

Université de Montréal

Caractérisation  
de la lipoprotéine lipase macrophagique  
dans le diabète de type 2

Par

Maryam Radimeh Sartippour

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

Avril 2000



©Maryam Radimeh Sartippour, 2000

QU  
145  
U58  
2000  
V.006

Université de Montréal

Caractéristiques  
de la typographie pour les étudiants  
dans le cadre de leur

Le

document de référence

document de référence

document de référence

Titre de la thèse : le français des jeunes Québécois  
en vue de l'intégration au grand public  
Thèse présentée par M. J. J. J.  
en vue de l'obtention du



2000

Université de Montréal

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée:

“Caractérisation de la lipoprotéine lipase  
macrophagique dans le diabète de type 2”

présentée par:

Maryam Radimeh Sartippour

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Omar Serri  
Dr. Geneviève Renier  
Dr. Jane Montgomery  
Dr. Pierre Maheux

*Dr. Moïse Bouchay*

Thèse acceptée le : *5 juillet 2000*

## SOMMAIRE

Les patients diabétiques de type 2 développent de manière prématurée et accélérée des lésions athéromateuses. Des études ont démontré que la lipoprotéine lipase (LPL) macrophagique pouvait contribuer, en favorisant l'accumulation de lipides dans les lésions athéromateuses, au développement de l'athérosclérose. Nous avons étudié la régulation de la LPL macrophagique dans le diabète. Nos résultats démontrent que: 1) l'incubation des macrophages murins et humains en présence de concentrations élevées de glucose augmente l'expression génique, la masse immunoréactive et l'activité de la LP. La voie de la protéine kinase C est impliquée dans l'effet modulateur du glucose sur la LPL macrophagique, *via* la surexpression du facteur de transcription *c-fos* et la liaison accrue des protéines nucléaires à la séquence AP-1 du promoteur génique de la LPL; 2) le glucose, à des concentrations élevées, stimule *in vitro* l'expression génique des "peroxisome proliferator-activated receptors" (PPAR)  $\alpha$  et  $\beta$  par les macrophages murins et humains, et diminue celle des PPAR $\gamma$  par les macrophages humains. Une augmentation des niveaux d'ARN messagers macrophagique de PPAR $\alpha$  et  $\beta$ , et une inhibition de l'expression génique de PPAR $\gamma$  sont aussi observées chez les patients diabétiques de type 2. L'incubation des macrophages murins, en présence de concentrations élevées de glucose, augmente la liaison des protéines nucléaires extraites de ces cellules à l'élément de réponse aux PPARs situé dans le promoteur du gène de la LPL. Ces données prises dans leur ensemble suggèrent l'implication des PPARs dans l'effet stimulant du glucose sur l'expression génique de la LPL macrophagique; 3) l'expression, la production et l'activité de LPL macrophagique sont augmentées chez les patients diabétiques et que les facteurs périphériques présents dans le sérum de ces sujets sont en partie responsables de ces anomalies. Une sécrétion macrophagique accrue de facteur de nécrose tumorale- $\alpha$ , tant au niveau basal que stimulé



par la LPL, est aussi observée chez les patients diabétiques. En résumé, nos données démontrent une augmentation d'expression de la LPL macrophagique chez le patient diabétique de type 2, au moins partiellement attribuable à l'hyperglycémie. Cette altération de la régulation de la LPL macrophagique associée au diabète pourrait représenter un nouveau mécanisme par lequel l'hyperglycémie favoriserait le développement et la progression de l'athérosclérose, chez le patient diabétique de type 2.

## TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	iii
Liste des figures.....	xiii
Liste des tableaux.....	xvi
Liste des abréviations.....	xvii
Dédicace.....	xx
Remerciements.....	xxi
I. Introduction.....	1
I.1. Diabète sucré.....	2
I.1.1. Définition.....	2
I.1.2. Classification.....	2
I.1.2.1. Diabète de type 1 (DID).....	4
I.1.2.1. Diabète de type 2 (DNID).....	7
I.1.2.3. Diabète gestationnel.....	8
I.1.2.4. Autres types de diabète.....	9
I.2. Diabète de type 2 (DNID).....	10
I.2.1. Prévalence.....	10
I.2.2.Étiologie.....	12
I.2.2.1. Facteurs génétiques.....	12
I.2.2.1.1. Études familiales.....	14
I.2.2.1.2. Prévalence du DNID dans les populations des premières nations...14	
I.2.2.1.3. Études sur des jumeaux.....	14

I.2.2.2. Gènes candidats.....	15
I.2.2.2.1. Mutations géniques impliqués dans la résistance à l'insuline.....	15
I.2.2.2.2. Mutations de gènes codant pour des protéines impliquées dans la quantité et la qualité de l'insuline sécrétée.....	18
I.2.2.2.3. Mutations de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et de l'obésité.....	21
I.2.2.2.4. Autres gènes candidats.....	23
I.2.2.3. Interactions gènes-environnement.....	24
I.2.2.4. Facteurs environnementaux.....	25
I.2.2.4.1. Obésité.....	25
I.2.2.4.2. Diète.....	27
I.2.2.4.3. Activité physique.....	28
I.2.2.4.4. Stress.....	28
I.2.3. Physiopathologie.....	29
I.2.3.1. Action de l'insuline.....	29
I.2.3.2. Résistance à l'insuline.....	31
I.2.3.2.1. Génétique et environnement.....	31
I.2.3.2.2. Contribution hépatique.....	32
I.2.3.2.3. Contribution du muscle squelettique.....	32
I.2.3.2.4. Contribution du tissu adipeux.....	33
I.2.3.2.5. Acides gras libres.....	33
I.2.3.2.6. Facteurs de nécrose tumorale- $\alpha$ .....	34

I.2.3.3. Hyperinsulinémie et intolérance au glucose.....	35
I.2.3.4. Insulinopénie.....	36
I.2.4. Complications associées au diabète de type 2.....	37
I.2.4.1. Rôle du contrôle métabolique.....	38
I.2.4.2. Mécanismes potentiellement responsables des complications associées au diabète de type 2.....	38
I.2.4.2.1. Glycation des protéines.....	39
I.2.4.2.2. Voie des polyols.....	41
I.2.4.2.3. Activation de la protéine kinase C.....	42
I.2.4.2.4. Altération du système de coagulation.....	43
I.2.4.2.5. Facteurs de croissance.....	44
I.2.4.2.6. Altérations du métabolisme des lipoprotéines.....	44
I.2.4.2.7. Stress oxydatif.....	45
I.2.4.3. Complications microvasculaires.....	47
I.2.4.3.1. Rétinopathie.....	47
I.2.4.3.2. Néphropathie.....	48
I.2.4.3.3. Neuropathie.....	50
I.2.4.4. Complications macrovasculaires et athérosclérose.....	51
I.2.5. Diagnostic.....	52
I.2.6. Traitement.....	54
I.2.6.1. Diète et exercice physique.....	54
I.2.6.2. Hypoglycémifiants oraux.....	55

I.2.6.3. Insulinothérapie.....	56
I.3. Athérosclérose.....	58
I.3.1. Artère saine.....	59
I.3.2. Phases de l'athérosclérose.....	60
I.3.2.1. Lésion primaire ou strie lipidique.....	60
I.3.2.2. Lésion intermédiaire ou fibro-lipidique.....	60
I.3.2.3. Lésion avancée ou plaque fibreuse.....	62
I.3.3. Cellules de la lésion athéromateuse.....	63
I.3.3.1. Endothélium.....	63
I.3.3.2. Macrophages dérivés des monocytes.....	64
I.3.3.3. Cellules musculaires lisses.....	66
I.3.3.4. Lymphocytes-T.....	67
I.3.3.5. Plaquettes sanguines.....	68
I.3.3.6. Interaction des cellules impliquées dans l'athérosclérose.....	69
I.3.4. Étiologie de l'initiation des lésions athéromateuses.....	71
I.3.4.1. Contribution des lipoprotéines.....	72
I.3.4.2. Contribution de l'infection.....	74
I.3.4.3. Contribution du stress oxydatif.....	76
I.3.4.4. Contribution de la réponse au dommage endothélial.....	77
I.3.4.5. Contribution de la thrombose.....	78
I.3.4.6. Théorie multifactorielle.....	78
I.3.5. Facteurs de risque de l'athérosclérose.....	79

I.3.5.1. Dyslipidémie.....	80
I.3.5.1.1. Hypercholestérolémie.....	80
I.3.5.1.2. Hypertriglycéridémie.....	83
I.3.5.2. Hypertension artérielle.....	85
I.3.5.3. Homocystéinémie.....	85
I.3.5.4. Infection.....	86
I.3.5.5. Obésité.....	87
I.3.5.6. Tabagisme.....	87
I.3.5.7. Fibrinogène.....	88
I.3.5.8. Diabète.....	89
I.3.5.8.1. Dyslipidémie.....	89
I.3.5.8.2. Hyperglycémie.....	90
I.3.5.8.3. Résistance à l'insuline et hyperinsulinémie.....	92
I.3.6. Facteurs environnementaux protecteurs.....	93
I.3.6.1. Acides gras alimentaires.....	93
I.3.6.2. Vitamines.....	96
I.3.6.3. Fibres.....	98
I.3.6.4. Alcool.....	98
I.3.6.5. Exercice physique.....	99
I.4. Lipoprotéine lipase.....	100
I.4.1. Structure de la lipoprotéine lipase.....	100
I.4.2 Génétique de la lipoprotéine lipase.....	101

I.4.3. Rôle de la lipoprotéine lipase.....	102
I.4.4. Métabolisme de la lipoprotéine lipase.....	104
I.4.4.1. Biosynthèse et sécrétion.....	104
I.4.4.2. Dégradation de la lipoprotéine lipase.....	105
I.4.4.3. Régulation de la lipoprotéine lipase.....	105
I.4.4.3.1. Régulation transcriptionnelle.....	105
I.4.4.3.2. Régulation post-transcriptionnelle.....	106
I.4.4.4. Régulateurs physiologiques de la lipoprotéine lipase.....	107
I.4.4.4.1. État de jeûne et état post-prandial.....	107
I.4.4.4.2. Régulateurs hormonaux et nutritionnels.....	108
I.4.4.4.3. Régulateurs de la LPL macrophagique.....	111
I.4.5. Lipoprotéine lipase et pathologie.....	113
I.4.5.1. Hyperlipidémie de type I ou hyperchylomicronémie.....	113
I.4.5.2. Hyperlipidémie familiale combinée.....	114
I.4.5.3. Lipoprotéine lipase et obésité.....	115
I.4.5.4. Lipoprotéine lipase et athérome.....	116
I.4.6. Lipoprotéine lipase et athérosclérose.....	116
I.4.6.1. Effets anti-athérogéniques de la lipoprotéine lipase.....	117
I.4.6.2. Effets pro-athérogéniques de la lipoprotéine lipase.....	118
I.4.6.2.1. Expression de la lipoprotéine lipase dans la lésion athéromateuse.....	118
I.4.6.2.2. Induction de lipoprotéines remnantes athérogéniques par la	

lipoprotéine lipase.....	119
I.4.6.2.3. Lipoprotéine lipase, un ligand athérogénique.....	119
I.4.6.2.4. Régulation de la lipoprotéine lipase par les agents présents dans la lésion.....	121
I.4.7. Lipoprotéine lipase et diabète.....	122
I.5. Hypothèse et objectifs.....	124
II. Résultats.....	125
II.1. Premier article: “Stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression and production”.....	126
II.2. Deuxième article: “Differential regulation of macrophage peroxisome proliferator- activated receptor expression by glucose. Role of peroxisome proliferator-activated receptors in lipoprotein lipase gene expression”.....	162
II.3. Troisième article: “Upregulation of macrophage lipoprotein lipase in patients with type 2 diabetes”.....	195
III. Discussion.....	224
III.1. Hyperglycémie et maladies cardiovasculaires.....	225
III.2. Lipoprotéine lipase et état nutritionnel.....	228
III.3. Lipoprotéine lipase macrophagique et glucose.....	230
III.3.1. Rôle du glucose dans l’expression et la production de la lipoprotéine lipase macrophagique.....	230



III.3.2. Rôle des PPARs dans l'induction de la lipoprotéine lipase macrophagique par le glucose.....	234
III.3.3. Régulation de la LPL chez le patient diabétique de type 2.....	242
IV. Conclusions et perspectives.....	248
IV.1. Conclusions.....	249
IV.2. Perspectives.....	250
V. Références.....	253

## LISTE DES FIGURES

### Introduction:

Figure 1. Prévalence du DNID chez les hommes âgés entre 45 et 54 ans dans diverses populations.....	11
Figure 2. Séquence des évènements dans la pathogenèse du DNID.....	13
Figure 3. Schéma simplifié de l'interaction entre l'insuline et son récepteur.....	17
Figure 4. Défauts génétiques de la cellules $\beta$ dans le DNID.....	19
Figure 5. Voies de signalisation de l'insuline.....	30
Figure 6. Réactions impliquées dans la glycation des protéines.....	39
Figure 7. Relation entre RI, HI et athérosclérose.....	95

### Premier article:

Figure 1. "Effect of high glucose concentrations on macrophage LPL mRNA levels".....	141
Figure 2. "Effect of high glucose concentrations on LPL and TNF- $\alpha$ immunoreactive mass".....	142
Figure 3. "Effect of high glucose concentrations on LPL gene expression and production by human monocyte-derived macrophages".....	143
Figure 4. "Effect of high glucose on macrophage <i>c-fos</i> mRNA levels".....	144
Figure 5. "Effect of <i>c-fos</i> antisense on glucose-induced macrophage LPL mRNA levels".....	145
Figure 6. "Effect of calphostin C on glucose-stimulated macrophage LPL mRNA levels".....	146

Figure 7. “Effect of high glucose concentrations on the binding of nuclear proteins extracted from J774 cells to the regulatory AP-1 sequence of the murine LPL gene promoter” .....	147
Figure 8. “Effect of high glucose concentrations on the half-life of macrophage LPL mRNA” .....	148
Deuxième article:	
Figure 1. “Effect of high glucose concentrations on PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , and PPAR $\gamma$ mRNA expression by human monocyte-derived macrophages” .....	175
Figure 2. “PPAR mRNA expression in monocyte-derived macrophages isolated from patients with type 2 diabetes” .....	176
Figure 3. “Effect of high glucose concentration on murine macrophage PPAR $\alpha$ mRNA expression” .....	177
Figure 4. “Effect of high glucose on murine macrophage PPAR $\alpha$ protein expression” .....	178
Figure 5. “Effect of high glucose concentration on the binding activity of nuclear proteins extracted from murine macrophages to the regulatory PPRE sequence of the human LPL gene promoter” .....	179
Troisième article:	
Figure 1: “LPL mRNA levels in macrophages of control subjects and diabetic patients” ....	207
Figure 2. “LPL secretion by macrophages of control subjects and diabetic patients” .....	208
Figure 3. “ LPL activity in macrophages of control subjects and diabetic patients” .....	209
Figure 4. “Basal TNF- $\alpha$ secretion by macrophages of control subjects and diabetic patients” .....	210

Figure 5. “ LPL-induced TNF- $\alpha$  secretion by macrophages of control subjects and diabetic patients” .....211

Discussion:

Figure 8. Mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans la surexpression de la LPL macrophagique dans le diabète.....241

**LISTE DES TABLEAUX**

## Introduction:

Tableau I. Classification étiologique de diabète.....	3
---	---

Tableau II. Classification génétique du DNID.....	16
---	----

## Deuxième article:

Tableau I. "Characteristics of the study population".....	180
---	-----

Tableau II. "Sequences of oligonucleotides".....	181
--	-----

## Troisième article:

Tableau I. "Characteristics of the study population".....	212
---	-----

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

ADN	: acide désoxyribonucléique
AGE	: “advanced glycation end products”, produits terminaux de glycation
AGL	: acides gras libre
AMPc	: adénosine monophosphate cyclique
AP	: protéine activatrice
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: acide ribonucléique messenger
ATP	: adénosine triphosphate
CETP	: protéines de transfert des esters de cholestérol
DDCT	: “Diabetes Control and Complication Trial”
DID	: diabète insulino-dépendant
DNID	: diabète non insulino-dépendant
FGF	: facteur de croissance des fibroblastes
FSE	: élément spécifique aux lipides
GAD	: acide glutamique décarboxylase
GM-CSF	: “granulocyte macrophage colony-stimulating factor”
GLUT	: transporteur du glucose
GRE	: éléments du réponse aux glucocorticoïdes
HbA <sub>1c</sub>	: hémoglobine glycosylée
HDL	: “high-density lipoprotein”, lipoprotéine de haute densité

HI	: hyperinsulinémie
HLA	: antigène leucocytaire humain
HNF	: facteur nucléaire hépatocytaire
ICAM	: “intracellular cell adhesion molecule”, molécule d’adhésion intercellulaire
IDL	: “intermediary density lipoprotein”, lipoprotéine de densité intermédiaire
IGF	: “insulin-like growth factor”, facteur de croissance ressemblant à l’insuline
IFN	: interféron
IL	: interleukine
IRS-1	: “insulin receptor substrate 1”, substrat-1 du récepteur à l’insuline
LCAT	: lécithine cholestérol acyltransférase
LDL	: “low-density lipoprotein”, lipoprotéine de faible densité
Lp(a)	: lipoprotéine (a)
LPL	: lipoprotéine lipase
LPS	: lipopolysaccharide
LRP	: “LDL receptor-related protein”
MAP kinase	: “mitogen-activated protein kinase”, protéine kinase activée par les mitogènes
MCP	: “monocyte chemoattractant protein”, protéine chémoattractrice des monocytes
M-CSF	: “macrophage-colony stimulating factor”
MHC	: complexe d’histocompatibilité majeur
MODY	: “maturity-onset diabetes of young people”, diabète de maturité du jeune
NGF	: facteur de croissance neuronal
NHANES III	: “Third National Health and Nutrition Examination Survey”

NO	: monoxyde d'azote
NF-κB	: “nuclear factor-kappa B”
Oct	: octamère
PAI	: “plasminogen activator inhibitor”
PDGF	: “platelet-derived growth factor”, facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGL <sub>2</sub>	: prostacycline
PI-3k	: phosphatidyl-inositol 3'-kinase
PKC	: protéine kinase C
PPAR	: “peroxisome proliferator-activated receptor”
PPRE	: “peroxisome proliferator responsive element”
RI	: résistance à l'insuline
Sp	: protéine stimulatrice
TGF	: “transforming growth factor”, facteur de croissance transformant
TNF	: “tumor necrosis factor”, facteur de nécrose tumorale
tPA	: “tissue-type plasminogen activator”
TRE	: élément répondant à la thyroïde
Tyr-P	: résidus de tyrosine
VCAM	: “vascular cell adhesion molecule”, molécule d'adhésion vasculaire
VEGF	: facteur de croissance endothélial vasculaire
VLDL	: “very low-density lipoprotein”, lipoprotéine de très faible densité



**DÉDICACE**

*A mon père*

*A ma mère*

*A ma fille*

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont à:

- l'Université Chahid Behechti de Téhéran qui m'a assuré les prêts nécessaires à la réalisation de mes études doctorales;
  
- Dr. Jeannette Fareh, Dr. Pouneh Kermani et Dr. Jean-Claude Mamputu, pour leur amitié et leur soutien tout au long de mes études;
  
- la famille Soufi et surtout à ma chère amie Forouzan, qui m'a prodiguée la sérénité nécessaire à la poursuite de mes études;
  
- la famille Jemaa et surtout à ma chère amie Amel, qui m'a acceptée dans son foyer chaleureux, m'assurant la paix nécessaire à la rédaction de ma thèse.

Je remercie Dr. Geneviève Renier pour sa direction exceptionnelle et pour sa compétence à créer un environnement scientifique riche, et en même temps vif et joyeux, pour ses étudiants.

## **I. INTRODUCTION**

## **I.1. Diabète sucré**

### **I.1.1. Définition**

Le diabète sucré n'est pas une maladie unique mais comprend plusieurs syndromes cliniques différents, dont le dénominateur commun est l'altération de l'homéostasie du glucose. Il existe donc une grande hétérogénéité dans l'étiologie, la pathogénie, la présentation clinique et l'histoire naturelle des différents types de diabète (Fajans et coll.,1978). Le diabète sucré se définit comme un désordre chronique du métabolisme imputable à un déficit relatif ou absolu de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline. Le diabète se caractérise par une hyperglycémie à jeun ou en période post-prandiale (Bennett,1996). Cliniquement, le diabète sucré peut varier d'un désordre asymptomatique à une condition fulminante se présentant sous la forme d'un choc ou d'un coma. L'hyperglycémie chronique peut mener à des complications métaboliques aiguës telles que la cétoacidose diabétique et le coma hyperosmolaire. Parmi les complications à long terme du diabète, on note: la rétinopathie, la néphropathie, la neuropathie et la macroangiopathie (Yamamoto et coll., 1998; Nathan, 1995).

### **I.1.2. Classification**

Idéalement, la classification d'un syndrome clinique devrait être basée sur son étiologie et sa pathogénie, mais celle du diabète est encore fondée sur les caractéristiques cliniques du patient; elle est donc arbitraire. Le diabète a longtemps été classifié en 2 types majeurs, le diabète insulino-dépendant (DID) ou juvénile et le diabète non insulino-dépendant (DNID) ou mature, sur la base de deux caractéristiques cliniques spécifiques: l'âge d'installation de la maladie et l'état d'insulino-dépendance. Le large chevauchement de l'âge d'installation du diabète entre ces 2 groupes indique que ces termes descriptifs sont souvent utilisés de façon non pertinente. En 1979, l'Institut National

de la Santé des États-Unis a publié une classification du diabète sucré (Harris et coll., 1985), adoptée plus tard par l'Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization, 1985). Cette classification a été mise à jour avec l'incorporation des résultats des recherches récentes. Selon cette classification (tableau I), 4 types de diabète sont identifiés: le diabète de type 1, le diabète de type 2, d'autres types de diabète et le diabète gestationnel (Expert committee on the classification of diabetes mellitus, 1999). Ces catégories seront discutées très brièvement dans les prochains paragraphes.

**Tableau I.** Classification étiologique de diabète sucré.

---

Diabète de type 1

- Destruction des cellules  $\beta$  (conduisant souvent à une déficience absolue en insuline)
- A. Modulation immunitaire
- B. Idiopathique

Diabète de type 2

- Peut aller d'une résistance à l'insuline (RI) prédominante associée à une déficience relative en insuline à un défaut de sécrétion prédominant associé à la RI

D'autres types spécifiques

- A. Défauts génétiques de la fonction des cellules  $\beta$
- B. Défauts génétiques dans l'action de l'insuline
- C. Maladies pancréatiques exocrines
- D. Endocrinopathies
- E. Induction par drogues ou produits chimiques
- F. Infections
- G. Formes non communes de diabète médiées par l'immunité
- H. Autres syndromes génétiques associés parfois au diabète

Diabète gestationnel

---

Adapté de "Expert committee on the classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 22 (suppl 1): S5-S19, 1999".

Malgré de multiples nouvelles informations concernant l'étiologie des différentes formes de diabète et les informations récentes montrant l'importance des niveaux de glycémie à jeun comme facteur de prédiction des complications du diabète, la classification et les critères de diagnostic de cette maladie n'ont subi que des modifications mineures. De nouvelles classifications seraient désirables afin d'améliorer les conduites thérapeutiques (Alberti et Zimmet, 1998).

### **1.1.2.1. Diabète de type 1 (DID)**

Bien que les termes DID et “diabète de type 1” soient habituellement utilisés de façon synonyme, le terme de DID s'applique à toutes les formes de diabète dans lesquelles l'insuline exogène est requise pour prévenir la cétoacidose diabétique et maintenir la survie, alors que le terme diabète de type 1 ne s'applique qu'aux formes de diabète résultant d'une destruction auto-immune des cellules  $\beta$  du pancréas.

Le DID se caractérise par une hyperglycémie prononcée, une cétonurie, de la cétoacidose et une carence en insuline. Une concentration de glucose plasmatique à jeun élevée ( $\geq 126$  mg/dl ou  $\geq 7$  mmol/l), la présence de glucose et de corps cétoniques dans l'urine sont également associées au DID. Dans le DID, les niveaux circulants d'insuline sont bas ou indétectables (Alberti et Zimmet, 1998; Unger et Foster, 1998).

Le DID représente environ 10% de l'ensemble des cas de diabète dans les pays occidentaux. Bien que le diabète de type 1 puisse survenir à tout âge, son incidence est particulièrement élevée lors de l'adolescence et diminue ensuite. La prévalence de cette maladie dans le monde varie de 0.1 à 0.5%. L'incidence de DID est particulièrement élevée dans les populations de race blanche (Trevisan et Vedovato, 1998; Tuomilehto et coll., 1992).

Il existe des évidences que le DID est une maladie immunitaire. Le DID est associé à la présence d'antigènes de classe II, eux même présents dans les maladies auto-immunitaires. Cette maladie est couplée à diverses maladies endocriniennes auto-immunitaires et se caractérise par une infiltration lymphocytaire des îlots de Langerhans et par la présence d'anticorps anti-îlots. La prévention du diabète franc par immuno-thérapie et la destruction rapide des cellules  $\beta$  du pancréas non affecté d'un jumeau monozygote, transplanté à son jumeau diabétique sont d'autres arguments démontrant le caractère auto-immun de cette maladie (Unger et Foster, 1998).

Bien que les facteurs génétiques puissent jouer un rôle important dans la pathogenèse du DID, leur contribution bien que nécessaire est insuffisante et requiert un facteur environnemental pour déclencher l'initiation de la maladie. En d'autres termes, il semble que les facteurs environnementaux soient impliqués dans la destruction auto-immunitaire des cellules  $\beta$  chez des individus présentant une susceptibilité génétique particulière. Ce concept est basé sur des études de famille montrant un faible taux (50%) de concordance de la maladie chez les jumeaux monozygotes (Morwessel, 1998; Pociot et coll., 1993). La susceptibilité génétique au DID semble impliquer divers et peut être même une multitude de gènes. Le complexe d'histocompatibilité majeur (MHC) est important dans le diabète (Durinovic-Bello, 1998), d'une part car la susceptibilité au DID semble être associée à certains allèles codant pour des antigènes leucocytaires humains (HLA), et d'autre part car cette région contrôle la réponse immunitaire. Les produits géniques du MHC incluent les molécules de classe I, impliquées dans l'immunité cellulaire et requises pour la reconnaissance et le rejet de cellules du non-soi, et les molécules de classe II. Ces molécules présentées par des cellules spécifiques incluant les macrophages, en association avec des antigènes étrangers ou des auto-antigènes, induisent l'activation des lymphocytes T (cytotoxiques et "helper") et des cellules "killer"



capables d'induire la lyse cellulaire. Les molécules de classe I et celles de classe II pourraient jouer un rôle majeur dans les réactions immunitaires caractérisant le développement du DID. Approximativement 95% des patients diabétiques de type 1 de race blanche expriment l'antigène DR3 ou DR4 et 55 à 60% d'entre eux expriment les deux. Alors qu'il a été proposé que l'état homozygote pour l'antigène DR3 puisse induire une forme auto-immune primaire de DID, il est postulé que chez les patients homozygotes pour l'allèle DR4, cette maladie puisse être causée de manière primaire par un facteur environnemental induisant une réponse immunitaire secondaire. D'autres gènes potentiellement impliqués dans la susceptibilité génétique au DID ont été identifiés sur les chromosomes 2q, 6q, 15q, et 11q (Unger et Foster, 1998; Sanjeevi et coll., 1998; Bennett et coll., 1995). Des efforts sont actuellement en cours pour identifier les altérations génétiques et les mécanismes impliqués dans la destruction des cellules  $\beta$  et le développement du DID (Arava et coll., 1999). L'analyse des gènes impliqués dans le DID est une tâche difficile en raison de l'interaction existant entre facteurs environnementaux et gènes de susceptibilité.

L'importance des facteurs environnementaux en tant qu'éléments déclenchant la nécrose et la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas est actuellement bien reconnue. Des toxines chimiques comme l'alloxane, la streptozotocine et le poison Vacor (Ohno et coll., 1998) sont capables d'induire la destruction non auto-immune du pancréas. L'ingestion de produits laitiers autres que le lait maternel chez les enfants âgés de moins de 2 mois a été incriminée dans la destruction des cellules  $\beta$  par des anticorps anti-albumine et anti-ABBOS, ABBOS étant un peptide de 17 acides aminés présent dans l'albumine (Virtanen et coll., 1994). La nécrose des cellules  $\beta$  peut aussi être déclenchée par des virus, soit par destruction cellulaire directe, soit par relâche de cytokines, soit par un phénomène auto-immun, les protéines virales ayant une homologie de séquence avec une protéine

des cellules  $\beta$  (Radermecker et coll., 1998). Par exemple, la protéine P2C du virus diabétogène Coxsackie B4 est hautement homologue à un épitope de l'acide glutamique décarboxylase (GAD) des cellules  $\beta$  (Hou et coll., 1994). D'autres virus tels les virus des oreillons et de la rubéole, le cytomégalovirus et certains rétrovirus ayant une haute homologie de séquence avec une protéine des cellules  $\beta$  ont été identifiés (Dahlquist, 1997; Yoon et Ray, 1985).

### **I.1.2.2. Diabète de type 2 (DNID)**

Le DNID est la forme la plus commune de diabète. Le DNID est souvent appelé diabète de l'âge mûr puisqu'il apparaît généralement après 40 ans. Toutefois, il existe une forme particulière et rare de DNID appelé diabète de maturité du jeune (MODY) qui se déclare chez des adultes jeunes voire pendant l'adolescence (Fajans, 1995; Tattersal et Fajans, 1975). L'obésité et la résistance à l'insuline (RI) constituent des facteurs de risque majeur de cette maladie. Le DNID implique dans la phase prédiabétique deux défauts, la RI périphérique et l'hyperinsulinémie (HI). Cette phase est suivie d'un état insulino-pénique, menant à un état hyperglycémique et à un diabète franc. Contrairement au DID, le DNID ne requiert pas l'administration d'insuline pour la prévention de la cétose et pour la survie, bien qu'elle puisse être exigée pour le contrôle de l'hyperglycémie (Unger et Foster, 1998). Le DNID comporte une forte composante génétique, une concordance de 60 à 90% pour le DNID étant observée entre jumeaux monozygotes. Cette composante est cependant sujette à une influence majeure des facteurs environnementaux, la maladie ne pouvant devenir manifeste que lorsque l'environnement favorise un apport alimentaire généreux et le développement d'une obésité (Nesher et coll., 1999; Morwessel, 1998).

### **I.1.2.3. Diabète gestationnel**

Le diabète gestationnel se définit comme une intolérance au glucose débutant ou étant découverte lors de la grossesse. Ce syndrome affecte approximativement 2% des femmes enceintes. Les facteurs de risque du diabète gestationnel incluent l'âge avancé, l'obésité et l'histoire familiale de diabète. Il est associé à une incidence accrue de RI, de maladies vasculaires, de prééclampsie et de macrosomie foetale (Van Assche et coll., 1998). Chez les femmes présentant des antécédents de diabète gestationnel, des complications vasculaires telles qu'une réduction de la vasodilatation induite par l'acétylcholine et une augmentation de la rigidité de la paroi vasculaire ont été détectées (Hu et coll., 1998). Si la tolérance au glucose revient à la normale après l'accouchement, 60% de ces femmes développeront néanmoins un diabète dans les 15 ans suivant leur accouchement. À ce sujet, Mohamed et Dooley (1998) ont démontré que le risque de développement de diabète de type 2 chez les femmes arborigènes Sioux obèses et non obèses avec antécédents de diabète gestationnel est de 70% dans les trois ans suivant leur accouchement et que ce risque augmente encore davantage après 4 ans. Des défauts de clairance du glucose et de sa production endogène ainsi que des élévations des concentrations plasmatiques d'acides gras libres (AGL) précèdent le développement du diabète de type 2 chez ces femmes (Xiang et coll., 1999). Il est actuellement préconisé que toutes les femmes ayant une histoire de diabète gestationnel soient évaluées par un test de tolérance au glucose dans les 2 mois suivant leur accouchement (Anastasiou et coll., 1999; Williams et coll., 1999; Dam, 1998).

#### **1.1.2.4. Autres types de diabète**

Certains autres types de diabète sont secondaires ou associés à certaines conditions et syndromes. Ces formes de diabète peuvent être secondaires à des maladies pancréatiques ou à l'ablation du tissu pancréatique (Mohan et coll., 1998; Caldara et coll., 1991), ou être déclenchées par des endocrinopathies (hyperthyroïdie, acromégalie, syndrome de Cushing, phéochromocytome, glucagonome, somatostatine, hyper-aldostéronisme primaire). Elles peuvent aussi être consécutives à l'administration de glucocorticoïdes (Hahn et coll., 1999; Selman et coll., 1997), ou de certains médicaments (anti-hypertenseurs, thiazides, drogues psycho-actives ou contraceptives, etc) (Pandit et coll., 1993). Dans certaines formes de diabète, une association est notée avec certains syndromes génétiques. Finalement, des défauts génétiques des récepteurs à l'insuline ou la présence d'anticorps se liant aux récepteurs de l'insuline peuvent induire ces formes de diabète (Bennett, 1996; Harris et coll., 1985).

La malnutrition représente une cause secondaire de diabète. Dans certains pays africains et en Inde, les enfants présentant une carence alimentaire en protéines manifestent un diabète, associé à une sévère hyperglycémie, mais non accompagné de cétose. Ces patients ont besoin d'insuline pour survivre, mais non pour la prévention de la cétose. Une étude menée au sud de l'Inde a démontré que ces patients ont des niveaux de peptide-C plus bas que ceux présents chez les patients diabétiques de type 2, mais beaucoup plus élevés que ceux existant chez les sujets diabétiques de type 1. La stimulation de la sécrétion d'insuline induite par l'augmentation de la concentration du peptide-C, pourrait expliquer l'absence de cétose chez ces patients (Mohan et coll., 1997; 1983).

## **I.2. Diabète de type 2 (DNID)**

Tel que mentionné précédemment, le DNID est la forme la plus commune de diabète et est imputable à une déficience de l'action et de la sécrétion de l'insuline. Malgré le fait qu'un traitement par l'insuline puisse être exigé pour maintenir le glucose sanguin à un niveau adéquat, l'insuline exogène ne semble pas absolument nécessaire pour la survie de ces patients.

### **I.2.1. Prévalence**

La prévalence du DNID varie beaucoup selon les populations étudiées. Elle est en augmentation dans les pays industrialisés. À titre d'exemple, la prévalence du DNID chez les hommes âgés entre 45 et 54 ans est de l'ordre de 2 à 3% en Chine et au Japon, mais varie de 7.5 à 56% aux États-Unis (figure 1) selon les sous-populations étudiées. Selon le "Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)", la prévalence du diabète est de 7.2% chez les blancs non hispaniques, 12.5% chez les afro-américains et 13.7% chez les mexicano-américains (Harris et coll., 1998). La prévalence du DNID dans les populations des premières nations varie de 4.6 à 49.5% (Zimmet, 1995; Sugarman et Percy, 1989). Les indiens Pima de l'Arizona (Bennett et Knowler, 1976) et les micronésiens du Nauru (Zimmet et Whithouse, 1978) sont les populations montrant la prévalence de DNID la plus élevée. Des prévalences élevées de DNID ont aussi été rapportées dans les populations des premières nations du nord du Canada (Fox et coll., 1994; Delisle et Ekoe, 1993). Selon une étude menée chez les indiens Ojibwa-Cree, la prévalence du DNID est de l'ordre de 28.0% chez les femmes et de 24.2% chez les hommes. Dans cette population, les femmes sont plus à risque de développer un diabète, et ce à des âges plus précoces (Harris et coll., 1997).

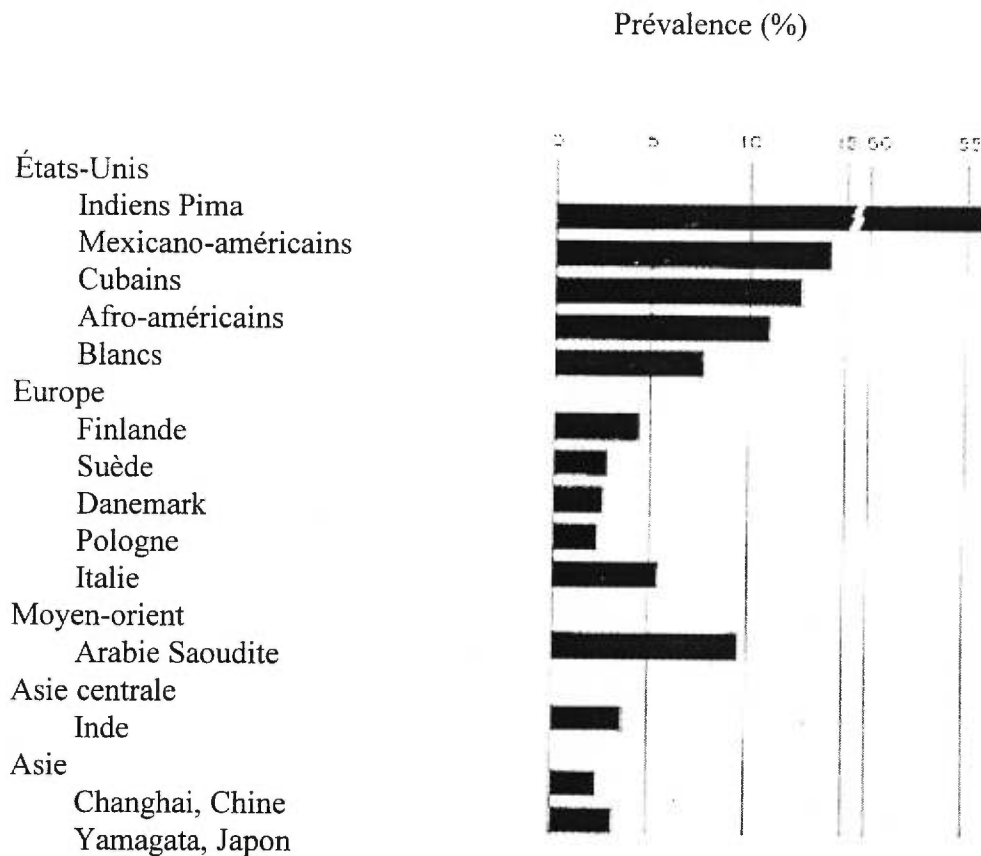


Figure 1. Prévalence du DNID chez les hommes âgés entre 45 et 54 ans dans diverses populations (adapté de “Warram JH, Rich SS, Krolewski AS. Epidemiology and genetics of diabetes mellitus. In: Kahn CR, Weir GC eds. *Joslin’s Diabetes mellitus*, 13th ed, Lea & Febiger, Pennsylvania 201-215, 1994”).

La population des premières nations du nord-ouest de l'Ontario (Sioux Lookout Zone) a une prévalence de DNID de l'ordre de 17% chez les individus âgés de plus de 10 ans. Dans cette population, le DNID survient même durant l'enfance (Morrison et Dooley, 1998; Harris et coll., 1996a). La décennie passée est témoin d'une augmentation de prévalence du diabète dans les populations des premières nations du Canada (Martin et Yidegiligne, 1998), ainsi que dans d'autres populations du monde, qui ont changé rapidement leur mode de vie, sont devenues plus sédentaires et consomment d'avantage d'aliments riches en énergie (Chukwuma et Tuomilehto, 1998).

## **I.2.2. Étiologie**

L'identification de la contribution génétique ou environnementale dans l'étiologie du DNID est ardue, notamment à cause du manque d'informations relatives aux mécanismes pathogéniques responsables de la maladie et surtout de la difficulté de cerner le début du DNID. Cependant, l'interaction des facteurs génétiques et environnementaux paraît jouer un rôle primordial dans l'étiologie du DNID (Poulsen et coll., 1999; Ghosh et Schork, 1996).

La phase transitoire, allant de la tolérance normale au glucose au diabète de type 2 chez les personnes génétiquement susceptibles, est ponctuée par la dysrégulation de la production hépatique de glucose, l'intolérance au glucose et l'altération de la fonction des cellules  $\beta$  (Flier, 1992). La RI et l'HI dans la phase prédiabétique se développent des années avant l'altération de la tolérance au glucose et peuvent ne pas conduire au DNID. Bien que la plupart des autorités en la matière considèrent que la RI est le défaut primaire, d'autres pensent qu'elle est secondaire à l'HI. Une troisième possibilité est qu'un défaut commun cause la RI et l'HI. La plupart des individus échappent en effet au déclenchement du diabète franc, pour une période indéfinie, par une production d'insuline accrue permettant de compenser la RI. L'HI compensatrice altère les cellules pancréatiques  $\beta$  (Polonsky et coll., 1996). La perte consécutive de la sécrétion compensatrice d'insuline et l'intolérance au glucose semblent être la cause de cette altération. Le schéma de la page 13 présente la séquence des événements dans la pathogenèse du DNID.

### **1.2.2.1. Facteurs génétiques**

Il existe de considérables évidences que les facteurs génétiques jouent un rôle important dans la susceptibilité au DNID. Les preuves directes proviennent de l'identification de mutations de gènes

spécifiques induisant le phénotype diabétique. Les preuves indirectes proviennent d'études de ségrégation familiale de certaines populations ethniques et des jumeaux identiques.

### PRÉDISPOSITION GÉNÉTIQUE

Obésité, RI      Masse et fonction des cellules  $\beta$ , autres?

↓

### ENVIRONNEMENT

Inactivité physique      Consommation abondante d'aliments

↓

### RI

↓

### HYPERGLYCÉMIE MODÉRÉE- HI

↓

### DÉCOMPENSATION DES CELLULES $\beta$

↓

### DIABÈTE SUCRÉ

Hyperglycémie sévère      Hypoinsulinémie

Figure 2. Séquence des événements dans la pathogenèse du DNID (adapté de "Weir GC, Bonner-Weir S. Insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 503, 1996").



#### **I.2.2.1.1. Études familiales**

Les études moléculaires de mutations rares dans les régions codant pour des gènes candidats montrent l'importance de gènes spécifiques dans l'expression phénotypique du diabète. Il a été ainsi démontré que des mutations des gènes codant pour le récepteur de l'insuline, la glucokinase (MODY, chromosome 7) et une série de gènes mitochondriaux sont impliquées dans le développement du diabète. Malheureusement la plupart des cas de DNID ne peuvent être attribués à ces gènes candidats. Néanmoins, la composante familiale du DNID suggère un rôle important des facteurs génétiques (Rich, 1996).

#### **I.2.2.1.2. Prévalence du DNID dans les populations des premières nations**

La prévalence élevée du DNID chez certains groupes ethniques supporte le concept d'une prédisposition génétique de cette maladie. Les indiens Pima de l'Arizona ont une prévalence de DNID dix fois plus élevée que la population générale des États-Unis. Dans la population indienne Pima, la prévalence du DNID varie de façon directe avec le degré de métissage avec les non indiens. Alors que la souche pure des indiens Pima ont une prévalence de DNID proche de deux fois celle observée chez les non indiens, la prévalence de cette maladie est intermédiaire dans le cas où les ancêtres sont 50% indiens (Knowler et coll., 1981).

#### **I.2.2.1.3. Études sur des jumeaux**

L'importance du rôle des facteurs génétiques dans l'étiologie du DNID est démontrée par les études menées chez les jumeaux monozygotes. Le suivi de jumeaux identiques montre une concordance presque complète pour le développement du DNID. L'étude de Barnett et coll. (1981)

sur les jumeaux identiques a démontré la présence d'une concordance de l'ordre de 90 à 100% dans le développement du DNID dans cette population. Une autre étude, menée récemment chez des paires de jumeaux monozygotes (n=606), a confirmé la notion de la prédisposition génétique dans le développement du DNID et de l'intolérance au glucose (Poulsen et coll., 1999).

### **1.2.2.2. Gènes candidats**

Le DNID semble être une maladie polygénique. Certains gènes et défauts géniques impliqués dans la susceptibilité au DNID sont présentés dans le tableau II.

#### **1.2.2.2.1. Mutations géniques impliquées dans la résistance à l'insuline**

**Récepteur à l'insuline:** le récepteur à l'insuline est formé de 2 sous-unités  $\alpha$  qui se lient à l'insuline et de 2 sous-unités  $\beta$  qui, ensemble, forment un hétérotétramère  $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$  (figure 3). Plus de 40 mutations susceptibles d'induire un état de RI ont été documentées dans le gène codant pour le récepteur de l'insuline. Les mutations dans la séquence structurale du gène du récepteur à l'insuline ne semblent cependant pas être à l'origine de la RI associée à la forme ordinaire de DNID (Taylor et coll., 1992).

**Substrat-1 du récepteur à l'insuline (IRS-1):** la liaison de l'insuline à son récepteur déclenche une série de réactions de phosphorylation incluant l'autophosphorylation des résidus de tyrosine du domaine cytoplasmique des récepteurs à l'insuline et la phosphorylation de multiples protéines intracellulaires incluant l'IRS-1 (figure 3). La phosphorylation de l'IRS-1 engendre diverses réponses métaboliques couplant la voie des récepteurs à l'insuline au transport trans-membranaire du glucose et à la synthèse de glycogène. Alors que des mutations du gène de l'IRS-1 ont été

## Tableau II. Classification génétique du DNID

---

### I. Formes du DNID caractérisées génétiquement

- A. MODY
  1. MODY1- lié au chromosome 20q
  2. MODY2- lié à la glucokinase (7p13-15)
  3. MODY3- lié au chromosome 12q
  4. Autres
- B. Défauts du gène de l'insuline
  1. Hyperpro-insulinémie familiale
  2. Mutation de la molécule d'insuline
- C. Défauts du récepteur de l'insuline
  1. Lépréchaunisme
  2. Syndrome de RI type A
  3. Syndrome de Rabson-Mendenhall
- D. Mutation du gène mitochondrial codant pour l'ARN de transfert
  1. Diabète à transmission maternelle avec surdité neurosensorielle
  2. Syndrome de MELAS
- E. Mutation du transporteur de glucose, le GLUT2 (3q26)

### II. Gènes impliqués dans le DNID

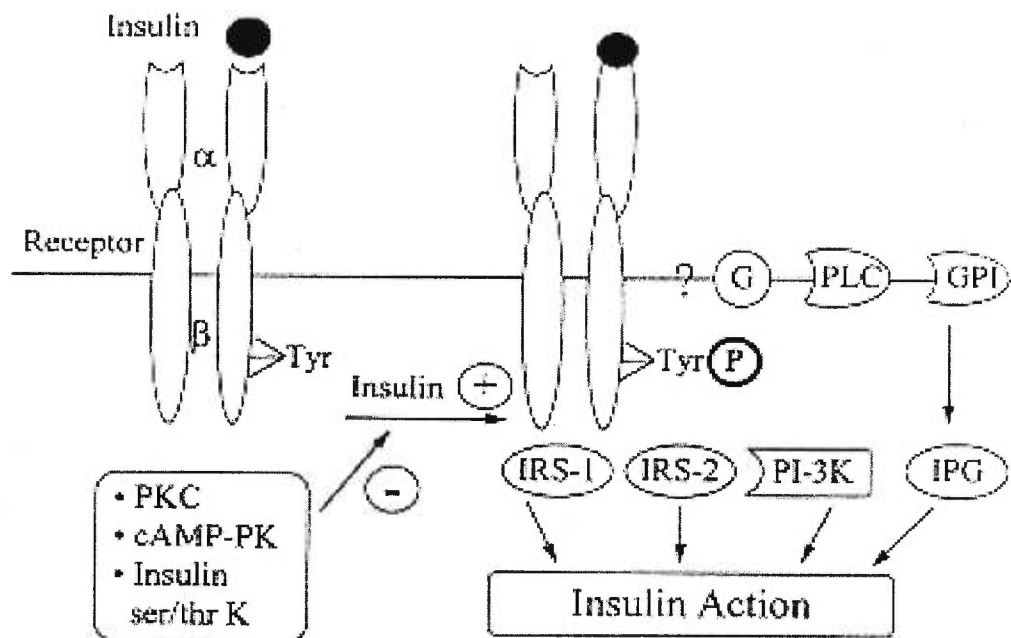
- A. Gènes dont l'implication est significative
  1. HLA locus DR4 (6p21-23)- uniquement chez les personnes âgées ayant le DNID
  2. Gène du récepteur du glucagon
  3. Substrat-1 du récepteur de l'insuline (2q76)
  4. Glycogène synthase (19q13)
  5. Protéines de liaison des acides gras (4q)
  6. RAD (2q3637)
- B. Gènes dont l'implication est non significative
  1. Gène de l'insuline (11p15)
  2. Gènes du MODY (20q, 7p, 12q)
  3. Canal K<sup>+</sup> sensible à l'ATP (21q22)
  4. Récepteur du peptide-1 ressemblant au glucagon (6p21)
  5. GLUT2 (3q36)
  6. GLUT4 (17p13)
  7. Récepteur de l'insuline (19p13)

---

GLUT: transporteur du glucose, MODY: diabète de maturité du jeune

Adapté de "Unger RH, Foster DW. *Diabetes Mellitus*. In: Williams Textbook of Endocrinology, 9th Ed. Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM and Larsen OR ed. Philadelphia, p 973-1059, 1998".

identifiées chez les sujets atteints de DNID (Stern, 1995), elles sont aussi retrouvées de manière commune chez les sujets sains. Il semble improbable que ces mutations puissent contribuer de manière importante à la pathogenèse du DNID.



IRS: substrat du récepteur à l'insuline, PKC: protéine kinase C, PI-3K: phosphatidylinositol-3' kinase.

Figure 3. Schéma simplifié de l'interaction entre l'insuline et son récepteur (adapté de "Car JF. Biochemical defects of insulin action in humans. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 519-529, 1996").

**Transporteur du glucose:** la mutation de gènes codant pour les transporteurs du glucose (GLUT) a fait l'objet de diverses études. Le GLUT4, exprimé dans les muscles et le tissu adipeux est induit par l'insuline et intervient dans l'utilisation périphérique du glucose. Les polymorphismes

dans le gène GLUT4 sont aussi fréquents chez les patients atteints de DNID que chez les sujets contrôles (Kusari et coll., 1991; Choi et coll., 1991), indiquant que les mutations du GLUT4 ne sont pas impliquées dans la pathogenèse du DNID. L'observation que la délétion du gène codant pour le GLUT4 dans les muscles et le tissu adipeux n'entraîne pas une altération considérable dans le niveau de tolérance au glucose (Garvey et coll., 1998; Katz et coll., 1995) supporte cette hypothèse. Toutefois des études sont actuellement en cours pour explorer les effets de délétion de la partie N-terminale et C-terminale du GLUT4 adipocytaire (Melvin et coll., 1999).

**Glycogène synthase:** la glycogène synthase est l'enzyme clé régulant la synthèse et le stockage du glycogène à partir du glucose dans le muscle et le foie. Bien qu'une association entre la présence des allèles A1 et A2 de l'enzyme et le DNID ait été rapportée dans diverses populations, les mutations de la glycogène synthase, rapportées chez les patients diabétiques, ne semblent pas jouer un rôle majeur dans le développement du DNID (Shuldiner et Silver, 1996; Groop et coll., 1993).

#### **I.2.2.2.2. Mutations de gènes codant pour des protéines impliquées dans la quantité et la qualité de l'insuline sécrétée (figure 4)**

**Pro-insuline et insuline:** des mutations dans le gène de la pro-insuline ont été rapportées. Ces mutations sont associées à une HI ou à une hyperpro-insulinémie n'altérant que peu l'homéostasie du glucose en l'absence d'autres facteurs environnementaux tels que l'âge et l'obésité (Kahn et coll., 1996). Un polymorphisme dans la région 5' du gène de l'insuline a été décrit chez les femmes obèses britanniques (Weaver et coll., 1992). De plus, Olansky et coll. (1992) ont identifié une insertion dans le promoteur de l'insuline, responsable d'une diminution de l'activité du

promoteur, et pouvant contribuer au développement du DNID chez 5 à 6% des afro-américains. Une mutation dans le gène de l'insuline, responsable d'hyperpro-insulinémie a aussi été rapporté par Collinet et coll. (1998).

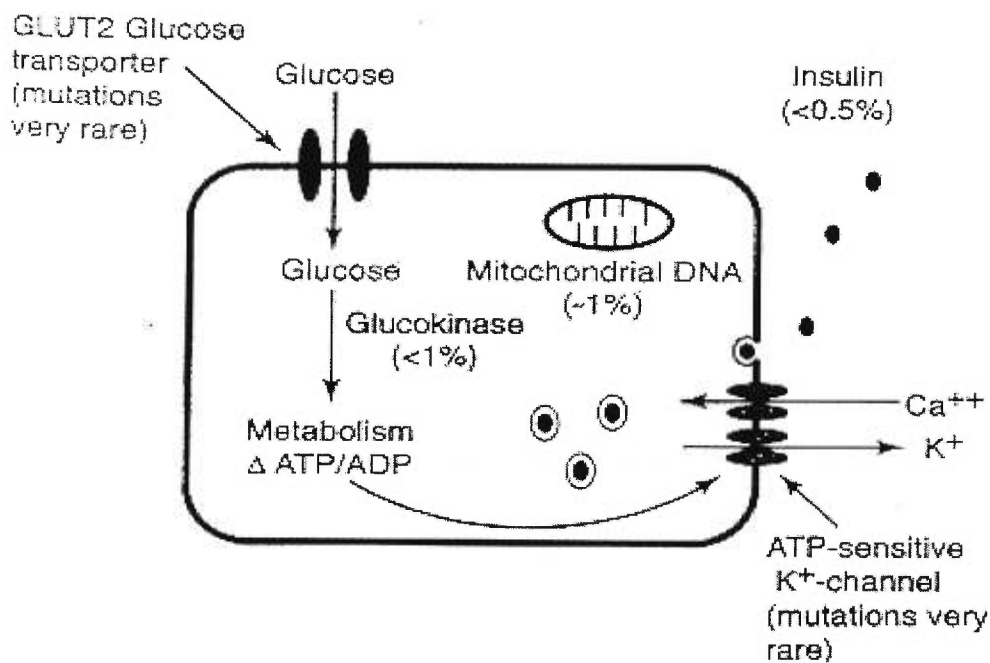


Figure 4. Défauts génétiques de la cellule  $\beta$  dans le DNID. Les chiffres dans la parenthèse indiquent la fréquence approximative de la mutation génétique (adapté de "Kahn CR, Vivent D, Doria A. Genetics of non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 47:509-531, 1996").

Finalement une mutation de l'allèle 2 du gène de l'insuline a été documentée comme induisant le diabète et une dysfonction sévère des cellules pancréatiques  $\beta$  chez la souris (Wang et coll., 1999). En dépit de ces résultats, il est important de noter que des mutations du gène de l'insuline ne semblent cependant pas jouer un rôle dans les formes communes de diabète de type 2.

**GLUT2:** le GLUT2, un autre transporteur de glucose, exprimé par les cellules  $\beta$ , est un gène candidat du DNID (Davies et coll., 1998). Une réduction des niveaux d'acide ribonucléique messager (ARNm) et de la protéine GLUT2 est observée dans les modèles animaux rendus spontanément diabétiques (Wang et Gleichmann, 1998). En outre une réduction du GLUT2 induit, chez la souris, le diabète (Valera, 1994). Bien que les mutations du GLUT2 soient peu communes dans le DNID, il semble que ces mutations puissent contribuer, dans certains cas rares, au développement du DNID (Shuldiner et Silver, 1996).

**Glucokinase:** la glucokinase est la première enzyme limitante du métabolisme du glucose dans les cellules pancréatiques  $\beta$ . Cette enzyme intervient dans la phosphorylation du glucose et initie la glycolyse, étape essentielle pour la sécrétion de l'insuline. Les mutations de cette enzyme paraissent être associées à une augmentation du seuil glycémique nécessaire pour déclencher la sécrétion de l'insuline (Matschinsky et coll., 1993; Matschinsky, 1990). Une corrélation positive a été rapportée entre l'activité de la glucokinase et l'altération de la fonction des cellules  $\beta$  (Gidh-Jain, 1993). Plus de 30 mutations du gène de la glucokinase ont été identifiées dans le MODY. Chez la souris "knock-out", le déficit en glucokinase hépatique et pancréatique induit l'hyperglycémie (Postic et coll., 1999).

**Gènes mitochondriaux:** l'acide désoxyribonucléique (ADN) mitochondrial est une molécule circulaire contenant 37 gènes qui codent pour 22 ARN de transfert et 13 enzymes de phosphorylation oxydative. Des mutations de cette molécule induisent des altérations des ARN de transfert, et affectent la synthèse des enzymes mitochondriales. Plusieurs études ont établi une association entre les mutations de l'ADN mitochondrial et le DNID à transmission maternelle (Kameoka et coll., 1998; Xiu et coll., 1997; Gerbitz et coll., 1996).

**Canal potassique sensible à l'adénosine-triphosphate (ATP):** la fermeture des canaux potassiques sensibles à l'ATP dépolarise la membrane plasmique des cellules  $\beta$  et active les canaux calciques voltage-dépendants. L'influx des ions calciques initie l'exocytose des granules contenant l'insuline. Les études effectuées sur les patients diabétiques de différentes populations ne suggèrent pas un rôle significatif des mutations de ces canaux dans le développement du diabète (Unger et Foster, 1998).

#### **I.2.2.2.3. Mutations de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et de l'obésité**

La relation existant entre les altérations du métabolisme lipidique, l'obésité et le diabète est bien établie. Une augmentation des niveaux des acyl-coenzyme A des acides gras à longue chaîne peut interférer avec le métabolisme du glucose au niveau des tissus périphériques et dans les îlots, causant un état de RI au niveau musculaire et altérant la sécrétion d'insuline. L'association d'un état de RI avec divers gènes impliqués dans le métabolisme lipidique a été étudiée, une incapacité de compensation par des cellules  $\beta$  étant caractéristique du diabète de type 2.

**Lipoprotéine lipase (LPL):** des mutations du gène de la LPL peuvent être responsables des niveaux élevés de triglycérides et de la diminution des lipoprotéines de haute densité (HDL) observés chez les sujets diabétiques. La détection de polymorphisme du gène de la LPL dans de nombreux membres de familles diabétiques aux États-Unis n'a cependant pas pu expliquer les anomalies du métabolisme des lipides chez ces individus (Elbein et coll., 1994). Ces résultats contrastent avec ceux de Zhang et coll. (1997) qui ont trouvé des mutations du gène de la LPL chez 8 patients diabétiques sur 18 et ont conclu que les mutations de ce gène sont fréquentes dans la population diabétique de type 2.



**Protéine liant les acides gras:** un polymorphisme dans le codon 54 du gène qui code pour la protéine liant les acides gras au niveau intestinal a été rapporté chez les indiens Pima. Le remplacement de l'alanine par la thréonine double l'affinité de cette protéine pour les acides gras à longue chaîne, augmentant ainsi leur captation et leur oxydation et supprime l'utilisation du glucose. Les individus hétérozygotes ou homozygotes pour cette substitution sont insulino-dépendants et hyperinsuliniques. Néanmoins, diverses études n'ont pu établir un lien entre cette substitution et le DNID (Prochazka, 1993; Humphreys et coll., 1994).

**Récepteur  $\beta$ 3-adrénergique:** la stimulation du récepteur  $\beta$ 3- adrénergique par les agonistes  $\beta$  stimule la lipolyse induite par les catécholamines et la thermogénèse. Une mutation du récepteur  $\beta$ 3-adrénergique adipocytaire a été identifiée chez les indiens Pima. Ces sujets présentent une diminution de leur métabolisme basal et une augmentation de leur indice de masse corporelle. Les sujets homozygotes pour cette mutation montrent aussi une prévalence accrue de développement du DNID (Hegele et coll., 1998; Walston et coll., 1995). La mutation du récepteur  $\beta$ 3-adrénergique est associée à l'obésité abdominale, à la RI et au développement précoce de DNID. En outre, une diminution de la lipolyse a été détectée chez les porteurs de cette mutation (Umekawa et coll., 1999).

**Leptine et son récepteur:** le gène *ob* code pour un peptide de 167 acides aminés sécrété par les adipocytes et nommé leptine. La mutation ou la délétion de ce gène conduit à une obésité extrême et induit le diabète chez la souris *ob/ob*. Chez les souris *db/db*, un modèle expérimental d'obésité et de diabète, des anomalies du récepteur hypothalamique de la leptine ont été identifiées. Une mutation du récepteur de la leptine est aussi retrouvée chez le rat *Zucker*. De telles mutations n'ont cependant pas été détectées dans l'obésité humaine et l'augmentation des niveaux plasmatiques de la leptine

chez les individus obèses semble être imputable à un défaut de sensibilité à la leptine endogène (Unger et Foster, 1998; Considine et coll., 1996).

#### **I.2.2.2.4. Autres gènes candidats**

Le facteur de nécrose tumorale (TNF)- $\alpha$  est une cytokine synthétisée par le tissu adipeux et les macrophages. Ce facteur semble influencer la réponse des tissus périphériques à l'insuline. Le TNF- $\alpha$  est surexprimé dans le tissu adipeux des sujets obèses et les niveaux d'ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  dans ce tissu corrélerent avec les niveaux d'HI (Hotamisligil et coll., 1995; 1993). Le TNF- $\alpha$  a été proposé comme un facteur causal du développement de la RI. Cependant, une association entre le pourcentage de graisse corporelle et les polymorphismes dans le promoteur du gène du TNF- $\alpha$  n'a pas été observée (Norman et coll., 1995).

Le glucagon augmente la production hépatique du glucose et est impliqué dans la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$ . Le niveau du glucagon est élevé dans le DNID. Une mutation identifiée dans le récepteur du glucagon induit une augmentation d'affinité de liaison de cette hormone (Hager et coll., 1995). L'hétérogénéité de cette mutation dans les différentes populations suggère qu'elle ne contribue pas significativement à la pathogenèse du diabète de type 2 (Huang et coll, 1999) .

MODY est une forme génétiquement hétérogène de DNID développée à l'âge précoce et à transmission autosomale dominante. De multiples études ont identifié dans des familles ayant une histoire familiale de MODY, des mutations sur les chromosomes 20 (MODY1, gène du facteur nucléaire hépatocytaire (HNF)-4 $\alpha$  ), 7 (MODY2, gène de la glucokinase) et 12 (MODY3, gène du HNF-1 $\alpha$ ). Le rôle de ces mutations dans la susceptibilité accrue au DNID a été démontré (Shaw et

coll., 1999; Ellard et coll., 1999). Les mutations des gènes codant pour les HNF ont en outre été documentées dans différentes populations (Ellard et coll., 1999; Moller et coll., 1999; Shaw et coll., 1999; Boutin et coll., 1999).

La majorité des études qui ont tenté d'établir un lien entre le diabète et le polymorphisme de certains gènes ont échoué; cet échec n'est pas surprenant lorsque l'on considère la nature hétérogène de la maladie et son degré de pénétration variable. Des analyses génétiques plus sophistiquées ont cependant montré que certaines mutations géniques pourraient être à l'origine du DNID. Les anomalies génétiques impliquées dans le DNID ne sont pas communes et il semble peu probable qu'un seul gène soit responsable du développement de cette maladie. Si les études n'ont pas pu confirmer, jusqu'à présent de façon solide, la susceptibilité génétique comme un prérequis pour le développement du DNID, il existe diverses évidences de l'influence déterminante de l'environnement sur cette maladie.

### **I.2.2.3. Interactions gènes-environnement**

Le DNID possède une composante génétique fortement influencée par les facteurs environnementaux. La prévalence élevée de diabète dans les populations des premières nations du monde ayant rapidement changé leur mode de vie suite à l'urbanisation (Chukwuma et coll., 1998; Martin et coll., 1998) reflète bien l'interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux. Le DNID peut ne devenir manifeste cliniquement que si l'environnement permet un apport alimentaire généreux et le développement d'un certain degré d'adiposité. À l'inverse, le phénotype peut apparaître en l'absence d'un génotype complet de DNID chez des sujets présentant une obésité massive (Unger et Foster, 1998).

#### **I.2.2.4. Facteurs environnementaux**

La prévalence de DNID chez les personnes immigrantes d'une population donnée est souvent accrue par rapport à celle observée chez les individus demeurant dans leur environnement original. Cette augmentation reflète l'effet des facteurs environnementaux sur la maladie. Dans certaines populations on a observé une augmentation majeure de la prévalence du DNID sur des courtes périodes de temps. Cette augmentation semble être reliée à des modifications rapides du style de vie (Martin et coll., 1998; Chukwuma et coll., 1998; Taylor et coll., 1985). La distribution globale de la prévalence du diabète à travers le monde suggère que ce sont les populations des pays en voie de développement et les individus plus défavorisés des pays développés qui ont les taux les plus élevés de DNID. Ces données démontrent avec force le rôle des facteurs environnementaux dans le développement du DNID.

##### **I.2.2.4.1. Obésité**

Une forte association existe entre l'obésité et le diabète de type 2 (World Health Organization, 1980). Dans les pays industrialisés, 70 à 90% des diabétiques de type 2 sont obèses. L'obésité entraîne une RI qui contribue à l'apparition de l'hyperglycémie. L'intolérance au glucose est plus fréquente chez les obèses. Sakurai et coll. (1999) ont démontré qu'un état d'obésité ordinaire persistant pendant plus de 10 ans ou qu'un état d'obésité extrême persistant pendant plus de un an sont des facteurs de prédiction importants du développement du diabète, indépendamment de la présence d'autres facteurs de risque. Le contrôle du DNID s'améliore avec la perte pondérale et une alimentation équilibrée. Bien que l'obésité soit un déterminant majeur du DNID, seule une petite fraction des sujets obèses développe cette maladie. Cette observation démontre l'importance de

l'interaction entre gènes et environnement dans le développement du DNID. Tandis que 80% des sujets diabétiques sont obèses, seulement 10% des sujets obèses sont diabétiques, ce qui suggère l'importance des facteurs génétiques. Cependant la forte prévalence d'obésité chez les patients atteints de DNID indique l'importance de l'obésité comme facteur de risque environnemental, chez les sujets présentant une susceptibilité génétique à développer le DNID (Knowler et coll., 1981).

Une réduction de poids, même modeste, et tout particulièrement une perte de graisse viscérale, diminue l'athérogénicité du DNID (Markovic et coll., 1998). La restriction énergétique et la perte pondérale réduisent les niveaux de glucose plasmatique à jeun, et ce indépendamment de la réduction de l'apport en hydrate de carbone. L'amélioration du contrôle glycémique, par la perte pondérale, est associée à une augmentation de sensibilité à l'insuline au niveau hépatique et périphérique (Goodpaster et coll., 1999; Markovic et coll., 1998).

Non seulement l'obésité, mais sa distribution figure parmi les facteurs de risque de développement du DNID. L'obésité centrale est associée à un risque accru de DNID. L'obésité abdominale est en outre associée à une incidence élevée de maladies coronariennes, d'hypertension, d'HI, d'hypertriglycémie, de lipémie post-prandiale, ainsi qu'à une diminution des HDL sériques et surtout à une élévation des lipoprotéines de faible densité (LDL) (Mekki et coll., 1999; Hong et coll., 1998). L'HI ou la RI semble être le fait central des anomalies associées à l'obésité abdominale (DeFronzo et Ferrannini, 1991). Dans une étude récente, il a été démontré que l'ablation chirurgicale, chez le rat, de la graisse viscérale induit une diminution remarquable de la quantité d'insuline infusée requise pour maintenir les niveaux plasmatiques de glucose et sa production hépatique. Cette intervention inhibe aussi la RI au niveau hépatique et diminue l'expression génique du TNF- $\alpha$  dans le tissu adipeux (Barzilai et coll., 1999). L'obésité et sa distribution ne peuvent cependant pas

expliquer entièrement les différences de prévalence du DNID entre les populations (Kawate et coll., 1979).

#### **I.2.2.4.2. Diète**

Une diète riche en lipides, et pauvre en fibres et hydrates de carbone non-raffinés contribue au développement de la RI. Un apport alimentaire riche en lipides provenant surtout d'acides gras saturés pourrait contribuer au développement des maladies telles le DNID chez les populations de premières nations (Mamleeva et coll., 1998; Trufakin and Gaidul, 1998).

Nesher et coll. (1999) ont étudié, chez des rats susceptibles ou résistants au diabète, l'interaction entre la diète et la susceptibilité génétique au diabète. Ils ont démontré qu'une diète riche en énergie augmente significativement les niveaux de glucose, d'insuline et de triglycérides plasmatiques chez les rats susceptibles, mais non chez les résistants. Un jeûne de 18 heures corrige partiellement les niveaux de glucose et d'insuline. Chez des hamsters insulino-résistants, une diète riche en lipides accentue l'état de RI, tandis que cette diète associée à l'exercice physique est dénuée d'effet (Liu et coll., 1998). L'induction nutritionnelle du DNID chez les rats obèses *Psammomys* est réversible par la restriction énergétique (Bar-On et coll., 1999).

L'interaction entre nutriments spécifiques est, elle aussi un déterminant important de l'état de RI. Une diète riche, simultanément, en sucrose et en acide linoléique diminue davantage la sensibilité à l'insuline qu'une diète riche en sucrose seul ou en acide linoléique seul. La présence excessive simultanée de ces deux nutriments, élève aussi la pression artérielle (Zhang et coll., 1999). Il a été récemment démontré que l'alimentation de souris présentant une déficience en LDL-récepteurs, par une diète occidentale, pouvait induire la RI et l'HI (Merat et coll., 1999).

#### **I.2.2.4.3. Activité physique**

Une activité physique, même modérée, réduit l'incidence du DNID, augmente la sensibilité à l'insuline et améliore le métabolisme lipidique (Imbeault et coll., 1999; Hill et Melanson, 1999). Des études transversales, démontrant une prévalence du diabète de 2 à 3 fois plus élevée chez les personnes physiquement inactives que chez les individus actifs, illustrent l'association directe existant entre le DNID et l'activité physique (Kriska et coll., 1993). Chez les sujets diabétiques obèses, ayant une hyperglycémie modérée, l'activité physique modérée normalise les taux de sécrétion d'insuline (Giacca et coll., 1998). Le manque d'activité physique contribue à l'état de RI en diminuant les concentrations musculaires de GLUT4. Les effets bénéfiques de l'exercice chronique sont associés à l'augmentation des niveaux de GLUT4 dans les tissus musculaires et adipeux des rats insulino-résistants. L'exercice physique d'endurance, chez les rats *Zucker*, améliore la sensibilité à l'insuline et augmente les niveaux de GLUT4 musculaire. Cette augmentation est associée à une activité accrue de l'hexokinase II et à la synthèse de glycogène (Brozinick et coll., 1993).

#### **I.2.2.4.4. Stress**

Le stress hormonal (*i.e.* suivant l'administration d'hormones stéroïdiennes) (Bjorntorp, 1995) ou oxydatif pourrait être un autre déterminant important du DNID. Ainsi les adipocytes 3T3-L1, exposés à des concentrations micromolaires de peroxyde d'hydrogène, montrent une translocation altérée du GLUT4 en présence d'insuline. Il a été suggéré que l'exposition des adipocytes au peroxyde d'hydrogène puisse altérer la distribution normale de l'IRS-1 et de la phosphatidyl-inositol 3'-kinase (PI-3k) dans la cellule (Tirosh et coll., 1999).

### **I.2.3. Physiopathologie**

Chez les animaux normaux, l'homéostasie du glucose est maintenue par les effets antagonistes de l'insuline sécrétée par les cellules  $\beta$  et du glucagon produit par les cellules  $\alpha$  des îlots de Langerhans. L'infusion de glucose ou l'ingestion d'hydrates de carbone augmente les niveaux plasmatiques d'insuline et diminue ceux du glucagon. La libération d'insuline inhibe la production hépatique de glucose tout en augmentant sa captation périphérique. Le glucagon, quant à lui, inhibe la glycolyse et augmente la glycogénolyse, la néoglucogenèse, la cétoxygénèse et l'urogène. L'effet du glucagon sur le métabolisme hépatique du glucose est médié par la libération de seconds messagers tels que l'adénosine-monophosphate cyclique (cAMP), un activateur de la protéine kinase A et les ions de calcium qui activent la protéine kinase C (PKC) (Unger et Foster, 1998). Le DNID est caractérisé par une double anomalie de sécrétion des hormones pancréatiques, une réduction de la sécrétion d'insuline et une libération excessive de glucagon, associée à une perturbation des effets de l'insuline sur ses tissus cibles.

#### **I.2.3.1. Action de l'insuline**

L'insuline inhibe la lipolyse et la protéolyse, stimule la lipogenèse et la biosynthèse de l'ADN et des protéines, active le transport du glucose, des acides aminés et des ions, et promeut la synthèse du glycogène et la glycolyse. En supprimant la sécrétion du glucagon, l'insuline exerce un effet anti-catabolique et en bloquant les effets hépatiques du glucagon, elle inhibe la glycogénolyse et la néoglucogenèse. L'action de l'insuline commence lorsqu'elle se lie à la sous-unité  $\alpha$  de son récepteur et induit ainsi un changement de conformation de la sous-unité  $\beta$  intracellulaire. Cette dernière est auto-phosphorylée sur des résidus tyrosine (Tyr-P) et acquiert une activité tyrosine kinase qui lui



permet de phosphoryler les Tyr-P de son principal substrat intracellulaire, l'IRS-1. Le recrutement de diverses protéines par IRS-1 mène à l'activation de diverses voies de signalisation impliquant des cascades phosphorylatives responsables des effets métaboliques de l'insuline et de ses effets sur la croissance cellulaire. Tel qu'illustré par la figure 5, le recrutement de Grb2 et Sos

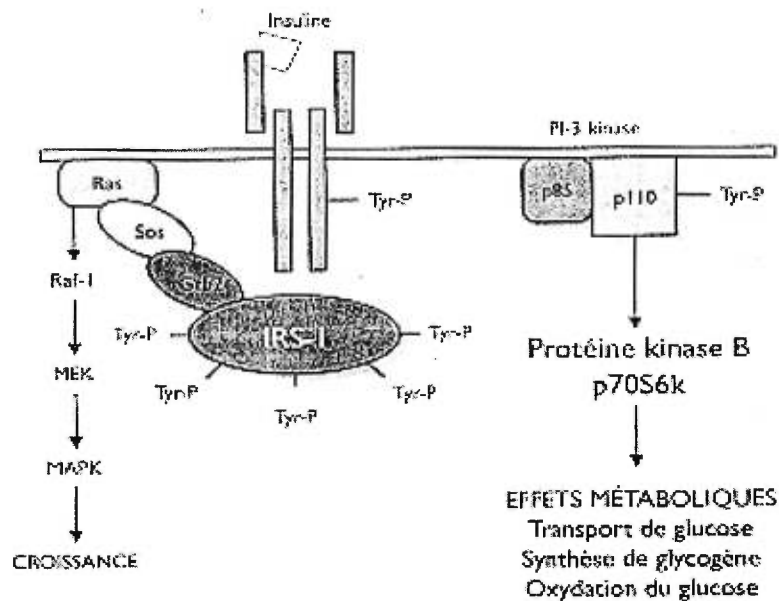


Figure 5. Voies de signalisation de l'insuline; les protéines intracellulaires impliquées dans la transmission du message insulinaire (adapté de: "Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 16:117-142, 1995").

conduit à l'activation de l'oncogène Ras, à la stimulation de la voie des protéines kinases activées par les mitogènes (MAP kinase) et à la multiplication cellulaire. La liaison de l'IRS-1 phosphorylé à la sous-unité régulatrice (p85) de la PI 3-k, conduit pour sa part à l'activation de cette enzyme. La PI 3-k exerce un rôle multifonctionnel dans l'action et la signalisation de l'insuline. Elle stimule la

captation du glucose au niveau musculaire et adipeux, en induisant dans ces tissus la translocation du GLUT4 et du GLUT1 et l'activation de la p70s6 kinase. Ce faisant, elle médie les effets métaboliques de l'insuline (Cheatham et Kahn., 1996; 1995). Dans le DNID, le nombre de récepteurs à l'insuline exprimés par les tissus cibles et la liaison de l'insuline à son récepteur sont souvent normaux. L'anomalie se situe donc essentiellement au niveau post-récepteuriel. À ce sujet, une diminution de l'activité de phosphorylation de l'IRS-1 a été rapportée dans le muscle squelettique isolé de patients atteints de DNID (Zierath et coll., 1998).

### **I.2.3.2. Résistance à l'insuline**

#### **I.2.3.2.1. Génétique et environnement**

La RI est la diminution de la capacité de l'insuline endogène ou exogène, à supprimer la production endogène hépatique de glucose et à augmenter la captation périphérique du glucose. La RI affecte aussi le métabolisme des lipides et des protéines (DeFronzo et coll., 1992; Reaven, 1995). La sensibilité des tissus cibles à l'action gluco-régulatrice de l'insuline est génétiquement déterminée et le risque de développement du DNID est inversement corrélé avec le seuil de sensibilité à l'insuline (Kahn, 1994). Les sujets apparentés à des patients atteints de DNID peuvent être insulino-résistants même s'ils sont jeunes, non obèses et tolérants au glucose. Cinquante pourcent de la parenté au premier degré des patients diabétiques démontrent une RI avant de développer le DNID (Kahn, 1994). L'obésité, et tout particulièrement l'obésité abdominale, est un facteur pathogénique acquis (Bjorntorp, 1994) responsable de la RI. L'effet de l'obésité sur la RI est plus accentué chez les patients diabétiques que chez les sujets sans histoire familiale de diabète ( Gerich et Van Haeften, 1998).

#### **I.2.3.2.2. Contribution hépatique**

Chez les patients atteints de DNID avec hyperglycémie à jeun modérée, la production hépatique de glucose est légèrement augmentée (DeFronzo, 1992). Cet effet est dû à une réduction de l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production hépatique de glucose et sur la sécrétion de glucagon. L'importance de l'augmentation de la néoglucogenèse hépatique est soulignée par l'observation que lorsque la phosphoénol-pyruvate carboxykinase, une enzyme régulant la néoglucogenèse est surexprimée chez la souris, une hyperglycémie en résulte (Valera et coll., 1994). Il faut cependant souligner qu'il est improbable que l'augmentation de production hépatique de glucose puisse jouer un rôle primaire dans la pathogenèse du DNID humain.

#### **I.2.3.2.3. Contribution du muscle squelettique**

Chez l'individu normal, 75% du glucose alimentaire est capté par le muscle et y est stocké sous forme de glycogène. L'altération de l'utilisation du glucose par les muscles squelettiques constitue un défaut majeur dans l'étiologie du diabète de type 2. L'anomalie de synthèse du glycogène est liée pour sa part à un défaut de la régulation de la glycogène synthase par l'insuline (Wang et coll., 1998). Chez le patient non insulino-dépendant, on assiste à une diminution importante du transport du glucose dans le muscle squelettique, de son stockage sous forme de glycogène et de son oxydation en réponse à l'insuline (Kelly et coll., 1992). Alors que les manipulations transgéniques visant à surexprimer, chez la souris, le GLUT4 au niveau musculaire stimulent l'utilisation du glucose (Tsao, 1999), le "knock out" du gène codant pour cette protéine n'induit cependant pas d'hyperglycémie chez la souris. Ces données suggèrent que la perte totale de transport de glucose stimulé par l'insuline est insuffisante pour induire le diabète.

#### **I.2.3.2.4. Contribution du tissu adipeux**

Le tissu adipeux est également un tissu cible de l'insuline, même si quantitativement il ne contribue que de façon mineure à l'utilisation du glucose. La RI y est caractérisée par un défaut de translocation des GLUT-4 à la membrane cellulaire (Bastard et coll., 1998; Garvey et coll., 1991). L'excès de masse adipeuse associée à l'obésité (intrinsèquement insulino-résistante), pourrait causer la RI au niveau musculaire en stimulant la relâche d'acides gras dans la circulation et en infiltrant le tissu musculaire. Au vu de l'influence des AGL sur la production et la captation du glucose, ainsi que sur la libération d'insuline, la RI au niveau du tissu adipeux pourrait être une composante importante de l'altération de l'homéostasie du glucose chez le patient atteint de DNID (Bergman et Mittelman, 1998).

#### **I.2.3.2.5. Acides gras libres**

La relâche inappropriée d'acides gras, au cours de la période post-prandiale, réduit la sensibilité du métabolisme du glucose à l'insuline et accentue la lipémie post-prandiale (Frayn, 1998). La coexistence de niveaux élevés d'AGL et d'une HI traduit la résistance adipocytaire à l'action anti-lipolytique de l'insuline. Dans l'obésité, l'augmentation des niveaux d'AGL tissulaires pourrait causer la RI, d'une part en inhibant le métabolisme musculaire du glucose, et d'autre part en induisant un état d'HI *via* la stimulation d'un métabolisme glucidique de faible  $K_m$  (constante de Michaelis) au niveau pancréatique et la prolifération des cellules  $\beta$  (Wiesenthal et coll., 1999; Milburn et coll., 1995). Dans cette condition, l'équilibre entre RI et HI permet le maintien d'une tolérance au glucose normale. Lors du développement du diabète, la surcharge en AGL interfère avec le métabolisme du glucose et altère la capacité des cellules  $\beta$  à répondre à l'hyperglycémie post-

prandiale. Dans cette situation, l'HI est insuffisante pour compenser la RI et le diabète se développe. Des expériences *in vivo* chez les rats ont récemment démontré que des niveaux plasmatiques élevés d'AGL diminuent la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Mason et coll., 1999; Boden, 1998). Au vu de la forte corrélation existant entre la concentration d'AGL et la production de glucose hépatique, il a été suggéré que l'insuline puisse contrôler la production de glucose hépatique par son effet régulateur sur la lipolyse adipocytaire. La RI au niveau des cellules adipocytaires pourrait donc constituer une composante importante de la régulation glycémique en raison de la relation entre les AGL et la production de glucose, la captation de glucose et la libération d'insuline. Ces données suggèrent que la RI adipocytaire puisse être la cause majeure de la dysrégulation du métabolisme des hydrates de carbone associée à l'état pré-diabétique (Bergman et Mittelman, 1998).

#### **I.2.3.2.6. Facteur de nécrose tumorale- $\alpha$**

Diverses évidences démontrent un rôle majeur du TNF- $\alpha$  dans le déclenchement de la RI. La production et l'expression du TNF- $\alpha$  sont augmentées dans le tissu adipeux de divers modèles expérimentaux d'obésité (Spiegelman et coll., 1993) et de sujets obèses (Kern et coll., 1995). Il a été démontré que le TNF- $\alpha$  diminue les niveaux d'ARNm du GLUT4 exprimés par les pré-adipocytes (Hotamisligil et coll., 1994), inhibe le transport du glucose, altère l'activité de la tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline et diminue la phosphorylation de l'IRS-1. Le traitement des îlots pancréatiques par le TNF- $\alpha$  et l'interleukine (IL)-1 $\beta$ , diminue les niveaux d'ARNm du GLUT2 et de la glucokinase (Park et coll., 1999). La neutralisation du TNF- $\alpha$ , chez le rat obèse, augmente la sensibilité à l'insuline en stimulant la captation périphérique du glucose (Hotamisligil et coll., 1993) et stimule la phosphorylation de la tyrosine kinase (Hotamisligil et coll., 1994a), suggérant que

l'expression excessive du TNF- $\alpha$  dans le tissu adipeux des animaux obèses puisse être en partie responsable de la RI. Il a enfin été démontré que l'absence du récepteur p55 du TNF- $\alpha$  améliore la sensibilité à l'insuline chez les souris obèses (Uysal et coll., 1998).

### **I.2.3.3. Hyperinsulinémie et intolérance au glucose**

Les individus insulino-résistants qui ont une tolérance normale au glucose, sont davantage hyperinsulinémiques que les sujets témoins, suggérant que l'augmentation du niveau d'insuline chez ces sujets leur permet de surmonter le défaut d'action de l'insuline (Reaven et coll., 1993). L'HI endogène maintient la tolérance au glucose et ralentit les complications microvasculaires. Juan et coll. (1999) ont démontré qu'une infusion sous cutanée d'insuline chez le rat induit un état de RI après un jour de traitement et une intolérance au glucose après 10 jours. L'HI exogène chronique est associée à une augmentation des niveaux d'AGL plasmatiques et de la lipogenèse de novo (Koopmans et coll., 1999).

L'intolérance au glucose est caractérisée par des niveaux plasmatiques de glucose, mesurés lors d'un test de tolérance au glucose, supérieurs aux niveaux normaux mais inférieurs à ceux retrouvés chez les patients diabétiques. Le risque de développement de diabète chez les sujets intolérants au glucose est 20 fois plus élevé que celui présenté par une population normale (Kenny et coll., 1995). La moitié de ces sujets développeront un DNID dans les années futures. Diverses variables métaboliques telles que la RI et la sécrétion de l'insuline, ainsi que certaines variables anthropométriques comme l'indice de masse corporelle et le ratio taille/hanche sont associés au développement de l'intolérance au glucose (Poulsen et coll., 1999). Chez la plupart des sujets, l'intolérance au glucose représente une étape transitoire vers le développement du DNID. L'hyperpro-

insulinémie associée à cet état est attribuée à une riposte insulinique au glucose retardée (Ruige et coll., 1999).

#### **I.2.3.4. Insulinopénie**

Bien que l'état d'intolérance au glucose soit associé à une HI, le développement du DNID se caractérise par un état de déficience relative ou absolue en insuline. L'insulinopénie résulte d'une anomalie qualitative et quantitative de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ . Elle est souvent associée à une RI des tissus cibles et s'aggrave progressivement au cours de l'évolution du DNID. Divers défauts des cellules  $\beta$ , tels que la réduction du GLUT2, l'altération des enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire du glucose et l'accumulation des triglycérides et du glycogène dans ces cellules, pourraient causer la déficience en insuline.

L'insulinopénie est progressivement aggravée par des phénomènes dits de glucotoxicité. En effet, une réduction de riposte insulinique en réponse au glucose est induite par l'hyperglycémie, réduit le GLUT2 et augmente l'activité de la glucokinase (Chen et coll., 1994; Leahy et coll., 1992). L'augmentation chronique de la production des AGL et des triglycérides, favorisée par l'obésité, ainsi que par l'hyperglycémie semble également entraver l'insulino-sécrétion en réponse au glucose. En effet, il a été démontré, chez le rat, que des niveaux plasmatiques élevés d'AGL diminuent la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Mason et coll., 1999).

La sécrétion d'insuline est pulsatile et synchronisée en fonction des niveaux de glucose plasmatique. Il a été démontré que l'administration pulsatile d'insuline induit une suppression plus efficace de la production de glucose hépatique (Bratusch-Marrain et coll., 1986). Dans le DNID, le

pic précoce de sécrétion d'insuline disparaît, et la sécrétion pulsatile d'insuline est abolie, aggravant la perte de sensibilité des tissus cibles à l'insuline (Lang et coll., 1981).

Des altérations qualitatives de l'insulino-sécrétion accompagnent ces anomalies fonctionnelles, une partie de l'hormone étant sécrétée sous forme de précurseurs inactifs. Le ratio pro-insuline/insuline est élevé dans le plasma des sujets atteints de DNID, et est corrélé de manière positive avec les niveaux de glycémie (Rhodes et Alarcon, 1994). Des concentrations élevées de pro-insulines circulantes, une histoire familiale positive et des niveaux de glucose à jeun élevés ont été suggérés comme des facteurs de risque de la progression du DNID (Wareham et coll., 1999).

La masse des cellules  $\beta$  dans le DNID est d'environ 50% de celle observée à l'état normal; elle est influencée par divers facteurs tels la capacité mitotique et la mort cellulaire. Deux facteurs majeurs aggravent l'insulinopénie: la RI des tissus cibles et l'augmentation de production du glucose par le foie due à l'hypersécrétion pancréatique de glucagon. L'altération de la sécrétion du glucagon est un phénomène précoce dans l'apparition du DNID. Il est lié à la RI entraînant un défaut de sensibilité à l'insuline de la cellule  $\alpha$  et une véritable "cécité" au glucose de cette cellule, imputable à l'hyperglycémie chronique. L'hypersécrétion de glucagon stimule la production hépatique de glucose, phénomène aggravé par l'accumulation des acides gras qui fournissent les cofacteurs nécessaires à la néoglucogenèse (Chen et coll., 1999).

#### **I.2.4. Complications associées au DNID**

Le diabète figure encore parmi les sept premières causes de mortalité aux États-Unis (Centers for Disease Control and Prevention, 1997). Dans ce pays près de 9.7% de la population âgée de 40 à 74 ans présentent une hyperglycémie à jeun, et 15.5% sont intolérants au glucose (Harris et coll.,



1998). Une morbidité considérable est associée au diabète. Parmi les complications reliées au diabète, la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie figurent parmi les complications microvasculaires tandis que l'athérosclérose et ses conséquences (les accidents coronariens et cérébrovasculaires) représentent les complications macrovasculaires (Janka, 1996).

#### **I.2.4.1. Rôle du contrôle métabolique**

La relation existant entre les complications diabétiques et les anomalies métaboliques du DNID est bien établie. L'hyperglycémie a fermement été identifiée comme un facteur de risque des complications vasculaires associées au diabète. Le contrôle glycémique prévient ou ralentit la progression des complications microvasculaires du diabète. Une réduction des événements cardiovasculaires et des facteurs de risque lipidiques a été notée suivant un traitement intensif de l'hyperglycémie (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993; Eastman et coll., 1993).

#### **I.2.4.2. Mécanismes potentiellement responsables des complications associées au DNID**

Bien qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus quant aux mécanismes pathogéniques reliant l'hyperglycémie et les complications du diabète, les médiateurs potentiels de l'hyperglycémie incluent: la glycation des protéines, l'activation de la voie des polyols et de la PKC, les altérations du système de coagulation, les facteurs de croissance, les altérations du métabolisme des lipoprotéines et le stress oxydatif.



de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine induit chez les sujets diabétiques la formation d'hémoglobine glycosylée ( $Hb_{A1c}$ ), un indice clinique du contrôle diabétique des 2 à 3 mois antérieurs (Dolhofer et Wieland, 1979; Cerami et coll., 1979). Chez les patients diabétiques de type 2, traités ou non à l'insuline, une forte corrélation existe entre la concentration d' $Hb_{A1c}$  et le risque de développement des complications micro- et macrovasculaires associées au diabète (Klein, 1995). La glycation de l'albumine inhibe la captation hépatique des glycoprotéines facilitant dès lors leur entrée dans la paroi des petits vaisseaux sanguins (Vlassara et coll., 1994). La glycation du collagène dans les membranes basales contribue à l'épaississement de la paroi vasculaire, et ce, par augmentation de la résistance de cette protéine à la digestion par collagénase (Kohn et Schnier, 1982). La glycation de la myéline altère la conduction nerveuse (Vlassara et coll., 1983). La glycation de la membrane leucocytaire altère les processus de chimiotaxie, diapédèse, phagocytose, d'activité bactéricide et l'immunité cellulaire (Alexowicz et coll., 1995).

La formation des AGE dans la matrice extracellulaire entraîne des changements de structure et de fonction de la matrice, un épaississement de la membrane basale, une perte de l'élasticité de la paroi vasculaire et une augmentation de la perméabilité vasculaire. La réaction directe des AGE et des lipoprotéines plasmatiques empêche, en outre, la reconnaissance des lipoprotéines par les récepteurs tissulaires (Hammes et coll., 1996; Bucala et coll., 1994).

**Effets biologiques:** la glycation des protéines est impliquée dans les complications micro- (glomérulo-néphrosclérose, rétinopathie) et macrovasculaires du DNID. Les AGE sont capables de se fixer sur des récepteurs cellulaires spécifiques exprimés, entre autre, sur les macrophages où ils provoquent la libération de cytokines (IL-1 et  $TNF-\alpha$ ) induisant la prolifération des cellules mésangiales glomérulaires, des cellules endothéliales et des fibroblastes (Vlassara et coll., 1988).

Leur fixation sur les cellules endothéliales entraîne l'activation de facteurs de coagulation, favorisant la vasoconstriction et la thrombose locale (Esposito et coll., 1992). Les interactions AGE-récepteurs induisent également la production de radicaux libres (Shantaram, 1999; Unger et Foster, 1998; Schmidt et coll., 1996).

**Inhibiteurs des AGE:** la découverte d'agents pharmacologiques capables d'inhiber spécifiquement la formation des AGE tels que l'aminoguanidine, a permis d'investiguer le rôle des protéines glyquées dans le développement des complications diabétiques. Il a été rapporté qu'un traitement à l'aminoguanidine inhibe le développement accéléré des complications micro- et macrovasculaires chez les sujets diabétiques (Hammes, 1996).

#### **I.2.4.2.2. Voie des polyols**

L'activation de la voie des polyols est un autre mécanisme potentiellement impliqué dans la pathogenèse des complications diabétiques. Elle est caractérisée par une production intracellulaire excessive de sorbitol formé à partir du glucose, par l'aldose réductase, et par l'oxydation du sorbitol en fructose. L'accumulation cellulaire de polyols induit une augmentation de la pression osmotique, altère les potentiels d'oxydo-réduction et diminue les équivalents réduits chargés d'éliminer les radicaux libres. L'excès de sorbitol et de fructose diminue l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase perturbant ainsi la conduction nerveuse et induisant l'accumulation de sodium dans les cellules (Hamada et coll., 1998). L'accumulation de sorbitol entraîne en outre, une réduction du *myo*-inositol et diminue l'efficacité de conduction nerveuse (Kishi et coll., 1999). Il a été démontré que la taurine, un acide aminé possédant des propriétés antioxydantes, est réduite dans les tissus des sujets diabétiques, un effet imputable à l'accumulation de sorbitol. La taurine intracellulaire joue un rôle

vital dans l'homéostasie des ions calciques et contrôle par ce processus la régulation osmolaire et l'activité des protéines kinases (Wu et coll., 1999; Stevens et coll., 1999). L'aldose réductase est présente dans la rétine, le rein, les lentilles, les cellules de Schwann et l'aorte. L'accumulation de polyols dans ces tissus a été impliquée dans la pathogenèse des cataractes, de la rétinopathie, de la neuropathie et des maladies vasculaires (Connors et coll., 1997; Tomlinson et coll., 1994).

Le fructose, produit final de la voie des polyols, induit des complications sévères chez les animaux et l'inhibition de sa production améliore la fonction nerveuse et vasculaire (Tilton et coll., 1995). La voie des polyols pourrait aussi contribuer à la pathogenèse des complications vasculaires en induisant la formation des AGE, le fructose pouvant se lier aux protéines, de façon non enzymatique (Suarez et coll., 1989).

#### **I.2.4.2.3. Activation de la protéine kinase C**

Dans plusieurs types cellulaires exprimant une activité réduite en aldose réductase, l'exposition à des niveaux glycémiques élevés augmente la synthèse de diacylglycerol et l'activité de la PKC. L'activation de la PKC par le glucose altère l'action de l'insuline en phosphorylant la sérine du domaine C-terminal du récepteur de l'insuline et diminue l'activité tyrosine kinase de ce récepteur (Farese, 1996). Il a été démontré que l'exposition prolongée des îlots du pancréas à des niveaux élevés de glucose altère, de manière PKC-dépendante, la sécrétion d'insuline (Thams et coll., 1990). L'induction de la PKC dans le foie, le coeur et les îlots pancréatiques pourrait jouer un rôle important dans l'induction de la RI. En effet, il a été postulé que l'augmentation de l'activité de la PKC suivant l'induction du diabète, chez le rat, induit la RI (Tang et coll., 1993). L'activation de la

PKC réduirait aussi la relaxation de l'endothélium médiée par le monoxyde d'azote (NO) (Farese, 1996; Tesfamariam et coll., 1991).

#### **I.2.4.2.4. Altération du système de coagulation**

Les complications thrombotiques constituent la cause de la plupart des décès chez les sujets diabétiques. Le DNID est associé à un état d'hypercoagulabilité, avec diminution de la fibrinolyse, activation plaquettaire et augmentation de l'agrégation plaquettaire (Tschoepe et Roesen, 1998). Il a été récemment proposé que l'HI puisse contribuer à l'hypercoagulabilité et à l'altération de la fibrinolyse associée au diabète (Meigs et coll., 2000). Les phénomènes pro-thrombotiques pourraient contribuer à l'athérogenèse, la micro-angiopathie et la coagulation intravasculaire associée au diabète. Les anomalies thrombolytiques sont associées à des concentrations plasmatiques élevées de fibrinogène, de "plasminogen activator inhibitor 1" ou PAI-1, de "tissue-type plasminogen activator" ou tPA, des facteurs von Willebrand et VII et de la viscosité plasmatique. L'ARNm du PAI-1 étant présent dans le tissu adipeux (Samad et coll., 1996), la production excessive de PAI-1 observée dans le diabète pourrait être en relation avec l'augmentation de masse adipeuse. Meigs et coll. (2000) ont récemment rapporté que l'intolérance au glucose est associée à une augmentation significative de PAI-1 et de tPA chez les sujets intolérants au glucose. Les protéines glyquées ont aussi été proposées comme des facteurs responsables de la production accrue de PAI-1 dans le DNID (Yamagishi et coll., 1998).

#### **I.2.4.2.5. Facteurs de croissance**

Bien que plusieurs facteurs de croissance aient été impliqués dans la pathogenèse des complications diabétiques, il n'existe pas encore d'évidences permettant d'incriminer un facteur de croissance déterminé dans le développement d'une complication donnée. Divers mécanismes incluant la glycation protéique et le stress oxydatif sont responsables de la production accrue de facteurs de croissance dans le diabète. Les niveaux élevés des AGE stimulent la production du facteur de croissance transformant (TGF)  $\beta$ -1 dans les glomérules de souris diabétiques (Yang et coll., 1995). Le facteur de croissance ressemblant à l'insuline (IGF)-I, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le TGF, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance des nerfs (NGF) figurent parmi les molécules impliquées dans les altérations vasculaires associées au diabète (Smith, 1998; Blakesley et LeRoith, 1996; Fernyhough et coll., 1994).

#### **I.2.4.2.6. Altérations du métabolisme des lipoprotéines**

Les sujets atteints de DNID ont fréquemment des niveaux plasmatiques élevés de triglycérides et une réduction des niveaux de HDL (Jovens, 1993). En raison de ces altérations, ces patients ne montrent que peu d'augmentation du cholestérol sérique. Les patients atteints de DNID produisent d'une manière excessive les lipoprotéines de très faible densité (VLDL): un reflet de leur RI. Le manque de clairance des VLDL et la diminution des HDL reflètent la diminution d'activité de la LPL chez ces patients. Il existe aussi, dans le DNID, des redistributions des triglycérides avec une augmentation nette du contenu des HDL et des LDL en triglycérides.

Les patients diabétiques de type 2 possèdent des VLDL enrichies en triglycérides dont le temps de résidence dans la circulation sanguine est accru. L'effet prolongé des protéines de transfert des esters de cholestérol (CETP) sur ces VLDL facilite le transfert du cholestérol des HDL et des LDL vers les VLDL et les chylomicrons. Ce faisant, la CETP exerce un effet athérogénique à l'état post-prandial, réduisant le cholestérol des HDL et augmentant le cholestérol des VLDL. Bien que la production des chylomicrons semble inchangée dans le DNID, leur nombre augmente en raison de leur temps de résidence plus long dans le plasma. Les particules remnantes des chylomicrons et celles des VLDL (LDL et lipoprotéines de densité intermédiaire ou IDL) sont athérogènes et exacerbent le processus athérosclérotique. Il est à noter que l'hypertriglycémie associée au DNID facilite la production de LDL petites et denses qui peuvent pénétrer facilement dans la paroi artérielle et initier le développement des lésions athéromateuses (Erkelens, 1998).

La glyco-oxydation des LDL circulantes par le glucose et les radicaux libres (Hunt et coll., 1990) facilite la captation de ces lipoprotéines par les macrophages présents dans la lésion athéromateuse, et contribue ainsi à la formation des cellules spumeuses. Le traitement de la dyslipidémie diabétique, en réduisant les triglycérides et les VLDL, diminue le risque des complications macrovasculaires (Erkelens, 1998).

#### **I.2.4.2.7. Stress oxydatif**

La formation de radicaux libres a lieu chez tous les individus lors de la respiration aérobie normale. Ces radicaux libres dérivés de la chaîne respiratoire peuvent, en cas d'excès, altérer les fonctions cellulaires ( $O_2 \rightarrow O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow \cdot OH \rightarrow H_2O$ ). Des mécanismes de défense tels que les enzymes cytochrome P450, la superoxyde dismutase, la glutathione peroxydase et la catalase



atténuent les dommages oxydatifs (Betteridge, 2000). La production excessive de radicaux libres favorise la peroxydation des lipides et des lipoprotéines et la genèse de molécules stables telles les aldéhydes qui altèrent la membrane cellulaire (Freeman et Crapo, 1982). Les radicaux libres stimulent la croissance des cellules musculaires lisses et l'expression des proto-oncogènes (Rao et Berk, 1992). Les radicaux libres sont impliqués dans la production des AGE, qui à leur tour constituent une source de radicaux libres (Nadler et Winer, 1996; Darley-Usmar et Halliwell, 1996).

Chez l'individu diabétique, la production de radicaux libres est augmentée et la capacité antioxydante de l'organisme est diminuée. Reflétant l'augmentation de stress oxydatif, des niveaux élevés de malondialdéhyde sont présents dans le plasma, les érythrocytes et l'urine des sujets atteints de DNID. Une augmentation des niveaux de lipoprotéines modifiées et une susceptibilité accrue des LDL à l'oxydation sont aussi observées dans le DNID (Jiang et coll., 1996; Nadler et Winer, 1996; Ceriello et coll., 1991). L'hyperglycémie induit le stress oxydatif par plusieurs mécanismes incluant l'auto-oxydation du glucose, la glyco-oxydation, la glycation des protéines et l'activation de la voie des polyols (Ceriello, 2000). L'auto-oxydation du glucose, en générant des radicaux libres, altère la synthèse de NO et augmente l'expression et l'activité des lipoxygénases. Tel que mentionné précédemment, la glycation des protéines induit la production de radicaux libres (Natarajan et coll., 1994; Wolff et coll., 1991). L'activation de la voie des polyols, induite par l'hyperglycémie, altère, pour sa part, les potentiels d'oxydo-réduction et diminue les équivalents réduits chargés d'éliminer les radicaux libres. L'hyperglycémie peut en outre, réduire de manière directe, les défenses antioxydantes de l'organisme (Jiang et coll., 1996; Baynes, 1991).

### **I.2.4.3. Complications microvasculaires**

L'hyperglycémie est un facteur de risque majeur des complications microvasculaires associées au diabète. Les bénéfices d'un bon contrôle glycémique dans la réduction de l'incidence et de la progression de la rétinopathie et de la néphropathie diabétique ont récemment été démontrés (UK Prospective Diabetes Study, 1998).

#### **I.2.4.3.1. Rétinopathie**

Le diabète est la première cause de cécité chez les adultes de moins de 65 ans dans les pays industrialisés. Alors que 99.5% des sujets atteints de DID démontrent un certain degré de rétinopathie après 15 ans d'évolution de la maladie, la rétinopathie est fréquemment présente au moment du diagnostic du DNID (Jiang et coll., 1996). Parmi les sujets atteints de diabète de type 2 depuis 20 ans, 80% ont un certain degré de rétinopathie et 20% d'entre eux démontrent une rétinopathie de type proliférative (Klein et Klein, 1995).

L'hyperglycémie est un facteur de risque majeur de développement de la rétinopathie diabétique. De multiples mécanismes biochimiques impliquant la voie des polyols, les AGE, le stress oxydatif, la voie de la PKC et les facteurs de croissance pourraient être impliqués dans la pathogenèse de la rétinopathie diabétique. À son stade précoce, la rétinopathie diabétique se caractérise par une dilatation ou une constriction des vaisseaux, une perméabilité vasculaire accrue, des micro-anévrismes, des hémorragies ponctuelles et des exudats. Le stade prolifératif de la rétinopathie est caractérisé par le développement de vaisseaux sanguins nouvellement formés, par la formation de tissu fibreux provenant de la rétine ou du disque optique (*macula*), et par la présence

d'hémorragies. Le décollement rétinien et la cécité sont les ultimes complications de la rétinopathie diabétique (Hammes et coll., 1999; Jiang et coll., 1996; Hammes et coll., 1991).

#### **I.2.4.3.2. Néphropathie**

Le taux de développement et la progression de la néphropathie diabétique sont intimement associés au contrôle glycémique (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993; Eastman et coll., 1993). Le diabète est la première cause d'insuffisance rénale terminale. En 1996, 42% des nouveaux cas d'insuffisance rénale étaient attribuables au diabète (US Renal Data System, 1998). La néphropathie diabétique est cliniquement définie par la présence d'une protéinurie persistante, telle que définie par un niveau d'albuminurie de plus de 300 mg par 24 heures, avec rétinopathie et hypertension concomitante. Vingt cinq à 50% des patients diabétiques développent une insuffisance rénale terminale. La mortalité des patients diabétiques souffrant de néphropathie est de 20 à 40 fois plus élevée que celle documentée chez les sujets diabétiques sans néphropathie. Un profil lipidique anormal augmente le risque de la mortalité par les maladies coronariennes chez les sujets souffrant de la néphropathie (Hirano, 1999; Trevisan et Viberti, 1996).

La néphropathie diabétique évolue par phases distinctes et interreliées: une phase précoce ou phase de microalbuminurie traduisant des anomalies de la fonction rénale et une phase clinique avec protéinurie persistante progressant vers l'insuffisance rénale terminale. Le rôle des altérations hémodynamiques et métaboliques est relativement bien établi dans l'évolution de la néphropathie. L'augmentation de la réabsorption tubulaire du glucose conduit à une augmentation du taux de filtration glomérulaire. L'hypertension artérielle aggrave ces anomalies hémodynamiques (Trevisan et Viberti, 1996).

Les AGE induisent des liaisons croisées des molécules de collagène dans la membrane glomérulaire, affectant son assemblage et son architecture et altérant la matrice mésangiale. Des études expérimentales ont démontré que l'administration d'inhibiteurs des AGE prévient la progression de la néphropathie, et ce, en supprimant la production excessive de facteurs de croissance (Tsuchida et coll., 1999; Soulis et coll., 1999).

L'accumulation de sorbitol dans les glomérules et les tubules rénaux, induite par l'hyperglycémie est un autre facteur causant la néphropathie, et ce par interruption de la régulation osmolaire des cellules et par diminution du *myo*-inositol. Il a été démontré que la supplémentation en *myo*-inositol ou l'administration d'inhibiteurs de l'aldose réductase réduit la protéinurie et le taux de filtration glomérulaire (Pugliese et coll., 1990; Tilton et coll., 1989).

Le glucose exerce un effet néphrotoxique direct: les cellules mésangiales exposées à des concentrations élevées de glucose, synthétisent moins les héparan sulfates. La réduction de la charge électrique négative qui physiologiquement restreint le flux transcapillaire de l'albumine circulante, pourrait contribuer au développement de la protéinurie. De plus, des niveaux élevés de glucose, en induisant la transcription et la sécrétion de facteurs de croissance, stimulent la synthèse de protéines de la matrice extra-cellulaire et inhibent leur dégradation. Parmi les autres mécanismes biochimiques impliqués dans l'effet de l'hyperglycémie sur la néphropathie diabétique on a: l'augmentation de la réabsorption du sodium, la stimulation de l'activité de la PKC et de la production des cytokines, l'altération du transport cationique et les anomalies du métabolisme lipidique (Trevisan et Viberti, 1996).

### **I.2.4.3.3. Neuropathie**

La neuropathie diabétique est une atteinte des nerfs crâniens ou périphériques dont la prévalence augmente avec la durée du diabète. Elle se manifeste par l'épaississement de la membrane basale des capillaires suivi d'une prolifération des cellules endothéliales aboutissant à la perte segmentaire des fibres myélinisées. L'accumulation de glucose dans la cellule nerveuse, conduit à l'activation de l'aldose réductase et de la voie des polyols, contribuant à la production intracellulaire excessive de sorbitol et de fructose. L'activation de la voie du sorbitol, en diminuant le *myo*-inositol, un précurseur de médiateurs responsables de la transmission de signaux extracellulaires, ralentit la conduction nerveuse chez les animaux diabétiques (Nakamura et coll., 1999; Tomlinson et Mayer, 1985; Greene et Lattimer, 1983). Il a été démontré par Gottsater et coll. (1999) que le développement d'une neuropathie parasympathique, 5 ans après le diagnostic de diabète de type 2, est associé à un profil métabolique non favorable incluant l'HI et l'hypertriglycémie.

La neuropathie diabétique entraîne une diminution de la sensibilité douloureuse et thermique conduisant au développement de plaies cutanées. La coexistence d'une neuropathie avec un syndrome d'insuffisance vasculaire est à l'origine du "foot syndrome" caractérisé par des ulcères au niveau des pieds, une complication sévère pouvant conduire à l'amputation. Ces altérations peuvent être accompagnées d'infections des membres inférieurs et de septicémie (Coleman et Brand, 1997; Vinik et coll., 1996). Selon Reiber et coll. (1995), le diabète est la première cause d'amputation non traumatique des membres inférieurs, 51% d'entre elles étant faites chez des patients diabétiques.

#### **I.2.4.4. Complications macrovasculaires et athérosclérose**

Les maladies cardiovasculaires sont la cause la plus importante de morbidité et de mortalité chez les patients diabétiques et le diabète est un facteur de risque de l'athérosclérose (Kleinman et coll., 1988; Pyörala et coll., 1987). Les complications macrovasculaires sont responsables de 80% des décès chez les sujets atteints de DNID, 60% étant attribuable aux maladies ischémiques cardiaques. Le risque athérosclérotique est plus élevé chez les patients mal contrôlés, probablement à cause de l'hyperglycémie et de la dyslipidémie qui y sont classiquement associées (augmentation des VLDL plasmatiques, diminution des HDL et glyco-oxydation des LDL) (Wild et coll., 1999; Gerstein et coll., 1999; Cervený et coll., 1998). Les syndromes athérosclérotiques associés au diabète ne sont pas distinguables de ceux survenant dans la population non diabétique, malgré le fait que l'incidence de l'infarctus myocardique silencieux paraisse plus élevée chez les patients diabétiques (Unger et Foster, 1998). Cependant, l'examen de 23,000 artères coronaires provenant d'autopsies et faites dans 14 pays différents ont démontré une étendue plus importante de ces lésions chez les sujets diabétiques (Robertson et Stron, 1968). Des études cliniques et épidémiologiques ont démontré que la mortalité des sujets diabétiques de type 2 par maladies cardiovasculaires est de 2 à 4 fois plus élevée que celle documentée dans la population générale (Gu et coll., 1998; Wei et coll., 1996; Bell, 1996; Stamler et coll., 1993). Ceci peut être expliqué par la présence de multiples facteurs de risque chez ces sujets. Cependant même après contrôle des facteurs de risque usuels tels que le tabagisme, l'hypertension ou l'hypercholestérolémie, la mortalité reste plus élevée chez les sujets diabétiques que chez les non diabétiques (Harris, 1996; Stamler et coll., 1993). Cet effet pourrait être dû à l'hyperglycémie, un facteur associé à un risque accru de maladies coronariennes (Klein, 1995; Kuusisto et coll., 1994; Wilson et coll., 1991).

La mortalité par attaques cérébrovasculaires est aussi plus élevée chez les individus diabétiques. Une étude standardisée pour l'âge et le sexe a démontré que la mortalité par attaques cérébrovasculaires chez les patients non insulino-dépendants est de deux fois plus élevée que celle documentée dans la population générale. La prévalence de la maladie vasculaire périphérique dans le DNID est de 22% (Howard, 1996).

Au vu de l'importance de la morbidité et la mortalité associée au développement de l'athérosclérose chez les sujets atteints de DNID, une section indépendante de cette thèse sera entièrement consacrée aux complications macrovasculaires associées au DNID et aux mécanismes qui en sont responsables.

### **I.2.5. Diagnostic**

Le début du DNID est souvent insidieux et peu symptomatique. Il n'est pas rare dès lors qu'au moment du diagnostic, des complications chroniques vasculaires, rénales, neurologiques et oculaires soient déjà présentes (Harris et coll., 1999).

Il y a vingt ans, le DNID se définissait par une hyperglycémie plasmatique à jeun (supérieure à 140 mg/dl ou 7.8 mmol/l) et/ou par une hyperglycémie, 2 heures après l'ingestion de 75 g de glucose (supérieure à 200 mg/dl ou 11.1 mmol/l) (World Health Organization, 1985;1980). Récemment l'association américaine du diabète a révisé ces critères de diagnostic et a recommandé que le diabète soit défini par une glycémie à jeun supérieure à 126 mg/dl (7 mmol/l) et qu'une glycémie à jeun variant entre 100 et 126 mg/dl soit considérée comme un état d'intolérance au glucose (Expert Committee, 1997). Des études sont en cours pour comparer ces critères de diagnostic et pour vérifier leurs spécificités (Guerrero-Romero et coll., 1999; Somani et coll., 1999; Shaw et

coll., 1999a; Gomez-Perez et coll., 1998). Outre les niveaux de glycémie à jeun et après surcharge en glucose, les niveaux d'HbA<sub>1c</sub> ainsi que l'épaississement de la membrane basale des muscles capillaires ont été proposés comme critères de diagnostic du diabète. Un épaississement de la membrane basale du muscle capillaire de plus de 180 nm pourrait constituer un autre critère diagnostique de diabète. Cette dernière variable est cependant indépendante de l'hyperglycémie (Unger et Foster, 1998; Bell et coll., 1998).

Actuellement, les critères de diagnostic utilisés ne permettent pas le diagnostic précoce du DNID. L'absence de diagnostic chez environ la moitié des individus souffrant de diabète est responsable du développement de complications micro- et macro-angiopathiques chez ces sujets (Grimaldi et Heurtier, 1999; Horton, 1995). Aux États-Unis les cas non diagnostiqués de DNID varient de 6.1 à 9.9% (Harris MI et coll, 1998). Au vu de l'importance d'un diagnostic précoce de DNID, l'établissement de critères permettant l'identification de personnes à risque de développer un DNID semble indispensable. Des études récentes visent à établir des critères diagnostiques précoces du DNID. Une concentration élevée de molécules ressemblant aux pro-insulines a été rapportée dans le DNID. Dans une étude prospective, Wareham et coll. (1999) ont suivi 1,122 individus non diabétiques pendant 4.5 ans afin d'identifier les facteurs de risque de diabète dans cette population. Leurs résultats suggèrent que les concentrations de pro-insuline plasmatique à jeun pourraient prédire d'une manière indépendante le risque de développement du diabète.

Un autre désavantage, lié aux critères de diagnostic actuellement utilisés, est l'imprécision relative à la classification des cas de diabète diagnostiqué. Ainsi certaines formes de diabète de type 1 ou de type 2 à progression lente sont difficilement classifiables, et ce particulièrement chez les adultes entre 20 et 50 ans ou chez des patients souffrant de DNID et requérant d'une manière



transitoire, l'administration d'insuline (Aizawa et coll., 1995). Diverses études sont actuellement en cours pour élaborer de nouveaux critères permettant une classification plus spécifique des divers types de diabète. Zimmet et coll. (1999) ont mesuré chez 3,672 patients diabétiques, les anticorps anti-îlots (“islet cell antibody”) et les anti-GAD. Ces anticorps circulants sont présents lors du diagnostic de DID chez 80% des patients et résultent, plutôt que sont la cause, d'un processus auto-immun, entraînant la destruction des cellules  $\beta$ . La détection précoce des anticorps anti-îlots et anti-GAD permettrait une classification plus précise des cas de diabète diagnostiqués tout en étant un bon facteur de prédiction des besoins en insuline exogène (Willis et coll., 1998; Ko et coll., 1998).

### **I.2.6. Traitement**

L'objectif du traitement du DNID est de normaliser les altérations métaboliques et ce faisant de réduire les complications à long-terme du diabète. La présence de multiples variables telles la fonction pancréatique, le poids corporel, la RI et l'âge des patients exige un choix prudent parmi les options de traitement disponibles, et rend nécessaire l'instauration de plans thérapeutiques individuels (Unger et Foster, 1998).

#### **I.2.6.1. Diète et exercice physique**

Les interventions nutritionnelles dans le DNID visent à diminuer la surcharge alimentaire et à étaler le temps d'absorption des nutriments. La thérapie diététique du DNID inclut de multiples repas, une diète riche en fibres et en aliments à faible indice glycémique et vise à diminuer l'absorption des hydrates de carbone. Des études effectuées chez des sujets normaux et des patients diabétiques de type 2 ont démontré que la réduction de la prise alimentaire en hydrates de carbone

diminue d'une manière aigüe la glycémie, les niveaux plasmatiques d'insuline et la concentration urinaire de peptide-C (Jenkins et Jenkins, 1996). L'effet d'une supplémentation par différents nutriments tels le magnésium, les vitamines et les acides gras insaturés sur le profil glycémique et lipidique des patients atteints de DNID est actuellement l'objet de diverses études. Pi-Sunyer et coll. (1999) ont évalué l'effet de repas préparés, tenant compte des critères de l'association américaine du diabète, sur la santé des patients. Ces auteurs ont suggéré que cette méthode puisse éliminer la complexité des recommandations diététiques multiples dans le contrôle du diabète de type 2.

L'exercice physique régulier joue un rôle important dans la prévention et le traitement du DNID. L'augmentation de la dépense énergétique, surtout combinée à une restriction diététique, diminue le poids et la graisse corporelle, augmente la sensibilité à l'insuline, améliore le contrôle glycémique à long terme et le profil lipidique, diminue la pression sanguine et le risque d'athérosclérose. L'efficacité de cette pratique semble dépendre davantage de la fréquence à laquelle est fait l'exercice plus que de sa durée (Bloomgarden, 1999; Giacca et coll., 1998; Horton, 1996).

#### **I.2.6.2. Hypoglycémiantes oraux**

L'usage des hypoglycémiantes est indiqué lorsque malgré une bonne compliance aux recommandations diététiques, un bon contrôle glycémique ne peut être obtenu.

Les sulphonylurées sont des hypoglycémiantes oraux utilisés depuis 1955 dans le traitement du DNID. Ces agents stimulent la synthèse de l'insuline, diminuent le seuil glycémique requis pour une réponse sécrétoire donnée des cellules  $\beta$  ou potentialisent l'action de l'insuline. La dose et la durée d'action de ces agents varient selon leur type et leur génération (Lebovitz, 1994).

Les biguanides comme la metformine sont des drogues qui augmentent la sensibilité à l'insuline en stimulant la captation du glucose par les tissus périphériques et qui inhibent la néoglucogenèse.

Les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase constituent un autre type d'agents hypoglycémiants. Un de ces inhibiteurs, l'acarbose est un oligosaccharide d'origine microbienne qui inhibe d'une manière compétitive l'amylase et les  $\alpha$ -glucosidases liées aux membranes. L'ingestion d'acarbose avec le repas ralentit l'absorption des hydrates de carbone et ce faisant réduit l'augmentation de glycémie suite à un repas riche en hydrates de carbone complexes (Amatruda, 1996; Chiasson et coll., 1994).

D'autres types de drogues comme les thiazolidinediones améliorent l'action de l'insuline et diminuent la RI. L'effet hypoglycémiant de ces agents semble être accompagné d'une réduction de la concentration plasmatique d'insuline, de triglycérides et d'acides gras non-estérifiés (Day, 1999).

### **1.2.6.3. Insulinothérapie**

Contrairement au cas de DID pour lesquels l'insuline est essentielle au maintien de la vie, un traitement par l'insuline n'est employé qu'en dernier recours, chez les patients atteints de DNID, pour améliorer le contrôle glycémique. L'usage combiné d'insuline et de médicaments hypoglycémiantes pourrait éviter l'insulinothérapie intensive et l'HI consécutive. Le succès de l'insulinothérapie dépend de la motivation des patients, de leur compliance et de leur capacité à recevoir une éducation adéquate (Edelman et Henry, 1996).

La thérapie conventionnelle à l'insuline a pour objectif de prévenir les symptômes d'hypo- et d'hyperglycémie, sans avoir d'objectifs spécifiques quant aux niveaux de glucose plasmatique. Par contre, la thérapie intensive à l'insuline vise à maintenir la glycémie à jeun entre 70 à 120 mg/dl (3.9-

6.7 mmol/l), la glycémie post-prandiale à moins de 180 mg/dl (10 mmol/l) et l'HbA<sub>1c</sub> inférieure à 6.05%. Ce contrôle glycémique strict pourrait prévenir les complications associées au DID (The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group, 1993). Les résultats d'une vingtaine d'années d'étude ont démontré l'effet bénéfique d'un bon contrôle glycémique sur les complications microvasculaires des sujets atteints de DNID (Leslie, 1999). D'autres études démontrent que l'insulinothérapie intensive peut aussi prévenir ou retarder les complications microvasculaires à long terme associées au DNID (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998; Barranco, 1998; Turner et Clapham, 1998). De plus, l'hyperglycémie étant un facteur de risque indépendant des maladies cardiovasculaires, cette thérapie pourrait réduire les complications macrovasculaires du diabète. L'insulinothérapie intensive présente cependant, certains limites ou écueils tels les risques d'hypoglycémie, le gain pondéral, les problèmes d'éducation des patients et de leur suivi (Drouin, 1997). En outre, le débat existant sur les effets pro-athérogéniques potentiels de cette thérapie limite encore son application.

Malgré le fait que le traitement du diabète puissent prévenir ou retarder les complications à long terme du diabète et réduire la mortalité qui y est associée, le contrôle du diabète reste difficile chez presque un tiers des sujets diabétiques non diagnostiqués. En outre, il reste à déplorer que, même au 21<sup>ème</sup> siècle, beaucoup de sujets diabétiques ne reçoivent pas encore de thérapie adéquate (Bell et coll., 1998).

### **I.3. Athérosclérose**

L'athérosclérose est une pathologie multifactorielle responsable de l'expression clinique des maladies coronariennes (Sharrett et coll., 1999), cérébrovasculaires et vasculaires périphériques (Mas, 1998) telles l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (Verhaeghe, 1998).

Les maladies cardiovasculaires représentent la cause principale de mortalité aux États-Unis, en Europe et dans une partie de l'Asie (World Health Organization, 1985a; Levy, 1981). Au Japon, l'incidence des ischémies coronariennes dues à l'athérosclérose augmente graduellement (Yutani et coll., 1999). Au Canada, 37% de l'ensemble des décès survenus en 1995 ont été attribués aux maladies de l'appareil circulatoire, 21% étant associés aux maladies cardiaques ischémiques (Heart and Stroke Foundation, 1997). On y a cependant observé de 1981 à 1991 une diminution de 22 à 16% des décès causés par l'infarctus du myocarde (Naylor et chen, 1994). Cette diminution peut être expliquée en partie par l'utilisation des agents  $\beta$ -bloquants et de l'aspirine, par l'usage de la thérapie thrombolytique (Rogers et coll., 1994), ainsi que par l'identification des facteurs de risque responsables des maladies cardiovasculaires (Hunink et coll., 1997). Dès 1970, les résultats des études épidémiologiques à long terme ont permis d'identifier les facteurs de risque majeurs des maladies coronariennes, tels l'hypercholestérolémie, le diabète, l'hypertension, l'histoire familiale, le tabagisme et la sédentarité (Dawber, 1980; Kannel et McGee, 1979). Il est à noter que presque 80% de la population québécoise présentent au moins un des facteurs de risque modifiables cités plus haut (Health Canada, 1995).

L'athérosclérose est caractérisée par un développement focal de lésions athéromateuses dans les artères de gros et moyen calibre. Le processus pathologique est initié par l'accumulation de lipoprotéines dans l'espace sous-intimal du vaisseau sanguin, et par l'adhésion des monocytes à

l'endothélium. Suite à leur migration vers l'espace sous-endothélial, les monocytes se différencient en macrophages qui, par leur capacité à accumuler le cholestérol, se transforment en cellules spumeuses. Les facteurs de croissance, les cytokines et d'autres substances vasoactives sécrétées par les macrophages, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les plaquettes, favorisent la progression de la lésion athéromateuse. Au stade ultérieur de la maladie, les cellules musculaires lisses migrent de la média vers l'intima, et y prolifèrent; elles y contribuent à l'augmentation du tissu conjonctif. La quantité accrue des protéines du tissu conjonctif et leur changement de composition (St. Clair, 1997; Stary et coll., 1995; Ross, 1995), facilitent la rétention des lipoprotéines dans l'espace sous-endothélial.

### **1.3.1. Artère saine**

L'artère ne sert pas seulement à véhiculer le sang vers les différents organes, mais est aussi capable de réguler de façon complexe le débit sanguin en fonction des besoins de ces organes, assurant l'homéostasie vasculaire. Différentes tuniques, de nombreuses cellules et molécules permettent cette fonction harmonieuse et adaptée.

L'artère normale est constituée de 3 couches: 1) l'intima nommée généralement endothélium est la tunique la plus interne tapissée d'une seule couche cellulaire, les cellules endothéliales, constituant l'interface entre la paroi artérielle et le sang circulant; 2) la média ou tunique moyenne constituée de cellules musculaires lisses dont la contraction et la relaxation régulent le débit sanguin et la pression artérielle; 3) l'adventice, la tunique la plus externe, qui comporte des nerfs et de petits vaisseaux sanguins nourriciers de l'artère. Une couche élastique limitante, constituée d'une

membrane basale mince recouverte de fibres de collagène, de fibres élastiques, de cellules musculaires lisses et de quelques fibroblastes, sépare la média de l'intima et de l'adventice.

### **1.3.2. Phases de l'athérosclérose**

#### **1.3.2.1. Lésion primaire ou strie lipidique**

Les premières étapes de l'athérosclérose se déroulent dans l'espace sous-endothélial. Les facteurs initiant le développement de la lésion athéromateuse sont d'une part les particules de LDL cholestérol qui s'infiltrent à travers l'endothélium dans l'espace sous-endothélial et y sont modifiées (oxydation ou glycation), et d'autre part les monocytes qui, après avoir adhérer aux cellules endothéliales activées, pénètrent dans la paroi vasculaire. Les monocytes se différencient alors en macrophages qui, en captant les esters de cholestérol dérivés des LDL, se transforment en cellules spumeuses (Napoli et coll., 1997; Stary, 1994).

L'accumulation de cellules inflammatoires et de lipides dans la paroi vasculaire caractérise la strie lipidique. Visible dès l'enfance, la strie lipidique se traduit macroscopiquement par un épaissement jaunâtre de l'intima. Elle est réversible (Verges, 1998; Ross, 1995; Stary, 1994; Badimon et coll., 1993).

#### **1.3.2.2. Lésion intermédiaire ou fibro-lipidique**

La lésion fibro-lipidique est composée d'un nombre élevé de macrophages, de lymphocytes-T, ainsi que d'un nombre varié de cellules musculaires lisses. Une matrice conjonctive relativement peu développée contenant des fibres de collagène, des fibres élastiques et des protéoglycans entoure ces cellules. À cette phase, la lésion contient des cellules spumeuses en couche (Katsuda et coll.,

1992). Les substances chimiotactiques, comme le PDGF, sécrétées par les macrophages et les cellules endothéliales, induisent la prolifération des cellules musculaires lisses et leur migration de l'intima vers la média (Tallquist et coll., 1999; Badimon et coll., 1993). Les cellules musculaires lisses produisent une quantité importante de matrice extracellulaire dans l'espace sous-endothélial.

Les lipides de la lésion intermédiaire sont constitués de cholestérol et de phospholipides, mais surtout d'esters de cholestérol. Ils sont pour la plupart contenus dans les macrophages, les cellules musculaires lisses et les cellules spumeuses; une petite quantité de gouttelettes lipidiques finement dispersées et des particules vésiculaires sont toutefois visibles dans l'espace extracellulaire (van Reyk et Jessup, 1999; Sary et coll., 1994).

Le développement et la progression des lésions intermédiaires dépendent des forces mécaniques qui agissent au niveau de la paroi vasculaire. Une de ces forces dénommée le "low shear stress", par sa capacité à augmenter le temps de résidence ainsi que le temps et la surface d'interaction entre diverses particules sanguines, telles les LDL et les leucocytes, et la paroi artérielle, augmente leur diffusion trans-endothéliale (Dong et Lei, 2000; Glacov et coll., 1988). Les forces mécaniques paraissent aussi causer un épaissement intimal adaptatif variable selon les niveaux plasmatiques de lipoprotéines (Sary et coll., 1992). La présence de cellules musculaires lisses, l'abondance de la matrice intracellulaire, l'accumulation excessive de lipoprotéines et de macrophages, la présence dans l'intima de cellules spumeuses et de gouttelettes lipidiques (Plutzky, 1999; Bauters et coll., 1998; Sary, 1994) constituent autant de signes de progression de la maladie athéromateuse.

Chez les sujets ayant des niveaux plasmatiques élevés de lipoprotéines athérogéniques, tels les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale homozygote, les lésions intermédiaires



progressent rapidement. Il est à noter que chez les sujets âgés, un épaissement intimal et des lésions avancées sont notées dans des sites non-vulnérables, même en l'absence de dyslipidémie (Agerbaek et coll., 1999; Stary, 1994).

### **1.3.2.3. Lésions avancées ou plaque fibreuse**

La lésion avancée est couverte par une coiffe dense de tissu conjonctif contenant de nombreuses cellules musculaires lisses, des macrophages et des lymphocytes T, recouvrant un core nécrotique central. Après leur migration vers l'intima, les cellules musculaires lisses produisent en grande quantité une matrice de tissu conjonctif, constituée de collagène, de fibres élastiques et de protéoglycans. L'accumulation continue de tissu conjonctif et de lipides extracellulaires ainsi que la présence massive de cellules musculaires lisses et de macrophages remplis de cholestérol donne naissance à la plaque fibreuse (Newby et Zaltsman, 1999; Bauters et coll., 1998; Ross, 1995; Ross, 1993). Outre l'épaississement artériel provoqué par la prolifération des cellules musculaires lisses, ces cellules jouent un rôle actif dans la sécrétion de PDGF (Libby et coll., 1988), un facteur à la fois mitogénique et chémoattractant.

La nécrose des cellules, induite par le cholestérol libre, la lyso-phosphatidyl-choline et les stérols oxydés (Kellner-Weibel et coll., 1999; Tabas, 1997; Steinberg et coll., 1996), entraîne l'apparition de dépôts lipidiques extracellulaires.

Selon le phénomène de remodelage vasculaire décrit par Glacov et coll. (1988), le développement de la plaque à l'intérieur du vaisseau est longtemps compensé par un élargissement de la taille de ce vaisseau. Au stade d'élargissement maximal, le développement de la plaque aboutit au rétrécissement progressif de la lumière vasculaire, limitant le débit sanguin et entraînant des

symptômes d'angor. La rupture de la plaque sera pour sa part, le facteur déclenchant d'un évènement coronarien. Si la présence d'une coiffe fibreuse épaisse et dense est un paramètre de stabilité d'une plaque, une plaque non uniforme, mince sur les côtés et riche en macrophages est reconnue comme instable (Zhou et coll., 1999; Gronholdt et coll., 1998; Fuster et coll., 1990). Il est à noter qu'outre les facteurs locaux, divers facteurs systémiques tels l'infection, l'auto-immunité et les gènes pourraient influencer la rupture de la plaque athéromateuse (Rothwell et coll., 2000).

### **1.3.3. Cellules de la lésion athéromateuse**

#### **1.3.3.1. Endothélium**

Les cellules endothéliales jouent un rôle critique dans l'homéostasie vasculaire (Ross, 1990) et assument de nombreuses fonctions (Shimokawa, 1999; Carter et coll., 1997; Massy et Keane, 1996; Ross, 1995) telles que:

- le maintien d'une surface non adhérente pour les leucocytes et les plaquettes sanguines;
- le contrôle d'échange de fluides et de nutriments entre le plasma et la paroi artérielle;
- le maintien du tonus vasculaire par la libération de molécules vasodilatatrices telles le NO et la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), et vasoconstrictives telles l'endothéline et l'angiotensine-II;
- la sécrétion de cytokines telles le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 et de facteurs de croissance tels le PDGF et le FGF;
- la formation et le maintien de la matrice du tissu conjonctif incluant la membrane basale et le collagène;
- le maintien d'une surface non thrombogénique par la production de molécules telles la PGI<sub>2</sub>, les héparan sulfates et l'ecto-adénosine-diphosphatase;

- l'équilibre entre les activités pro- et anti-coagulantes, par la synthèse d'une variété de substances pro-coagulantes (le facteur de von Willebrand, les facteurs V et VIII et le facteur tissulaire), anti-coagulantes (la thrombomoduline) et fibrinolytiques (le PAI-1).

### **1.3.3.2. Macrophages dérivés des monocytes**

Les monocytes sanguins passent occasionnellement à travers l'endothélium sain et sont ainsi parfois détectés de manière isolée dans une paroi vasculaire intacte. La présence massive de monocytes dans l'intima vasculaire est considérée comme l'évènement biologique le plus précoce de l'athérosclérose. Ce phénomène est observé lors de l'induction expérimentale de lésions athéromateuses dans divers modèles expérimentaux (Schwartz et coll., 1991; Ross, 1986).

Le recrutement des monocytes dans l'intima artérielle est un processus d'origine inflammatoire impliquant une variété de mécanismes, dont l'essentiel constitue l'adhésion monocyttaire aux cellules endothéliales. Ce contact paraît plus probable au niveau des sites vasculaires où les conditions hémodynamiques occasionnent un temps de résidence prolongé du sang à la surface endothéliale. L'adhésion des monocytes, est un phénomène actif impliquant l'expression de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium et la sécrétion d'une variété de cytokines chémoattractrices telles l'IL-1 $\beta$  et le "monocyte colony stimulating factor ou M-CSF". Des glycoprotéines exprimées à la surface des monocytes sont aussi impliquées dans ce processus (Chiac, 1998; Schwartz et coll., 1993). L'adhésion des monocytes est suivie par leur migration à travers l'endothélium. Ce dernier processus semble stimulé par certains facteurs chémoattractants tels les LDL oxydées et le "monocyte chemoattractant protein-1" (MCP-1). Le MCP-1, produit par les cellules endothéliales et musculaires lisses, est un facteur chimiotactique spécifique aux monocytes

(Reckless et coll., 1999; Aiello et coll., 1999; Yoshimura et coll., 1989). Sa synthèse est stimulée en présence de LDL oxydées (Cushing et coll., 1990).

Les monocytes présents dans l'espace sous-endothélial, sont activés et se différencient en macrophages (Schwartz et coll., 1993). Ils possèdent de multiples récepteurs distincts dans la membrane cellulaire, incluant des récepteurs pour les LDL, des récepteurs "scavengers" avec des sites reconnaissant les LDL oxydées, des récepteurs Fc et des récepteurs pour les protéines glyquées. Une liaison à chacun de ces récepteurs peut favoriser la libération des cytokines, des facteurs de croissance, des protéases, des prostaglandines et des radicaux libres. Les macrophages sécrètent en outre des protéines importantes pour le métabolisme des lipoprotéines comme la LPL et l'apo E (Kraemer, 1992). Ces macrophages accumulent des lipides et captent, par leurs récepteurs "scavengers", les LDL oxydées. La concentration intracellulaire de cholestérol ne contrôlant pas négativement l'expression de ces récepteurs, les macrophages se transforment en cellules spumeuses (van Reyk et Jessup, 1999; Badimon et coll., 1993; Schwartz et coll., 1991; Gerrity et coll., 1979). Il a été démontré récemment que les macrophages captent les VLDL modérément oxydées par les récepteurs "scavengers"; l'oxydation des VLDL augmentent leur captation macrophagique de l'ordre de 2 fois (Jong et coll., 2000).

Les macrophages jouent un rôle important dans la progression de la lésion athéromateuse. Ils prolifèrent, incorporent des lipides et oxydent les LDL (Chisolm et coll., 1999; Natarajan et coll., 1997; Badimon et coll., 1993; Rosenfeld et Ross, 1990; Parthasarathy et coll., 1986). Ils produisent des facteurs de croissance qui induisent la prolifération des monocytes, des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales et, stimulent la néovascularisation de la plaque. Les macrophages activés produisent enfin, une série de molécules chimiotactiques pour les monocytes et les cellules

musculaires lisses (Ross, 1995). Finalement ils libèrent des enzymes telles les métallo-protéinases qui dégradent la matrice et contribuent ainsi à la déstabilisation et à la rupture de la plaque athéromateuse (Newby et Zaltsman, 1999). Le TNF- $\alpha$  et les LDL oxydées augmentent l'expression des métallo-protéinases par les macrophages dérivés des monocytes humains, ce qui contribue à la dégradation de la matrice extracellulaire (Rajavashisth et coll., 1999; 1999a).

### **1.3.3.3. Cellules musculaires lisses**

Malgré leur présence dans certains segments de la couche intimale, les cellules musculaires lisses constituent la composante majeure de la couche médiale. S'attachant à la fois à la matrice du tissu conjonctif et aux cellules voisines, ces cellules assurent le maintien du tonus artériel. À la naissance, un espace virtuel existe entre la membrane basale sous-jacente à l'endothélium et la couche élastique interne de l'artère. Avec l'âge, quelques cellules musculaires lisses apparaissent à l'intérieur de l'intima, entraînant ainsi un épaissement uniforme de l'intima. Ces régions deviendront plus sensibles à l'accumulation de cellules inflammatoires, de cellules musculaires lisses et de lipides (Owens et coll., 1997; Ross, 1995; Owens, 1995). L'expression de récepteurs pour les LDL et les VLDL, ainsi que l'expression de récepteurs "scavengers" à la surface des cellules musculaires lisses et des macrophages rendent compte de la transformation de ces cellules en cellules spumeuses au cours de l'athérogenèse (Hiltunen et coll., 1998).

La stimulation des cellules musculaires lisses par différents agents pathogéniques entraîne l'expression de facteurs de croissance (tels le PDGF, le FGF, l'IGF-I) et de cytokines (*i.e.* l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ ), par ces cellules. Ces molécules exercent à leur tour divers effets autocrines et paracrines et stimulent le processus d'apoptose (Hishikawa et coll., 1999; Libby et coll., 1988). La

susceptibilité des cellules musculaires lisses, à être activées par ces substances, dépend en partie de leur phénotype. Au sein de l'artère, deux phénotypes de cellules musculaires lisses ont été distingués: le phénotype contractile (prédominant, riche en myofilaments cytosoliques) et responsable des changements vasomoteurs; le phénotype synthétique, ayant un Golgi et un réticulum endoplasmique rugueux plus développés, et exprimant des gènes qui contrôlent la croissance et induisent la synthèse de la matrice cellulaire. La transformation des cellules musculaires lisses du phénotype contractile vers le phénotype synthétique entraîne la migration de ces cellules vers l'intima, ainsi que leur prolifération en réponse à des facteurs de croissance et chimiotactiques (Shuster et Herman, 1998; Ross 1990; Stary et coll., 1992; Raines et Ross, 1993).

Selon leur origine, les cellules musculaires lisses pourraient répondre aux stimuli, proliférer et synthétiser la matrice de manière variable. Ainsi, le type de tissu conjonctif qui entoure les cellules musculaires lisses de la média d'une artère saine diffère de celui entourant ces cellules dans les lésions athéromateuses: l'artère saine démontre plus de fibres de collagène, et l'artère athéromateuse plus de protéoglycans parsemés de fibres de collagène. La nature de la matrice entourant les cellules musculaires lisses pourrait déterminer la quiescence ou la multiplication de ces cellules en réponse à divers stimuli (Tummalapalli et Tyagi, 1999; St. Clair, 1997; Stary, 1995). À noter que les interactions entre les cellules musculaires lisses et la matrice extracellulaire peuvent aussi conduire à l'expression de chémokines par les macrophages (Weissberg, 1999; Ross, 1999).

#### **1.3.3.4. Lymphocytes-T**

Une quantité importante de lymphocytes-T a été détectée dans les lésions athéromateuses, suggérant que ces cellules puissent être une composante immunitaire de l'athérogenèse (Hansson,

1997; 1989). On note plus particulièrement dans ces lésions, la présence de cellules CD4+ et CD8+, (Libby et Hansson, 1991) et ceci indifféremment des facteurs de risque impliqués dans la pathogenèse de la maladie. La prolifération des lymphocytes-T induite par l'IL-2, pourrait induire l'expansion de la lésion. Les lymphocytes-T activés pourraient à leur tour être chimiotactiques pour les macrophages et les activer en libérant l'IFN $\gamma$ , le "granulocyte-macrophage colony-stimulating factor" (GM-CSF) ou le TNF- $\alpha$  (Favero et Lafont, 1998; Ross, 1993).

#### **1.3.3.5. Plaquettes sanguines**

Lorsque l'endothélium est intact, les plaquettes sanguines jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité vasculaire, en exerçant un rôle protecteur contre l'hémorragie spontanée. Dans une situation pathologique telle l'athérosclérose, les plaquettes adhèrent à la paroi vasculaire, sont activées, recrutées, et participent au processus de coagulation, d'agrégation (formation de ponts moléculaires entre les plaquettes et le réseau de fibrine) et de rétraction du caillot (Drouet et coll., 1998).

Les plaquettes adhèrent à l'endothélium altéré. Leur activation conduit à la production de prostaglandines, telles le thromboxane A<sub>2</sub> (une des substances les plus vasoconstrictrices et puissantes dans l'agrégation plaquettaire), et de leucotriènes, qui amplifient la réponse inflammatoire. Les plaquettes activées peuvent s'accumuler dans la paroi artérielle et recruter des plaquettes additionnelles dans un thrombus en expansion. La glycoprotéine IIb/IIIa, un récepteur appartenant à la superfamille des intégrines est exprimée à la surface des plaquettes durant leur activation et durant la formation du thrombus (Bombeli et coll., 1998; Badimon et coll., 1997). Les plaquettes activées libèrent des granules qui contiennent une vaste variété de substances ayant des propriétés

mitogéniques et chimiotactiques telles le PDGF et le TGF $\beta$ . Ces facteurs contribuent à l'infiltration des monocytes ainsi qu'à la prolifération des cellules musculaires lisses et des monocytes (Bombeli et coll., 1998; Fuster et coll., 1992).

#### **I.3.3.6. Interaction des cellules impliquées dans l'athérosclérose**

Les branches, les bifurcations et les courbures artérielles sont des sites vasculaires spécifiques où le flux sanguin peut être altéré par le stress de cisaillement ou "Shear stress" et la turbulence du courant sanguin (Stanton, 1999; Gotlieb et Langille, 1996). Des molécules d'adhésion spécifiques, répondant à ces types de stress sont exprimées par l'endothélium recouvrant ces sites spécifiques. Ces molécules, dont les sélectines, les molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM) et les molécules d'adhésion vasculaire (VCAM) sont responsables de l'adhésion, de la migration et de l'accumulation des monocytes et des lymphocytes-T et agissent comme récepteurs pour les intégrines exprimées à la surface des monocytes et des lymphocytes-T. Les molécules chémoattractrices générées par l'endothélium, les cellules musculaires lisses et les monocytes, telles le MCP-1, l'ostéopontine et les LDL modifiées, attirent les monocytes et les lymphocytes-T dans la paroi artérielle (Giachelli et coll., 1998; Springer et Cybulsky, 1996).

L'activation des monocytes et des lymphocytes-T dans la lésion conduit à la surexpression de certains antigènes à leurs surfaces, telles les molécules ressemblants à la mucine se liant aux sélectines, les intégrines se liant aux molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines et les récepteurs se liant aux molécules chémoattractrices. Ces interactions ligands-récepteurs activent davantage les cellules mononucléées, induisent la prolifération cellulaire et déterminent les sites des réponses inflammatoires et ceux des lésions (Springer et Cybulsky, 1996).



ICAM-1 et VCAM-1, sont exprimées de façon précoce à la surface des cellules endothéliales, recouvrant les aires vasculaires susceptibles à l'athérosclérose. La dyslipidémie, et en particulier l'hypercholestérolémie, augmente l'expression de ces molécules d'adhésion. Dans les lésions avancées, les cellules intimaales expriment, à leur tour, ces molécules d'adhésion (Iiyama et coll., 1999; Nakashima et coll., 1998).

Les disintégrines, une classe de molécule récemment découverte et ressemblante aux métalloprotéinases ou aux protéines riches en cystéine, ont été identifiées au niveau de l'endothélium, des cellules musculaires lisses et des macrophages (Herren et coll., 1997). Ces protéines transmembranaires qui paraissent impliquées dans les interactions entre les cellules, contiennent une séquence analogue à celle des métalloprotéinases dans leur segment extracellulaire qui leur permet d'activer des molécules telles le TNF- $\alpha$  (Black et coll., 1997). Les disintégrines sont absentes dans l'artère saine mais présentes dans les lésions athéromateuses (Herren et coll., 1997).

Les macrophages et les cellules spumeuses présents dans les lésions athéromateuses constituent une source locale de facteurs activant le plasminogène, un médiateur phospholipidique semblant exercer un rôle pro-athérogénique et pro-thrombotique. Les plaquettes activées stimulent l'expression des récepteurs à la thrombine à la surface des cellules musculaires lisses, potentialisant ainsi la réponse mitogénique et vasoconstrictrice de ces cellules à la thrombine. L'activation des plaquettes par la thrombine induit la sécrétion d'IL-8 et de MCP-1 par les monocytes et stimulent ainsi leur adhésion et leur migration à travers l'endothélium vasculaire. Les plaquettes activées, exprimant la P-sélectine, participent à l'interaction des leucocytes avec les cellules endothéliales et les surfaces sous-endothéliales des sites artériels sujets aux contraintes de cisaillement (Drouet et coll., 1998).

#### 1.3.4. Étiologie de l'initiation des lésions athéromateuses

La dysfonction endothéliale et les anomalies du métabolisme lipidique paraissent jouer un rôle primordial et synergistique dans le développement de la plaque athéromateuse.

La durée de vie normale d'une cellule endothéliale est estimée à 30 ans environ. Au-delà de ce laps de temps, les cellules endothéliales sont remplacées par de l'endothélium régénéré. Ces cellules régénérées semblent avoir une capacité diminuée à libérer des facteurs vasorelaxants tels que le NO, et à maintenir leurs propriétés anti-agrégantes. Par opposition, la libération de facteurs vasoconstricteurs est maintenue, voire même augmentée, dans les vaisseaux sanguins lésés (Vanhoutte et Boulanger, 1995; Gohra et coll., 1995). Des niveaux élevés de LDL plasmatiques, en particulier lorsque ces lipoprotéines sont oxydées, petites et denses, sont associés à l'augmentation de leur infiltration dans l'espace sous-endothélial. Ce dernier processus aboutit à l'oxydation des LDL par l'action des lipoxgénases, d'espèces radicalaires oxygénées, de peroxynitrite, de myéloperoxydase et de la LPL (Podrez et coll., 1999; Balagopalakrishna et coll., 1999). Les LDL oxydées sont cytotoxiques et inhibent la dilatation endothéliale dépendante du NO. Les LDL oxydées en induisant l'expression de molécules d'adhésion et de MCP-1, contribuent aussi au recrutement de nouveaux monocytes dans l'espace sous-endothélial et fournissent de nouveaux précurseurs des cellules spumeuses. La présence des cellules spumeuses dans l'intima est considérée comme un marqueur cellulaire de l'accumulation pathologique des lipoprotéines, particulièrement dans les régions susceptibles à l'athérosclérose (Boring et coll., 1998; Verges, 1998; Hajjar et Haberland, 1997; Massy, 1996).

Plusieurs hypothèses ont suggéré la contribution de divers éléments dans l'initiation de l'athérosclérose. La contribution de certains facteurs a été sujette à la revue de littérature suivante.

#### 1.3.4.1. Contribution des lipoprotéines

Des concentrations élevées de LDL plasmatiques entraînent l'infiltration de ces lipoprotéines dans la paroi artérielle et leur captation subséquente par les macrophages et les cellules musculaires lisses. D'autre part, la liaison des LDL aux protéoglycans de la matrice extracellulaire, en retenant ces particules dans l'espace sous-endothélial, contribue à l'augmentation de la captation de ces lipoprotéines par les macrophages (Williams et Tabas, 1998; Boréon et coll., 1998).

- **la concentration des lipoprotéines:** l'accumulation des lipoprotéines plasmatiques dans l'intima est associée à des réactions cellulaires spécifiques, constituant les événements fondamentaux responsables de l'initiation des lésions (Syvanne et coll., 1998; Wilson, 1994; Getz, 1990). La taille et la complexité des lésions est fonction de cette accumulation. Le seuil de concentration des lipoprotéines plasmatiques induisant l'accumulation de ces particules dans l'intima et les réactions pathologiques cellulaires qui en découlent, restent toutefois à être clarifiées.

- **le temps de résidence:** l'existence de forces mécaniques au niveau de certaines régions de l'arbre vasculaire augmente le temps de résidence des lipoprotéines athérogéniques à la surface luminale et favorise leur infiltration dans la paroi artérielle (Knobler et coll., 1998; Fatourae et coll., 1998).

- **les modifications des lipoprotéines:** les lipoprotéines captées dans l'espace sous endothélial y sont modifiées. Plusieurs études ont mis en évidence une association entre la présence de LDL petites, denses et riches en triglycérides, la propension de ces LDL à être oxydées et le risque coronarien (Griffin et coll., 1999; Byrne, 1999; Austin et Edwards, 1996). La présence en grand nombre de LDL oxydées au niveau des lésions athérosclérotiques ainsi que le potentiel inhibiteur des antioxydants dans le développement des lésions athéromateuses dans divers modèles

expérimentaux (Galle et coll., 1999; Chopra et Turnham, 1999; Stephen et coll., 1996; Andalibi et coll., 1993; Yla-Herttuala, 1989), suggèrent un rôle pathogénique central du stress oxydatif dans l'athérosclérose. Les LDL oxydées sont internalisées par les récepteurs "scavengers" des macrophages, ainsi que par les cellules musculaires lisses (de Villiers et Smart, 1999; Llorente-Cortes et coll., 1998; Massy, 1996). Alors que les lipides sont réestérifiés pour le stockage, la dégradation des lipides oxydés par les macrophages n'a pas lieu ou semble minime (Lougheed et coll., 1991). Les LDL oxydées possèdent des propriétés chimiotactiques pour les monocytes circulants, stimulant la synthèse de MCP-1 et la production de cytokines telles le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  par les cellules vasculaires (Klouche et coll., 1998; Frostegard et coll., 1997; Jovinge et coll., 1996; Ohlsson et coll., 1996; Cushing et coll., 1990). Elles favorisent l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et augmentent la perméabilité de la barrière endothéliale (Verges, 1998). Les LDL modifiées stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses et la réplication des macrophages dans la lésion athéromateuse (Chatterjee et Ghosh, 1996). Elles augmentent l'activité pro-coagulante de l'endothélium, ainsi que la synthèse endothéliale de PAI-1 (Allison et coll., 1999). Elles inhibent la vasodilatation endothéliale dépendante du NO (Yudkin, 1999; Dichtl et coll., 1999).

- **le niveau de cholestérol plasmatique:** en conditions normales, l'intima contient quelques macrophages isolés. L'hypercholestérolémie augmente le passage des monocytes de la circulation vers l'intima. Des études épidémiologiques ont rapporté une relation entre les niveaux élevés de cholestérol plasmatique et l'abondance des stries lipidiques dans la lésion athéromateuse (Napoli et coll., 1999; Euroaspire Study Group, 1997). En outre, une diminution des niveaux du cholestérol sanguin a été reliée à une réduction d'évènements coronariens (Nordestgaard et coll., 1994; Brown et coll., 1990).

#### I.3.4.2. Contribution de l'infection

Plusieurs études ont suggéré des associations entre l'incidence de l'athérosclérose et l'infection par deux types de microorganismes: le virus de l'herpes et le *Chlamydia Pneumoniae*. Ces agents infectieux ont été identifiés dans les lésions athéromateuses coronariennes (Libby et coll., 1997).

**Virus et athérosclérose:** la première preuve de l'implication d'agents infectieux dans l'athérosclérose provient d'expériences impliquant des virus de l'herpes. Dans ce travail, Fabricant (1981) se référait à l'induction, par le virus de l'herpes, d'une maladie "ressemblant à l'athérosclérose" chez les oiseaux. Depuis, deux virus humains, les virus de l'herpes simplex de type I et le cytomégalovirus, ont été impliqués dans l'infection des cellules artérielles, la transformation des cellules spumeuses, la prolifération des cellules musculaires lisses, le dysfonctionnement des cellules endothéliales, l'expression des molécules d'adhésion et la production de cytokines par les monocytes/macrophages (Nicholson et Hajjar, 1999; Nicholson et Hajjar, 1998). Bien que les arguments expérimentaux impliquant les virus de l'herpes dans l'athérogenèse soient solides, les arguments clinico-anatomiques sont faibles, voire contradictoires. Cette fragilité des données histopathologiques pourrait être attribuable à une particularité remarquable des cytomégalovirus qui peuvent *in vitro* altérer les fonctions des cellules infectées, puis s'évanouir sans laisser la moindre signe de leur intervention (Legrand et coll., 1997).

**Bactéries et athérosclérose:** les bactéries ont étoffé la liste des microbes potentiellement impliqués dans le développement de l'athérosclérose. Un titre plus élevé d'anticorps contre le *Chlamydia pneumoniae*, une bactérie gram-négative, est rapporté chez les victimes d'accidents coronariens (Saikku et coll., 1988). L'exposition des macrophages à cet agent pathogène augmente

la captation des LDL, leur oxydation et la formation des cellules spumeuses (Byrne et Kalayoglou, 1999; Kalayoglu et coll., 1999). Bien qu'il n'existe pas de preuve convaincante que cette bactérie soit capable d'induire à elle seule des lésions athéromateuses (Hoffmeister et coll., 2000), l'infection par cet agent pathogène semble cependant pouvoir accélérer le développement des lésions athéromateuses dans divers modèles expérimentaux (Moazed et coll., 1997; 1996). Une autre bactérie, *l'helicobacter pylori*, montre aussi une association inconstante avec les maladies artérielles (Pellicano et coll., 1999; Danesh et Peto, 1998; 1997). Néanmoins, les appuis expérimentaux ou histopathologiques de l'implication de cet agent dans l'athérogenèse restent faibles.

Bien qu'il n'existe pas d'étude sur l'effet direct des microorganismes pathologiques sur l'induction de lésions artérielles, il est cependant possible que l'infection combinée à d'autres facteurs, puisse être responsable de la genèse de lésions athéromateuses chez certains patients (Kuo et Campbell, 1998).

**Protéines de stress:** un anticorps dirigé contre un antigène microbien pourrait présenter une réactivité croisée avec une protéine naturelle exprimée dans les plaques, induisant une réaction immune capable d'aviver l'inflammation locale; certaines protéines bactériennes de choc thermique ("Heat Shock Proteins" ou HSP) dont la structure est restée très proche des HSP humaines sont incriminées dans la pathogenèse de l'athérosclérose. Les HSP sont synthétisées physiologiquement pour protéger la cellule des agressions reliées au stress. Dans divers modèles expérimentaux, le choc thermique a été utilisé pour produire l'épaississement focal de l'intima. L'HSP 60 peut servir d'auto-antigène et des concentrations élevées d'auto-anticorps anti-HSP 60 ont été observées dans les lésions d'athérosclérose (Prohaszka et coll., 1999). L'HSP 70 est aussi retrouvée dans les lésions athéromateuses et aux endroits où l'artère est épaissie. L'existence d'une corrélation entre les niveaux

d'anti-HSP 70 et différents types de maladies vasculaires suggère que cette protéine puisse être impliquée dans la pathogenèse et la progression de l'athérosclérose (Chan et coll., 1999). Bien que la présence de ces protéines soit retrouvée au stade précoce de l'athérosclérose, les lésions vasculaires produites expérimentalement par le choc thermique ne reproduisent pas les caractéristiques des lésions athérosclérotiques humaines .

#### **1.3.4.3. Contribution du stress oxydatif**

Il a été démontré que le stress oxydatif induisait l'activation de gènes régulés par un système rédox-sensible. Dans un micro-environnement de paroi vasculaire dépourvu d'antioxydants, les modifications oxydatives des particules de LDL ont lieu. Ce processus d'oxydation est un phénomène complexe résultant d'un déséquilibre entre les facteurs antioxydants (Abplanalp et coll., 2000; Chopra et Turnham, 1999) et pro-oxydants libérés, entre autres, par les macrophages activés (Kaplan et coll., 1999).

Divers mécanismes semblent responsables de l'effet inhibiteur des antioxydants sur le processus athérosclérotique tels la réduction de l'infiltration des monocytes (Rangan et coll., 1999), la réduction d'expression des molécules d'adhésion (Ferns et coll., 1993) et l'inhibition d'oxydation des LDL (Tsujita et Yokoyama, 1996; Guyton et coll., 1995). Les antioxydants inhibent la prolifération des cellules musculaires lisses, l'induction de l'agrégation plaquettaire, la production des cellules spumeuses et l'apoptose cellulaire. L'interaction entre antioxydants et monocytes pourrait être responsable de la diminution de production des cytokines et des facteurs de croissance et/ou de la réduction de la réponse des cellules musculaires lisses à ces facteurs (Girndt et coll., 2000; Weisburger, 1999; Santanam et coll., 1998).

Bien que les études épidémiologiques aient observé une relation inverse entre les niveaux ou l'apport en vitamine E et les événements cardiovasculaires (Losonczy et coll., 1996), les études d'intervention n'ont pu démontrer de manière constante, l'effet bénéfique d'un apport accru en antioxydants sur les taux de morbidité et mortalité cardiovasculaires (Yusuf et coll., 2000). La consommation des nutriments riches en antioxydants reste actuellement la seule mesure préconisée pour la prévention des maladies cardiovasculaires (Schwenke, 1998).

#### **1.3.4.4. Contribution de la réponse au dommage endothélial**

L'altération de la fonction endothéliale précède toute altération histologique du vaisseau sanguin (Lerman A et Burnett, 1992). Il a été proposé qu'une lésion de l'endothélium et/ou une altération de ses fonctions (dysfonction endothéliale) puissent constituer des mécanismes précoces du développement de l'athérosclérose (Ross et Glomset, 1976). La dysfonction ou le dommage endothélial se traduisent par divers phénomènes tels la production excessive de molécules d'adhésion, le changement de la perméabilité vasculaire, la perte de capacité vasodilatatrice et la sécrétion de facteurs vasoconstrictifs, l'incompétence des cellules endothéliales à régénérer les sites lésés et à prévenir l'agrégation plaquettaire et la thrombose, et enfin la production anormale de cytokines et de facteurs de croissance (Dart et Chin-Dusting, 1999; Dimmeler et coll., 1998; Jackiewicz et coll., 1996; Gajdusek et coll., 1980).

La pathogenèse des maladies cardiovasculaires implique la présence de divers facteurs interagissant au niveau endothélial, tels les cytokines, les molécules d'adhésion, les auto-anticorps, le NO et l'endothéline-1 (Sharma et coll., 2000). Un des changements les plus précoces au cours de l'athérogenèse est la liaison et l'adhésion des leucocytes à l'endothélium découlant de l'expression



de diverses glycoprotéines, telles ICAM-1 et VCAM-1, à la surface de la cellule endothéliale. Parmi les autres altérations précoces notées au niveau endothélial se retrouvent les changements de perméabilité vasculaire, facilitant le transport des lipoprotéines et leur modification dans l'espace sous-endothélial (oxydation et/ou glycation) (Campbell et Campbell, 1997; Massy et coll., 1996).

#### **1.3.4.5. Contribution de la thrombose**

Le dépôt de fibrine a longtemps été suggéré comme la cause de l'épaississement de l'intima (Von Rokitansky, 1852). L'observation d'un dépôt plaquettaire dans les endroits désendothélialisés pouvant déclencher la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (Ross et coll., 1977), la présence de minces couches de fibrine et/ou de plaquettes agrégées sur la surface intimale d'artères d'enfants et de jeunes adultes et la présence de petits thrombi plaquettaires associés aux lésions précoces athéromateuses, semblent supporter cette hypothèse (Faggiotto et Ross, 1984). Si peu d'évidences supportent aujourd'hui un rôle initiateur de la thrombose dans l'athérosclérose, son rôle s'avère critique dans les phases ultérieures de l'athérosclérose, où tous les éléments d'activation et de coagulation se trouvent réunis dans la paroi (Drouet et coll., 1998).

#### **1.3.4.6. Théorie multifactorielle**

L'intégration des diverses théories proposées dans une seule théorie multifactorielle paraît pouvoir expliquer d'une meilleure façon le processus d'initiation de l'athérosclérose. La cellule endothéliale normalement quiescente présente une surface luminale non réactive vis-à-vis des éléments moléculaires et circulants. Les agressions hémodynamiques, oxydatives, métaboliques (diabète, hyperhomocystéinémie, hypercholestérolémie), inflammatoires et immunologiques agissent

sur ces cellules. Les niveaux augmentés des lipoprotéines plasmatiques et leurs modifications altèrent l'intégrité de l'endothélium. Les effets des LDL modifiées pourraient expliquer la perméabilité augmentée, le tonus vasculaire altéré et la thrombogénicité au niveau de la paroi vasculaire, ainsi que l'apoptose des cellules endothéliales. L'endothélium lésé ne maintient plus les fonctions homéostatiques et acquiert des propriétés anormales favorisant l'adhérence des leucocytes et leur passage à travers l'endothélium, l'adhérence des plaquettes et la disparition des activités fibrinolytiques et anti-coagulantes (Cicala et coll., 1998). La libération de facteurs mitogéniques par les cellules endothéliales et les macrophages favorise la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses qui, à leur tour, synthétisent du tissu conjonctif. Les réponses de l'endothélium aux facteurs pro-athérogéniques, l'hyperlipidémie et les modifications de lipoprotéines, pouvant coexister de manière variable, contribuent à l'adhésion et à la pénétration des monocytes aux sites de lésion (de Vries et coll., 1999; Consigny, 1995).

### **I.3.5. Facteurs de risque de l'athérosclérose**

Divers facteurs interviennent dans le développement de l'athérosclérose, certains étant réversibles et d'autres non. Les principaux facteurs de risque réversibles sont: la dyslipidémie, le stress oxydatif, l'hypertension, le diabète sucré, l'hyperhomocystéinémie et les agents infectieux (Ross, 1993; Schwartz et coll., 1993; 1991). Les antécédants familiaux de maladie ischémique, l'âge et le sexe mâle constituent des facteurs de risque non modifiables. La section suivante a pour objet de présenter les données récentes de la littérature sur les principaux facteurs de risque de l'athérosclérose.

### **I.3.5.1. Dyslipidémie**

#### **I.3.5.1.1. Hypercholestérolémie**

La relation entre cholestérolémie et athérosclérose est compliquée dans la mesure où le transport du cholestérol s'effectue non seulement par des lipoprotéines athérogènes telles les LDL, les IDL et les VLDL, mais aussi par des lipoprotéines protectrices comme les HDL (Bruckert et Emmerich, 1997). D'autre part, le lien entre concentration de LDL et athérosclérose n'est pas direct dans la mesure où les particules de LDL doivent être modifiées par l'endothélium vasculaire pour être athérogéniques (Williams et Tabas, 1995). Pourtant, la cholestérolémie totale, après ajustement des autres facteurs de risque, ressort clairement comme un facteur de risque des maladies cardiovasculaires (Lala et coll., 1998; Kannel, 1995; Kannel et coll., 1971). Dans divers modèles expérimentaux, l'hypercholestérolémie, induite par diètes riches en graisses et/ou en cholestérol, reproduit les altérations de relaxation endothélium-dépendante (Vanhoutte et Scott-Burden, 1994), observées chez les sujets hypercholestérolémiques (Mc Lenachan et coll., 1991). Une diminution du niveau de cholestérol plasmatique, chez les patients hypercholestérolémiques, pourrait diminuer la progression, et même induire une régression de l'athérosclérose (Ornish et coll., 1990).

**Les LDL:** des niveaux élevés de LDL plasmatiques ont été reconnus comme un facteur de risque indépendant du développement de l'athérosclérose et des maladies coronariennes (Cullen et Assmann, 1999; Howard, 1999; Evans et coll., 1998). Cette dyslipidémie est associée à l'abondance des stries lipidiques dans la lésion athéromateuse (Napoli et coll., 1999; Eurospire Study Group, 1997). La modification des LDL par oxydation, glycation, agrégation, association aux protéoglycans ou incorporation dans des complexes immuns conduit à l'altération de l'endothélium et des cellules musculaires lisses sous-jacentes. Une fois infiltrées dans la paroi artérielle, les LDL sont oxydées

et captées par les macrophages (Brown et Fuster, 1996). Les LDL oxydées favorisent la formation des cellules spumeuses, sont cytotoxiques à hautes concentrations (Ylitalo et coll., 1999; Loughheed et coll., 1991) et sont impliquées dans l'apoptose des cellules endothéliales humaines par la formation des superoxydes (Claise et coll., 1999; Galle et coll., 1999). Les LDL modifiées sont chimiotactiques pour les monocytes (Klouché et coll., 1998) et augmentent la réaction inflammatoire locale vasculaire, en stimulant la différenciation des monocytes en macrophages dans l'espace sous endothéliale (Asakura et coll., 1999; Lee et coll., 1999). La liaison des LDL modifiées aux récepteurs scavengers macrophagiques induit la relâche de cytokines; leur présence maintient le cercle délétère de l'inflammation et conduit à l'apoptose cellulaire dans la paroi vasculaire (Sakashita et coll., 1999; Kaplan et Aviram, 1999; Galle et coll., 1999; Berliner et Heinecke, 1996; Palkama, 1991). Les LDL oxydées stimulent l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales en induisant l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales (Kamanna et coll., 1999; Amberger et coll., 1997). Elles augmentent la perméabilité des cellules endothéliales (Gardner et coll., 1999) et inhibent leur prolifération (Chen et coll., 2000). Les LDL oxydées stimulent l'expression de PAI-1 par les cellules musculaires lisses (Dichtl et coll., 1999). En raison de ses multiples effets pro-athérogéniques, il a été suggéré que l'oxydation des LDL puisse constituer un marqueur de l'athérosclérose coronarienne (Holvoet, 1999).

**Les HDL:** une relation inverse entre le niveau sérique des HDL et le risque cardiovasculaire a été démontré par toutes les études épidémiologiques prospectives (Brown et coll., 1990; Gordon et coll., 1989); cette relation inverse est particulièrement forte chez les femmes (Castelli et coll., 1986). Les HDL ont un rôle "scavenger" pour le cholestérol tissulaire, protègent les LDL contre les modifications oxydatives et, inhibent l'expression des molécules d'adhésion au niveau endothélial

(Sich et coll., 1998; Bruce et coll., 1998; Watson et coll., 1995; Cockerill et coll., 1995). La paraoxonase et l'acetyl-hydrolase associées aux HDL détoxifient les phospholipides oxydés, réduisent les hydroperoxydes et inhibent les signaux induits par les LDL oxydées. L'oxydation des HDL dans l'espace sous-endothélial diminue leur capacité de transport inverse du cholestérol et induit l'accumulation de cholestérol dans les macrophages (Bonfont et Rousselot, 1999). L'oxydation des HDL *in vivo* au niveau de l'espace sous-endothélial augmente aussi l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Sharma et coll., 1999; Bonfont-Rousselot et coll., 1999).

**La Lipoprotéine (a) ou Lp(a):** la Lp(a) est une lipoprotéine plasmatique qui présente des propriétés physico-chimiques voisines de celles des LDL. Elle s'en distingue par la présence d'une glycoprotéine spécifique, l'apo (a), liée à l'apo B-100. L'apo (a), fortement glycosylée possède une importante homologie de séquence avec le plasminogène, le précurseur de la plasmine. Des niveaux plasmatiques élevés de Lp(a) sont considérés comme un facteur de risque indépendant de l'athérosclérose (Rand et coll., 1998; Saito et coll., 1997). Le potentiel pro-athérogénique de cette lipoprotéine pourrait être dû à sa liaison accrue à l'endothélium et aux monocytes, ainsi qu'à sa capacité de stimuler certaines molécules d'adhésion à la surface endothéliale (Galle et coll., 1999; Schaefer et coll., 1994). Il a aussi été démontré que la Lp(a) stimulait l'infiltration des monocytes et la prolifération des cellules musculaires lisses dans la paroi vasculaire (Tanaka et coll., 1998). La présence d'une séquence dans l'apo (a), similaire à un motif présent dans les pro-enzymes de fibrinolyse du plasminogène ainsi que son homologie de séquence avec les LDL suggèrent une association entre la Lp(a), la thrombose et l'athérosclérose (Marcovina et Koschinsky, 1998; Hachulla et Parra, 1991). Bien que l'accumulation de Lp(a) dans les lésions athérosclérotiques ait

été démontrée, sa contribution dans l'athérogenèse reste incertaine (Ogorelkova et coll., 1999; Enas and Jacob, 1999; Marcovina et Koschinsky, 1998).

#### **I.3.5.1.2. Hypertriglycéridémie**

Les chylomicrons et les VLDL, contenant la majorité des triglycérides plasmatiques, sont de larges lipoprotéines, ne pouvant traverser l'endothélium vasculaire (Faegerman, 1998). Cependant, la liaison des lipoprotéines riches en triglycérides, à la paroi vasculaire, entraîne leur lipolyse par la LPL, libérant d'une part, un surplus d'acides gras toxiques pour l'endothélium et d'autre part des particules remnantes plus petites, capables de pénétrer l'endothélium (Cohn et coll., 1999; Zilversmit, 1995). L'hypertriglycéridémie a été suggérée comme un facteur de risque indépendant des maladies ischémiques, ainsi qu'un marqueur des maladies coronariennes (Egger et coll., 1999; Grundy, 1998). En effet, de nombreuses études ont mis en évidence une association entre l'hypertriglycéridémie et/ou les lipoprotéines riches en triglycérides et la progression des plaques athéromateuses (Hodis et Mack, 1998; Buchwald et coll., 1990; Blakenhom et coll., 1987). Des méta-analyses faites à partir de plusieurs grandes études épidémiologiques prospectives, ont aussi démontré une association indépendante entre l'hypertriglycéridémie et les maladies cardiovasculaires après ajustement pour les HDL, et ce, aussi bien chez les hommes que chez les femmes (Austin, 1998; Hokanson et Austin, 1996; 1996a).

Plusieurs données expérimentales suggèrent que l'hypertriglycéridémie pourrait avoir des conséquences athérogènes et thrombogènes. En effet, l'hypertriglycéridémie s'accompagne d'une augmentation des chylomicrons- et des VLDL-remnants riches en triglycérides qui se lient à des récepteurs exprimés par les monocytes, les macrophages et les cellules endothéliales, donnant

naissance aux cellules spumeuses. L'hypertriglycéridémie s'accompagne d'une augmentation des LDL denses; elle entraîne un enrichissement en triglycérides des HDL avec un accroissement de leur catabolisme et une diminution de leur taux plasmatique. Finalement, l'hypertriglycéridémie paraît favoriser la thrombogenèse, dans la mesure où elle est associée à une augmentation du facteur VII, de l'activité coagulante du facteur X et du PAI-1 (Gianturco et Bradley, 1999; Byrne, 1999; Verges, 1998; Ohni et coll., 1995; Grundy et Vega, 1992; Fontbonne et coll., 1989).

Une forme d'hypertriglycéridémie, se caractérisant par une augmentation des niveaux plasmatiques de chylomicrons à jeun ou hyperchylomicronémie, est liée à un défaut d'activité de la LPL, suite à une anomalie de l'enzyme ou de son activateur physiologique, l'apo CII. Bien que physiologiquement les VLDL soient catabolisées par la LPL, ces particules ne sont pas toujours augmentées lors d'un déficit de cette enzyme. Ceci pourrait être imputable à un effet de la lipase hépatique qui serait capable de compenser le défaut d'action de la LPL sur les VLDL, ou encore à une captation directe des VLDL par le foie. L'augmentation des VLDL associée à la déficience en LPL est probablement due à un défaut de cette enzyme ou à une synthèse hépatique accrue de VLDL. Toutefois, les niveaux extrêmement variables de triglycérides chez les individus porteurs de mutations du gène de la LPL, font penser que des facteurs, autres que la LPL, sont impliqués dans ce type de dyslipidémie (Julien et coll., 1997); cette hypothèse est supportée par l'observation que certaines mutations du gène de la LPL semblent protectrices (*i.e.* Ser447Ter) pour les maladies ischémiques (Sing et coll., 1999).

### **I.3.5.2. Hypertension artérielle**

Divers mécanismes physiologiques sont responsables de l'effet délétère de l'hypertension artérielle sur le développement de l'athérosclérose. Chez les patients hypertendus, les concentrations plasmatiques d'angiotensine II, le produit principal du système rénine-angiotensine, sont élevées. L'angiotensine II contribue à l'athérogenèse par la stimulation des cellules musculaires lisses (Chobanian et Dzau, 1996). Sa liaison aux récepteurs spécifiques exprimés par les cellules musculaires lisses induit l'hypertrophie de ces cellules et y augmente l'activité lipoxigénase responsable de l'oxydation des LDL (Chobanian et Dzau, 1996; Gibbons et coll, 1992).

L'hypertension augmente aussi la production du peroxyde d'hydrogène et de radicaux libres. Ces substances réduisent la formation de NO par l'endothélium et augmentent l'adhésion leucocytaire à l'endothélium (Lacy et coll., 1998; Swei et coll., 1997). Le stress hémodynamique associé à l'hypertension artérielle induit en outre, la production de MCP-1 par les cellules musculaires lisses (Capers et coll., 1997). Finalement une activation leucocytaire est documentée dans l'hypertension artérielle (Kristal et coll., 1998).

### **I.3.5.3. Homocystéinémie**

L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque indépendant des maladies cardiovasculaires (Nygård et Nordrehaug, 1997; Verhoef et Stampfer, 1995; Boushey et coll., 1995). L'homocystéine pourrait exercer ses effets pro-athérogéniques par différents mécanismes. Il a été démontré que l'homocystéine exerce un effet cytotoxique sur les cellules endothéliales, stimule l'oxydation et l'agrégation des LDL, favorise la formation de radicaux libres et stimule la prolifération des cellules



musculaires lisses. L'homocystéine augmente la production de collagène tout en diminuant la disponibilité du NO (Majors et coll., 1997; Upchurch et coll., 1997; Hajjar, 1993).

Il est possible qu'un traitement par l'acide folique ou les vitamines B<sub>6</sub> et B<sub>12</sub> puisse, en normalisant les niveaux plasmatiques de l'homocystéine, prévenir le risque accru de maladies cardiovasculaires associé à l'hyperhomocystéinémie (Scott et Sutton, 1999; Omenn et coll., 1998).

#### **I.3.5.4. Infection**

Tel que mentionné précédemment, différentes données démontrent l'existence d'une association entre l'athérosclérose et la présence d'au moins deux types d'agents infectieux: l'herpesvirus et le *Chlamydia pneumoniae*, qui ont été identifiés dans les lésions athéromateuses (Libby et coll., 1997; Jackson et coll., 1997; Hendrix et coll., 1990). L'augmentation du titre d'anticorps contre ces microorganismes est utilisée comme un facteur de prédiction des complications cardiovasculaires, chez les sujets ayant subi un infarctus myocardique (Melnick et coll., 1993; Gupta et coll., 1997). Il n'existe cependant pas d'évidence démontrant le rôle étiologique de ces organismes dans l'athérogenèse.

#### **I.3.5.5. Obésité**

Il est bien connu que les sujets obèses présentent un risque élevé de développement des maladies cardiovasculaires. Ce risque est médié essentiellement par l'induction de facteurs de risque tels que la dyslipidémie, l'hypertension et le diabète de type 2 (Lamarche et coll., 1998; Després et Marette, 1994; DeFronzo et Ferrannini, 1991). L'obésité est, en outre, associée à diverses complications incluant la RI, la dysfonction vasculaire, l'activation excessive du système nerveux

central, l'hypertrophie myocardique et l'altération de la fonction ventriculaire (Alexander, 1985; Guillermo et coll., 1988). Une perte de poids corporel, en améliorant le profil lipidique (Becque et coll., 1988), pourrait diminuer le risque de développement des lésions athéromateuses.

Depuis plusieurs années, il est devenu évident que la répartition de la masse adipeuse corporelle, plutôt que la masse du tissu adipeux en soi, est un déterminant majeur du risque de développement des complications vasculaires. C'est ainsi que l'obésité viscérale est considérée comme un facteur de risque des maladies cardiovasculaires (Lamarche et Lewis, 1998; Hauner, 1995; DeFronzo et Ferrannini, 1991; Després et coll., 1990). L'obésité viscérale est associée à certains facteurs de risque cardiovasculaires, tels la dyslipidémie, l'intolérance au glucose et l'hypertension artérielle (Mekki et coll., 1999). Un des mécanismes par lequel l'obésité exerce son rôle délétère au niveau de la paroi vasculaire est la production de TNF- $\alpha$  qui, d'une part induit la RI et la production d'angiotensinogène, et d'autre part inhibe la LPL au niveau du tissu adipeux (Uysal et coll., 1998; Hotamisligil et Spiegelman, 1994; Hotamisligil et coll., 1993).

#### **I.3.5.6. Tabagisme**

L'infarctus myocardique représente la principale cause de mortalité liée au tabagisme. Le tabagisme est un facteur de risque indépendant de l'athérosclérose (Ross, 1986). Les mécanismes par lesquels le tabagisme exerce ses effets pro-athérogéniques incluent: l'activation de la coagulation, l'augmentation du travail cardiaque, la réduction du transport et de l'apport tissulaire en oxygène, la libération de catécholamines et la vasoconstriction coronarienne (Trap-Jensen, 1988; Fitzgerald et coll., 1988).

Plusieurs anomalies retrouvées chez les sujets fumeurs peuvent expliquer l'effet du tabac sur le développement de l'athérosclérose: la diminution de protection antioxydante, le profil lipidique anormal et le niveau élevé des LDL oxydées, l'augmentation de fibrinogène circulant, l'élévation des produits de dégradation du thromboxane A<sub>2</sub> et de la prostacycline, la diminution de la relaxation endothélium-dépendante et l'augmentation de l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales (Weber et coll., 1996; Murohara et coll., 1994; Harats et coll., 1989; Chow et coll., 1986).

### **I.3.5.7. Fibrinogène**

L'augmentation de la concentration plasmatique de fibrinogène est un facteur de risque indépendant de l'athérosclérose, et un facteur de prédiction de son évolution et de ses complications (Folsom et coll., 2000; Park et coll., 1999; Ceriello et coll., 1997). Le fibrinogène et/ou la fibrine sont présents dans les plaques athéromateuses dès les étapes les plus précoces de la strie lipidique (Smith et coll., 1990). Le fibrinogène plasmatique peut contribuer au développement de l'athérosclérose en favorisant divers mécanismes tels l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, l'activation des monocytes, la production de radicaux libres, et l'agrégation plaquettaire et érythrocytaire. Les produits de dégradation de la fibrine ont une activité mitogénique pour les cellules musculaires lisses pariétales (Lowe et coll., 1993; Duplâa et coll., 1993; Trezzini et coll., 1989; Berliner et coll., 1987). Il a été suggéré tout récemment que l'activation des monocytes par l'IL-6 contribue à l'augmentation du fibrinogène et à l'augmentation de la captation lipidique par les macrophages (Yudkin et coll., 1999).

### **I.3.5.8. Diabète**

La prévalence des maladies cardiovasculaires est élevée chez les patients diabétiques et les individus intolérants au glucose, ainsi que chez ceux présentant un risque accru de développer le diabète (Wei et coll., 1998; Haffner et coll., 1990; Jarrett et Shipley, 1988; Pan et coll., 1986; Jarrett, 1984). L'athérosclérose vasculaire est la cause majeure de mortalité et de morbidité des patients diabétiques (Pyorala et coll., 1987). La dyslipidémie, l'HI, l'hypertension artérielle et l'obésité centrale, rencontrées fréquemment chez les sujets diabétiques, paraissent être responsables du risque élevé de développement de l'athérosclérose associé au diabète (Stern, 1995; Shantaram, 1999).

#### **I.3.5.8.1. Dyslipidémie**

Les anomalies lipidiques du DNID jouent un rôle important dans l'athérogenèse associée à cette maladie. Ces désordres lipidiques sont d'ordre quantitatif et qualitatif. Les anomalies quantitatives lipidiques majeures dans le DNID sont l'hypertriglycémie et la diminution des taux plasmatiques des HDL (U.K. Prospective Diabetes Study 27, 1997). Les anomalies qualitatives sont le changement de taille des lipoprotéines (de larges VLDL et de petites LDL), ainsi que l'augmentation du contenu des LDL et des HDL en triglycérides, la glycation des apolipoprotéines et l'augmentation de susceptibilité des LDL à l'oxydation (Dixon et coll., 1999).

Dans le DNID, la production endogène excessive de VLDL reflète l'apport accru des AGL au foie et la RI hépatique (Byrne et coll., 1997). Une inhibition insulino-dépendante de l'activité de la LPL plasmatique entraîne aussi une clairance retardée des VLDL et une diminution des HDL (Erkelens, 1998).

L'hypertriglycéridémie et l'augmentation des lipoprotéines riches en triglycérides sont associées au développement des maladies coronariennes et de l'athérosclérose (Hokanson et Austin, 1996; Laakso et coll., 1993). Chez les diabétiques, trois quart des particules lipoprotéiques riches en triglycérides sont comprises dans les IDL (Steiner et coll., 1998), des lipoprotéines remnantes athérogéniques (Tkac et coll., 1997). L'hypertriglycéridémie diabétique facilite aussi la production de LDL petites et denses qui pénètrent facilement dans la paroi vasculaire et initient le développement des lésions athéromateuses (Austin et coll., 1998). L'hypertriglycéridémie est associée à l'augmentation de  $\beta$ -VLDL petites et denses qui sont athérogéniques (Chanu, 1999; Sprecher, 1998). Les VLDL riches en triglycérides sont présentes dans la plaque athéromateuse et sont toxiques pour les macrophages et les cellules endothéliales. De plus, ces lipoprotéines sont captées préférentiellement par les macrophages, favorisant la différenciation des macrophages en cellules spumeuses (Gianturco et coll., 1982). Au cours de l'état post-prandial, l'hypertriglycéridémie et les concentrations de lipoprotéines riches en triglycérides, sont aussi plus élevées dans le DNID, augmentant le stress oxydatif et induisant la dysfonction endothéliale (Evans et coll., 1998).

#### **1.3.5.8.2. Hyperglycémie**

L'hyperglycémie est un facteur de prédiction de la mortalité cardiovasculaire (de Vegt et coll., 1999) et de la dysfonction endothéliale NO-dépendante du DNID (Cosentino et Luscher, 1998). Divers mécanismes incluant les anomalies de composition des lipoprotéines, les altérations du système de coagulation, la glycation des protéines et le stress oxydatif peuvent expliquer l'association entre hyperglycémie et complications vasculaires du diabète. L'hyperglycémie induit des anomalies qualitatives des LDL, telles la glycation et l'augmentation de susceptibilité à

l'oxydation qui sont connues pour leurs effets pro-athérogéniques. Elle induit des altérations du système de coagulation, stimulant la formation de la thrombine, activant la fonction plaquettaire et endothéliale et inhibant la fibrinolyse. L'hyperglycémie entraîne aussi la production de protéines glyquées. Le collagène et d'autres protéines glyquées augmentent la migration des monocytes à travers l'endothélium et l'expression subséquente des facteurs de croissance, un mécanisme important dans les étapes précoces de l'athérosclérose. La captation des AGE par des récepteurs macrophagiques spécifiques stimulent l'expression de plusieurs cytokines qui modulent le processus athéromateux. La liaison des AGE à leurs récepteurs induit un état de stress oxydatif, augmentant la peroxydation lipidique (Shantaram, 1999; Unger et Foster, 1998; Schmidt et coll., 1994; Yan et coll., 1994).

L'hyperglycémie induit finalement la production de radicaux libres et diminue la capacité de défense antioxydante (Giugliano et coll., 1996; Tesfamariam, 1991). Le stress oxydatif favorise l'oxydation des LDL et des HDL. Les LDL oxydées génèrent une variété de molécules bio-actives pro-athérogéniques telles les phospholipides et les stérols modifiés (Berliner et coll., 1995). Ces substances peuvent être cytotoxiques, mais aussi chimiotactiques pour les monocytes et les lymphocytes-T. Elles peuvent également induire l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Les LDL oxydées sont enfin des molécules immuno-géniques, capables d'induire des réponses immunitaires humorales et cellulaires (Stemme et coll., 1995; Yla-Herttuala et coll., 1994).

La réduction de la capacité de défense antioxydante contribue aussi au développement du stress oxydatif dans le diabète (Baynes, 1991). Une diminution des niveaux plasmatiques des antioxydants naturels (incluant les protéines se liant au groupe thiol, l'acide urique, la vitamine E et

la vitamine C) a été rapporté dans le DNID. Cette altération du statut antioxydant est associée à la formation excessive de lipoprotéines oxydées (Opara et coll., 1999; Ceriello et coll., 1997).

#### **I.3.5.8.3. Résistance à l'insuline et hyperinsulinémie**

Le syndrome X est une constellation d'anomalies incluant la RI, la dyslipidémie, l'hypertension artérielle, l'intolérance au glucose et l'augmentation des niveaux de fibrinogène et de PAI-1 (Reaven et Laws, 1994; Reaven, 1992). Le trait central de ce syndrome est l'obésité centrale. Ce syndrome est associé à un risque accru de maladies cardiovasculaires.

La sensibilité à l'insuline ne pouvant être mesurée facilement, il n'existe pas à l'heure actuelle de preuves définitives permettant d'établir la RI comme un facteur de risque de maladie coronarienne. La RI est associée à une diminution des niveaux plasmatiques des HDL, ainsi qu'à une augmentation des concentrations plasmatiques de glucose, de fibrinogène, de PAI-1, de triglycérides totaux, de VLDL riches en triglycérides et de LDL petites et denses (Haffner et coll., 1999). La RI entraîne des anomalies au niveau des organes, spécialement au niveau du tissu adipeux, du foie et des muscles squelettiques. L'excès de lipides, produit par la RI périphérique, entraîne des anomalies lipidiques et de coagulation. La RI augmente la pression sanguine au niveau des petits vaisseaux (Ferrannini, 1992). Elle accélère la diminution de sécrétion d'insuline qui se produit avec l'âge et favorise ainsi l'intolérance au glucose. La RI entraîne une augmentation des niveaux plasmatiques d'insuline, une hormone impliquée dans la stimulation des processus de prolifération cellulaire et inflammatoires associés à l'athérogenèse (Grundy, 1999).

Des niveaux élevés d'insuline ont été documentés chez les sujets à haut risque de maladies cardiovasculaires (Laakso, 1996). Un niveau plasmatique élevé d'insuline à jeun et en post-prandial

a été proposé comme prédicteur sensible du développement des maladies coronariennes, indépendamment d'autres facteurs de risque (Mather, 2000; Burchfield et coll., 1998; Stolar, 1988). L'HI associée au syndrome X peut résulter de la RI ou alternativement être secondaire à l'adiposité viscérale. L'HI semble incriminée dans le développement de toutes les anomalies métaboliques du syndrome X, y compris la dyslipidémie, l'intolérance au glucose et l'hypertension. Outre son rôle dans la genèse de ces divers facteurs de risque cardiovasculaire, l'HI pourrait contribuer par elle-même et directement à la pathogenèse de l'athérosclérose associée au diabète. Ainsi, l'HI induit un état dyslipidémique en augmentant les niveaux plasmatiques de VLDL et en diminuant ceux des HDL. Elle accélère l'accumulation d'esters de cholestérol dans l'aorte et accroît la susceptibilité des LDL à l'oxydation (Quinone-Galvan et coll., 1999; Abe et coll., 1996; Haller et coll., 1996; Reaven et coll., 1993; Haffner et coll., 1992). L'HI contribue enfin à la prolifération de cellules musculaires lisses et la synthèse du PAI-1 (Ridray, 1995; Negri et coll., 1993). La figure 7 montre la relation entre la RI, l'HI et l'athérosclérose.

### **I.3.6. Facteurs environnementaux protecteurs**

L'ensemble des études actuellement disponibles suggèrent un rôle cardioprotecteur de certains agents ou conditions tels certains acides gras, les vitamines antioxydantes, les fibres, l'alcool et l'exercice physique.

#### **I.3.6.1. Acides gras alimentaires**

Selon les études épidémiologiques, la teneur et le type d'acides gras de la diète influencent le risque de développement des maladies cardiovasculaires. Outre leur rôle comme source



énergétique et comme composants des membranes cellulaires, les acides gras influencent l'expression génique, entraînant des changements dans le métabolisme, la prolifération et la différenciation cellulaire. Chez les mammifères, divers facteurs transcriptionnels tels les “peroxisome proliferator-activated receptors” (PPARs) et le facteur nucléaire kappa B (NFκB) ont été impliqués dans les effets régulateurs géniques des acides gras (Jump et Clarke, 1999).

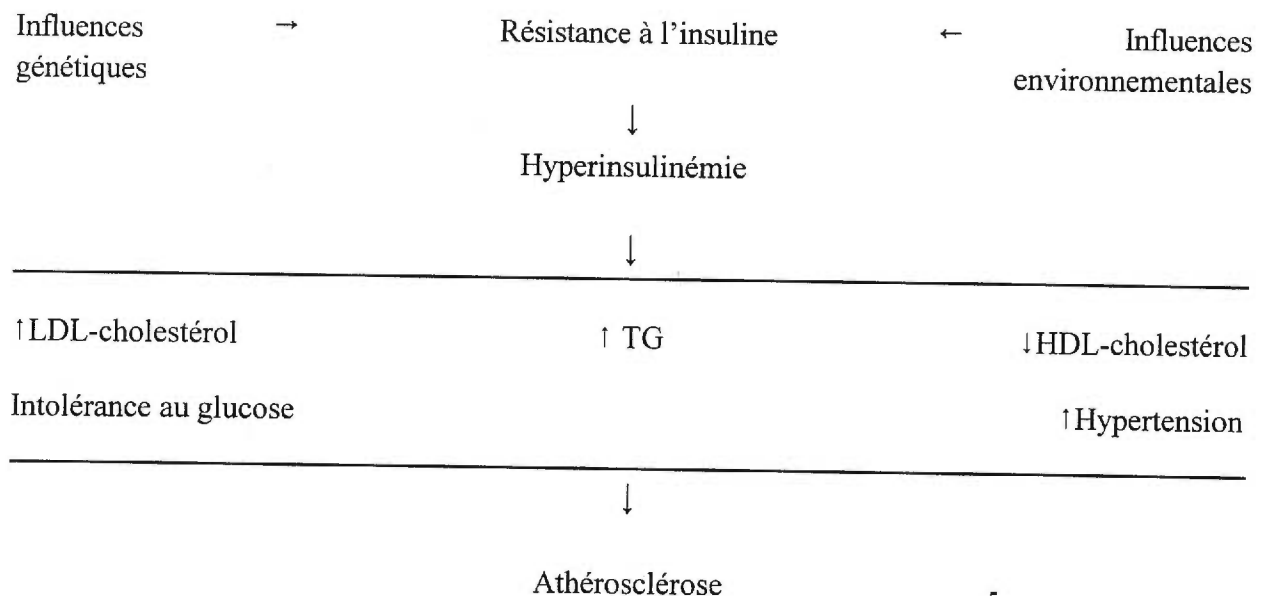


Figure 7. Relation entre RI, HI et athérosclérose. Adapté de “Reaven GM. Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Phys Rev* 75:473-486, 1995.

**Acides gras mono-insaturés:** alors qu’une étude prospective d’intervention primaire, dite des “7 pays” effectuée il y a vingt ans, a démontré une relation directe entre la consommation d’acides gras saturés et la fréquence des maladies coronariennes (Wiseman et coll., 1996; Visioli et

coll., 1995; Keys, 1980), divers arguments suggèrent qu'un apport accru en acides gras mono-insaturés puisse exercer un rôle cardioprotecteur. En effet, il a été démontré qu'une diète riche en acide oléique rétablit l'activité des récepteurs LDL (Dietschy et coll., 1993; Daumerie et coll., 1992) et augmente le "turn over" des esters de cholestérol par les HDL (Sola et coll., 1997). L'acide oléique diminue aussi l'expression des molécules d'adhésion telles VCAM-1 (Massaro et coll., 1999).

**Acides gras polyinsaturés  $\omega$ 6:** ces acides gras montrent des effets anti-athérogéniques et cardioprotecteurs (Ma et coll., 1997), en raison de leur action hypocholestérolémiant (Rudell et coll., 1995; Mattson et Grundy, 1985). Ainsi, l'acide  $\gamma$ -linoléique induit une diminution significative des niveaux plasmatiques de triglycérides, de cholestérol total et de LDL, et une augmentation des niveaux plasmatiques de HDL. Une diète enrichie en acide gras polyinsaturés augmente la production des prostacyclines, tout en diminuant l'agrégation plaquettaire et les niveaux de thromboxane B<sub>2</sub> sérique (Guivernau et coll., 1994).

**Acides gras polyinsaturés  $\omega$ 3:** selon des études épidémiologiques, l'incidence de maladies coronariennes dans les populations consommant une grande quantité d'huile de poisson, riche en acides gras  $\omega$ 3, est faible (Bang et coll., 1980; Kagawa et coll., 1982). Une multitude d'évidences indirectes suggèrent l'effet anti-athérosclérotique de diètes enrichies en acides gras  $\omega$ 3. Il a été rapporté qu'une diète enrichie en acide  $\alpha$ -linoléique diminue le nombre d'événements coronariens et de morts subites (de Lorgeril et coll., 1994). Bien que les études cliniques n'apportent pas de preuve directe de l'effet bénéfique de l'huile de poisson sur l'athérogenèse, des travaux ont néanmoins démontré, que ces acides gras diminuaient la tension artérielle et exerçaient des effets hypotriglycéridémiants, vasodilatateurs et anti-inflammatoires (Roche et Gibney, 1999; Horrocks et Yeo, 1999; Nakamura et coll., 1998; Kestin et coll., 1990). Un effet inhibiteur des acides  $\omega$ 3 sur

divers paramètres incluant l'adhésion des monocytes à l'endothélium (De Caterina et coll., 1994), la chimiotaxie (Lee et coll., 1985), l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (De Caterina et coll., 1994), l'agrégation plaquettaire (Moncada et coll., 1985) et la production du facteur VII, a en outre été rapporté (Cigolini et coll., 1996; Renier et coll., 1993). Enfin, une inhibition de la production du TNF- $\alpha$ , un facteur causal de la RI, par les acides gras  $\omega 3$  a été rapporté par diverses équipes de recherche (Calder, 1995; Renier et coll., 1993; Endres et coll., 1989).

Il faut cependant noter que les acides gras polyinsaturés diminuent la concentration plasmatique des HDL (Itakura et coll., 1990) et augmentent la peroxydation lipidique (Sola et coll., 1997; Thomas et coll., 1996; Steinberg et coll., 1989).

### **I.3.6.2. Vitamines**

Certaines vitamines pourraient par leur propriété antioxydante, réduire la morbidité et la mortalité reliées aux maladies cardiovasculaires. Bien que les études épidémiologiques aient suggéré un effet protecteur de la vitamine E sur les maladies coronariennes (Losonczy et coll., 1996), les études d'intervention n'ont cependant pas pu démontrer que l'apport en vitamines antioxydantes réduisait de manière significative les maladies cardiovasculaires (Yusuf et coll., 2000). Il n'existe pas à l'heure actuelle d'études longitudinales randomisées visant à évaluer, dans la population diabétique, les effets des vitamines antioxydantes dans la prévention des maladies coronariennes (Paolisso et coll., 1999).

**Vitamine E:** une relation inverse entre l'apport ou les niveaux plasmatiques de vitamine E et l'incidence de maladies coronariennes a été bien documentée (Yusuf et coll., 2000; Mune et coll., 1999; Losonczy et coll., 1996). La vitamine E augmente la résistance des lipoprotéines à l'oxydation (Negre-Salvayre et coll., 1991), inhibe l'agrégation plaquettaire et diminue l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales (Yoshida et coll., 1999; Islam et coll., 1998). Elle diminue en outre, la production de superoxyde et de cytokines par les leucocytes (van Tits et coll., 2000). Au vu de l'absence de preuves quant à l'efficacité de la vitamine E à réduire les événements cardiovasculaires, aucune recommandation n'est actuellement émise pour la population générale quant à la supplémentation de la diète en vitamine E. Cependant, chez les patients présentant des LDL petites et denses, une hypercholestérolémie familiale, une augmentation des niveaux plasmatiques de Lp(a) et chez les sujets consommant des suppléments d'huile de poisson, une supplémentation en vitamine E a été recommandée (Tangney et Rosenson, 1999).

**Vitamine C:** l'acide ascorbique ou vitamine C complexe les radicaux libres dans le compartiment plasmatique, inhibe l'activation endothéliale et l'adhésion monocyttaire à l'endothélium, améliore l'activité biologique du NO et régénère la vitamine E (Frei, 1999). Le traitement des cellules musculaires lisses à la vitamine C protège ces cellules contre l'apoptose (Siow et coll., 1999). Bien qu'il n'existe pas de recommandations quant à la supplémentation de la diète par la vitamine C dans le cadre de prévention des maladies cardiovasculaires, l'ingestion d'aliments riches en vitamine C est toutefois encouragée (Harats et coll., 1998; Tribble, 1999).

**Vitamines B<sub>6</sub> et B<sub>12</sub>:** au vu du rôle pro-athérogénique joué par l'homocystéine et du rôle primordial des vitamines B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> et acide folique dans le métabolisme de cet acide aminé, des études sont actuellement en cours pour évaluer les effets cardioprotecteurs d'une supplémentation en

vitamines B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> et acide folique, chez les patients présentant des niveaux plasmatiques accrus d'homocystéine. S'il existe, à l'heure actuelle, suffisamment de preuves quant à la relation existant entre les folates et l'homocystéinémie, le bien fondé de l'utilisation des folates et de la vitamine B<sub>12</sub> dans la prévention secondaire ou primaire des maladies cardiovasculaires, par contre, n'est pas encore démontré (Woo et coll., 1999; Robinson et coll., 1998; Rimm et coll., 1998).

### **I.3.6.3. Fibres**

Les fibres non solubles, telles la pectine, la cellulose et l'hémi-cellulose, pourraient exercer un effet bénéfique important sur le risque coronarien. Une diète riche en fibres pourrait diminuer la fréquence, la durée et la sévérité de l'angine et favoriser la régression de l'athérosclérose coronarienne (Segasothy et Phillips, 1999). Les aliments riches en fibres, contenant généralement des vitamines, des minéraux, des acides gras mono-insaturés ou polyinsaturés  $\omega$ 3, l'évaluation des effets bénéfiques des fibres requiert l'examen du rôle de ces nutriments et micro-nutriments dans l'effet cardioprotecteur des fibres (Anderson et Hanna, 1999).

### **I.3.6.4. Alcool**

Il existe une relation inverse entre une consommation modérée (maximum 3 verres par jour) d'alcool et le risque de maladies coronariennes. Cette relation inverse disparaît rapidement lors de l'ingestion de quantités plus importantes ou après arrêt de la consommation d'alcool (Rimm et coll., 1996; Doll et coll., 1994).

L'effet cardioprotecteur du vin rouge est attribué à la présence dans cet alcool de flavonoïdes, des macromolécules possédant des propriétés antioxydantes (Weisburger, 1999). Les flavonoïdes

diminuent le dépôt plaquettaire, la vasoconstriction artérielle et l'oxydation des LDL; la proportion alcool/polyphénols paraît critique pour cet effet (Mruk et coll., 2000; van Golde et coll., 1999).

#### **I.3.6.5. Exercice physique**

De nombreuses études ont relaté l'effet bénéfique de l'exercice physique modéré chez les sujets atteints des maladies coronariennes. Il a été démontré que l'exercice d'endurance réduit les décès des patients atteints de maladies coronariennes de l'ordre de 37 à 50% (Hakim et coll., 1998). L'exercice physique régulier augmente les niveaux de HDL sériques et l'oxydation des lipides par le muscle squelettique (Hardman, 1999; Turcotte, 1999). Il diminue aussi la production de cytokines pro-athérogéniques par les cellules mono-nucléées (Smith et coll., 1999). En période post-prandiale, l'entraînement aérobique diminue les niveaux plasmatiques des lipoprotéines athérogéniques en favorisant le dépôt des acides gras alimentaires dans les muscles et en améliorant ainsi la balance entre l'oxydation et l'apport lipidique (Hardman, 1998).

#### **I. 4. Lipoprotéine lipase**

La LPL est une enzyme clé du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides. Son action principale consiste à hydrolyser les triglycérides des chylomicrons et des VLDL en mono- et diglycérides et en AGL. Par cette action, la LPL engendre la formation de résidus de chylomicrons et initie le processus requis pour la conversion des VLDL en LDL aboutissant à la formation de particules remnantes, appauvries en triglycérides (Jansen et coll., 1998; Hugh et Barrett, 1998; Bruckert et Dejager, 1994; Olivecrona et Bengtsson-Olivecrona, 1993; Auwerx et coll., 1992).

##### **I.4.1. Structure de la lipoprotéine lipase**

La LPL est une glycoprotéine active sous forme homodimérique de 448 acides aminés. Elle appartient à la famille des sérine-estérases, comprenant la lipase hépatique, la lipase pancréatique et la lipase salivaire. Ces protéines présentent une grande homologie. Au niveau du domaine N-terminal, se retrouve le site catalytique de l'enzyme constitué des acides aminés sérine en position 132, acide aspartique en position 156 et histidine en position 241, le site de liaison des substrats lipidiques localisé entre les résidus 125 à 142 et le site de liaison de l'héparine (région 292-300). Le domaine C-terminal possède, pour sa part, un rôle primordial dans l'interaction initiale et la spécificité de liaison de la LPL avec les lipoprotéines (Wong, 1994). La LPL possède plusieurs sites de N-glycosylation, la glycosylation de la LPL étant indispensable à son activité enzymatique (Foubert et coll., 1996; Wong et coll., 1994; Olivecrona et Bengtsson-Olivecrona, 1990; Ong et Kern, 1989).

#### **I.4.2. Génétique de la lipoprotéine lipase**

Chez l'humain, le gène codant pour la LPL est situé sur le bras court (p22) du chromosome 8 et comprend 10 exons et 9 introns répartis sur 30 kilobases. De nombreuses mutations de ce gène, incluant des délétions, duplications et mutations faux-sens, ont été décrites. Une mutation particulièrement fréquente du gène de la LPL consiste en la substitution d'une glycine par un acide glutamique en position 188. Cette mutation induit la synthèse d'une molécule de LPL inactive. Une autre mutation située en position 176, responsable de la substitution d'une alanine par une thréonine, entraîne un défaut de liaison de la LPL à l'héparine (Foubert et coll., 1996; Santamarina-Fojo et Dugi, 1994; Lalouel et coll., 1992; Takagi et coll., 1992; Hayden et coll., 1991). Il existe une fréquence extrêmement élevée de mutations du gène de la LPL chez les canadiens-français du Québec. Les mutations du gène de la LPL dans les positions Gly188→Glu, Pro207→Leu, Asp250→Asn et Asn291→Ser sont relativement communes dans la province de Québec et rendent compte de presque 97% des mutations retrouvées dans la déficience homozygote en LPL ou hyperchylomicronémie familiale (Ma et coll., 1992; 1992a).

Les diverses mutations fonctionnelles du gène de la LPL, s'accompagnent de perturbations différentielles du profil lipidique plasmatique, et paraissent augmenter la susceptibilité aux maladies coronariennes (Austin et coll., 1999; Mero et coll., 1999; Julien P et coll., 1998). Il a été suggéré que la déficience homozygote et hétérozygote en LPL puisse prédisposer aux maladies cardiovasculaires prématurées et augmenter la progression de l'athérosclérose coronarienne (Nordestgaard et coll., 1997; Jukema et coll., 1996; Reymer et coll., 1995). En outre, une diminution d'activité de la LPL a été associée à une altération du profil lipidique et à une diminution de la production de NO (Sprecher et coll., 1996; Renier et Lambert, 1995).



Si les mutations Gly188→Glu, Asp9→ Asn et Asn291→ Ser sont associées à un profil lipidique athérogénique, les porteurs de la mutation Ser447-Ter (C→G) montrent un profil lipidique de type cardioprotecteur. Une mutation dans le promoteur de la LPL à la position 93 pourrait même augmenter l'activité de l'enzyme, et améliorer le profil lipidique plasmatique (Wittrup et coll., 1999; Hokanson, 1999; Henderson et coll., 1999; Fisher et coll., 1997).

L'association entre mutations de la LPL et concentrations élevées de LDL petites et denses n'a pas été confirmée par toutes les études. En effet, les allèles mutés de la LPL ne semblent pas contribuer significativement au risque coronarien chez les canadiens d'ascendance française. Il semble que la présence de facteurs de risque autres que les mutations soit nécessaire pour augmenter le risque de maladies coronariennes chez ces sujets (Minnich et coll., 1998; Gaudet et coll., 1998; Julien et coll., 1997).

### **1.4.3. Rôle de la lipoprotéine lipase**

Les chylomicrons et les VLDL transportent physiologiquement la quasi-totalité des triglycérides. Les AGL produits par l'hydrolyse des triglycérides, sont soit captés par les cellules, soit liés à l'albumine et transportés vers le foie. Le catabolisme des particules riches en triglycérides par la LPL s'accompagne d'un transfert important de lipides. En appauvrissant la particule en triglycérides, la LPL diminue la taille de la lipoprotéine et rend disponible les lipides de surface (phospholipides), pour la formation des HDL naissantes. L'action de la LPL s'accompagne d'un transfert de triglycérides et de cholestérol entre les HDL, les VLDL et les chylomicrons (Pruneta et coll., 1999; Hult et coll., 1998; Patsch, 1998; Olivecrona et Olivecrona, 1998; Cooper, 1997). Après hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycérides, la LPL reste associée sous sa forme dimérique

aux résidus de ces lipoprotéines et médie, en stimulant la liaison et la captation cellulaire des lipoprotéines, leur catabolisme (Beisiegel et Heeren, 1997).

Divers récepteurs cellulaires tels le récepteur des LDL, la protéine reliée au récepteur LDL ("LDL receptor-related protein" ou LRP), le récepteur Gp330 et le récepteur des VLDL lient la LPL. La LPL stimule le catabolisme des LDL et surtout des VLDL *via* le récepteur des LDL (Chappell et Medh, 1998). Le LRP induit la captation, par la LPL, des chylomicrons, des VLDL et des  $\beta$ -VLDL (Chappell et coll., 1993; Willnow et coll., 1992; Beisiegel et coll., 1991). Le récepteur Gp330 paraît faciliter la clairance des lipoprotéines associées à la LPL dans le plasma (Kounnas et coll., 1993). Finalement, le récepteur VLDL, exprimé au niveau musculaire, adipeux et cardiaque, augmente la captation des VLDL, médiée par la LPL (Takahashi et coll., 1995). Au niveau des fibroblastes, la LPL induit le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides *via* la protéine reliée au récepteur LDL/le récepteur  $\alpha$ 2-macroglobuline; les protéoglycans de la surface cellulaire facilitent ce processus (Chappell et coll., 1993). La LPL endogène augmente la liaison et l'association cellulaire des LDL natives et oxydées aux macrophages et contribue à la formation des cellules spumeuses (Wang et coll., 1999a). La LPL médie aussi la captation des HDL par les cellules hépatiques, indépendamment de son action lipolytique et indépendamment de la présence de récepteurs LDL (Rinninger et coll., 1998).

Si le rôle majeur de la LPL est d'hydrolyser les lipoprotéines riches en triglycérides, la finalité de son action varie selon les tissus. Ainsi, l'enzyme assure la production de lait dans la glande mammaire, la mise en réserve de graisse dans le tissu adipeux, l'approvisionnement en énergie pour le muscle, la synthèse de surfactant dans les cellules pulmonaires et enfin la thermogénèse dans le tissu adipeux brun (Vaziri et coll., 1999; Mellish et coll., 1999; van Bennekum et coll., 1999;

Hocquette et coll., 1998; Klingenspor et coll., 1996; Cole et Hixon, 1995; Jiang et coll., 1991; Eckel, 1989).

#### **I.4.4. Métabolisme de la lipoprotéine lipase**

##### **I.4.4.1. Biosynthèse et sécrétion**

Chez les mammifères, la LPL est principalement synthétisée dans le tissu adipeux, le muscle cardiaque, les muscles squelettiques et la glande mammaire pendant la lactation (Cryer et Jones, 1987; 1977; Hietanen et Greenwood, 1977; Chajek et coll., 1977). Elle est aussi exprimée, mais à des niveaux moindres par le cerveau, les ovaires, les testicules, le foie, le rein, les glandes surrénales et le poumon (Peinado-Onsurbe et coll., 1992; Semenkovich et coll., 1989; Kirchgessner et coll., 1989; Goldberg et coll., 1989; Gavin et coll., 1987; Brannon et coll., 1978). Elle est produite dans la paroi artérielle par les cellules musculaires lisses et les macrophages (O'Brien et coll., 1992; Jonasson, 1987).

Après sa synthèse, l'enzyme est activée par la N-glycosylation. Ce processus commence dans le réticulum endoplasmique pour ensuite se poursuivre dans l'appareil de Golgi. Dans chacun des compartiments, différentes enzymes clivent ou ajoutent à la protéine, divers résidus incluant le glucose, le mannose, le galactose, l'acide galacturonique, et l'acide sialique, formant des chaînes d'oligosaccharides complexes (Braun et Severson, 1992a). La glycosylation de la LPL, au site Asn-43, est indispensable pour la sécrétion de la protéine active (Ben-Zeev et coll., 1994; Semenkovich et coll., 1990). Après sa sécrétion, la LPL se lie aux protéoglycans exprimés à la surface des cellules endothéliales des capillaires sanguins; c'est une liaison ionique saturable, inhibée de façon compétitive par l'héparine (Lookene et coll., 1997; Foubert et coll., 1996; Wang et coll., 1992).

#### **I.4.4.2. Dégradation de la lipoprotéine lipase**

Le transport de la LPL vers le foie, site catabolique de l'enzyme, se fait par l'intervention des lipoprotéines. Physiologiquement, près de 70% de la LPL est dégradée dans la cellule hépatique. La dégradation de la LPL au niveau hépatique et adipocytaire est médiée par les protéoglycans (Obunike et coll., 1996; Sehayek et coll., 1995). La LPL a une demie-vie très courte et son activité est quasi-indéetectable dans le sang. Il semble que toute augmentation de l'activité plasmatique de la LPL soit essentiellement liée à une diminution de sa dégradation (Jansen et coll., 1998; Casaroli-Marano et coll., 1998). Il est à noter que la cellule endothéliale ne peut cataboliser l'enzyme, mais peut, cependant, l'internaliser et la re-sécréter, ce qui correspond à une mise en réserve (Knutson, 2000; Eckel, 1989).

#### **I.4.4.3. Régulation de la lipoprotéine lipase**

La régulation de la synthèse et de l'activité de la LPL est spécifique à une cellule et à un tissu considéré. Elle peut en outre, varier dans un même tissu au cours du développement (Singh-Bist et coll., 1994). Elle implique des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. Les régulateurs physiologiques de la LPL incluent l'état nutritionnel, les hormones, les nutriments, ainsi que les produits hydrolytiques générés par son action (Bengtsson et Olivecrona, 1980).

##### **I.4.4.3.1. Régulation transcriptionnelle**

Le promoteur du gène de la LPL contient plusieurs éléments *cis*, responsables de la régulation transcriptionnelle de l'enzyme. L'octamère (Oct)-1 est une séquence qui contrôle la transcription de la LPL. Sa mutation diminue la transcription génique de l'enzyme (Previato et coll., 1991). Parmi

les autres éléments *cis* présents dans le promoteur du gène de la LPL, on peut citer les éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE), l'élément spécifique aux lipides (FSE2), l'élément répondant à la thyroïde (TRE), la protéine activatrice 1 et 2 (AP1, AP2) et la protéine stimulatrice 1 (Sp1). Il semble que les différences existant entre ces éléments puissent expliquer les variations dans l'expression tissulaire, spécifiques de la LPL (Enerbäck et Gimble, 1993). Les PPARs sont les éléments les plus récemment impliqués dans la régulation transcriptionnelle de la LPL (Schoonjans et coll., 1996).

#### **I.4.4.3.2. Régulation post-transcriptionnelle**

**Stabilité du messager:** il a été démontré que la lipopolysaccharide (LPS) et l'interféron (IFN)- $\gamma$  diminuent la stabilité de l'ARNm de la LPL des monocytes/macrophages humains (Jonasson et coll., 1990; White et coll., 1988). Il semble d'autre part que les catécholamines activent une protéine, qui en se liant à la région 3' de l'ARNm de l'enzyme, puisse contrôler la traduction de la LPL adipocytaire. Il a été postulé que la PKC, en phosphorylant cette protéine, intervienne dans la traduction de la LPL (Ranganathan et coll., 1999; 1999a; 1997).

**Glycosylation:** la glycosylation de la LPL sur les sites Asn-43, Asn-257 et Asn-359 est impliquée dans la maturation et la sécrétion de l'enzyme active (BenZeev et coll., 1994; Semenkovich et coll., 1990).

**Liaison aux protéoglycans:** la liaison de la LPL aux héparan sulfates protéoglycans exprimés à la surface des cellules augmente l'activité de l'enzyme (Foubert et coll., 1996; Camps et coll., 1990). La LPL augmente à son tour, la production cellulaire des protéoglycans (Obunike et coll., 2000). Elle interagit avec les protéoglycans et les récepteurs des lipoprotéines au niveau des

fibroblastes et augmente, ainsi, la captation des lipoprotéines (Mann et coll., 1999). Le glycosyl-phosphatidyl-inositol est impliqué dans l'attache de la LPL aux protéoglycans (Chan et coll., 1988). Les AGL, pour leur part, interviennent dans la relâche de la LPL liée à l'endothélium vasculaire (Saxena et Goldberg, 1990; Olivecrona et Bengtsson, 1984).

**Interaction avec l'apo CII et l'apo CIII:** la LPL requiert la présence de son cofacteur, l'apo CII, pour acquérir son activité enzymatique. Ainsi l'activité plasmatique de la LPL augmente en présence de niveaux élevés de HDL, particules transportant les apo CII (Fremont et coll., 1987) et diminue lors du catabolisme des HDL2 en HDL3, qui sont plus petites et moins efficaces dans le transport des apo CII (Andersson et coll., 1999; Sich et coll., 1998). L'apo CIII inhibe la LPL et une diminution de transcription de l'apo CIII favorise la liaison de la LPL périphérique à son substrat (Bisgaier et coll., 1998; Ebara et coll., 1997).

#### **I.4.4.4. Régulateurs physiologiques de la lipoprotéine lipase**

##### **I.4.4.4.1. État de jeûne et état post-prandial**

Au cours du jeûne, une activité élevée de la LPL musculaire et basse de la LPL adipeuse, dirige les triglycérides vers les muscles qui les utilisent comme substrats énergétiques. Au contraire en phase post-prandiale, l'activité de la LPL augmente dans le tissu adipeux, assurant ainsi une mise en réserve des graisses dans ce tissu. Ces différences dans le niveau d'activité de la LPL reflètent les besoins énergétiques de l'organisme. En effet, le tissu adipeux stocke les graisses à l'état nourri, période pendant laquelle le muscle cardiaque utilise le glucose comme source première d'énergie. En période de jeûne, il se produit une lipolyse des triglycérides dans le tissu adipeux pour fournir l'énergie nécessaire à l'organisme (Olivecrona et coll., 1995; Ong et Kern, 1989a; Chajek-Shaul et

coll., 1985). Les changements tissulaires de la LPL, au cours du jeûne, pourraient être médiés par l'AMPc. En effet, il a été rapporté que l'AMPc diminue la LPL adipocytaire, mais augmente l'activité de la LPL au niveau des autres tissus (Cryer, 1987).

Plusieurs études ont démontré une régulation nutritionnelle de la LPL plasmatique. Coppack et coll. (1996) ont rapporté que le muscle sécrète la LPL active dans le plasma à l'état post-prandial et à l'état de jeûne, tandis que le tissu adipeux ne libère que peu de LPL active à l'état post-prandial et aucune LPL active à l'état de jeûne. Ces résultats sont surprenants dans la mesure où l'activité de la LPL est généralement plus élevée dans le tissu adipeux que dans le tissu musculaire. Les travaux récents de Karpe et coll. (1998) montrent qu'à l'état post-prandial et à l'état de jeûne, les tissus adipeux et musculaires sécrètent tous deux la LPL dans le plasma. Cependant, alors que le tissu musculaire sécrète régulièrement de la LPL active dans le plasma, le tissu adipeux sécrète une quantité importante de LPL inactive (Bergö et coll., 1996). Il semble que la LPL active soit redistribuée du tissu musculaire vers le tissu adipeux.

Malgré les multiples études effectuées sur la régulation de la LPL par l'état nutritionnel, il n'existe pas à l'heure actuelle de données sur les effets de l'état de jeûne et de l'état post-prandial sur la régulation de la LPL monocytaire/macrophagique.

#### **1.4.4.2. Régulateurs hormonaux et nutritionnels**

**Insuline/glucose:** l'insuline est l'hormone régulatrice majeure de la LPL adipocytaire. Des études menées sur des adipocytes isolés et en culture ont démontré que cette hormone inhibe la lipolyse, mais augmente, d'une manière aigüe, l'activité de la LPL et sa sécrétion; cette augmentation a été attribuée à des effets post-transcriptionnels de l'insuline sur les niveaux de la LPL adipocytaire

(Picard et coll., 1999; Raynolds et coll., 1990; Semenkovich et coll., 1989; Padines-Figueres et coll., 1988; Eckel, 1987; Vydelingum et coll., 1983; Ashby et coll., 1978). Des études *in vitro* ont montré que l'exposition des adipocytes 3T3-L1 à l'insuline cause la relâche de la LPL dans le milieu (Spooner et coll., 1979; Eckel et coll., 1978). La phosphatidyl-inositol-phospholipase C paraît être impliquée dans l'effet de l'insuline sur la libération de la LPL (Chan et coll., 1988). *In vivo*, une réduction d'activité de la LPL adipocytaire a été documentée chez le rat diabétique. Cette altération est réversible par administration d'insuline (Deshaies et coll., 1991; Behr et Kraemer, 1988; Nomura et coll., 1984; Chen et coll., 1980). L'activité de la LPL adipocytaire est aussi élevée durant le clamp euglycémique-hyperinsulinémique chez l'homme et le rat (Terrettaz et coll., 1994; Farese et coll., 1991). Cette augmentation semble médiée par la PI 3-kinase (Kraemer et coll., 1998). Si l'activation de la PKC n'augmente pas la LPL adipocytaire, son inhibition entraîne une diminution de la synthèse de l'enzyme, suggérant un rôle constitutif de la PKC dans la régulation de la LPL adipocytaire (Ranganathan et coll., 1999). Outre l'insuline, le glucose augmente aussi *in vitro* l'activité et la synthèse de la LPL par les adipocytes en culture. Il potentialise les effets stimulants de l'insuline sur l'activité de la LPL adipocytaire (Ong et coll., 1989).

Les effets modulateurs de l'insuline sur l'activité de la LPL musculaire, sont moins bien caractérisés. L'insuline inhibe l'activité et l'expression génique de la LPL musculaire (Laville et coll., 1996; Richelsen et coll., 1993). Cette inhibition est inversement reliée à la captation musculaire de glucose (Kiens et coll., 1989). La diminution aiguë de l'insulinémie durant le jeûne et l'exercice physique est accompagnée d'une augmentation de l'activité musculaire de l'enzyme (Seip et coll., 1995; Ladu et coll., 1991; Gorski et coll., 1982). Par contre, une diminution chronique de l'insuline diminue les niveaux de LPL musculaire, suggérant que le maintien des niveaux physiologiques de



LPL musculaire nécessite la présence continue de cette hormone (Deshaies et coll., 1991). Certaines études ont suggéré que les niveaux d'activité de la LPL musculaire pourrait être reliés à l'action métabolique de l'insuline sur la captation du glucose et du métabolisme des lipides, plutôt qu'à ses taux plasmatiques (Ferraro et coll., 1993; Pollare et coll., 1991).

Au niveau cardiaque, l'insuline semble diminuer l'activité de la LPL par un effet indirect. En effet, si l'incubation de cardiomyocytes en présence d'insuline n'affecte pas l'activité de la LPL, l'injection d'insuline *in vivo* induit une diminution d'activité de la LPL cardiaque chez le rat (Braun et Severson, 1992; Olooney et coll., 1983).

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

**Acides gras:** il a été suggéré que la libération d'acides gras, produits par l'action hydrolytique de la LPL, pourrait faciliter sa dissociation de ses sites de liaison (Karpe et coll., 1992; Peterson et coll., 1990). Physiologiquement, l'augmentation de concentration des AGL inhibe l'activité de la LPL plasmatique. Cette action est probablement l'étape limitante de la lipolyse des chylomicrons et des VLDL. Les acides gras polyinsaturés  $\omega_3$  augmentent l'ARNm de la LPL adipocytaire et l'activité de la LPL plasmatique (Luo et coll., 1998; Harris et coll., 1997; Zampelas et coll., 1994).

#### **I.4.4.4.3. Régulateurs de la lipoprotéine lipase macrophagique**

Les macrophages sont des cellules immuno-compétentes qui sécrètent, de manière constitutive, la LPL. La régulation de la LPL macrophagique est complexe. Les agents affectant la

prolifération et la maturation des cellules monocytaires augmentent la sécrétion de la LPL (Goldman, 1990). Une augmentation de production de LPL par les macrophages inflammatoires est aussi observée (Behr et Kraemer, 1986).

La régulation de sécrétion de la LPL macrophagique est différente de celle de la LPL adipocytaire et musculaire. Par exemple, alors que les glucocorticoïdes stimulent l'activité de la LPL musculaire (Krausz et coll., 1981), ils inhibent la sécrétion de la LPL macrophagique (Kawakami et coll., 1986). En outre, alors que l'insuline augmente l'activité de la LPL adipocytaire et que la RI s'accompagne d'une difficulté de l'insuline à stimuler la production de LPL au niveau adipocytaire (Maheux et coll., 1997; Eckel, 1987), cette hormone n'exerce aucun effet sur la sécrétion de la LPL macrophagique (Behr et Kraemer, 1986a).

**Hormones:** l'effet des hormones sur la LPL macrophagique a été relativement peu étudié. Il a été démontré que l'insuline et l'IGF-1 n'exercent pas d'effet direct sur la sécrétion de la LPL macrophagique (Behr et Kraemer, 1986a). En effet, dans une étude utilisant des souris déficientes en insuline, Behr et Kraemer (1988) ont observé qu'un traitement à l'insuline de ces souris affectait peu la sécrétion de la LPL macrophagique. Au vu de la diminution de sécrétion de la LPL macrophagique observée dans ce modèle expérimental et de l'absence d'effet direct de l'insuline sur la LPL macrophagique, ces auteurs ont suggéré que le diabète puisse modifier la sécrétion de la LPL macrophagique par des changements secondaires à la production d'effecteurs immunologiques.

La dexaméthasone inhibe, pour sa part, l'activité et la sécrétion de la LPL macrophagique chez la souris (Goldman 1990; Behr et coll., 1986), mais l'augmente chez l'humain (Kraemer, 1992; Domin et coll., 1991; Auwerx et coll., 1989). Enfin, la thyroxine stimule la synthèse et l'activité de la LPL macrophagique (Ong et coll., 1992; Saffari et coll., 1992).

**Cytokines:** White et coll (1988) ont rapporté que le traitement de macrophages humains par le TNF- $\alpha$  n'affectait pas l'activité de la LPL. Par contre, une réduction des niveaux d'ARNm, de la masse et de l'activité de la LPL produite par les macrophages J774.2 a été documentée en présence de TNF- $\alpha$  (Tengku-Muhammad et coll., 1996). Il semble que l'incubation de ces cellules en présence d'une combinaison de cytokines réduise de manière synergique, l'activité de la LPL, le degré de synergie maximale étant produit par la combinaison IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  (Tengku-Muhammad et coll., 1999; 1998).

**Facteurs de croissance:** le PDGF est sécrété par les macrophages humains, principalement sous isoforme de PDGF-BB. L'incubation des macrophages en présence de PDGF-BB induit l'expression de la LPL (Inaba et coll., 1995).

D'une manière similaire, le M-CSF augmente les niveaux d'ARNm de la LPL et la sécrétion de l'enzyme par les macrophages humains et alvéolaires de rat (Inaba et coll., 1995; Mori et coll., 1991). Le M-CSF, comme le PDGF-BB, pourrait réguler l'expression de la LPL, par sa capacité à stimuler la prolifération, la différenciation et la maturation des macrophages (Inaba et coll., 1995; Mori et coll., 1991).

**Dérivés lipidiques:** les macrophages sécrètent des prostaglandines en présence de LPS (DeLong et coll., 1999; Kawada et coll., 1992). L'étude effectuée par De Sanctis et coll. (1994) suggère que les prostaglandines médient l'effet inhibiteur de la LPS sur l'expression de la LPL macrophagique et la sécrétion de cette enzyme.

Les oxystérols produits suite à l'oxydation des LDL sont impliqués dans la régulation de la LPL macrophagique. L'incubation de macrophages dérivés de monocytes humains en présence de 7 $\beta$ -hydroxycholestérol et de 25-hydroxycholestérol diminue l'ARNm et l'activité de la LPL. Parmi

les autres dérivés du cholestérol, le cholestane-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -6 $\beta$ -triol et le 27-hydroxycholestérol diminuent l'activité de la LPL macrophagique (Mattsson Hultén et coll., 1996).

#### **I.4.5. Lipoprotéine lipase et pathologie**

La régulation de la LPL est modifiée par de nombreux états pathologiques. Les affections rénales chroniques, le syndrome néphrotique et l'hyperthyroïdie sont associés à une hypertriglycéridémie et à une baisse de l'activité plasmatique de la LPL. L'intérêt de la LPL en pathologie est considérable puisque plusieurs anomalies métaboliques sont associées à une diminution aussi bien qu'à une augmentation de l'activité de l'enzyme.

##### **I.4.5.1. Hyperlipidémie de type I ou hyperchylomicronémie**

L'hyperlipidémie de type I est une forme rare de dyslipidémie. Elle est aussi appelée hypertriglycéridémie exogène, au vu de l'influence des graisses alimentaires sur son expression. En effet, un régime pauvre en graisses entraîne une baisse rapide et constante des niveaux de triglycérides plasmatiques, alors qu'un régime riche en graisses augmente ce paramètre biologique (Savonen et coll., 1999; Shirai et coll., 1992). L'hyperlipidémie de type I est liée à un défaut de l'activité de la LPL. Ce défaut peut être lié à des anomalies génétiques de l'enzyme ou de son activateur physiologique, l'apo CII. Dans les deux cas, la présentation clinique est identique: le catabolisme des chylomicrons est ralenti, et ceux-ci s'accumulent dans la circulation. Bien que physiologiquement les VLDL soient catabolisés par la LPL, ces particules ne s'accumulent pas dans la circulation, et ce peut être grâce à l'action compensatrice de la lipase hépatique, ou alors à leur

captation directe par le foie. Une forme rare d'hyperchylomicronémie, liée à la présence d'inhibiteur circulant de la LPL a été décrite (Santamarina-Fojo, 1998; Brunzell et coll., 1983).

La complication majeure de l'hypertriglycéridémie de type I est la pancréatite aiguë, accident accompagnant classiquement une poussée d'hypertriglycéridémie majeure (Santamarina-Fojo, 1998; Brunzell et coll., 1983).

#### **I.4.5.2. Hyperlipidémie familiale combinée**

L'hyperlipidémie familiale combinée est une forme fréquente de dyslipidémie; le risque de maladies cardiovasculaires y est très élevé. Très souvent, elle se manifeste sous forme d'une hyperlipidémie mixte avec augmentation modérée du cholestérol et des triglycérides. Cette anomalie ne présente pas de caractéristiques cliniques particulières puisque plusieurs variétés d'hyperlipidémies peuvent y être individualisées. Elle peut même se traduire par une anomalie purement qualitative des LDL qui sont enrichies en apo B (Calabresi et coll., 1999; Goldstein et coll., 1973).

Malgré un mécanisme commun de synthèse hépatique accrue de l'apo B100, l'expression phénotypique de l'hyperlipidémie familiale combinée est variable. Ce phénomène peut être dû soit à une hétérogénéité génétique du catabolisme des lipoprotéines, soit à l'intervention de facteurs environnementaux, permettant une adaptation face à l'anomalie primaire (Yao et McLeod, 1994).

Les mécanismes responsables de l'augmentation de synthèse de l'apo B et des VLDL sont encore hypothétiques; un déficit en LPL pourrait en être responsable (Babirak et coll., 1992). En effet, il a été montré que la LPL diminuait la sécrétion de VLDL par les cellules hépatocytaires. Dans

le cas d'un déficit partiel en LPL, le remodelage des VLDL pourrait être moindre et aboutir à la sécrétion de particules enrichies en apo B (Avramoglu et coll., 1995).

Le rôle potentiel d'un déficit en LPL dans la pathogenèse de cette dyslipidémie est supporté par l'effet hypotriglycéridémiant des fibrates, des molécules connues pour leur effet stimulant sur la LPL (Andersson et coll., 1999; Steals et coll., 1997).

#### **1.4.5.3. Lipoprotéine lipase et obésité**

L'hypertriglycéridémie est une anomalie fréquemment retrouvée chez les patients obèses. La LPL joue un rôle fondamental au niveau du tissu adipeux puisqu'elle y permet la mise en réserve des acides gras produits par l'hydrolyse des triglycérides. Les niveaux plasmatiques de la LPL influencent la taille des cellules adipeuses et montrent une corrélation positive avec l'indice de masse corporelle (Kern et coll., 1990). À l'heure actuelle, il n'y a pas de preuve qu'une augmentation de l'activité lipasique puisse induire l'obésité. Cependant, il a été démontré que chez les femmes ayant des antécédents d'obésité, l'activité de la LPL plasmatique est exagérée après prise de sucre et après administration d'insuline. Cette hyper-réponse de la LPL peut avoir pour conséquence une mise en réserve excessive de triglycérides dans le tissu adipeux, conduisant à une reprise pondérale. Une augmentation de l'activité plasmatique de la LPL, a par ailleurs, été notée dans des modèles d'obésité expérimentale et dans le syndrome de Willi Prader (Schwartz et coll., 1979). D'autres études corrélent négativement la graisse viscérale abdominale et la masse de la LPL plasmatique, indépendamment des niveaux d'insuline à jeun (Kobayashi et coll., 1998). Une augmentation de la LPL adipocytaire a été documentée chez les sujets obèses (Berman et coll., 1999). Enfin, une corrélation négative entre l'indice de masse corporelle et la LPL musculaire et une relation inverse

entre la RI, le ratio taille/hanche et la LPL musculaire ont été rapportées par Richelsen et coll. (1993).

#### **I.4.5.4. Lipoprotéine lipase et athérome**

Une baisse d'activité de la LPL plasmatique a été documentée chez les patients coronariens (Henderson et coll., 1999). Il a été proposé que la déficience hétérozygote en LPL puisse favoriser les maladies coronariennes en raison de la dyslipidémie qui y est associée (Hokanson et coll., 1999; Henderson et coll., 1999; Julien et coll., 1997). Au vu de l'importance de la LPL dans le développement et la progression de l'athérome, nous traiterons ce sujet de manière développée dans la section suivante.

#### **I.4.6. Lipoprotéine lipase et athérosclérose**

En dépit du fait que la LPL soit synthétisée essentiellement par le tissu adipeux et musculaire, elle est aussi exprimée et sécrétée par diverses cellules vasculaires telles les macrophages et les cellules musculaires lisses. C'est cette source de LPL qui a été récemment impliquée dans la pathogenèse de l'athérosclérose. En effet, bien que la LPL puisse exercer un effet périphérique anti-athérogénique, de nombreuses évidences suggèrent que l'enzyme sécrétée dans la paroi vasculaire puisse promouvoir, par ses propriétés enzymatiques et structurales, le développement de l'athérosclérose (Chait et coll., 1982; Zilversmit, 1973).

#### **I.4.6.1. Effets anti-athérogéniques de la lipoprotéine lipase**

L'activité de la LPL est diminuée chez les patients coronariens et certains patients déficients en LPL développent des lésions avancées d'athérosclérose (Henderson et coll., 1999; Benlian et coll., 1996). Les individus hétérozygotes pour des mutations du gène de la LPL, induisant une diminution de l'activité de cette enzyme, sont prédisposés à développer des lésions athéromateuses de manière prématurée (Henderson et coll., 1999; Nordestgaard et coll., 1997; Wittrup et coll., 1997; Jukema et coll., 1996; Reymer et coll., 1995). À l'inverse, il a été rapporté qu'une mutation de la LPL, induisant une augmentation de l'activité de l'enzyme, confère une protection contre la maladie coronarienne (Gagnes et coll., 1999; Henderson et coll., 1999; Wittrup et coll., 1997).

Un autre argument en faveur d'un rôle anti-athérogénique de la LPL est que l'hypertriglycéridémie associée à la RI et au diabète de type 2, et impliquée dans l'accélération de l'athérosclérose (Chanu, 1999; Austin, 1998), est largement médiée par la suppression de l'expression de la LPL adipocytaire par les cytokines telles le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (Halle et coll., 1998; Kern, 1997). D'autre part, la lipolyse des lipoprotéines riches en triglycérides dans le tissu adipeux, le coeur et les muscles squelettiques, détermine un profil lipidique non athérogénique (Yagy et coll., 1999). Ainsi la surexpression de la LPL normalise le profil lipidique athérogénique des souris déficientes en apo-E ou en récepteur aux LDL et protège ces modèles expérimentaux de l'hyperlipidémie induite par la diète (Yagy et coll., 1999; Shimada et coll., 1996; Hayden et coll., 1993). Hokanson et coll (1999) ont aussi rapporté une relation entre la déficience en LPL et la production de petites particules de LDL. Finalement, la LPL paraît hydrolyser les VLDL modérément oxydées d'une manière moins efficace, comparées aux VLDL natives (Jong et coll., 2000). L'administration d'un activateur de la LPL tissulaire, le NO-1886, prévient, en augmentant les HDL,



le développement de l'athérosclérose (Tsutsumi et coll., 1993). La LPL médie finalement la captation sélective des HDL, contenant plus d'esters de cholestérol, par les cellules hépatiques et stimule la clairance hépatique des lipoprotéines et des résidus de chylomicrons (Rinninger et coll., 1998).

#### **I.4.6.2. Effets pro-athérogéniques de la lipoprotéine lipase**

La première théorie impliquant la LPL dans l'athérosclérose a été proposée par Zilversmit et coll. (1973). Selon cette théorie, l'augmentation de la concentration des lipoprotéines remnantes riches en cholestérol au niveau de l'endothélium vasculaire, résultant de l'action hydrolytique de la LPL, induit une accumulation de cholestérol dans la paroi vasculaire. Depuis lors, différentes découvertes ont appuyé le concept d'un rôle athérogénique de la LPL et sont discutées dans les sections ci-dessous.

##### **I.4.6.2.1. Expression de la lipoprotéine lipase dans la lésion athéromateuse**

Les cellules spumeuses dérivées des macrophages sont la source primaire de la LPL dans la lésion athérosclérotique (O'Brien et coll., 1992; Yla-Herttuala et coll., 1991). Le rôle de la LPL macrophagique dans l'athérogenèse a été longtemps débattu. En 1993, Renier et coll., ont démontré que l'état de susceptibilité à l'athérosclérose est associé, chez la souris congénique, à des niveaux élevés de LPL macrophagique, suggérant ainsi un rôle contributif de la LPL macrophagique dans la progression de l'athérosclérose. Récemment, il a été démontré, qu'en dépit d'une dyslipidémie profonde, une diète athérogénique n'augmente pas de manière significative le développement de lésions athéromateuses, chez des souris présentant un déficit hétérozygote en LPL (Semenkovich et

coll., 1998). Enfin, le rôle de la LPL macrophagique dans la formation des cellules spumeuses et des lésions athéromateuses a été récemment rapporté par Babaev et coll. (1999).

#### **I.4.6.2.2. Induction de lipoprotéines remnantes athérogéniques par la lipoprotéine lipase**

Par ses propriétés catalytiques, la LPL hydrolyse les lipoprotéines riches en triglycérides et les enrichit en esters de cholestérol (Zilversmit, 1995). Les résidus de lipoprotéines captés avidement par les macrophages, ainsi que les AGL générés par l'action hydrolytique de la LPL et réestérifiés dans les macrophages, contribuent de manière directe à la formation des cellules spumeuses (Evans et coll., 1993; Aviram et coll., 1988). Il a été récemment démontré que l'hydrolyse des VLDL par la LPL, en libérant le fer de la transferrine, contribue à l'oxydation des LDL (Balagopalakrishna et coll., 1999).

#### **I.4.6.2.3. Lipoprotéine lipase, un ligand athérogénique**

Indépendamment de son effet catalytique, la LPL agit comme un ligand pro-athérogénique, facilitant la captation cellulaire des lipoprotéines. L'association de la LPL aux lipoprotéines favorise leur interaction avec la surface cellulaire et leur captation (Auerbach et coll., 1999; Wu et Pizzo, 1996; Medh et coll., 1996; Fernandez-Borja et coll., 1996; Hendriks et coll., 1996). La LPL endogène augmente la liaison et l'association cellulaire des LDL natives et oxydées, aux macrophages, et contribue à la formation des cellules spumeuses (Wang et coll., 1999a). L'interaction entre LDL et LPL augmente suite à l'oxydation des LDL (Wang et coll., 1999a; Makoveichuk et coll., 1998; Kaplan et Aviram, 1997). L'enzyme agit aussi de manière synergique avec la sphingomyélinase pour augmenter l'association des LDL et de la Lp(a) aux héparan sulfates

et à la matrice sous-endothéliale (Auerbach et coll., 1999; van Barlingen et coll., 1997; 1996; Tabas et coll., 1993) et contrôle la phagocytose médiée par les récepteurs Fc macrophagique (Yin et coll., 1997). Ce faisant, la LPL contribue à la rétention et à l'accumulation des lipoprotéines dans la matrice sous-endothéliale et à leur captation cellulaire (Wu et Pizzo, 1996; Medh et coll., 1996; Goldberg, 1996).

L'effet de la LPL sur la captation des lipoprotéines nécessite qu'elle se lie simultanément aux héparan sulfates protéoglycans, aux lipoprotéines et aux récepteurs (Goldberg, 1996; Olivecrona et Olivecrona, 1995). Tel que mentionné précédemment, les récepteurs cellulaires liant la LPL incluent tous les membres de la famille du récepteur des LDL étudiés à ce jour, c'est-à-dire le récepteur des LDL, la LRP, le récepteur Gp330 et le récepteur des VLDL (Chappell et Medh, 1998; Hendriks et coll., 1997). Takahashi et coll. (1995) ont suggéré que les macrophages puissent exprimer des récepteurs qui reconnaissent tant les VLDL riches en triglycérides et riches en apo-E, que les lipoprotéines remnantes riches en triglycérides.

La fonction de pont proposée pour la LPL a été supportée par de nombreuses études *in vitro* (Rumsey et coll., 1992; Mulder et coll., 1992; Eisenberg et coll., 1992; Beisiegel et coll., 1991). Tout récemment, Merkel et coll., (1998) ont démontré que la LPL catalytiquement inactive, était capable de se lier *in vivo* aux protéoglycans et d'induire la captation des VLDL par les muscles. Il a aussi été proposé que la LPL puisse former un pont entre les héparan sulfates exprimés à la surface de l'endothélium et ceux exprimés à la surface des monocytes et ce faisant, jouer le rôle d'une molécule d'adhésion (Mamputu et coll., 1997; Obunike et coll., 1997). L'oxydation des lipoprotéines influence l'effet de la LPL sur la captation des lipoprotéines. Ainsi, la LPL stimule la liaison des LDL oxydées aux macrophages et leur captation subséquente (Hendriks et coll., 1996). L'oxydation des LDL et

des VLDL augmente aussi leur affinité pour les héparan sulfates et la LPL, exprimés à la surface des macrophages et des cellules endothéliales (Makoveichuk et coll., 1998; Auerbach et coll., 1996).

#### **I.4.6.2.4. Régulation de la lipoprotéine lipase par les agents présents dans la lésion**

Comme suggéré précédemment, l'expression de la LPL dans la paroi vasculaire paraît pro-athérogénique. Plusieurs facteurs présents dans la lésion incluant les lipoprotéines modifiées, les facteurs de croissance, les facteurs chimiotactiques et les cytokines jouent sans doute, un rôle majeur dans la régulation de l'expression de la LPL macrophagique au niveau de la paroi vasculaire (Ross, 1999; 1995; 1993). La LPS et diverses cytokines telles l'IL-1, l'IL-11, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  suppriment l'expression, l'activité et la sécrétion de la LPL (Tengku-Muhammad et coll., 1999; 1998; 1996). L'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et la LPS agissent de manière synergique pour inhiber l'enzyme (Tengku-Muhammad et coll., 1999; 1998). D'autres agents tels les prostaglandines, les LDL oxydées, la lysophosphatidylcholine, le 7 $\beta$ -hydroxycholestérol et le 25-hydroxycholestérol suppriment l'expression de la LPL macrophagique (Stengel et coll., 1998; Hulten et coll., 1996; Desanctis et coll., 1994). La suppression de la LPL par ces agents pro-athérogéniques pourrait limiter la transformation des macrophages en cellules spumeuses durant les étapes initiales de la formation des lésions athéromateuses. Parmi les agents augmentant l'expression de la LPL macrophagique, on note le stress oxydatif et les espèces radicalaires oxygénés, la dexaméthasone, le PDGF et le M-CSF (Renier et coll., 1996; Inaba et coll., 1995; Mori et coll., 1991; Domin et coll., 1991).

#### **I.4.7. Lipoprotéine lipase et diabète**

L'activité enzymatique de la LPL au niveau du tissu adipeux et des muscles squelettiques dépend de l'insuline, variant avec les niveaux d'insuline et la sensibilité des tissus à cette hormone. Le diabète module l'expression de la LPL par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. En effet, l'induction du diabète chez l'animal est associée à une diminution de l'expression et surtout de l'activité de la LPL adipocytaire (Taskinen, 1987). À l'inverse, le diabète est associée à une augmentation de la masse et de l'activité de la LPL cardiaque (Shepherd et coll., 1998; Rodrigues et coll., 1997). Cette altération est corrigée par l'administration d'insuline (Tavangar et coll., 1992). Des études immuno-histochimiques ont démontré que l'augmentation de la LPL au niveau cardiaque était imputable à une augmentation d'activité de cette enzyme au niveau de l'endothélium capillaire. Il a été proposé que l'activité augmentée de la LPL au niveau de l'endothélium capillaire puisse accroître, au cours des états d'insulino-déficience, l'apport des AGL au coeur (Tavangar et coll., 1992).

En vertu de sa modulation tissulaires la LPL a été suggérée comme gène candidat impliqué dans la pathogenèse de l'obésité et du DNID (Ranganathan et coll, 1999; Mingrone et coll., 1999; Knudsen et coll., 1997). Des mutations du gène de la LPL ont été retrouvées chez certains sujets diabétiques obèses (Zhang et coll., 1997). Une diminution d'activité de la LPL plasmatique et adipocytaire, documentée chez les sujets diabétiques, suggère un rôle de cette enzyme dans la dyslipidémie associée au diabète. Il a été proposé que l'inhibition d'expression de la LPL puisse être secondaire, dans ces pathologies, à l'augmentation de production, par le tissu adipeux et musculaire, du TNF- $\alpha$ . (Kern, 1997).

Tel que mentionné auparavant, la RI diabétique est associée à une altération du profil lipidique caractérisée par une augmentation des triglycérides, une diminution des niveaux plasmatiques de HDL, et un changement de composition des LDL. L'HI et l'obésité abdominale, compagnons typiques de la RI, contribuent à ces anomalies lipidiques. Il a été proposé que la déficience en LPL, en altérant les niveaux de triglycérides et d'AGL plasmatiques et ceux de lipoprotéines puisse induire la RI et le DNID (Boivin et Deshaies, 2000; Mingrone et coll., 1999; Howard, 1999; Maheux et coll., 1997; Knudsen et coll., 1995). À l'inverse, d'autres études soutiennent que l'hypertriglycéridémie et les modifications qualitatives des LDL associées au diabète ne soient pas causées par la diminution d'activité tissulaire de la LPL (Jansen et coll., 1994; Kraemer et coll., 1982; Chen et coll., 1980). Cette hypothèse est appuyée par l'étude de Jansen et coll. (1994), démontrant un accroissement de l'activité plasmatique de la LPL chez les patients insulino-résistants atteints de maladies coronariennes.

## **I. 5. Hypothèse et objectifs**

Les patients atteints de DNID développent des lésions athéromateuses de manière accélérée. Diverses évidences suggèrent que la LPL, synthétisée par les macrophages dans la paroi vasculaire, puisse contribuer au développement et à la progression du processus athéromateux. En dépit de ces observations, la régulation de la LPL macrophagique dans le diabète n'a pas été étudiée. L'hyperglycémie est un facteur de risque des maladies cardiovasculaires associées au diabète. Le glucose stimule la prolifération macrophagique et accroît la production de cytokines pro-athérogéniques par ces cellules. L'hypothèse de notre étude est qu'il existe chez le patient diabétique de type 2, une altération de la régulation de la LPL macrophagique, au moins partiellement attribuable à l'hyperglycémie.

Les objectifs spécifiques de notre étude sont:

- 1) d'étudier *in vitro* l'effet direct de concentrations élevées de glucose sur l'expression et la production de la LPL macrophagique;
- 2) d'étudier le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) impliqué(s) dans la régulation de la LPL par le glucose;
- 3) de caractériser le système de la LPL macrophagique et le rôle des facteurs périphériques dans la régulation de cette enzyme chez le patient diabétique de type 2.

## II. RÉSULTATS



**II. 1. PREMIER ARTICLE**

*Diabetes* 47:431-438, 1998

**STIMULATORY EFFECT OF GLUCOSE ON MACROPHAGE LIPOPROTEIN LIPASE  
EXPRESSION AND PRODUCTION.**

Maryam Radimeh Sartippour, Anick Lambert, Mireille Laframboise, Pascal St-Jacques, and  
Geneviève Renier.

Department of Nutrition, Louis-Charles Simard Research Center, Notre-Dame Hospital, University  
of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Short title: Glucose increases macrophage lipoprotein lipase expression.

Keywords: Glucose, macrophage, lipoprotein lipase.

Abbreviations: CSF, colony-stimulating factor; DECP, diethyl pyrocarbonate; DMEM, Dulbecco's minimal essential medium; DTT, dithiothreitol; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FCS, fetal calf serum; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IL, interleukin; LPL, lipoprotein lipase; MDM, monocyte-derived macrophage; PCR, polymerase chain reaction; PDGF, platelet-derived growth factor; PKC, protein kinase C; PMA, phorbol myristate acetate; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; TNF, tumor necrosis factor.

Address correspondence and reprint requests to:

Dr. Geneviève Renier  
Notre-Dame Hospital  
Louis-Charles Simard Research Center  
3rd floor, door 3622  
1560 Sherbrooke St. East  
Montreal, Quebec, H2L 4M1, Canada.  
E-mail: renierg@.ere.umontreal.ca

**SUMMARY**

Cardiovascular diseases are the leading cause of morbidity and mortality in diabetes. Lipoprotein lipase (LPL), a major secretory product of macrophages, has been suggested to play a key role in the development of atherosclerosis. In the present study, we evaluated the effect of high glucose on macrophage LPL mRNA expression and secretion. Exposure of murine J774 macrophages to high D-glucose concentrations (20-30 mM) resulted in a dramatic upregulation of LPL mRNA expression and immunoreactive mass. This effect was not observed when these cells were incubated in presence of L-glucose or mannitol. High glucose concentrations were also found to enhance LPL gene expression and immunoreactive mass in human monocyte-derived macrophages. J774 cells cultured in an high glucose environment expressed increased c-fos mRNA levels. Treatment of these cells with c-fos antisense DNA or protein kinase C inhibitor inhibited the stimulatory effect of glucose on LPL mRNA expression. In J774 cells exposed to high glucose concentrations, enhanced nuclear protein binding to the AP-1-responsive region of the murine LPL promoter was observed, while LPL mRNA stability remained unchanged. Overall, these results demonstrate that high glucose upregulates macrophage LPL gene expression and immunoreactive mass and that this effect involves transcriptional events.

## INTRODUCTION

Atherosclerosis occurs prematurely in diabetic patients and is considered to be a major complication of diabetes mellitus (1-5). Evidence has been provided that immune reactions are involved in the development of atherosclerosis. The early recruitment of monocytes to the arterial intima and their subsequent transformation into lipid-laden macrophages argue for a crucial role of these cells in the development and progression of atherosclerotic lesions (6-9). Macrophages constitutively synthesize lipoprotein lipase (LPL) (10-12), a key enzyme in the catabolism of triglyceride-rich lipoproteins (13). Accumulating evidence suggests that LPL, by promoting the uptake of atherogenic lipoproteins by different vascular cell types, may contribute to lipid accumulation within the arterial wall, thereby promoting the atherogenic process (14-15). It has been shown that LPL activity is low in normal arteries, which have few macrophages, and increases during progression of the atherosclerotic plaque, which contains a large number of macrophage-like cells [16]. Furthermore macrophages have been documented to express LPL, both mRNA and protein, in atherosclerotic lesions in vivo (17-20).

Despite the high incidence of atherosclerosis in diabetic patients and the potential key role of macrophage LPL in the atherogenic process, the regulation of macrophage LPL expression in diabetes has not been investigated. Several studies suggest that macrophage LPL secretion could be enhanced in diabetes. High macrophage LPL expression and secretion have been previously documented in atherosclerosis- and diabetes-prone mice (21). In addition, incubation of human macrophages with hypertriglyceridemic VLDLs, which accumulate in the plasma of diabetic subjects, has been shown to result in enhanced LPL production by these cells (22).

The modulatory effect of a high glucose environment on macrophage function has been previously documented. It has been reported that high glucose concentrations increase the proliferation of macrophages (23) and enhance the growth response of these cells to colony-stimulating factor (CSF)-1 (24). Glucose and advanced glycation end products have also been shown to increase the production of interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  by human monocytes (25, 26). In the present study, we studied the effect of high glucose on macrophage LPL expression and secretion. In addition, based on previous data showing a stimulatory effect of high glucose on *c-fos* protein (27) and an involvement of this oncogene in the control of LPL expression (28), we evaluated the role of *c-fos* in the regulation of macrophage LPL by glucose.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Reagents**

Fetal calf serum (FCS) was purchased from Hyclone Laboratories (Logan, UT). Glucose-free Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) and RPMI 1640 medium were obtained from INC Biochemicals Inc., (Costa Mesa, CA) and Gibco BRL, (Burlington, ONT), respectively. D-glucose, L-glucose, mannitol, phorbol myristate acetate (PMA), actinomycin D and heparin were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Calphostin C was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA).

### **Murine and human macrophages**

The J774 murine macrophage cell line was obtained from the American Type Cell Culture Collection (Rockville, MD). J774 cells were cultured in DMEM containing 10% FCS (FCS-DMEM) and 100 µg/ml penicillin-streptomycin (Flow, McLean, VA). For experiments assessing the effect of increasing concentrations of glucose, we used a customized preparation of FCS-DMEM containing 5.6 mmol/l of glucose to which varying amounts of glucose was added to make up the desired final glucose concentrations.

Human monocytes were isolated as previously described (29). Peripheral blood mononuclear cells were isolated by density centrifugation using Ficoll, allowed to aggregate in presence of FCS, then further purified by the rosetting technique. After density centrifugation, we recovered highly purified monocytes (85-90%), as assessed by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, Rutherford, NJ) using phycoerythrin-conjugated anti-CD14 monoclonal antibody (Becton Dickinson). In some experiments, monocytes were positively selected according to CD14 expression by means of a FACSort (Becton Dickinson). Differentiation of monocytes into monocyte-derived

macrophages (MDMs) was achieved by culturing the freshly isolated monocytes in RPMI 1640 medium supplemented with 20% (vol/vol) autologous serum. After 4 days in culture, MDMs were incubated for 1-5 days in fresh RPMI medium containing 5.6 or 30 mmol/l glucose and supplemented with 20% autologous serum. The low and high glucose RPMI media were prepared by adding to glucose-free RPMI medium (Gibco BRL) appropriate amounts of glucose to make up the desired final glucose concentrations.

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

Ten million J774 macrophages were plated in plastic petri dishes (100 x 20 mm) (Falcon, Lincoln Park, NJ.). After treatment with appropriate agents, these cells were lysed with guanidine isothiocyanate. Total RNA was purified by centrifugation through a cesium chloride gradient as previously described in detail by Chirgwin et al (30). Of the total RNA, 18 µg was separated in a 1.2% agarose gel containing 2.2 mol/l formaldehyde as previously described (31). The blots were prehybridized for 18 h in prehybridization buffer. The mRNA expression was analyzed by hybridization with [<sup>32</sup>P] dCTP-labeled LPL (specific activity ~ 3,000 Ci/mmol; Amersham, Arlington Heights, IL), *c-fos* and S28 DNA inserts. Hybridization was detected by autoradiography with Kodak X-Omat-AR films (Rochester, NY). mRNA expression was quantified by high resolution optical densitometry (SciScan 5000, USB, Cleveland, OH).

Expression of the LPL gene in glucose-stimulated human MDMs was performed by the polymerase chain reaction (PCR) technique. Cytoplasmic RNA for use in the PCR reaction was extracted from human MDMs by the acid-phenol technique of Chomczynski (32), precipitated and resuspended in diethyl pyrocarbonate water. cDNA was synthesized from RNA by incubating total

cellular RNA with 0.1  $\mu$ g oligodT (Pharmacia, Piscataway, NJ) for 5 min at 98°C, then by incubating the mixture with reverse transcription buffer for 60 min at 37°C. The cDNA obtained was amplified by using 0.8  $\mu$ mol/l of two synthetic primers specific for human LPL (5'-GAGATTTCTCTGTATGGCACC-3') (5'-CTGCAAATGAGACACTTTCTC-3') and human glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase(GAPDH)(5'-CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG-3') (5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG-3'), used as internal standard, in the PCR reaction mixture. A 277-base pair human LPL cDNA fragment and a 456-base pair human GAPDH cDNA fragment were amplified enzymatically by 30 repeated cycles at 95°C for 60 s, 60°C for 40 sec, and 72°C for 90 sec. An aliquot of each reaction mixture was then subjected to electrophoresis on 4.2% PAGE gel followed by autoradiography with Kodak X-Omat-AR films. RNA expression was quantified by high resolution optical densitometry (SciScan 5000, USB).

### **DNA binding assay**

The isolation of nuclei was performed as previously described (33). Briefly,  $5 \times 10^7$  J774 cells were collected, washed with cold PBS, and lysed in 1 ml of ice-cold buffer A (15 mmol/l KCl, 2 mmol/l  $MgCl_2$ , 10 mmol/l HEPES, 0.1% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 0.5% Nonidet P-40). After a 10-min incubation on ice, lysed cells were centrifuged and the nuclei were washed with buffer A without Nonidet P-40. The nuclei were then lysed in a buffer containing 2 mol/l KCl, 25 mmol/l HEPES, 0.1 mmol/l EDTA, and 1mmol/l dithiothreitol (DTT). After a 15-min incubation period, a dialysis buffer (25 mmol/l HEPES, 1mmol/l DTT, 0.1% PMSF, 2  $\mu$ g/ml aprotinin, 0.1 mmol/l EDTA, and 11% glycerol) was added to the nuclei preparation. Nuclei were collected by centrifugation for 20 min at 13,000g. Fifty-microliter aliquots of the supernatants were



frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  and protein concentration was determined. DNA retardation (mobility shift) electrophoresis assays were performed as previously described by Fried and Crothers (34). Briefly, 5- $\mu\text{g}$  nuclear extracts were incubated for 15-min in the presence of 5x binding buffer (125 mmol/l HEPES, pH 7.5, 50% glycerol, 250 mmol/l NaCl, 0.25% Nonidet P-40, 5 mmol/l DTT). End-labeled double-stranded consensus sequences of the LPL promoter AP-1-enhancing element (10,000 cpm per sample) were then added to the samples for 30 min. Samples were analysed on a 4% nondenaturing polyacrylamide gel, containing 0.01% Nonidet P-40. The specificity of the nuclear protein binding was assessed by incubating the nuclear proteins isolated from macrophages with labeled DNA probe in the presence of a 100-molar excess of unlabeled DNA probe.

### DNA probes

The probe for detection of murine LPL was prepared by PCR. cDNA was obtained from total RNA using a reverse transcription reaction. Two synthetic primers spanning bases 255-287 and 1,117-1,149 of the LPL cDNA were used to enzymatically amplify a 894-base pair region of the LPL probe. The cDNA probes for murine *c-fos* and S28 were purchased from American Type Cell Culture Collection. A 20-mer double stranded oligonucleotide (5'-GGGCACCTGACTAAGGCCAG-3'; 5'-TGTGCTGGCCTTAGTCAGGT-3') containing the consensus sequence for the AP-1 responsive element of the murine LPL gene promoter (35, 36) was synthesized with the aid of an automated DNA synthesizer. After annealing, the double-strand oligonucleotide was labeled with  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$  by using the Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) 5'-end-labeling kit.

***c-fos* oligonucleotide synthesis**

Phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides specific to the 5'-end of murine *c-fos* were synthesized in both the sense (*fos*) and antisense (*sof*) orientation by means of an automatic DNA synthesizer. The sequences were: 5'-ATGATGTTCTCGGGTTTC-3' for *fos* and 5'-GAAACCCGAGAACATCAT-3' for *sof*. After synthesis, oligomers were purified by Guard-Pak C18 cartridges (Waters, Milford, MA), precipitated with 2-propanol, dissolved in water and quantitated by spectrophotometry.

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

Two million J774 cells or human MDMs were incubated for 1-5 days in culture medium containing 5.6 or 30 mmol/l glucose. At 1 h before the end of the incubation period, 0.5U/ml heparin was added to the medium. The amounts of murine and human LPL immunoreactive mass were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described (37, 38) and were expressed per milligrams protein per milliliter. Medium and intracellular LPL activity of J774 cells exposed for 5 days to 5.6 or 30 mmol/l glucose was determined using the confluolip kit (Progen, Heidelberg, Germany) (39).

**Determination of TNF- $\alpha$  immunoreactive mass**

J774 cells were cultured for 1-5 days in the presence of 5.6 or 30mmol/l glucose. At the end of the incubation periods, the quantity of TNF- $\alpha$  immunoreactive mass released in the culture medium of the cells was determined by ELISA (40) and expressed per milligrams protein per milliliter.

**Determination of protein concentrations**

Total protein content was estimated according to the Bradford method (41) by using a colorimetric assay (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada).

**Statistical analysis**

All values were expressed as the mean  $\pm$  SE. Data were analyzed by Student's *t*-test for single comparisons and by Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons.

## RESULTS

### **Effect of D-glucose on LPL expression, production and activity.**

Incubation of J774 cells with increasing D-glucose concentrations (5.6, 10, 20 and 30mmol/l) increased, in a dose-dependent manner, the LPL mRNA expression by these cells (Fig. 1A). Maximal effect was observed after a 48-h incubation period in the presence of 30mmol/l glucose concentration. Under these experimental conditions, no modulation of the mRNA expression of S28 was observed (Fig. 1B). LPL mRNA levels normalized to the levels of S28 mRNA are illustrated in Fig. 1C.

Recovery of enhanced amounts of LPL immunoreactive mass from the culture media containing high glucose concentrations reflected the increase in LPL mRNA expression of J774 cells exposed to a high glucose environment (Fig. 2A). Maximal levels of LPL mass were observed in J774 cells treated for 4 days with 20 mmol/l glucose. Enhanced TNF- $\alpha$  release by macrophages was also observed after culture of these cells in a high glucose concentration medium. Although significantly elevated after a 24-h and 48-h incubation period in the presence of 30mmol/l glucose (data not shown), maximal levels of TNF- $\alpha$  mass were observed after culture of the cells in the presence of 20-30 mmol/l glucose for 3-5 days (Fig. 2B). In J774 cells exposed to high glucose concentrations, a 1.25-fold increase in the levels of medium LPL activity was observed. In contrast, the levels of intracellular LPL activity in these cells remained unchanged (data not shown).

### **Effect of D-glucose on human MDM LPL expression and secretion.**

To ascertain the physiological relevance of our findings in J774 cells, LPL gene expression and secretion by human MDMs cultured in the presence of 5.6 or 30 mmol/l glucose concentrations

were next measured. The stimulatory effect of high glucose concentrations on MDM LPL mRNA levels and immunoreactive mass was observed after a 5-day exposure of these cells to 30 mmol/l glucose concentration (Fig. 3).

#### **Effect of L-glucose and mannitol on murine macrophage LPL mRNA expression.**

To control for osmolality, J774 cells were incubated for 48 hours in the presence of 5.6 or 30 mmol/l L-glucose or mannitol. No demonstrable stimulatory effect of both L-glucose and mannitol was observed on macrophage LPL mRNA expression, thereby indicating a specific effect of D-glucose on macrophage LPL gene expression (LPL mRNA expression: L-glucose, 1.2; mannitol, 1.1).

#### **Effect of high glucose concentration on basal and PMA-stimulated macrophage *c-fos* mRNA levels.**

To evaluate the effect of high glucose concentrations on macrophage *c-fos* mRNA expression, J774 cells were cultured for 48 h in the presence of 5.6 or 30 mmol/l glucose. At the end of these incubation periods, cells were left unstimulated or were incubated in presence of 50 nmol/l PMA for 30 minutes. Exposure of unstimulated macrophages to high glucose concentrations significantly enhances basal *c-fos* mRNA levels (*c-fos* mRNA expression [fold increase over control values]: 30 mmol/l glucose:  $2.1 \pm 0.1$ ,  $P < 0.005$ ). (Fig. 4A and C). A marked increase in *c-fos* mRNA levels was also observed in PMA-stimulated cells as compared to those observed in cells exposed to normal glucose concentrations (Fig. 4A and C).

**Effects of *c-fos* antisense oligonucleotide on glucose-induced macrophage LPL gene expression.**

To assess the role of *c-fos* in the regulation of macrophage LPL expression by glucose, J774 cells were cultured for 48 h with 5.6 or 30 mmol/l glucose in the presence or absence of *c-fos* sense or antisense oligonucleotides. As shown in Fig. 5, addition of 10  $\mu\text{mol/l}$  *c-fos* antisense oligonucleotides to the macrophage culture medium led to a significant inhibition of glucose-stimulated macrophage LPL mRNA expression. Maximal effectiveness of the *sof* oligomer was observed between 5 and 10  $\mu\text{mol/l}$  (data not shown). No inhibitory effect of either *c-fos* sense (Fig. 5) and *c-myc* antisense oligonucleotide (data not shown) was observed on glucose-induced LPL expression.

**Effect of calphostin C, on glucose-stimulated LPL gene expression.**

To determine whether protein kinase C (PKC) may represent the signaling pathway involved in the upregulation of macrophage LPL gene expression by glucose, J774 cells were cultured for 48 h with 5.6 or 30 mmol/l glucose in the presence or absence of the PKC inhibitor calphostin C (0.1  $\mu\text{mol/ml}$ ). As shown in Fig. 6, incubation of the cells in the presence of calphostin C totally abolished the stimulatory effect of glucose on LPL mRNA levels.

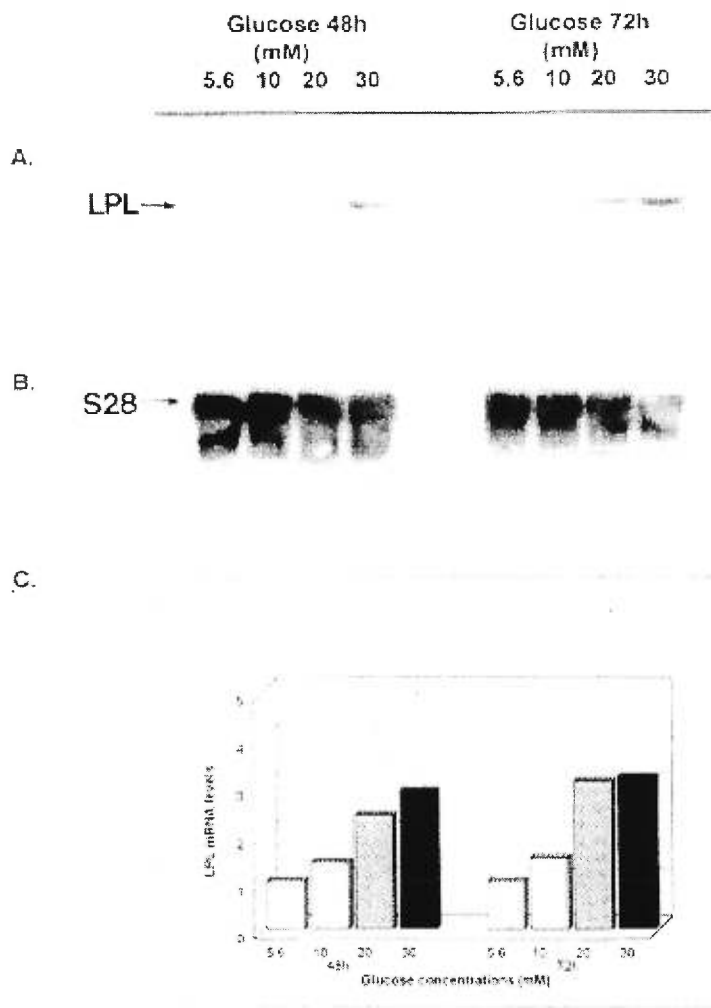
**Effect of high glucose concentrations on the binding of nuclear proteins to the regulatory AP-1 sequence of the murine LPL gene promoter.**

We next determined whether incubation of J774 cells in the presence of high glucose concentrations might induce changes at the level of LPL gene promoter binding proteins. We found that a 48-h exposure of these cells to a high glucose environment resulted in a dramatic increase in

the binding of nuclear proteins to the AP-1 consensus sequence of the LPL promoter (Fig. 7). This binding complex was specifically competed in the presence of a 100-fold molar excess of the unlabeled AP-1 oligonucleotide.

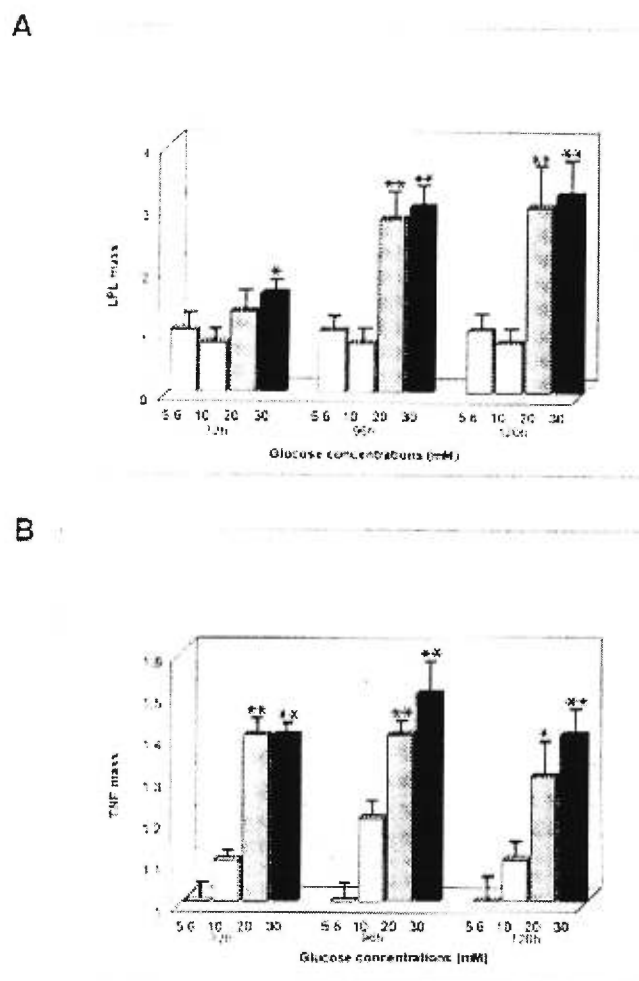
#### **Regulation of macrophage LPL mRNA half-life by high glucose.**

To investigate the possibility that high glucose concentrations may affect the mRNA half-life of macrophage LPL, the half-life of LPL mRNAs was measured in J774 cells cultured for 48 h in 5.6 or 30 mmol/l glucose after the addition of D-actinomycin. As shown in Fig. 8, no difference in the rate of decay of LPL mRNA was observed in cells treated with low or high glucose concentrations, the LPL mRNA half-life being approximated, under both experimental conditions, to 11 h.

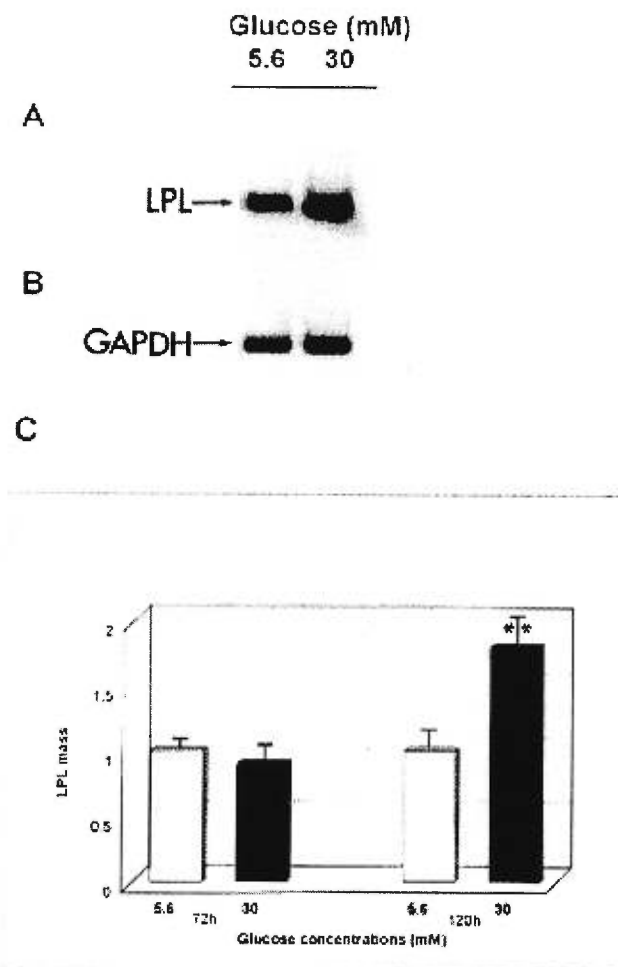


**FIG. 1. Effect of high glucose concentrations on macrophage LPL mRNA levels.** J774 cells were cultured for 48 and 72 h in the presence of increasing D-glucose concentrations. At the end of the incubation period, cells were lysed and total RNAs were extracted and analyzed by Northern blot analysis for LPL mRNA (A) and S28 mRNA expression (B). C: LPL mRNA levels normalized to the levels of S28 mRNA. Data represent the results of one representative experiment out of six.

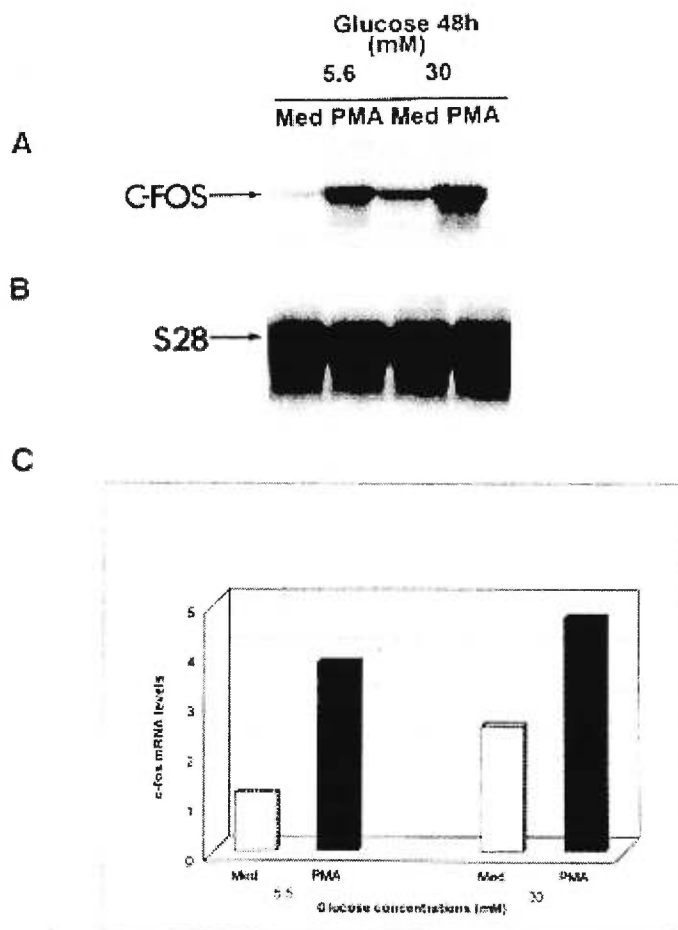




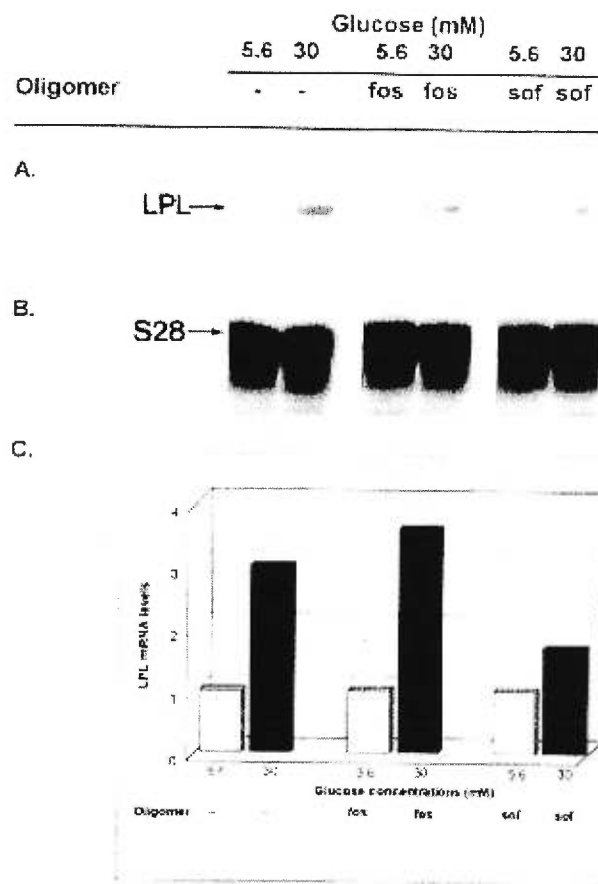
**FIG. 2. Effect of high glucose concentrations on LPL and TNF- $\alpha$  immunoreactive masses.** LPL and TNF- $\alpha$  immunoreactive masses were determined by ELISA in the culture medium of J774 cells exposed for 72, 96 and 120 h to increasing D-glucose concentrations. LPL (A) and TNF- $\alpha$  (B) productions are expressed as fold increase over basal values. Data represent the mean  $\pm$  SE of three experiments. \*,  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. controls.



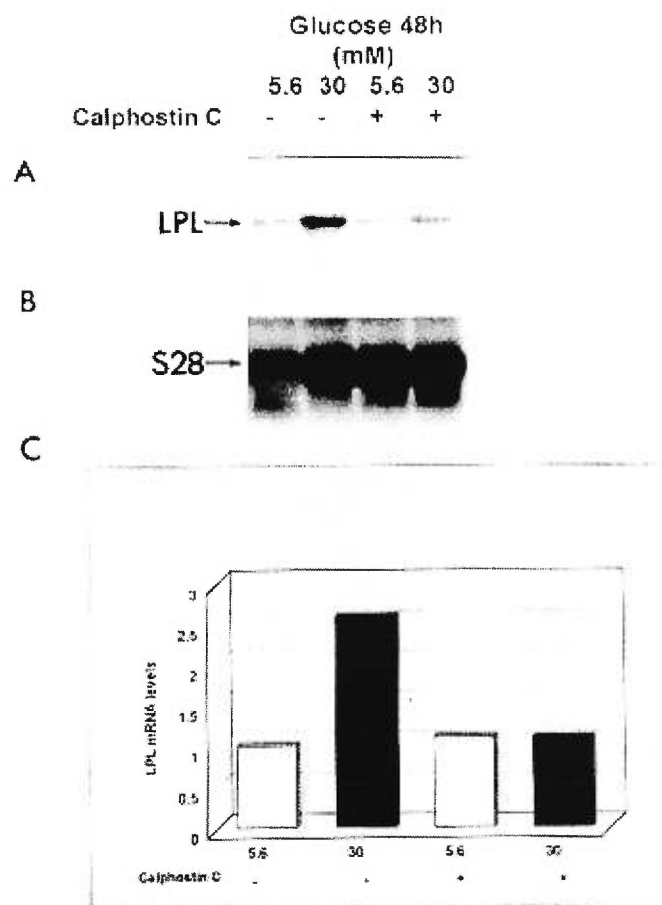
**FIG. 3. Effect of high glucose concentrations on LPL gene expression and production by human MDMs.** Human MDMs were cultured in the presence of 5.6 and 30 mmol/l glucose. After 5 days, cells were lysed and LPL and GAPDH mRNA expression were analyzed by reverse transcriptase-PCR (A and B). Human MDMs were cultured for 72 and 120 h in the presence of 5.6 and 30 mmol/l glucose. At the end of the incubation periods, supernatants were collected and assayed for LPL immunoreactive mass (C). Data represent the mean  $\pm$  SE of three experiments. \*\*,  $P < 0.01$  vs. controls.



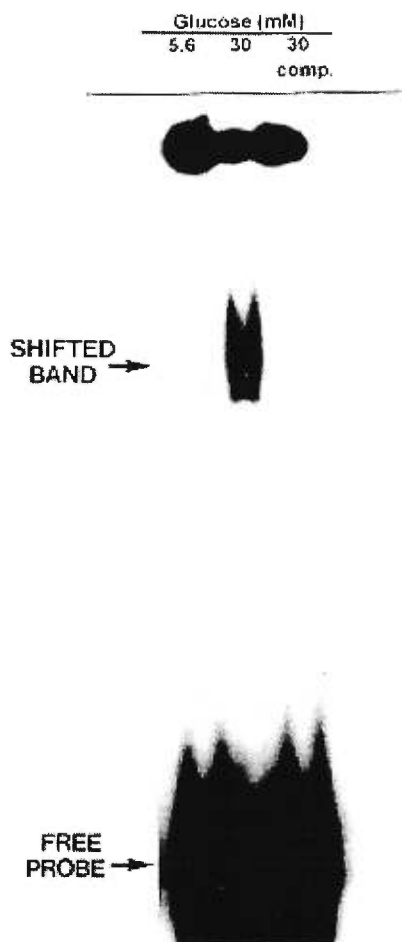
**FIG. 4. Effect of high glucose on macrophage *c-fos* mRNA levels.** Macrophages were cultured for 48 h in the presence of 5.6 or 30 mmol/l glucose, then left unstimulated or stimulated with PMA for 30 min. At the end of the incubation period, cells were lysed and *c-fos* mRNA (A) and S28 mRNA (B) levels were determined by Northern blot analysis. C: LPL mRNA levels normalized to the levels of S28 mRNA. Data represent the results of one representative experiment out of five.



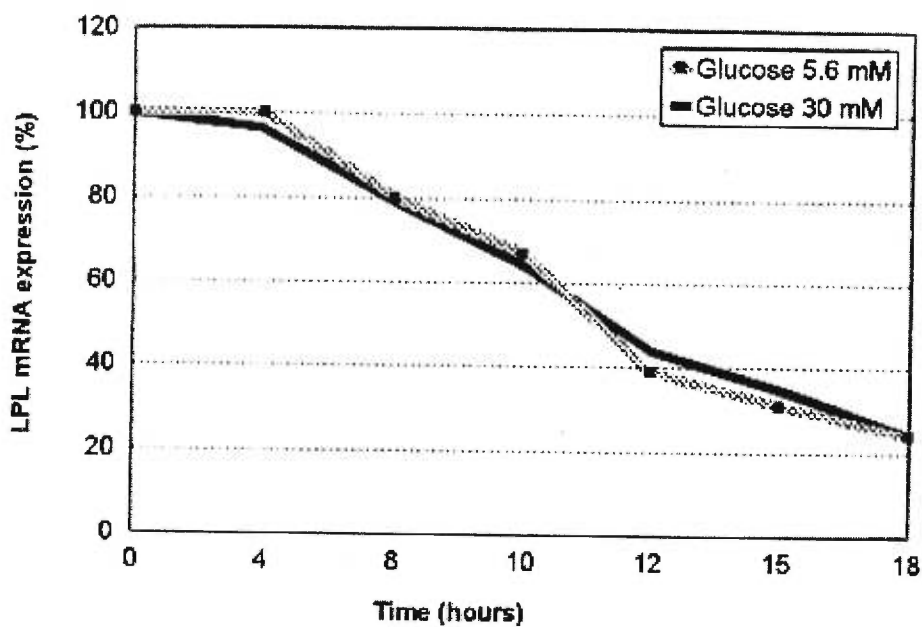
**FIG. 5. Effect of *c-fos* antisense on glucose-induced macrophage LPL mRNA levels.** J774 cells were cultured for 48 h with 5.6 or 30 mmol/l glucose in the absence or presence of 10  $\mu$ mol/l sense (*fos*) and antisense (*sof*) *c-fos* oligonucleotides. At the end of the incubation period, cells were lysed and LPL mRNA (A) and S28 mRNA (B) levels were determined by Northern blot analysis. C: LPL mRNA levels normalized to the levels of S28 mRNA. Data represent the results of one representative experiment out of three.



**FIG. 6. Effect of calphostin C on glucose-stimulated macrophage LPL mRNA levels.** J774 cells were cultured for 48 h with 5.6 or 30 mmol/l glucose in the presence or absence of calphostin C (0.1  $\mu$ g/ml). At the end of the incubation period, cells were lysed and total RNAs were extracted and analyzed by Northern blot analysis for LPL mRNA (A) and S28 mRNA expression (B). C: LPL mRNA levels normalized to the levels of S28 mRNA. Data represent the results of one representative experiment out of three.



**FIG. 7. Effect of high glucose concentrations on the binding of nuclear proteins extracted from J774 cells to the regulatory AP-1 sequence of the murine LPL gene promoter.** J774 cells were exposed for 48 h to 5.6 or 30 mmol/l glucose. The nuclear proteins isolated from these cells were incubated with double-stranded AP-1 regulatory element of the LPL gene. Retardation was assessed by gel electrophoresis in 4% polyacrylamide gels. Data represent the results of one representative experiment out of three.



**FIG. 8.** Effect of high glucose concentrations on the half-life of macrophage LPL mRNA. J774 cells were cultured for 48 h in the presence of 5.6 or 30 mmol/l glucose. Levels of LPL mRNA expression after 4, 8, 10, 12, 15 and 18 h of actinomycin D treatment were calculated and plotted as a percentage expression compared to 100% of LPL mRNA extracted from cells exposed to 5.6 or 30 mmol/l glucose. Data represent the results of one representative experiment out of five.

## DISCUSSION

Studies of human LPL regulation by nutritional factors have been limited to adipose tissue and skeletal muscle. With refeeding or glucose/insulin infusion, adipose LPL levels have been shown to increase, while skeletal muscle LPL levels have been found to decrease (42-44). Apart from being secreted by parenchymal cells of various tissues (45-49), LPL is constitutively expressed and produced by macrophages (10-12). Glucose has been recently identified as a key regulator of macrophage function. A stimulatory effect of high glucose has been reported on macrophage proliferation (23) and production of several cytokines, including TNF- $\alpha$  and IL-6 (25, 26). Furthermore, increased CSF-1 and platelet-derived growth factor (PDGF) receptor mRNA expression have been observed in macrophages exposed to a high glucose environment (24,50).

The present study demonstrates that macrophage LPL immunoreactive mass is enhanced by high glucose concentrations and that this effect requires the uptake of glucose by macrophages, since the nonmetabolized glucose isomer failed to produce a similar effect. The importance of this observation is underlined by our finding that high glucose concentrations also stimulate the secretion of LPL immunoreactive mass by human MDM. Evidence has been provided that high glucose enhances human monocyte TNF- $\alpha$  secretion (26). In accordance with these data, we found that glucose-treated J774 cells and human MDMs (data not shown) also overproduce TNF- $\alpha$ . Our finding that TNF- $\alpha$  induction in these cells parallels that of LPL further supports the notion that TNF- $\alpha$  does not suppress LPL secretion in J774 cells and human MDMs (51,52).

Our study also demonstrates that the effect of glucose on macrophage LPL secretion is exerted at the transcriptional level, as reflected by the dramatic increase in LPL mRNA levels following macrophage exposure to high glucose concentrations. It is well known that the regulation



of LPL gene expression is controlled by several *cis*- and *trans*-acting factors surrounding the LPL transcriptional start site (53). Evidence of the involvement of *c-fos* in LPL regulation has been recently provided by the observation that anti-sense *c-fos* inhibits the expression of adipocyte LPL mRNA (28). Based on the finding that high glucose stimulates *c-fos* protein in mesangial cells (27) and on the characterization of an AP-1 site in the regulatory sequences of the murine LPL gene (35,36), we elaborated a tentative model in which *c-fos* protein could mediate the regulatory effect of glucose on macrophage LPL gene expression. Analysis of *c-fos* mRNA levels in macrophages cultured in a high glucose environment demonstrated that glucose enhances *c-fos* mRNA levels in macrophages. The similar kinetic pattern of induction of *c-fos* and LPL gene expression in macrophages exposed to high glucose suggested a possible role of *c-fos* in the LPL regulation by glucose. Evidence of the involvement of *c-fos* in the stimulatory effect of glucose on macrophage LPL gene expression was provided by our finding that anti-sense *c-fos* oligonucleotides significantly inhibit glucose-induced macrophage LPL gene expression. In accordance with the results of Barcellini-Couget et al (28), we did not observe, even with high oligomer concentration, a complete inhibition of the glucose-induced LPL mRNA levels. These data argue for the involvement of other regulatory pathways beside *c-fos* protein in the modulatory regulation of LPL gene expression by glucose.

Gene expression in eukaryotic cells is governed by nuclear transcription factors. These proteins interact with regulatory DNA elements and may accelerate or retard gene transcriptional rate. AP-1 has been identified as a family of related transcription factors, which frequently consist of either a *c-jun/c-fos* heterodimer or *c-jun/c-jun* homodimers. The presence of an AP-1 site in the regulatory sequence of the murine LPL gene suggests that *c-fos* could enhance the transcriptional rate

of the macrophage LPL gene expression by binding to the AP-1 regulatory domain of the LPL gene. The enhanced nuclear protein binding to the AP-1 regulatory sequence of the LPL promoter that we observed supports this hypothesis. Based on the association between product of the *c-fos* gene and members of the *c-jun* family, an induction of *c-jun* transcript and protein in macrophages by high glucose concentrations can be assumed. The parallel induction of *c-fos* and *c-jun* observed in mesangial cells exposed to high glucose concentrations seems to support this possibility (27).

The activity of inducible transcription factors is regulated by various signal transduction pathways. Transcription of both *c-fos* and *c-jun* is rapidly induced by activators of PKC, leading to an increase in AP-1 activity. Since PKC is activated in several cells including macrophages in response to high glucose (28,54-56), it was tempting to postulate that the signal transduction pathway involved in the stimulatory effect of glucose on macrophage LPL mRNA levels could involve PKC. Our data, which show an abrogation of the stimulatory effect of glucose on macrophage LPL production in the presence of the PKC inhibitor, calphostin C, support this possibility. From these observations, we propose that exposure of macrophages to high glucose sequentially induces PKC activation and its well-known targets, *c-fos* and *c-jun*, which by interacting with the AP-1 sequence may then increase the transcriptional rate of the LPL gene. Our finding that glucose modulates macrophage LPL mRNA levels is at variance with other data generated in adipocytes showing that high glucose concentrations enhance LPL synthetic rate without affecting LPL mRNA levels (57). While it is well known that LPL regulation is cell and tissue specific, these observations could indicate that the mechanisms responsible for LPL regulation may also markedly differ from one cell system to another.

It is well established that LPL gene expression is controlled at both the transcriptional and posttranscriptional levels. The earliest point where posttranscriptional regulation can occur is at the level of LPL mRNA stability. Our results, which demonstrate identical LPL mRNA half-life in J774 cells cultured under normo- or hyperglycemic conditions indicate that glucose does not exert its stimulatory effect on macrophage LPL gene expression by enhancing LPL mRNA stability.

Data generated by the current study provide one important piece of information about the secretion of LPL immunoreactive mass by macrophages exposed to a high glucose milieu. Macrophage LPL has been implicated in the pathogenesis of one of the most important complications of diabetes mellitus, namely, the atherosclerotic plaque. It has been suggested that this enzyme may favor the uptake of atherogenic lipoproteins by vascular cells and their retention in the vascular wall (14,15). Although the regulation of macrophage LPL in diabetic patients has not yet been investigated, our data suggest that hyperglycemia may tend to increase the in vivo production of LPL by macrophages at vascular sites and that this alteration may contribute to the accelerated atherosclerosis associated with diabetes. This possibility is further supported by the observations that high glucose also increase macrophage receptors for CSF-1 and PDGF, two well characterized enhancers of macrophage LPL production (58,59).

In conclusion, our data demonstrate that high glucose enhances macrophage LPL secretion. This effect is exerted at the transcriptional level and is, at least partly, mediated by *c-fos* oncogene.

**ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada and from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

**REFERENCES**

1. DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:173-194, 1991
2. Eschwege E, Richard JL, Thibault N, Ducimetiere P, Warnet JM, : Coronary heart disease mortality in relation with diabetes, blood glucose and plasma insulin levels. The Paris Prospective Study, ten years later. *Horm Metab Res* 15:41-46, 1985
3. Welburn TA, Wearne K: Coronary heart disease incidence and cardiovascular mortality in Busselton with reference to glucose and insulin concentrations. *Diabetes Care* 2:154-158, 1979
4. Fuller JH, Shipley MJ, Rose G, Jarrett RJ, Keen H: Coronary-heart-disease risk and impaired glucose tolerance. The Whitehall study. *Lancet* 1:1373-1376, 1980
5. Pyorala K: Relationship of glucose tolerance and plasma insulin to the incidence of coronary heart disease: results from two population studies in Finland. *Diabetes Care* 2:131-141, 1979
6. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK: Regional accumulation of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 6:131-138, 1986
7. Rosenfeld ME, Khoo JC, Miller E, Parthasarathy S, Palinski W, Witztum JL: Macrophage-derived foam cells freshly isolated from rabbit atherosclerotic lesions degrade modified lipoproteins, promote oxidation of low-density lipoproteins, and contain oxidation specific lipid protein adducts. *J Clin Invest* 87:90-99, 1991

8. Gerrity RG: The role of the monocyte in atherogenesis:I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 103:181-189, 1981
9. Joris I, Zand T, Nunnari JJ, Krolikowski FJ, Majno G: Studies on the pathogenesis of atherosclerosis.I. Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats. *Am J Pathol* 113:341-358, 1983
10. Chait A, Iverius PH, Brunzell JD: Lipoprotein lipase secretion by human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 69:490-493, 1982
11. Wang-Iverson P, Ungar A, Bliumis J, Bukberg PR, Gibson JC, Brown WV: Human monocytes in culture synthesize and secrete lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Comm* 104:923-928, 1982
12. Mahoney EM, Khoo JC, Steinberg D: Lipoprotein lipase secretion by human monocytes and rabbit alveolar macrophages in culture. *Proc Natl Acad Sci* 79:1639-1642, 1982
13. Eckel RH: Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 320:1060-1068, 1989
14. Rumsey SC, Obunike JC, Arad Y, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ: Lipoprotein lipase-mediated uptake and degradation of low density lipoproteins by fibroblasts and macrophages. *J Clin Invest* 90:1504-1512, 1992
15. Kraemer FB: Role of lipoprotein lipase and apolipoprotein lipase E secretion by macrophages in modulating lipoprotein uptake. Possible role in acceleration of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes* 41:77-80, 1992
16. Corey JE, Zilversmit DB: Effect of cholesterol feeding on arterial lipolytic activity in the rabbit. *Atherosclerosis* 27:201-212, 1977

17. O'Brien KD, Gordon D, Deeb S, Ferguson M, Chait A: Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 89:1544-1550, 1992
18. Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Goldberg IJ, Steinberg D, Witztum JL: Macrophages and smooth muscle cells express lipoprotein lipase in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Aca Sci U.S.A* 88:10143-10147, 1991
19. Mattsson L, Johansson H, Ottosson M, Bondjers G, Wiklund O: Expression of lipoprotein lipase mRNA and secretion in macrophages isolated from human atherosclerotic aorta. *J Clin Invest* 92:1759-1765, 1993
20. O'Brien KD, Deeb SS, Ferguson M, MacDonald TO, Allen MD, Alpers CE, Chait A: Apolipoprotein E localization in human coronary atherosclerotic plaques by in situ hybridization and immunohistochemistry and comparison with lipoprotein lipase. *Am J Pathol* 144:538-548, 1994
21. Renier G, Skamene E, DeSanctis JB, Radzioch D: High macrophage lipoprotein lipase expression and secretion are associated in inbred murine strains with susceptibility to atherosclerosis. *Arterioscl Thromb* 13:190-196, 1993
22. Ishibashi S, Mori N, Murase T, Shimano H, Gotohda T, Kawakami M, Akanuma Y, Takaku F, Yamada N: Enhanced lipoprotein lipase secretion from human monocyte-derived macrophages caused by hypertriglyceridemic very low density lipoproteins. *Arteriosclerosis* 9:650-655, 1989
23. Liu YJ, Saini A, Cohen DJ, Ooi BS: Modulation of macrophages proliferation by hyperglycemia. *Mol Cell Endocrinol* 114:187-192, 1995

24. Saini A, Liu YJ, Cohen DJ, Ooi BS: Hyperglycemia augments macrophage growth responses to colony-stimulating factor-1. *Metabolism* 45:1125-1129, 1996
25. 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 New York Acad Sci* 748:562-570, 1995
26. Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F: Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. *Diabetes* 45:954-959, 1996
27. Kreisberg JI, Radnik RA, Ayo SH, Garoni J, Saikumar P: High glucose elevates c-fos and c-jun transcripts and proteins in mesangial cell cultures. *Kidney Int* 46:105-112, 1994
28. Barcellini-Couget S, Pradines-Figuères A, Roux P, Dani C, Ailhaud G: The regulation by growth hormone of lipoprotein lipase gene expression is mediated by c-fos protooncogene. *Endocrinology* 132:53-60, 1993
29. Mentzer SJ, Guyre PM, Burakoff SJ, Faller DV: Spontaneous aggregation as a mechanism for human monocyte purification. *Cell Immunol* 101:312-319, 1986
30. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ: Isolation of biologically active ribonucleic acids from sources enriched in ribonucleases. *Biochemistry* 18:5492-5499, 1979
31. Thomas P. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5201-5205, 1980
32. Chomczynski P, Sacchi N: Single step method for RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987



33. Han J, Beutler B, Huez G: Complex regulation of tumor necrosis factor mRNA turnover in lipopolysaccharide activated macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1090:22-28, 1991
34. Fried M, Crothers DM: Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 9:6505-6525, 1981
35. Zechner R, Newman TC, Steiner E, Breslow JL: The structure of the mouse lipoprotein lipase gene: a B1 repetitive element is inserted into the 3' untranslated region of the mRNA. *Genome* 11:62-76, 1991
36. Hua XX, Enerback S, Hudson J, Youkhana K, Gimble JM: Cloning and characterization of the promoter of the murine lipoprotein lipase-encoding gene: structural and functional analysis. *Gene* 107:247-258, 1991
37. Goers JWF, Pedersen ME, Kern PA, Ong J, Schotz M. An enzyme-linked immunoassay for lipoprotein lipase. *Anal Biochem* 166:27-35, 1987
38. Ikeda Y, Takagi A, Ohkaru Y, Nogi K, Iwanaga T, Kurooka S, Yamamoto A: A sandwich-enzyme immunoassay for the quantification of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in human postheparin plasma using monoclonal antibodies to the corresponding enzymes. *J Lipid Res* 31:1911-1924, 1990
39. Duque M, Graupner M, Stutz H, Wicher I, Zechner R, Paltauf F, Hermetter A. New fluorogenic triacylglycerol analogs as substrates for the determination of lipase activities. *J Lipid Res* 37:868-876, 1996
40. Sheehan KCF, Ruddle NH, Schreiber RD. Generation and characterization of hamster monoclonal antibodies that neutralize murine tumor necrosis factors. *J. Immunol* 142:3884-3893, 1989

41. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976
42. Hollenberg CH: Effect of nutrition on activity and release of lipase from rat adipose tissue. *Am J Physiol* 197:667-670, 1959
43. Lithell H, Boberg J, Hellsing K, Lundqvist G, Vessby B: Lipoprotein lipase activity in human skeletal muscle and adipose tissue in the fasting and the fed states. *Atherosclerosis* 30:89-94, 1978
44. Farese RV Jr, Yost TJ, Eckel RH: Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism* 40:214-216, 1991
45. Eckel RH: Adipose tissue lipoprotein lipase. In Lipoprotein lipase. J. Borensztajn, editor. Evener, Chicago, IL. 79-132, 1987
46. Borensztajn J: Heart and skeletal muscle lipoprotein lipase. In Lipoprotein lipase. J. Borensztajn, editor. Evener, Chicago, IL. 133-148, 1987
47. Scow RH, Chernick SS: Role of lipoprotein lipase during lactation. In Lipoprotein lipase. J. Borensztajn, editor. Evener, Chicago, IL. 149-186, 1987
48. Okabe T, Yorifuji H, Murase T, Takaku F: Pulmonary macrophages: a major source of lipoprotein lipase in the lung. *Biochem Biophys Res Commun* 125:273-278, 1984
49. Eckel RH, Robbins RJ: Lipoprotein lipase is produced, regulated and functional in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:7604-7607, 1984
50. 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. Involvement of platelet-derived growth factor in diabetic angiopathy. *Diabetes* 45:507-512, 1996
51. Friedman G, Chajek-Shaul T, Gallily R, Stein O, Shiloni E, Etienne J, Stein Y: Modulation of lipoprotein lipase activity in mouse peritoneal macrophages by recombinant human tumor necrosis factor. *Biochim Biophys Acta* 963:201-207, 1988
  52. White JR, Chait A, Klebanoff SJ, Deeb S, Brunzell JD. Bacterial lipopolysaccharide reduces macrophage lipoprotein lipase levels: an effect that is independent of tumor necrosis factor. *J Lipid Res* 29:1379-1385, 1988
  53. Enerback S, Gimble JM: Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochim Biophys Acta* 1169:107-125, 1993
  54. Ayo SH, Radnik RA, Garoni J, Troyer DA, Kreisberg JI: High glucose increases diacylglycerol mass and activates protein kinase C in mesangial cell cultures. *Am J Physiol* 261:F571-F577, 1991
  55. Williams B, Schrier RW: Characterization of glucose-induced in situ protein kinase C activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 41:1464-1472, 1992
  56. Sharma K, Danoff TM, DePiero A, Ziyadeh FN: Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages and glomerular mesangial cells by elevated glucose levels: possible mediation via protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 207:80-88, 1995
  57. Ong JM, Kern PA: Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein and messenger mRNA levels in human adipose tissue. *J Clin Invest* 84:305-311, 1989

58. Mori N, Gotoda T, Ishibashi S, Shimano H, Harada K, Inaba T, Takaku F, Yazaki Y, Yamada N: Effects of human recombinant macrophage colony-stimulating factor on the secretion of lipoprotein lipase by macrophages. *Arterioscl Thromb* 11:1315-1321, 1991
59. Inaba T, Kawamura M, Gotoda T, Harada K, Shimada M, Ohsuga J, Shimano H, Akanuma Y, Yazaki Y, Yamada N: Effects of platelet-derived growth factor on the synthesis of lipoprotein lipase in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 15:522-528, 1995

**II. 2. DEUXIÈME ARTICLE**

**DIFFERENTIAL REGULATION OF MACROPHAGE PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR EXPRESSION BY GLUCOSE: ROLE OF PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS IN LIPOPROTEIN LIPASE GENE EXPRESSION.**

Maryam Radimeh Sartippour, Geneviève Renier.

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Center, Notre-Dame Hospital, Department of Nutrition, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Short title: Glucose regulates macrophage PPAR expression.

Key Words: Peroxisome proliferator-activated receptors, macrophage, glucose, lipoprotein lipase

Abbreviations: PPARs, peroxisome proliferator-activated receptors; LPL, lipoprotein lipase; PPRE, peroxisome proliferator responsive element; LDL, low-density lipoprotein; ATCC, American Type Culture Collection; PCR, polymerase chain reaction.

Reprint requests to:

Dr. Geneviève Renier  
Notre-Dame Hospital  
Research Center, 3th floor, door Y-3622  
1560 Sherbrooke St East  
Montreal, Quebec, H2L 4M1, Canada  
Phone: (514) 281-6000 #6895  
FAX: (514) 896-4701  
E-MAIL: [renierg@ere.umontreal.ca](mailto:renierg@ere.umontreal.ca)

## SUMMARY

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are implicated in several metabolic disorders with altered glucose and lipid metabolism, including atherosclerosis and diabetes. In the present study, we evaluated the *in vitro* and *ex vivo* effects of high glucose concentrations on macrophage PPAR mRNA expression. Exposition of monocyte-derived macrophages isolated from healthy donors to a high glucose environment led to an increase in PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta$  mRNA expression. In contrast, this treatment significantly decreased human macrophage PPAR $\gamma$  mRNA expression. Overexpression of PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta$  mRNA and inhibition of PPAR $\gamma$  mRNA expression were also observed in monocyte-derived macrophages isolated from patients with type 2 diabetes. Because high glucose and PPAR $\alpha$  agonists increase lipoprotein lipase (LPL) gene expression, the role of PPAR $\alpha$  in the glucose-mediated upregulation of macrophage LPL gene expression was next evaluated. Incubation of murine J774 macrophages with high glucose concentrations increased the expression of PPAR $\alpha$  at the mRNA and protein levels and enhanced nuclear protein binding to the peroxisome proliferator responsive element of the LPL promoter. Incubation of nuclear extracts in the presence of anti-PPAR $\alpha$  and anti-PPAR $\beta$  antibodies decreased glucose-stimulated nuclear protein binding to the peroxisome proliferator responsive element. These results demonstrate that glucose is an important regulator of macrophage PPAR expression and suggest a role of PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta$  in the upregulation of macrophage LPL by glucose. Dysregulation of macrophage PPAR expression in type 2 diabetes may contribute, by altering arterial lipid metabolism and inflammatory response, to the accelerated atherosclerosis associated with diabetes.

## INTRODUCTION

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the superfamily of nuclear hormone receptors(1-3). Members of this family include PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  and PPAR $\gamma$ . PPARs are characterized by distinct tissue distribution patterns and metabolic functions. PPAR $\alpha$  is expressed preferentially in tissues exhibiting high catabolic rates of fatty acids, such as liver and brown adipose tissue, and plays a key role in lipid metabolism (4,5). PPAR $\beta$  (also called NUC-1 or PPAR $\delta$ ) is ubiquitously expressed, and its specific function is still unknown (5,6). PPAR $\gamma$  is adipose tissue selective and is implicated as a mediator of adipocyte differentiation and regulation of glucose homeostasis (7,8). The activity of PPARs is regulated by various agents including insulin, fatty acids, fibrates, leukotriene B<sub>4</sub>, prostaglandin J<sub>2</sub>, and synthetic thiazolidinedione drugs (9-13). PPARs function as ligand-dependent transcription factors, which, upon heterodimerization with the 9-*cis*-retinoic acid receptor, bind to a specific response element termed peroxisome proliferator responsive element (PPRE), which is present in the promoter of various genes implicated in lipid metabolism, such as lipoprotein lipase (LPL) (14-15).

Recent findings demonstrate that PPARs are involved in several metabolic diseases, such as obesity, dyslipidemia, atherosclerosis and diabetes. Diabetes is a major risk factor for atherosclerosis (16). Accumulating evidence indicates that immune mechanisms play a critical role in the pathogenesis of atherosclerosis. Arguments that point to the monocyte/macrophage as a principal participant in atherogenesis include its role in arterial lipid metabolism, and as a precursor of foam cells (17-20). Recent studies have demonstrated that PPARs are expressed in cells of the monocyte/macrophage lineage (21) and in macrophage-derived foam cells of atherosclerotic lesions (22-24). It has been proposed that PPARs may regulate macrophage activation and lipid metabolism



in monocytic cells (22,24-27). Although macrophage PPARs may play a key role in the accelerated atherosclerosis associated with diabetes, the modulatory effect of a high glucose environment on macrophage PPAR expression has not yet been investigated. In the present study, we determined the in vitro effect of high glucose on macrophage PPAR expression and examined the regulation of macrophage PPAR expression in human type 2 diabetes. In addition, on the basis of previous results demonstrating a stimulatory effect of glucose on macrophage LPL expression (28) and a key role of PPARs in the control of LPL gene expression (14,15), we also investigated the role of PPARs in the regulation of macrophage LPL mRNA expression by glucose.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Reagents**

FCS was purchased from Hyclone Laboratories. DMEM was obtained from ICN Biochemicals Inc. RPMI 1640 medium, Hank's balanced salt solution and TRIZOL reagent were purchased from GIBCO-BRL. Lymphoprep and penicillin-streptomycin were obtained from Nycomed Pharma As and Flow, respectively. D-glucose was purchased from Sigma Chemical Co.

### **Human and murine macrophages**

Human monocytes were isolated as previously described (29-30). Peripheral blood mononuclear cells were isolated by density centrifugation using Ficoll, allowed to aggregate in the presence of FCS, and then further purified by the rosetting technique. After density centrifugation, highly purified monocytes (85% to 90%) were recovered, as assessed by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson). Differentiation of monocytes into macrophages was achieved by culturing the freshly isolated monocytes in RPMI 1640 medium (2000 000/mL) containing 20% (vol/vol) autologous serum for 4 days.

The J774 murine macrophage cell line was obtained from American Type Culture Collection (ATCC). Murine macrophages were cultured in DMEM containing 10% FCS and 100 µg/mL penicillin-streptomycin (FCS-DMEM). For experiments assessing the effect of increasing concentrations of glucose, a customized preparation of FCS-DMEM was used; this preparation contained 5.6 mmol/L of glucose to which varying amounts of glucose were added to make up the desired final glucose concentrations.

## **Patients**

The study group comprised 7 patients with type 2 diabetes and 7 healthy control subjects. They gave written consent to participate in this study, which was approved by the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research and Ethics committees. All patients recruited from our outpatient clinic were normotriglyceridemic and treated with glyburide and metformin. None of the patients was primarily insulin dependent. Characteristics of the study population are presented in Table 1. Healthy controls, matched with patients for sex, age and body mass index, were recruited from the hospital staff and relatives. Subjects with infectious or inflammatory conditions, cardiac, renal or pulmonary decompensated diseases or who were treated with anti-inflammatory or antioxidant drugs were excluded from the study.

## **Analysis of PPARs mRNA expression**

The levels of PPARs mRNAs in human and murine macrophages were assessed by semi-quantitative polymerase chain reaction (PCR) and Northern blot analysis, respectively.

**PCR technique:** cytoplasmic RNA for use in the PCR reaction was extracted from human macrophages by an improvement of the acid-phenol technique of Chomczynski and Sacchi (31), precipitated, and resuspended in diethyl pyrocarbonate water. cDNA was synthesized from RNA by incubating total cellular RNA isolated from human macrophages with 0.1  $\mu$ g random primers (Pharmacia) for 5 minutes at 98°C then by incubating the mixture with reverse transcription buffer for 60 minutes at 37°C. The cDNA obtained was amplified by using 0.8  $\mu$ mol/L of 2 synthetic primers for PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$  and GAPDH. Primers (sense and antisense) used in the PCR reaction are shown in Table 2. A 510-bp human PPAR $\alpha$  cDNA fragment, a 406-bp murine PPAR $\beta$

cDNA fragment, a 421-bp murine PPAR $\gamma$  cDNA fragment, and a 456-bp human GAPDH cDNA fragment were amplified enzymatically by repeated cycles. An aliquot of each reaction mixture was then subjected to electrophoresis on 1% agarose gel. The intensity of the bands was measured by an image analysis scanning system (Alpha Imager 2000, Packard Instrument Co).

**Northern blot analysis:** ten million J774 macrophages were plated in plastic petri dishes (100x20mm, Falcon). After treatment with appropriate agents, macrophages were lysed with guanidine isothiocyanate. Total RNA was purified by centrifugation through a cesium chloride gradient (32). Total RNA (20  $\mu$ g) was separated on a 1.2% agarose gel containing 2.2 mol/L formaldehyde (33). The blots were prehybridized for 8 hours. The mRNA expression was analyzed by hybridization with [ $^{32}$ P] dCTP (specific activity 3,000 Ci/mmol; Amersham)-labeled murine PPAR $\alpha$  and S28 cDNA probes. Hybridization was detected by autoradiography. RNA expression was quantified by high resolution optical densitometry.

### **Analysis of PPARs protein expression**

After appropriate treatments, murine macrophages were pellet and lysed in 50 mmol/L Tris HCl (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl and 1% Nonidet P-40. Samples were centrifuged at 13000 rpm for 15 minutes at 4°C and supernatants were collected. Protein concentrations were determined with a colorimetric assay (Bio-Rad) by use of BSA as standard. Samples (50  $\mu$ g proteins) were applied to 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane using a Bio-Rad transfer blotting system at 100 V for 60 minutes. Membranes were blocked overnight at 4°C with a solution of PBS-0.3%Tween 20 containing 1% BSA and 5% FCS. After a wash with PBS-0.05%Tween 20, membranes were incubated for 3 hours at room temperature with anti-PPAR $\alpha$  antibody (1/1000;

kindly provided by Dr. W. Wahli, Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland) in PBS-0.05% Tween 20 and FCS 1%. After a further wash, membranes were incubated with IgG antibodies linked to the horseradish peroxidase in PBS-0.05% Tween 20 and FCS 5% for 1 hour at room temperature. Membranes were washed with PBS containing 0.05% Tween 20. Antigen detection was performed with an enhanced chemiluminescence detection system (Amersham).

### **DNA Binding assay**

The isolation of nuclei was performed as previously described<sup>34</sup>. Briefly,  $5 \times 10^7$  J774 cells were collected, washed with cold PBS, and lysed in 1 mL of ice-cold buffer A (15 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L HEPES, 0.1% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 0.5% Nonidet P-40). After a 10-min incubation on ice, lysed cells were centrifuged and the nuclei were washed with buffer A without Nonidet P-40. The nuclei were then lysed in a buffer containing 2 mol/L KCl, 25 mmol/L HEPES, 0.1 mmol/L EDTA and 1mmol/L dithiothreitol. After a 15-min incubation period, a dialysis buffer (25 mmol/L HEPES, 1mmol/L dithiothreitol, 0.1% phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 µg/mL aprotinin, 0.1 mmol/L EDTA, 11% glycerol) was added to the nuclei preparation. Nuclei were collected by centrifugation for 20 min at 13,000 rpm. Aliquot (50 µL) of the supernatants were frozen at -70°C, and protein concentration was determined. DNA retardation (mobility shift) electrophoresis assays were performed as previously described by Fried and Crothers (35). Briefly, 5 µg nuclear extracts were incubated for 15 minutes in the presence of 5x binding buffer (125 mmol/L HEPES, pH 7.5, 50% glycerol, 250 mmol/L NaCl, 0.25% Nonidet P-40, 5 mmol/L dithiothreitol) in the presence or absence of 200 ng anti-PPAR $\alpha$ , anti-PPAR $\beta$  (kindly provided by Dr. W. Wahli, Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland) or anti-PPAR $\gamma$

(Calbiochem) antibodies. End-labeled double-stranded consensus sequences of the LPL promoter PPAR-enhancing element (20,000 cpm per sample) were then added to the samples for 30 minutes. Samples were analyzed on a 4% nondenaturing polyacrylamide gel containing 0.01% Nonidet P-40. The specificity of the nuclear protein binding was assessed by incubating the nuclear proteins isolated from murine macrophages with labeled DNA probe in the presence of a 1000-molar excess of unlabeled DNA probe.

### **DNA probes**

The cDNA probe for detection of murine PPAR $\alpha$  was prepared by PCR. cDNA was obtained from total RNA using a reverse transcription reaction. Two synthetic primers (Table 2) spanning bases 1175-1759 were used to enzymatically amplify a 584-bp region of the PPAR $\alpha$  probe. The PPAR $\alpha$  probe was purified by Sephaglas BandPrep Kit (Pharmacia). The cDNA probe for murine S28 was purchased from ATCC. A 20-mer double-stranded oligonucleotide (Table 2) containing the consensus sequence for the PPPE of the human LPL gene promoter (14) was synthesized with the aid of an automated DNA synthesizer. After annealing, the double-stranded oligonucleotide was labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP by using the Boehringer Mannheim 5'-end-labeling kit.

### **Statistical analysis**

All values were expressed as the mean  $\pm$  SEM. For single comparisons, data were analyzed using Student's t test or Mann-Whitney rank sum Test. For multiple comparisons, data were analyzed by ANOVA, followed by the Tukey test or the Dunn test.

## RESULTS

### **Effect of high glucose on human monocyte-derived macrophage PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ and PPAR $\gamma$ mRNA levels.**

To evaluate the effects of high glucose concentrations on macrophage PPAR mRNA expression, monocyte-derived macrophages obtained from healthy control subjects were cultured for 48 hours in the presence of 5.6 or 30 mmol/L glucose. High glucose concentration significantly enhanced PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta$  mRNA expression (PPAR $\alpha$  mRNA levels [fold increase over control values] for 30 mmol/L glucose,  $2.44 \pm 0.73$ ,  $P=0.036$ ; PPAR $\beta$  mRNA levels [fold increase over control values] for 30 mmol/L glucose,  $1.47 \pm 0.66$ ,  $P=0.016$ ; Fig. 1A). In contrast, high glucose significantly decreased PPAR $\gamma$  mRNA expression (PPAR $\gamma$  mRNA levels [fold decrease under control values] for 30 mmol/L glucose,  $1.64 \pm 0.08$ ,  $P<0.001$ ; Fig. 1A). PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , and PPAR $\gamma$  mRNA levels normalized to the levels of GAPDH mRNA (Fig. 1A) are illustrated in Fig. 1B.

### **Regulation of monocyte-derived macrophage PPAR mRNA expression in patients with type 2 diabetes.**

To investigate the regulation of macrophage PPARs in diabetes, PPARs mRNA expression was determined in monocyte-derived macrophages isolated from patients with type 2 diabetes. Macrophages of diabetic patients expressed higher PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta$  mRNA levels than did macrophages of control subjects (PPAR $\alpha$  mRNA levels [fold increase over control values],  $1.93 \pm 0.16$ ,  $P=0.003$ ; PPAR $\beta$  mRNA levels [fold increase over control value],  $1.92 \pm 0.35$ ,  $P=0.048$ ; Fig. 2A and 2B). Macrophages of diabetic patients also expressed significantly lower PPAR $\gamma$  mRNA

levels as compared with levels in macrophages of control subjects (PPAR $\gamma$  mRNA levels [fold decrease under control values],  $1.31 \pm 0.11$ ,  $P=0.026$ , Fig. 2C).

### **Role of PPARs in the upregulation of macrophage LPL gene expression in response to glucose.**

On the basis of our previous observations that LPL, a key target gene for PPARs, is upregulated by glucose in J774 murine macrophages (28), we next determined whether incubation of J774 cells in the presence of high glucose concentrations might induce changes at the level of LPL gene promoter binding PPAR protein.

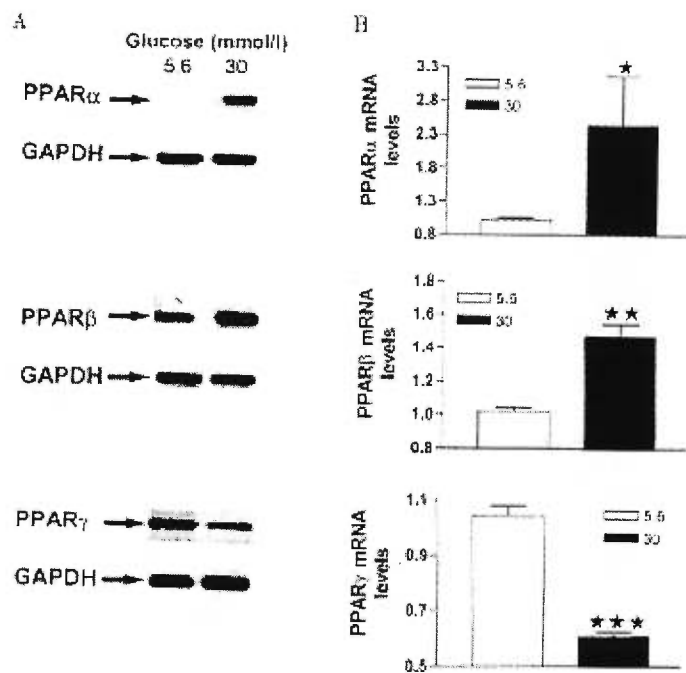
As part of a setup for subsequent gel-shift data, PPAR $\alpha$  mRNA and protein levels in J774 cells exposed to high glucose concentrations were first determined. Incubation of J774 cells with increasing glucose concentrations (5.6, 10, 20 and 30 mmol/L) for 48 hours increased, in a dose-dependent manner, PPAR $\alpha$  mRNA expression by these cells, (Fig. 3A). Under these experimental conditions, no modulation of the mRNA expression of S28, used as internal control, was observed (Fig. 3B). PPAR $\alpha$  mRNA levels normalized to the levels of S28 mRNA are illustrated in Fig. 3C.

Determination of PPAR $\alpha$  protein levels in J774 cells exposed for 48 hours in the presence of 30 mmol/L glucose demonstrated a significant increase in the expression levels of this receptor over control values (PPAR $\alpha$  protein levels [fold increase over control values], 30 mmol/L glucose,  $2.95 \pm 0.43$ ; Fig. 4).

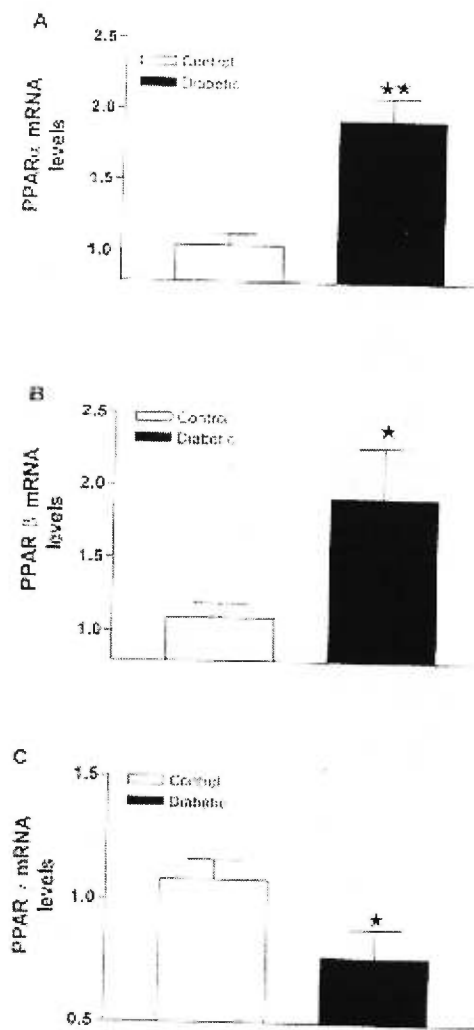
Exposure of J774 cells to a high glucose environment for 60 hours resulted in a significant increase in the binding of nuclear proteins to the PPRE consensus sequence of the LPL promoter (Fig. 5). The specificity of these proteins is demonstrated by the fact that they were effectively competed by excess unlabeled PPRE oligonucleotide. In the glucose-treated nuclear extracts,



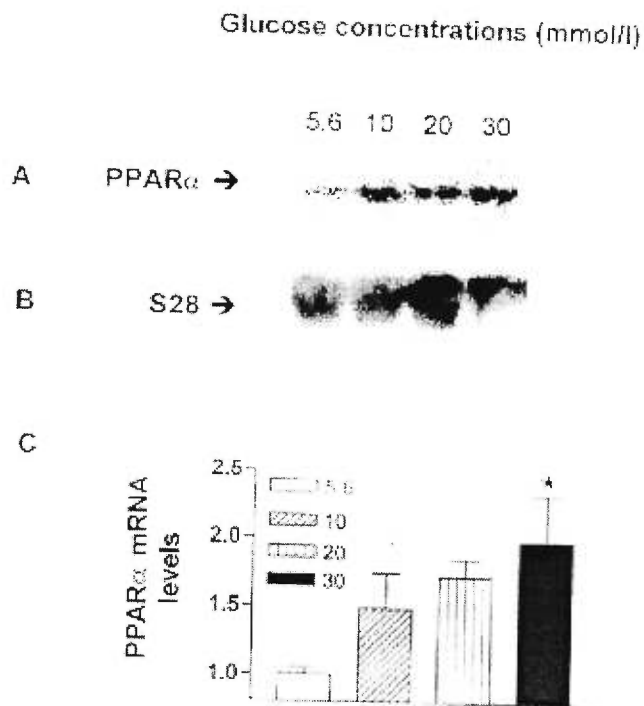
antibodies against PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta$  decreased the binding activity to the PPRE sequence, whereas anti-PPAR $\gamma$  antibody was ineffective (Fig. 5).



**FIG. 1. Effect of high glucose concentrations on PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , and PPAR $\gamma$  mRNA expression by human monocyte-derived macrophages.** Monocyte-derived macrophages obtained from healthy control subjects were cultured in the presence of 5.6 or 30 mmol/L glucose. After 2 days, cells were lysed. A, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$  and GAPDH mRNA expression was analyzed by PCR. B, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$  mRNA levels normalized to the levels of GAPDH mRNA. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 different experiments. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.02$ , and \*\*\*  $P < 0.001$  vs control.

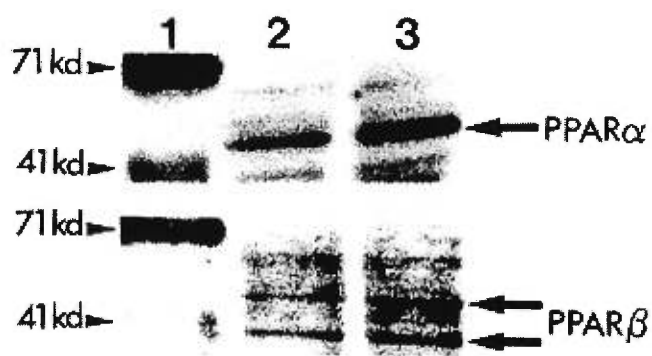


**FIG. 2. PPARs mRNA expression in monocyte-derived macrophages isolated from patients with type 2 diabetes.** Monocytes were isolated from 7 control subjects and 7 diabetic patients and cultured for 4 days in RPMI medium supplemented with 20% autologous serum. At the end of the incubation period, monocyte-derived macrophages were lysed and PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$  mRNA was analyzed by PCR. PPAR $\alpha$  (A), PPAR $\beta$  (B), PPAR $\gamma$  (C) mRNA levels normalized to the levels of GAPDH mRNA. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.005$  vs control.

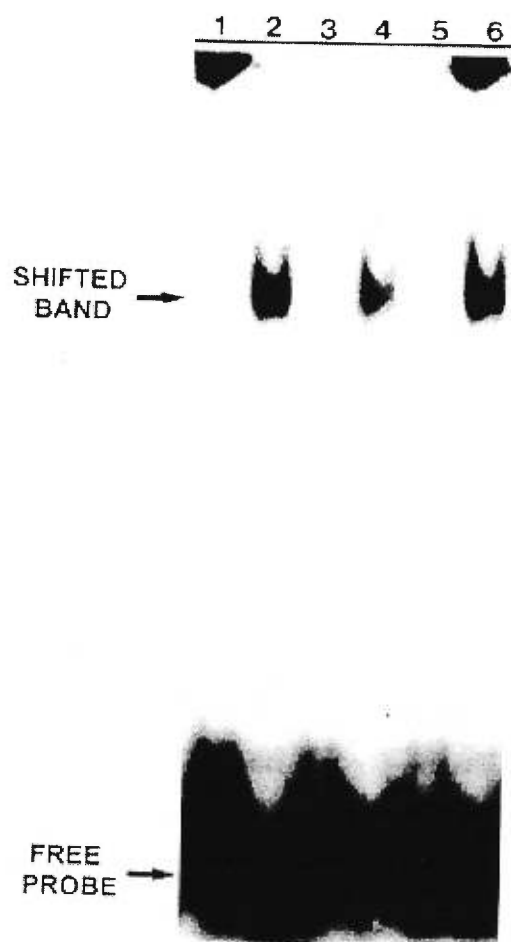


**FIG. 3. Effect of high glucose concentration on murine macrophage PPAR $\alpha$  mRNA expression.**

J774 cells were cultured for 48 hours in the presence of increasing glucose concentrations. At the end of the incubation period, cells were lysed and total RNA was extracted and analyzed by Northern blot analysis for PPAR $\alpha$  (A) and S28 mRNA (B) expression. PPAR $\alpha$  mRNA levels normalized to the levels of S28 mRNA (C). Data shown in panel C represent the results of 4 independent experiments.



**FIG. 4. Effect of high glucose on murine macrophage PPAR $\alpha$  protein expression.** Murine macrophages were incubated for 2 days with 5.6 or 30 mmol/L glucose. At the end of the incubation period, cells were lysed and Western blot analysis was carried out as described in Methods. PPAR $\alpha$  was detected using the polyclonal anti-rat PPAR $\alpha$  antibody. Lanes are as follows: lane 1, molecular weight markers; lane 2, 5.6 mmol/L glucose; and lane 3, 30 mmol/L glucose.



**FIG. 5. Effect of high glucose concentration on the binding activity of nuclear proteins extracted from murine macrophages to the regulatory PPRE sequence of the human LPL gene promoter.** Murine macrophages were exposed for 60 hours to 5.6 or 30 mmol/L glucose. The nuclear proteins isolated from these cells were incubated with double-stranded PPAR regulatory element of the LPL gene. Retardation was assessed on a 4% nondenaturing polyacrylamide gel. Data represent the results of one of 3 representative experiments. Lanes are as follows: lane 1, 5.6 mmol/L glucose; lane 2, 30 mmol/L glucose; lane 3, 30 mmol/L glucose +competitor; lane 4, 30 mmol/L glucose +anti-PPAR $\alpha$  antibody; lane 5, 30 mmol/L glucose +anti-PPAR $\beta$  antibody; and lane 6, 30 mmol/L glucose +anti-PPAR $\gamma$  antibody.

**TABLE 1. Characteristics of the study population**

	<b>Patients with type 2 diabetes</b>	<b>Controls</b>	<b>P</b>
Age, y	50.4 ± 4.5	42.6 ± 4.9	NS
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	30.9 ± 2.8	27.1 ± 1.2	NS
Fasting glucose, mmol/L	7.9 ± 0.9	4.9 ± 0.1	<0.005
Triglycerides, mmol/L	1.79 ± 0.34	1.01 ± 0.01	<0.05
Total cholesterol, mmol/L	5.19 ± 0.36	4.34 ± 0.18	NS
HDL cholesterol, mmol/L	1.23 ± 0.10	1.44 ± 0.11	NS
LDL cholesterol, mmol/L	3.24 ± 0.26	2.69 ± 0.21	NS

Values are mean ± SEM. NS indicates not significant.

**TABLE 2. Sequences of oligonucleotides**

Murine PPAR $\alpha$	
sense	5'-GTGGTGCATTTGGGCGTAACTCAC-3'
antisense	5'-GACAGCAGGGCAGCTGACTGAG-3'
Murine PPAR $\beta$	
sense	5'-ATCAGCGTGCATGTGTTCTACCGC-3'
antisense	5'-TGTCCTGGATGGCTTCCACCTGTG-3'
Murine PPAR $\gamma$	
sense	5'-GGTTGACACAGAGATGCCATTCTGGCC-3'
antisense	5'-AAGCTTCCATCGGATGGTTCTTCG-3'
Human PPAR $\alpha$	
sense	5'-GTGGAGTCTGAGCACATGTACA-3'
antisense	5'-ATACACAGTGTCTCCATATCAT-3'
Human GAPDH	
sense	5'-CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG-3'
antisense	5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG-3'
PPRE	
sense	5'-CGTCTGCCCTTTCCCCCTCT-3'
antisense	5'-GAGAAGAGGGGGAAAGGGCA-3'



## DISCUSSION

Glucose is the primary metabolic substrate of macrophages (36). Enhanced glucose metabolism occurs in these cells in response to mitogenic or immunologic stimulation. Evidence has been provided that high glucose regulates in vitro macrophage lipid metabolism and function. Indeed, it has been shown that macrophages cultured in a high glucose environment overexpress LPL, a key enzyme in triglyceride-rich lipoproteins (28), and secrete large amounts of various proinflammatory cytokines, including tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 (37,38).

PPARs are key nuclear factors in nutrient gene interaction, that translate nutritional signals into changes in the expression of genes implicated in lipid and glucose metabolism (14,15). In adipose tissue, skeletal muscle and hepatic cells, PPARs mRNA expression has been shown to be under hormonal control, as reflected by the induction at the transcriptional level of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  gene expression by insulin and glucocorticoids (39-42). The observation that PPARs are transcriptionally active in human macrophages has raised questions on the nature of the regulators of PPARs mRNA expression and the target genes for PPARs in these cells. Insight into the regulation of PPAR $\gamma$  expression in activated macrophages has recently been provided by Ricote et al<sup>24</sup> who demonstrated an induction of PPAR $\gamma$  expression in these cells by colony-stimulating factor, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and oxidized LDL.

The present study demonstrates for the first time that high glucose levels regulate PPAR expression in human macrophages; PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta$  are increased, whereas PPAR $\gamma$  is decreased. These results identify the macrophage PPAR genes as response genes for glucose action. The molecular mechanism(s) by which glucose upregulates macrophage PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta$  mRNA levels is presently unknown. One may hypothesize that such effects may result from the direct

interaction of glucose with a putative glucose responsive element present in the promoter of these genes. DNA motifs that could mediate glucose responsiveness of genes include the *cis*-acting carbohydrate responsive element (5'-CACGTGNNNGCG-3'), the CACGTG motif related to the consensus sequence binding site for the *c-myc* family of transcription factors, and other glucose responsive elements, such as the stimulatory protein 1 sites (43-46). The presence of a stimulatory protein 1 site (-130 to -125) and of sequences similar to the *cis*-acting carbohydrate responsive element (-313 to -302) and the CACGTG motif (-869 to -862 and -140 to -135) in the promoter of the PPAR $\alpha$  gene (47) suggests that glucose may induce PPAR $\alpha$  gene expression through this site(s). Our preliminary results (data not shown) showing that high glucose increases the level of binding of nuclear proteins to the stimulatory protein 1 and carbohydrate responsive elements present in the PPAR $\alpha$  promoter seem to support this possibility. Alternatively, intracellular accumulation of fatty acids resulting from glucose interaction with lipid metabolism, may be responsible for PPAR $\alpha$  gene induction. This possibility is supported by one recent study demonstrating, in hepatic cells, an upregulatory effect of fatty acids on the steady-state PPARs mRNA levels (41). Negative regulation of PPAR $\gamma$  gene expression in glucose-treated macrophages could theoretically involve tumor necrosis factor- $\alpha$ . Indeed, it has been shown that high glucose stimulates macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion (38) and that this cytokine, in turn, exerts a suppressive effect on PPAR $\gamma$  mRNA expression (48,49).

Because PPARs regulate lipid metabolism, genes involved in macrophage lipid metabolism, such as LPL, are likely candidates as target genes for PPARs in these cells. This view is supported by the observation that PPARs agonists increase LPL gene expression (14,15,50,51) and by the demonstration of a PPRE site in the regulatory sequence of the human LPL gene (14). The parallel

induction of PPAR $\alpha$  and LPL gene expression in glucose-treated macrophages is consistent with the view that the transcriptional effect of glucose on macrophage LPL that we previously reported (28) may involve this PPARs isoform. This possibility is further supported by the fact that anti-PPAR $\alpha$  decreases the enhanced binding of nuclear proteins isolated from glucose-treated macrophages to the PPRE regulatory domain of the LPL gene. The upregulation of PPAR $\beta$  by high glucose also suggests a potential role of this isoform in the stimulation of LPL gene expression by glucose. Our finding that anti-PPAR $\beta$  antibody decreases the glucose-induced binding activity to the PPRE is consistent with this view. Finally, despite the reduction of PPAR $\gamma$  expression by glucose, it cannot be excluded that induction of a potent PPAR $\gamma$  ligand by glucose may be sufficient to activate this isoform and thereby stimulate the LPL target gene. However, this possibility is not supported by our results, which show that anti-PPAR $\gamma$  antibody does not decrease the glucose-induced binding activity to the PPRE regulatory domain of the LPL gene.

Genes involved in the control of inflammation may represent additional targets for PPARs in macrophages. Indeed, it has been previously shown that mice rendered deficient for PPAR $\alpha$  display a prolonged response to inflammatory stimuli (11) and that PPAR $\gamma$  negatively regulates genes implicated in macrophage activation (25,26). On the basis of these results and observations that glucose-treated macrophages exhibit an increase in cytokine production (37,38) and an inhibition of macrophage PPAR $\gamma$  expression, it is tempting to speculate that the stimulatory effect of glucose on macrophage function may involve, at least partly, a suppression of PPAR $\gamma$  activation in these cells. Whether PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  exert differential effects on macrophage function and whether the different subcellular localization of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  proteins in macrophages, ie, PPAR $\gamma$  in

the nucleus and PPAR $\alpha$  in the cytoplasmic compartment (27), are responsible for these effects remain to be investigated.

Human diabetes is associated with a high incidence of atherosclerosis (16). Recent evidence demonstrates that PPAR $\gamma$  is expressed in macrophage foam cells of human atherosclerotic lesions (22-24). Furthermore, expression of PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  and PPAR $\gamma$  has been documented in vascular cells, including macrophages, smooth muscle cells (52,53) and endothelial cells (54). PPARs may interfere with atherogenesis by regulating arterial lipid metabolism and/or inflammation. Our findings that human type 2 diabetes is associated with altered macrophage PPAR gene expression further suggest that changes in macrophage PPAR activation may occur in the vascular wall in the hyperglycemic state and may influence atherogenesis. Dysregulation of macrophage PPARs in the arterial wall, may contribute, by increasing the *in vivo* macrophage production of LPL and of proinflammatory cytokines, to the accelerated atherosclerosis associated with diabetes. Given the potential proatherogenic effect of macrophage LPL in the arterial wall, study of the biological role of these transcription factors in the regulation of macrophage LPL expression seems especially relevant to the development of new strategies in the prevention and treatment of atherosclerosis.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Medical Research Council of Canada, the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Association Diabète Québec. The authors thank Dr. W. Wahli (Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland) for providing the anti-PPAR $\alpha$  and anti-PPAR $\beta$  antibodies and Dr. O. Serri (University of Montreal, Metabolic Unit of Notre-Dame Hospital, Montreal, Quebec, Canada) for the referral of the diabetic patients and for his helpful comments in the preparation of the manuscript.

**REFERENCES**

1. Schoonjans K, Martin G, Staels B, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol.* 1997;8:159-166.
2. Desvergne B, Wahli W. PPAR: a key nuclear factor in nutrient/gene interactions? In: Baeuerle PA, ed. *Inducible gene expression*, Vol 1. Boston, Mass: Birkhäuser, 1995.
3. Desvergne B, Ijpenberg A, Devchand PR, Wahli W. The peroxisome proliferator-activated receptors at the cross-road of diet and hormonal signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998;65:65-74.
4. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7355-7359.
5. Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$  in the adult rat. *Endocrinology* 1996;137:354-366.
6. Schmidt A, Endo N, Rutledge SJ, Vogel R, Shinar D, Rodan GA. Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol Endocrinol* 1992;6:1634-1641.
7. Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 1994;135:798-800.
8. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR $\gamma$ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol.* 1995;15:351-357.

9. Rieusset J, Andreelli F, Auboeuf D, Roques M, Vallier P, Riou JP, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in human adipocytes. *Diabetes*. 1999;48:699-705.
10. Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:2160-2164.
11. Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vasquez M, Gonzalez FJ, Whali W. The PPAR $\alpha$ -leukotriene B<sub>4</sub> pathway to inflammation control. *Nature*. 1996;384:39-43.
12. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J<sub>2</sub> is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR  $\gamma$ . *Cell*. 1995;83:803-812.
13. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *J Biol Chem*. 1995;270:12953-12956.
14. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J*. 1996;15:5336-5348.
15. Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, Staels B. Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR. *Atherosclerosis*. 1996;124(suppl): S29-S37.
16. Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993;328:1676-1685.

17. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986;6:131-138.
18. Rosenfeld ME, Khoo JC, Miller E, Parthasarathy S, Palinski W, Witztum JL. Macrophage-derived foam cells freshly isolated from rabbit atherosclerotic lesions degrade modified lipoproteins, promote oxidation of low-density lipoproteins, and contain oxidation-specific lipid protein adducts. *J Clin Invest*. 1991;87:90-99.
19. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis. I: transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol*. 1981;103:181-190.
20. Joris I, Zand T, Nunnari JJ, Krolikowski FJ, Majno G. Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. I: adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats. *Am J Pathol*. 1983;113:341-358.
21. Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G, Nimer SD. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr*. 1995;4:281-299.
22. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPAR $\gamma$  promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 1998;93:241-252.
23. Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J. Macrophages in human atheroma contain PPAR gamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPAR gamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol*. 1998;153:17-23.



24. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:7614-7619.
25. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ and Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1998;391:79-82.
26. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR- $\gamma$  agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998;391:82-86.
27. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem*. 1998;273:25573-25580.
28. Sartippour MR, Lambert A, Laframboise M, St.-Jacques P, Renier G. Stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression and production. *Diabetes*. 1998;47:431-438.
29. Mentzer SJ, Guyre PM, Burakoff SJ, Faller DV. Spontaneous aggregation as a mechanism for human monocyte purification. *Cell Immunol*. 1986;101:312-319.
30. Hoover ML, Chapman SW, Cuchens MA. A procedure for the isolation of highly purified populations of B cells. T cells and monocytes from human peripheral and umbilical cord blood. *J Immunol Methods*. 1985;78:71-85.
31. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-159.

32. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 1979;18:5294-5299.
33. Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77:5201-5205.
34. Han JH, Beutler B, Huez G. Complex regulation of tumor necrosis factor mRNA turnover in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1090:22-28.
35. Fried M, Crothers DM. Equilibria and kinetics of *lac* repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*. 1981;9:6505-6525.
36. Calder PC. Fuel utilization by cells of the immune system. *Proc Nut Soc*. 1995;54:65-82.
37. 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*. 1995;748:562-570.
38. Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F. Glucose-dependent interleukin-6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. *Diabetes*. 1996;45:954-959.
39. Park KS, Ciaraldi TP, Abrams-Carter L, Mudaliar S, Nikoulina SE, Henry RR. PPAR-gamma gene expression is elevated in skeletal muscle of obese and type II diabetic subjects. *Diabetes*. 1997;46:1230-1234.
40. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues: effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest*. 1997;99:2416-2422.

41. Steineger HH, Sorensen HN, Tugwood JD, Skrede S, Spydevold O, Gautvik KM. Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. Hormonal modulation of fatty-acid-induced transcription. *Eur J Biochem.* 1994;225:967-974.
42. Lemberger T, Staels B, Saladin R, Desvergne B, Auwerx J, Wahli W. Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  gene by glucocorticoids. *J Biol Chem.* 1994;269:24527-24530.
43. Shih HM, Towle HC. Definition of the carbohydrate response element of the rat S14 gene. Evidence for a common factor required for carbohydrate regulation of hepatic genes. *J Biol Chem.* 1992;267:13222-13228.
44. Shih H, Towle HC. Definition of the carbohydrate response element of the rat S14 gene: context of the CAGTG motif determines the specificity of carbohydrate regulation. *J Biol Chem.* 1994;269:9380-9387.
45. Daniel S, Kim KH. Sp1 mediates glucose activation of the acetyl-CoA carboxylase promoter. *J Biol Chem.* 1996;271:1385-1392.
46. Chen YQ, Su M, Walia RR, Hao Q, Covington JW, Vaughan DE. Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1998;273:8225-8231.
47. Gearing KL, Crickmore A, Gustafsson JA. Structure of the mouse peroxisome proliferator activated receptor alpha gene. *Biochem Biophys Res Com.* 1994;199:255-263.

48. Xing H, Northrop JP, Grove JR, Kilpatrick KE, Su JL, Ringold GM. TNF alpha-mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPAR gamma without effects on Pref-1 expression. *Endocrinology*. 1997;138:2776-2783.
49. Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkowski D, White-Carrington S, Spiegelman BM, Moller DE. Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Mol Endocrinol*. 1996;10:1457-1466.
50. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res*. 1996;37:907-925.
51. Staels B, Schoonjans K, Fruchart JC, Auwerx J. The effects of fibrates and thiazolidinediones on plasma triglyceride metabolism are mediated by distinct peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). *Biochimie*. 1997;79:95-99.
52. Iijima K, Yoshizumi M, Ako J, Eto M, Kim S, Hashimoto M, Sugimoto N, Liang Y-Q, Sudoh N, Toba K, Ouchi Y. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;247:353-356.
53. Marx N, Schönbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1998;83:1097-1103.

54. Inoue I, Shino K, Noji S, Awata T, Katayama S. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) in primary cultures of human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;246:370-374.

**II. 3. TROISIÈME ARTICLE**

*Diabetes* 49:597-602, 2000

**UPREGULATION OF MACROPHAGE LIPOPROTEIN LIPASE IN PATIENTS WITH  
TYPE 2 DIABETES : ROLE OF PERIPHERAL FACTORS.**

Maryam Radimeh Sartippour and Geneviève Renier.

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Center, Notre-Dame Hospital, Department  
of Nutrition, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Short title: Upregulation of macrophage LPL in diabetes.

Key words: Macrophage, lipoprotein lipase, tumor necrosis factor alpha, advanced glycation end  
products, diabetes.

Abbreviations: AGE, advanced glycation end products; ELISA, enzyme-linked immunosorbent  
assay; FCS, fetal calf serum; LPL, lipoprotein lipase; LPS, lipopolysaccharide; PBS, phosphate-  
buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; TNF, tumor necrosis factor.

Reprint requests to:

Dr. Geneviève Renier  
Notre-Dame Hospital  
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal  
Research Center, 3th floor, door Y-3622  
1560 Sherbrooke St. East  
Montreal, Quebec, H2L 4M1, Canada  
Phone: (514) 281-6000 #6895  
FAX: (514) 896-4701  
E-MAIL: [renierg@ere.umontreal.ca](mailto:renierg@ere.umontreal.ca)

## SUMMARY

Atherosclerosis is the major complication of diabetes. Accumulating evidence indicates that lipoprotein lipase (LPL) produced by macrophages in the vascular wall may favor the development of atherosclerosis by promoting lipid accumulation within the lesion. We previously demonstrated that high glucose stimulates in vitro murine and human macrophage LPL production. In this study, we measured macrophage LPL mRNA expression, immunoreactive mass and activity in normotriglyceridemic subjects with type 2 diabetes. Monocytes isolated from healthy control subjects and patients with type 2 diabetes were differentiated into macrophages in RPMI medium containing 20% autologous serum. After 5 days in culture, macrophage LPL mRNA expression, mass and activity were determined. Macrophages of diabetic patients cultured in their own sera showed a significant increase in LPL mRNA levels, mass, and activity compared with macrophages of control subjects. Differentiation of macrophages of diabetic patients in sera obtained from control subjects significantly reduced these anomalies. Conversely, culturing macrophages of control subjects in sera of diabetic patients significantly increased LPL mass and activity in these cells. Besides LPL overproduction, macrophages of diabetic patients exhibited an increase in basal and LPL-induced tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  release. TNF- $\alpha$  alterations were reduced by exposing these cells to sera of control subjects. Overall, these data demonstrate that macrophages of diabetic patients overexpress LPL and TNF- $\alpha$  and that peripheral factors dysregulated in diabetes are, in part, responsible for these alterations.



## INTRODUCTION

Diabetes is associated with accelerated atherosclerosis (1-3). Evidence has been provided that differentiation of monocytes into lipid-laden macrophages may favor the development and progression of atherosclerotic lesions (4,5). Macrophages constitutively synthesize lipoprotein lipase (LPL) (6,7), a key enzyme in the catabolism of triglyceride-rich lipoproteins (8). Several studies have supported a major role of LPL in the atherogenic process. It has been shown that LPL activity is low in normal arteries and increases during the progression of atherosclerotic lesions (9). Macrophages have been documented to express LPL mRNA and protein in atherosclerotic lesions in vivo (10,11), and high macrophage LPL secretion has been documented in atherosclerosis-prone mice (12). The proatherogenic effects of LPL include its ability to facilitate retention of apolipoprotein E-containing lipoproteins after binding to cells or to extracellular matrix, to modify lipoprotein particles to more atherogenic forms and to mediate uptake of lipoprotein particles through receptors, independent of its catalytic activity (13-17). LPL also acts as a monocyte adhesion molecule (18,19) and as a signaling molecule for gene regulation of the proatherogenic factor tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (20,21).

Despite the high incidence of atherosclerosis in diabetic patients and the potential key role of macrophage LPL in atherogenesis, the regulation of macrophage LPL in diabetes has been poorly investigated. To the best of our knowledge, macrophage LPL mRNA expression has thus far been measured in only a small number of hypertriglyceridemic patients with type 2 diabetes (22), and the levels of macrophage LPL activity and secretion in these patients have not been determined. Our previous observation that high glucose stimulates in vitro human macrophage LPL production (23),

supports the possibility that induction of macrophage LPL may occur in type 2 diabetes and that hormonal and metabolic factors dysregulated in diabetes may play a key role in this alteration.

Along with LPL, macrophage TNF- $\alpha$  may represent a major factor contributing to the development of atherosclerosis in type 2 diabetes. Accumulating evidence suggests that macrophage TNF- $\alpha$  production is increased in human type 2 diabetes. First, TNF- $\alpha$  production is increased in monocytes of patients with type 2 diabetes and in macrophages of diabetic mice (24,25). Second, human macrophages incubated with high glucose concentrations or in the presence of advanced glycation end products (AGEs) overproduce TNF- $\alpha$  (23,26,27). In the present study we sought to investigate the regulation of macrophage LPL and TNF- $\alpha$  secretion in patients with type 2 diabetes and to evaluate the role of peripheral factors on these parameters.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Reagents**

Fetal calf serum (FCS) was purchased from Hyclone Laboratories (Logan, UT). RPMI 1640 medium, Hank's balanced salt solution and TRIzol reagent were obtained from Gibco BRL (Grand Island, NY). Lymphoprep and penicillin-streptomycin were purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway) and Flow (McLean, VA), respectively. Bovine LPL and heparin were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO). LPL was dialysed against saline, using 10,000 MWCO Slide-A-Lyzer dialysis cassettes purchased from Pierce (Rockford, IL). Purity of the LPL preparation, as assessed by silver stained SDS-PAGE, was found to be >90%. LPL preparation was detoxified using an endotoxin removal resin from Associates of Cape Cod (Falmouth, MA). Endotoxin content of the LPL preparation (1 µg/ml) was determined by the Limulus amoebocyte lysate assay (E-toxate; Sigma Chemical) and was consistently found to be <6 pg/ml. Treatment of macrophages with 6 pg/ml lipopolysaccharide (LPS) did not induce any TNF- $\alpha$  production. LPL concentration was determined by the Bradford method (28) using a colorimetric assay (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).

### **Patients**

The study group comprised 10 patients with type 2 diabetes and 10 healthy control subjects. The diabetic patients, five women and five men, gave written consent to participate in this study, which was approved by the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research and Ethics committees. All patients were recruited from our diabetic outpatient clinic. Their mean age ( $\pm$  SE) was  $48.5 \pm 2.7$  years (range 37-64), BMI  $26.8 \pm 0.86$  kg/m<sup>2</sup> (range 24.4-32), and duration of diabetes  $5.6 \pm 2.3$  years (range 1-22). All the patients except one had optimal to acceptable diabetes

control (mean level of serum glycated hemoglobin:  $0.059 \pm 0.006$ ; normal values, 0.038-0.052). All the patients except two were normotriglyceridemic (serum triglycerides levels  $< 2.3$  mmol/l) and treated with glyburide and metformin. None of the patients was primarily insulin dependent. One patient was hypertensive and treated with enalapril, two had macroangiopathy and one had microangiopathy (microalbuminuria). Characteristics of the study population are presented in Table 1. Healthy control subjects, matched with patients for sex, age and BMI, were recruited from the hospital staff and relatives. Subjects who had infectious or inflammatory conditions or cardiac, renal or pulmonary decompensated diseases or who were treated with anti-inflammatory or antioxidant drugs were excluded from the study.

### **Human macrophages**

Peripheral blood mononuclear cells were isolated by density centrifugation using Ficoll, allowed to aggregate in the presence of FCS, then further purified by the rosetting technique (29). After density centrifugation, highly purified monocytes (85-90%) were recovered, as assessed by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, Rutherford, NJ). In every experiment, monocytes were isolated from one diabetic patient and one control subject and serum from each was collected. Monocytes were differentiated into macrophages by culturing the cells (2 million per milliliter) in 24-well plates in RPMI 1640 medium supplemented with 1% (vol/vol) penicillin-streptomycin and 20% (vol/vol) of each own serum. The cells were incubated for 5 days at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air atmosphere. The culture medium was changed at day 4. In experiments aimed at assessing the role of peripheral factors on macrophage LPL production, monocytes isolated from the diabetic patient were differentiated in the serum of the control subject, and monocytes isolated from

the control subject were differentiated in the serum obtained from the diabetic patient. The biochemical composition of the control and diabetic sera used in the experiments was determined by measuring the levels of serum endotoxin, glucose, glycated hemoglobin, LPL mass and LPL activity. Whereas levels of serum endotoxin, glycated hemoglobin, and LPL mass and activity did not differ between the control and diabetic populations, increased fasting serum glucose levels were observed in the diabetic patients compared to the control subjects (Table 1). The low- and high-glucose RPMI media were prepared by adding appropriate amounts of glucose to glucose-free RPMI medium (Gibco BRL) to achieve the desired final glucose concentrations.

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

Expression of the LPL gene in human diabetic and control macrophages was performed by polymerase chain reaction (PCR) technique. Total RNA for use in the PCR reaction was extracted from human macrophages by an improvement of the acid-phenol technique of Chomczynski and Sacchi (30). Briefly, cells were lysed with TRIzol reagent and chloroform was added to the solution. After centrifugation, the RNA present in the aqueous phase was precipitated and resuspended in diethyl pyrocarbonate water. cDNA was synthesized from RNA by incubating total cellular RNA with 0.1 µg oligodT (Pharmacia, Piscataway, NJ) for 5 min at 98°C then by incubating the mixture with reverse transcription buffer for 60 min at 37°C. The cDNA obtained was amplified by using 0.8 µmol/l of two synthetic primers specific for human LPL (5'-GAGATTTCTCTGTATGGCACC-3' and 5'-CTGCAAATGAGACACTTTCTC-3') and human GAPDH (5'-CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG-3' and 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG-3') as internal standard in the PCR reaction mixture. A 277-bp human LPL cDNA fragment and a 456-bp

human GAPDH cDNA fragment were amplified enzymatically by 27 and 30 repeated cycles for GAPDH and LPL, respectively, at 95°C for 60 s, 60°C for 40 s, and 72°C for 90 s. An aliquot of each reaction mixture was then subjected to electrophoresis on 1% agarose gel containing ethidium bromide. The intensity of the bands was measured by an image analysis scanning system (Alpha Imager 2000; Packard Instruments, Meriden, CT).

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

Monocytes isolated from the control subjects and the diabetic patients were incubated for 5 days in RPMI medium containing 20% serum of control subjects or diabetic patients. LPL activity and mass were measured in the supernatants 24 h after the final medium change. One hour before the end of the incubation period, 0.5 U/ml heparin was added to the medium. The amount of human LPL immunoreactive mass was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the Markit-F LPL kit (Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan) (31). Medium LPL activity was determined using the Confluolip kit ( Progen, Heidelberg, Germany) (32).

#### **Determination of human macrophage TNF- $\alpha$ immunoreactive mass**

Monocytes isolated from control subjects and the diabetic patients were incubated for 5 days in RPMI medium containing 20% serum of control subjects or diabetic patients. Twenty-four hours after the final medium change, TNF- $\alpha$  immunoreactive mass released in the culture medium was determined by a double-sandwich ELISA (Quantikine, R&D systems, Minneapolis, MN). In some experiments, the effect of LPL on TNF- $\alpha$  secretion was determined by adding 1  $\mu$ g/ml LPL to the medium.

**Statistical analysis**

All values are expressed as the mean  $\pm$  SE. For single comparisons, data were analyzed using Student's *t* test or the Mann-Whitney rank-sum test. For multiple comparisons data were analyzed by analysis of variance followed by Tukey's test or Dunnett's method.

## RESULTS

### **Levels of LPL mRNA in macrophages of control subjects and diabetic patients.**

Monocyte-derived macrophages of diabetic patients cultured in their own sera demonstrated a significant increase in LPL mRNA levels compared with those isolated from the control subjects (Fig.1A). Under these experimental conditions, no modulation of the mRNA expression of GAPDH was observed (Fig.1B). LPL mRNA levels normalized to the levels of GAPDH mRNA are presented in Fig.1C.

### **Levels of LPL immunoreactive mass in macrophages of control subjects and diabetic patients.**

Monocyte-derived macrophages of diabetic patients cultured in their own sera secreted significantly higher LPL mass than macrophages of control subjects ( $P < 0.001$ ) (Fig.2). Culture of macrophages of diabetic patients in sera of control subjects significantly reduced this alteration ( $P < 0.005$ ) (Fig.2). In contrast, differentiation of macrophages of control subjects in sera of diabetic patients resulted in a significant increase in the amounts of LPL secreted by these cells ( $P < 0.001$ ) (Fig.2).

### **LPL activity in macrophages of control subjects and diabetic patients.**

Monocyte-derived macrophages of diabetic patients cultured in their own sera secreted significantly higher LPL activity than macrophages of control subjects ( $P < 0.005$ ) (Fig.3). Incubation of macrophages of diabetic patients in sera of control subjects partially reversed this anomaly ( $P < 0.001$ ) (Fig.3). Conversely, differentiation of monocytes isolated from the control



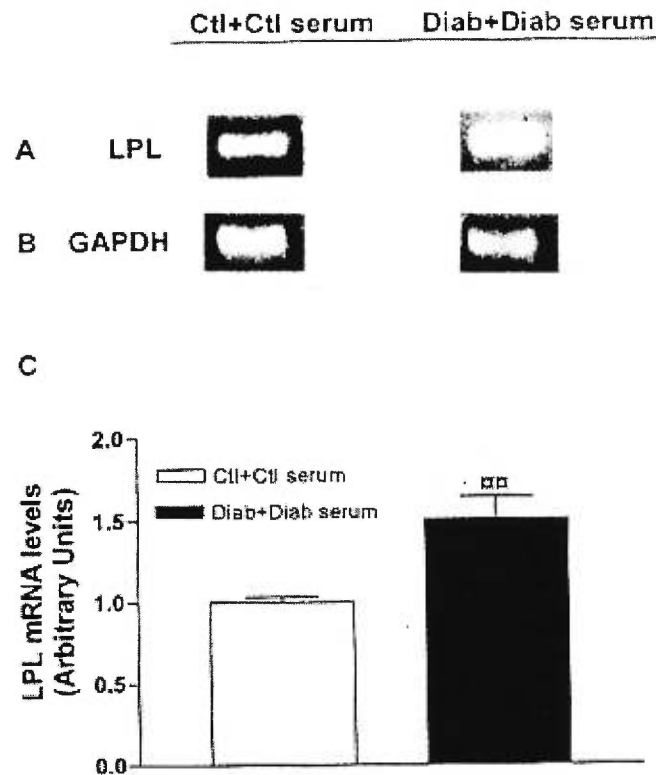
subjects into macrophages in sera of diabetic patients significantly enhanced LPL activity in these cells (Fig.3).

#### **Basal TNF- $\alpha$ secretion by macrophages of control subjects and diabetic patients.**

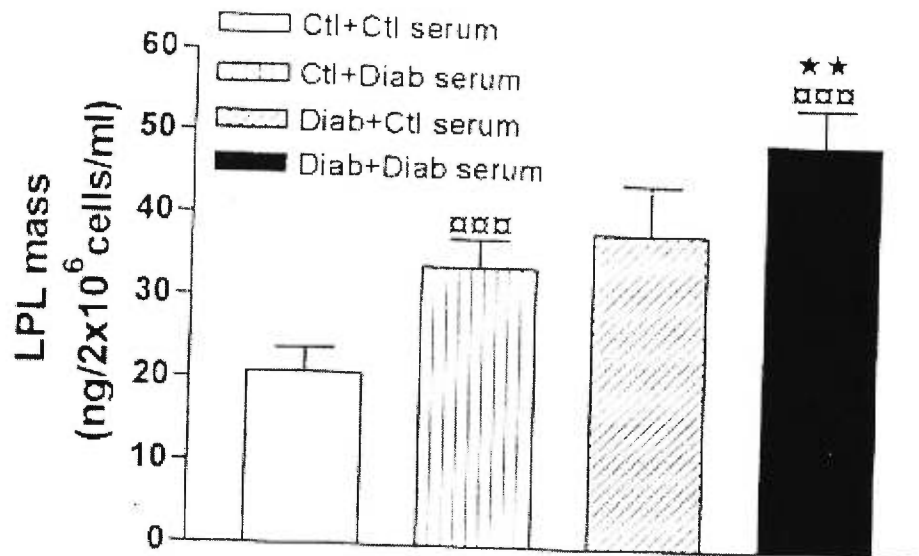
Macrophages of diabetic patients cultured in their own sera secreted significantly higher amounts of TNF- $\alpha$  than macrophages of control subjects ( $P < 0.001$ ) (Fig.4). Incubation of macrophages of diabetic patients in sera of control subjects dramatically decreased basal TNF- $\alpha$  production by these cells ( $P < 0.001$ ) (Fig.4). In macrophages of control subjects differentiated in sera of diabetic patients, a twofold increase in basal TNF- $\alpha$  secretion was also observed ( $P < 0.005$ ) (Fig.4).

#### **LPL-induced TNF- $\alpha$ secretion by control and diabetic macrophages.**

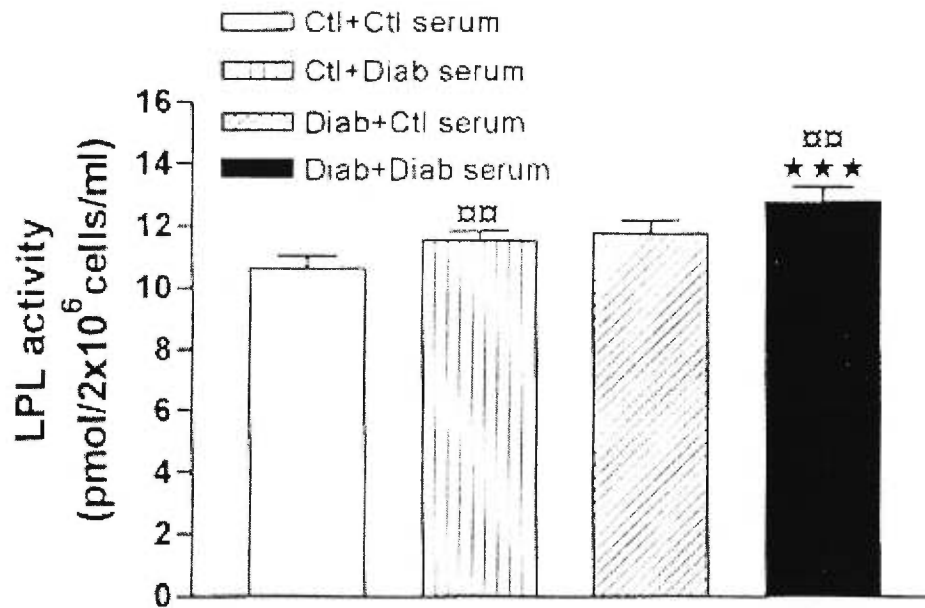
Responsiveness to LPL, as assessed by TNF- $\alpha$  production, was significantly higher in monocyte-derived macrophages of diabetic patients than in cells of control subjects when culture was performed with autologous serum ( $P = 0.005$ ) (Fig.5). A significant decrease in LPL-induced TNF- $\alpha$  secretion by macrophages of diabetic patients was observed following exposure of these cells to sera of normal control subjects ( $P < 0.005$ ) (Fig.5). In contrast, a marked increase in TNF- $\alpha$  levels was found in supernatants harvested from macrophages of control subjects exposed to sera of diabetic patients ( $P = 0.05$ ) (Fig.5).



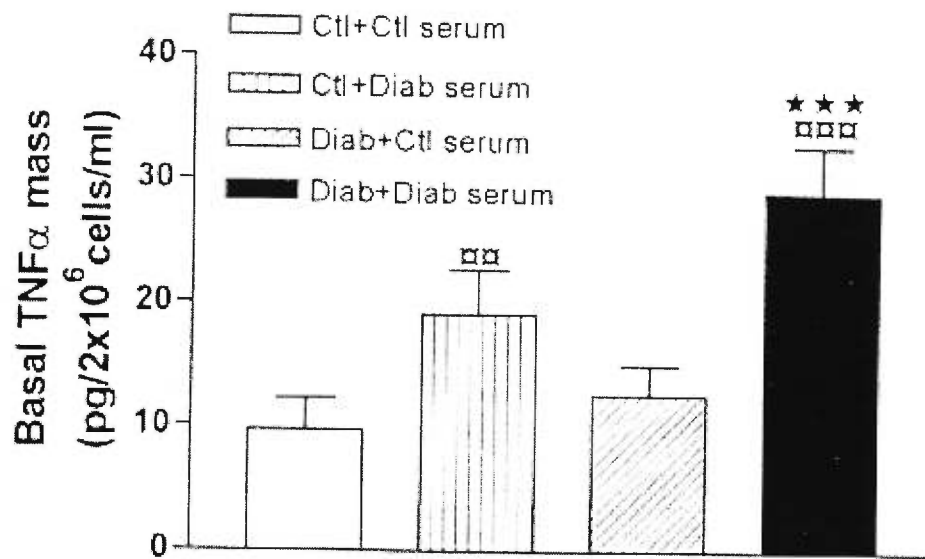
**FIG. 1. LPL mRNA levels in macrophages of control subjects and diabetic patients.** Monocytes of control subjects (Ctl) or diabetic patients (Diab) were cultured for 5 days in RPMI medium containing 20% of their own sera. Twenty-four hours after the final medium change, cells were lysed and LPL (A) and GAPDH (B) mRNA expression was analyzed by reverse transcription PCR. C: LPL mRNA levels (arbitrary units) normalized to the levels of GAPDH mRNA. Data represent means  $\pm$  SE of results obtained in 10 control subjects and 10 diabetic patients. □□P < 0.005 vs. control subjects.



**FIG. 2. LPL secretion by macrophages of control subjects and diabetic patients.** Monocytes of control subjects (Ctl) or diabetic patients (Diab) were cultured in their own sera for 5 days. In some experiments, monocytes of control subjects were differentiated in sera of diabetic patients and monocytes of diabetic patients were differentiated in sera of control subjects. Twenty-four hours after the final medium change, LPL immunoreactive mass was determined in the medium. Values for LPL mass are expressed as nanograms per  $2 \times 10^6$  cells per milliliter. Data represent means  $\pm$  SE of results obtained in 10 control subjects and 10 diabetic patients. □□□ $P < 0.001$  vs. Ctl + Ctl serum; \*\* $P < 0.005$  vs. Diab + Ctl serum.

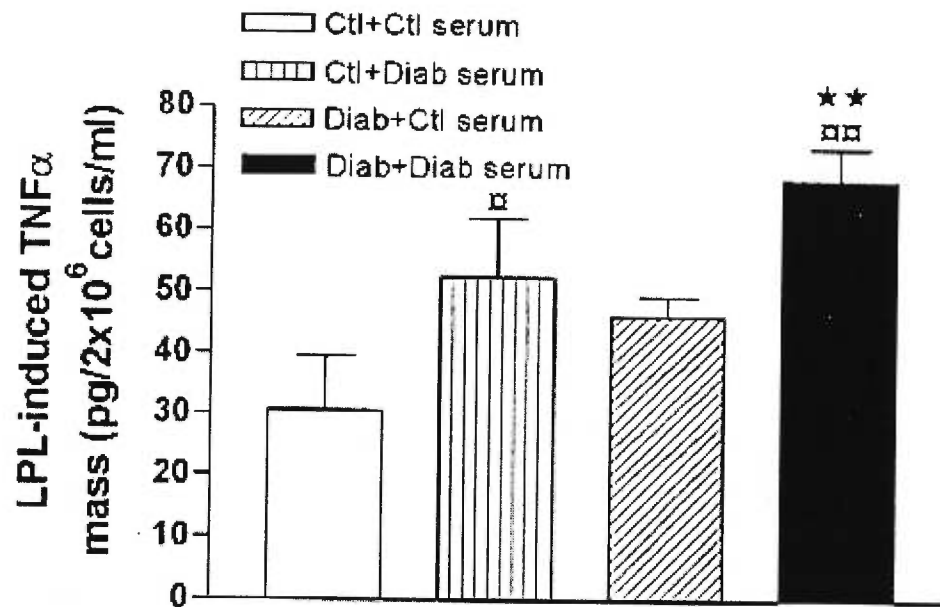


**FIG. 3. LPL activity in macrophages of control subjects and diabetic patients.** Monocytes of control subjects (Ctl) or diabetic patients (Diab) were cultured in their own sera for 5 days. In some experiments, monocytes of control subjects were differentiated in sera of diabetic patients and monocytes of diabetic patients were differentiated in sera of control subjects. Twenty-four hours after a medium change, LPL activity was determined in the supernatants. Values for LPL activity are expressed as picomoles per  $2 \times 10^6$  cells per milliliter. Data represent the means  $\pm$  SE of results obtained in 10 control subjects and 10 diabetic patients. □□  $P < 0.005$  vs. Ctl + Ctl serum; \*\*\* $P < 0.001$  vs. Diab + Ctl serum.



**FIG. 4. Basal TNF- $\alpha$  secretion by macrophages of control subjects and diabetic patients.**

Monocytes of control subjects (Ctl) or diabetic patients (Diab) were cultured in their own sera for 5 days. In some experiments, monocytes of control subjects were differentiated in sera of diabetic patients and monocytes of diabetic patients were differentiated in sera of control subjects. Twenty-four hours after the final medium change, TNF- $\alpha$  immunoreactive mass was determined in the supernatants. Values for TNF- $\alpha$  mass are expressed as picograms per 2x10<sup>6</sup> cells per milliliter. Data represent the mean  $\pm$  SE of results obtained in 8 control subjects and 8 diabetic patients. □□P < 0.005 vs. Ctl + Ctl serum; □□□P < 0.001 vs. Ctl + Ctl serum; \*\*\*P < 0.001 vs. Diab + Ctl serum.



**FIG. 5. LPL-induced TNF- $\alpha$  secretion by macrophages of control subjects and diabetic patients.** Monocytes of control subjects (Ctl) or diabetic patients (Diab) were cultured in their own sera for 5 days. In some experiments, monocytes of control subjects were differentiated in sera of diabetic patients and monocytes of diabetic patients were differentiated in sera of control subjects. Twenty-four hours after the last medium change, exogenous bovine LPL (1  $\mu$ g/ml) was added to the culture medium. The 24-h production of TNF- $\alpha$  was determined in the supernatants. Values for TNF- $\alpha$  mass are expressed as picograms per 2x10<sup>6</sup> cells per milliliter. Data represent the mean  $\pm$  SE of results obtained in 5 control subjects and 5 diabetic patients.  $\square$ P = 0.05 vs. Ctl + Ctl serum;  $\square\square$ P = 0.005 vs. Ctl + Ctl serum;  $\square\square\square$ P = 0.005 vs. Ctl + Ctl serum;  $\square\square\square$ P = 0.005 vs. Diab + Ctl serum.

**TABLE 1. Characteristics of the study population.**

	<b>Patients with Type 2 diabetes</b>	<b>Controls subjects</b>
Age (years)	48.5 ± 2.7	39.2 ± 3.8
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.8 ± 0.9	26.1 ± 0.8
Fasting glucose (mmol/l)	7.9 ± 0.7 <sup>b</sup>	5.0 ± 0.1
Triglycerides (mmol/l)	1.96 ± 0.21 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.14
Cholesterol (mmol/l)		
Total	5.18 ± 0.27	4.86 ± 0.26
HDL	1.10 ± 0.06	1.44 ± 0.12
LDL	3.18 ± 0.26	2.81 ± 0.24
Endotoxin (pg/ml)	<6	<6
LPL mass (ng/ml)	76.58 ± 15.20	76.58 ± 6.14
LPL activity (pmol/ml)	11.57 ± 0.48	10.66 ± 0.15

Data are means ± SE. <sup>b</sup> P<0.005, diabetic vs. control subjects;

<sup>a</sup> P<0.05, diabetic vs. control subjects.

## DISCUSSION

The present study establishes that macrophage LPL induction occurs in human type 2 diabetes at both the gene and protein levels. Our finding that LPL mRNA is overexpressed in type 2 diabetes is in accordance with the results of Creedon et al. (22) who found higher copy numbers of LPL mRNA in hypertriglyceridemic diabetic patients than in nondiabetic subjects. Although hypertriglyceridemia may contribute to the increased transcripts levels of LPL message in patients with type 2 diabetes (33), our finding that enhanced LPL mRNA expression also occurs in normotriglyceridemic subjects with type 2 diabetes clearly indicates that dyslipidemia is not the sole mechanism responsible for the induction of macrophage LPL mRNA expression in type 2 diabetes. Our observation that high glucose stimulates *in vitro* human macrophage LPL mRNA expression (23) suggests that other metabolic factors dysregulated in diabetes including hyperglycemia may play a key role in the macrophage LPL mRNA overexpression associated with type 2 diabetes. The molecular mechanisms responsible for the induction of macrophage LPL mRNA expression in macrophages isolated from diabetic patients are unknown. Although the limited amount of biological material extracted from human cells did not allow us to perform run-on experiments or to evaluate LPL mRNA stability, our previous finding that transcriptional events are involved in the stimulatory effect of glucose on murine macrophage LPL expression (23) suggests that a similar mechanism may be responsible for the overexpression of LPL in macrophages isolated from patients with type 2 diabetes.

Previous studies have demonstrated that diabetes induces tissue-specific changes in the levels of LPL mRNA, immunoreactive protein, and activity. Whereas diabetes has been repeatedly shown to decrease adipose tissue LPL activity (34-37), LPL activity in skeletal muscle of diabetic patients



has been found to be either unchanged or decreased (36,38-41). Our results, which demonstrate that induction of macrophage LPL immunoreactive protein and activity occurs in the diabetic state and parallels changes in LPL mRNA levels, indicate that in human macrophages, diabetes exerts a pre-translational control on LPL expression.

Although the mechanisms responsible for macrophage LPL induction in diabetes remain uncertain, our observation that culture of macrophages of diabetic patients in sera of control subjects markedly decreases this alteration indicates that metabolic or hormonal factors present in the sera of diabetic subjects are at least partly responsible for the overproduction of macrophage LPL in diabetes. Potential metabolic factors associated with macrophage LPL induction include glucose and AGE. Indeed, these factors accumulate in the plasma and vessel wall of diabetic patients (42, 43) and stimulate *in vitro* human macrophage LPL production (23).

Along with peripheral factors, other mechanisms seem to be involved in the upregulation of macrophage LPL in type 2 diabetes. Indeed, we found that incubation of macrophages of diabetic patients with sera of normal controls did not totally normalize macrophage LPL induction. Although clear evidence demonstrating the insulin-sensitivity of macrophage LPL is still lacking (44), one possibility is that induction of macrophage LPL in diabetes could, at least in part, represent a compensatory mechanism to provide the cells with energy in the presence of diminished insulin-mediated glucose uptake. Studies of macrophage LPL regulation in insulin-resistant nondiabetic subjects are currently underway to investigate this possibility.

Just as TNF- $\alpha$  is overexpressed in adipose tissue and muscle of insulin-resistant subjects, increased TNF- $\alpha$  production has been documented in monocytes of patients with type 2 diabetes (24). Our results indicate a similar augmentation of basal TNF- $\alpha$  secretion by macrophages of

diabetic patients. Our finding that culture of macrophages of diabetic subjects in sera of normal control subjects totally reverses the induction of macrophage TNF- $\alpha$  underlines the role of peripheral factors in this alteration. Data indicating a stimulatory effect of high glucose, AGE and LDL on monocyte/macrophage TNF- $\alpha$  release (26,27,45) support a role of these factors in the dysregulation of macrophage TNF- $\alpha$  in diabetes.

Besides its role in lipid metabolism, LPL acts as an activator of macrophage function, inducing TNF- $\alpha$  secretion (20,21). The present report provides evidence that LPL-induced TNF- $\alpha$  production is higher in macrophages of diabetic patients than in those of control subjects. Because diabetes is associated with enhanced oxidative stress (43,46) and reactive oxygen species facilitate LPS-induced TNF- $\alpha$  production (47), one may speculate that oxidant stress may, at least in part, be responsible for the upregulation of macrophage responsiveness to LPL observed in diabetes. However, arguing against this possibility is our recent observation that reactive oxygen intermediates decrease LPL-induced TNF- $\alpha$  production (48). From these results, it clearly appears that future studies will be needed to address the mechanisms involved in this alteration.

Atherosclerosis is the leading complication of type 2 diabetes. The pathogenesis of atherosclerosis is poorly understood but clearly involves the production in the vascular wall of macrophage LPL and TNF- $\alpha$ . Data generated in the present study clearly demonstrate that human type 2 diabetes promotes the overproduction of these two proatherogenic factors and that metabolic and/or hormonal factors accumulating in the sera of diabetic subjects are, at least in part, responsible for these alterations. These results suggest that diabetes may tend to increase the in vivo production of LPL and TNF- $\alpha$  in the arterial wall and that these alterations may contribute to the development of atherosclerosis associated with diabetes. Better understanding of the pathobiology of

atherosclerosis associated with diabetes gained from studies of the human diabetic macrophage should lead to the development of new methods for the prevention and treatment of diabetic atherosclerosis.

**ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by grants from the Medical Research Council of Canada and from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

The authors thank Dr. O. Serri (University of Montreal, Metabolic Unit of Notre-Dame Hospital, Montreal) for the referral of the diabetic patients and for his helpful comments in the preparation of the manuscript.

## REFERENCES

1. DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:173-194, 1991
2. Fuller JH, Shipley MJ, Rose G, Jarrett RJ, Keen H: Coronary-heart-disease risk and impaired glucose tolerance: the Whitehall Study. *Lancet* 1:1373-1376, 1980
3. Pyorala K: Relationship of glucose tolerance and plasma insulin to the incidence of coronary heart disease :results from two population studies in Finland. *Diabetes Care* 2:131-141, 1979
4. Rosenfeld ME, Khoo JC, Miller E, Parthasarathy S, Palinsky W, Witztum JL: Macrophage-derived foam cells freshly isolated from rabbit atherosclerotic lesions degrade modified lipoproteins, promote oxidation of low-density lipoproteins, and contain oxidation-specific lipid protein adducts. *J Clin Invest* 87:90-99, 1991
5. Gerrity RG: The role of the monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 103:181-190, 1981
6. Chait A, Iverius PH, Brunzell JD: Lipoprotein lipase secretion by human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 69:490-493, 1982
7. Wang-Iverson P, Ungar A, Bliumis J, Bukberg PR, Gibson JC, Brown WV: Human monocytes in culture synthesize and secrete lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun* 104:923-928, 1982
8. Eckel RH: Lipoprotein lipase: a multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 320:1060-1068, 1989

9. Corey JE, Zilversmit DB: Effect of cholesterol feeding on arterial lipolytic activity in the rabbit. *Atherosclerosis* 27:201-212, 1977
10. O'Brien KD, Gordon D, Deeb S, Ferguson M, Chait A: Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 89:1544-1550, 1992
11. Mattsson L, Johansson H, Ottosson M, Bondjers G, Wiklund O: Expression of lipoprotein lipase mRNA and secretion in macrophages isolated from human atherosclerotic aorta. *J Clin Invest* 92:1759-1765, 1993
12. Renier G, Skamene E, DeSanctis JB, Radzioch D: High macrophage lipoprotein lipase expression and secretion are associated in inbred murine strains with susceptibility to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* 13:190-196, 1993
13. Eisenberg S, Sehayek E, Olivecrona T, Vlodavsky I: Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J Clin Invest* 90:2013-2021, 1992
14. Williams KJ, Fless GM, Petrie KA, Snyder ML, Brocia RW, Swenson TL: Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein(a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. Roles for low density lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 267:13284-13292, 1992
15. Rumsey SC, Obunike JC, Arad Y, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ: Lipoprotein lipase-mediated uptake and degradation of low density lipoproteins by fibroblasts and macrophages. *J Clin Invest* 90:1504-1512, 1992

16. Saxena U, Klein MG, Vanni TM, Goldberg IJ: Lipoprotein lipase increases low density lipoprotein retention by subendothelial cell matrix. *J Clin Invest* 89:373-380, 1992
17. Hendriks WL, van der Boom H, van Vark LC, Havekes LM: Lipoprotein lipase stimulates the binding and uptake of moderately oxidized low-density lipoprotein by J774 macrophages. *Biochem J* 314:563-568, 1996
18. Mamputu JC, Desfaits AC, Renier G. Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *J Lipid Res* 38:1722-1729, 1997
19. Obunike JC, Paka S, Pillarisetti S, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase can function as a monocyte adhesion protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1414-1420, 1997
20. Renier G, Skamene E, DeSanctis JB, Radzioch D. Induction of tumor necrosis factor  $\alpha$  gene expression by lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 35:271-278, 1994
21. Mamputu JC, Renier G. Differentiation of human monocytes to monocyte-derived macrophages is associated with increased lipoprotein lipase-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  expression and production. A process involving cell surface proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, in press, 1999
22. Creedon G, Sexton D, Griffin M, O'Meara N and Collins P: Lipoprotein lipase in human monocyte-derived macrophages isolated from type II diabetic subjects. *Biochem Soc Trans* 25:134S, 1997
23. Sartippour MR, Lambert A, Laframboise M, St-Jacques P, Renier G: Stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression and production. *Diabetes* 47:431-438, 1998

24. 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
25. Yamakawa T, Tanaka S, Yamakawa Y, Kiuchi Y, Isoda F, Kawamoto S, Okuda K, Sekihara H: Augmented production of tumor necrosis factor- $\alpha$  in obese mice. *Clin Immunol Immunopathol* 75:51-56, 1995
26. 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
27. 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
28. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976
29. Mentzer SJ, Guyre PM, Burakoff SJ, Faller DV: Spontaneous aggregation as a mechanism for human monocyte purification. *Cell Immunol* 101:312-319, 1986
30. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method for RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987
31. Ikeda Y, Takagi A, Ohkaru Y, Nogi K, Iwanaga T, Kurooka S, Yamamoto A: A sandwich-enzyme immunoassay for the quantification of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in human postheparin plasma using monoclonal antibodies to the corresponding enzymes. *J Lipid Res* 31:1911-1924, 1990



32. Duque M, Graupner M, Stutz H, Wicher I, Zechner R, Paltauf F, Hermetter A: New Fluorogenic triacylglycerol analogs as substrates for the determination and chiral discrimination of lipase activities. *J Lipid Res* 37:868-876, 1996
33. Ishibashi S, Mori N, Murase T, Shimano H, Gotohda T, Kawakami M, Akanuma Y, Takaku F, Yamada N: Enhanced lipoprotein lipase secretion from human monocyte-derived macrophages caused by hypertriglyceridemic very low density lipoproteins. *Arteriosclerosis* 9:650-655, 1989
34. Pykalisto OJ, Smith PH, Brunzell JD: Determinants of human adipose tissue lipoprotein lipase. Effect of diabetes and obesity on basal- and diet-induced activity. *J Clin Invest* 56:1108-1117, 1975
35. Taylor KG, Galton DJ, Holdsworth G: Insulin-independent diabetes: A defect in the activity of lipoprotein lipase in adipose tissue. *Diabetologia* 16:313-317, 1979
36. Vessby B, Selinus I, Lithell H: Serum lipoproteins and lipoprotein lipase in overweight, type II diabetics during and after supplemented fasting. *Arteriosclerosis* 5:93-100, 1985
37. Simsolo RB, Ong JM, Saffari B, Kern P: Effect of improved diabetes control on the expression of lipoprotein lipase in human adipose tissue. *J Lipid Res* 33:89-95, 1992
38. Taskinen MR, Nikkila EA, Kuusi T, Harmo K: Lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins in untreated type 2 (insulin-independent) diabetes associated with obesity. *Diabetologia* 22:46-50, 1982
39. Pollare T, Vessby B, Lithell H: Lipoprotein lipase activity in skeletal muscle is related to insulin sensitivity. *Arterioscler Thromb* 11:1192-1203, 1991

40. Taskinen MR, Nikkila EA, Nousiainen R, Gordin A: Lipoprotein lipase activity in adipose tissue and skeletal muscle of human diabetics during insulin deprivation and restoration. *Scand J Clin Lab Invest* 41:263-268, 1981
41. Yost TJ, Froyd KK, Jensen DR, Eckel RH: Change in skeletal muscle lipoprotein lipase activity in response to insulin/glucose in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 44:786-790, 1995
42. 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
43. Baynes JW: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40:405-412, 1991
44. Behr SR, Kraemer FB: Insulin deficiency decreases lipoprotein lipase secretion by murine macrophages. *Diabetes* 37:1076-1081, 1988
45. Jovinge S, Ares MP, Kallin B, Nilsson J: Human monocytes/macrophages release TNF- $\alpha$  in response to ox-LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 1573-1579, 1996
46. Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Ohishi N, Yagi K: Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem Med* 21:104-107, 1979
47. Chaudhri G, Clark IA: Reactive oxygen species facilitate the in vitro and in vivo lipopolysaccharide-induced release of tumor necrosis factor. *J Immunol* 143:1290-1294, 1989.
48. Renier G, Desfaits AC, Lambert A, Mikhail R : Role of oxidant injury on macrophage lipoprotein lipase (LPL) production and sensitivity to LPL. *J Lipid Res* 37:799-809, 1996

### **III. DISCUSSION**

### III.1. Hyperglycémie et maladies cardiovasculaires

Le DNID est associé à une prévalence élevée de maladies cardiovasculaires. L'hyperglycémie chronique associée au diabète représente un déterminant majeur des complications vasculaires associées à cette maladie (Massi-Benedetti et Federici, 1999; Hanefeld et coll., 1999; Orchard, 1999). En effet, il a été démontré qu'il existe une relation positive entre le risque de maladies cardiovasculaires et les concentrations plasmatiques de glucose et d'Hb<sub>A1C</sub> (Eschwege et coll., 1985; Fuller et coll., 1980). L'épaisseur de l'intima-média de l'artère carotide chez les sujets présentant une intolérance au glucose corrèle aussi positivement avec les niveaux de glucose plasmatique à jeun, suggérant que même des augmentations relativement faibles des niveaux glycémiques plasmatiques puissent accroître le risque cardiovasculaire (Hanefeld et coll., 1999). Les données d'études prospectives telles le DCCT et le UKPDS suggèrent en outre qu'un contrôle glycémique strict puisse réduire les complications vasculaires associées au diabète (Laasko, 1999; UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998; Laasko and Kuusisto, 1996a; Kuusisto et coll., 1994; The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993).

Les mécanismes impliqués dans l'effet délétère du glucose sur le développement des maladies vasculaires diabétiques incluent les altérations du système de coagulation, la glycation des protéines, le stress oxydatif et les anomalies de la composition des lipoprotéines.

Les altérations du système de coagulation, retrouvées dans le diabète, contribuent de manière indéniable au développement de l'athérosclérose dans cette maladie (Massi-Benedetti et Federici, 1999). L'hyperglycémie stimule la formation de la fibrine et de la thrombine, activant dès lors la fonction plaquettaire et inhibant la fibrinolyse. Il a été récemment documenté qu'un contrôle

glycémique adéquat normalisait l'activité fibrinolytique dans le diabète de type 2 (Jarvi et coll., 1999). L'hyperglycémie stimule, en outre, indirectement et en augmentant les AGE, l'apoptose cellulaire et l'activité pro-coagulante (Min et coll., 1999). Une association entre intolérance au glucose et augmentation des titres d'anticorps anti-PAI-1 et anti-tPA, a finalement été rapportée (Meigs et coll., 2000).

L'hyperglycémie entraîne aussi la formation de protéines glyquées. L'interaction des AGE avec leurs récepteurs favorise la création d'un état pro-oxydant et augmente la peroxydation lipidique (Shantaram, 1999; Unger et Foster, 1998; Schmidt et coll., 1994; Yan et coll., 1994). En induisant la formation de radicaux libres, les AGE modulent l'expression génique (Brownlee, 2000). Les LDL glyquées sont détectables dans l'intima des artères athérosclérotiques et agissent comme des composants immuno-actifs accélérant l'athérogenèse chez le patient diabétique (Makita et coll., 1999; Sima et coll., 1997). Une relation entre les niveaux d'Hb<sub>A1c</sub> et le profil des lipoprotéines plasmatiques a été démontrée chez les patients diabétiques (Sanchez-Cabezudo et coll., 1994). La glycation de la phosphatidyl-éthanolamine, un composant des LDL, contribue à la captation de ces particules par les macrophages (Ravandi et coll., 1999).

L'hyperglycémie induit la production de radicaux libres, tels l'anion superoxyde, et diminue les défenses antioxydantes de l'organisme (Opara et coll., 1999; Ceriello et coll., 1997; Giugliano et coll., 1996; Tesfamariam et coll., 1991; Baynes, 1991). Alors qu'une relation solide existe chez la souris diabétique entre l'hyperglycémie et la diminution d'activité de diverses enzymes antioxydantes telles la glutathione peroxydase (Romero et coll., 1999), un contrôle glycémique inadéquat est associé chez les sujets diabétiques de type 2 à une altération de l'activité de la catalase, de la superoxyde dismutase et de la paraoxonase (Sozmen et coll., 1999). Les radicaux libres

pourraient constituer des médiateurs importants des effets délétères de l'hyperglycémie sur les complications vasculaires du diabète. En effet, il a été rapporté que certains antioxydants tels les vitamines C et E pourraient prévenir certains processus pathologiques associés au développement des complications diabétiques (Brownlee, 2000; Ceriello, 1999). L'hyperglycémie chronique induit aussi, *via* le stress oxydatif, l'apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques, un effet inhibé par les antioxydants (Ihara et coll., 1999; Kaneto et coll., 1999). Il a été proposé que la PKC puisse constituer un mécanisme responsable de la production de radicaux libres médiée par l'auto-oxydation du glucose et par les AGE (Ha et Kim, 1999).

L'hyperglycémie est associée à une altération du profil lipidique et à des niveaux plasmatiques élevés de peroxydes lipidiques (Serban et Negru, 1998). Un contrôle glycémique adéquat réduit l'hyperchylomicronémie post-prandiale et normalise le profil lipidique, chez le patient diabétique de type 2 (Phillips et coll., 1999; Jarvi et coll., 1999). L'oxydation et la glyco-oxydation des lipoprotéines, associées au diabète, sont responsables de multiples effets pro-athérogéniques tels la formation de cellules spumeuses et la prolifération des cellules musculaires lisses (Holvoet, 1999). L'hyperglycémie, en induisant la glycation des LDL, augmente la captation de ces lipoprotéines par les macrophages (Makita et coll., 1999; Ravandi et coll., 1999). La modification des lipoprotéines augmente en outre la relâche de cytokines et la perméabilité des cellules endothéliales et stimule l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et la réplication macrophagique (Kaplan et Aviram, 1999; Galle et coll., 1999; Kamanna et coll., 1999; Gardner et coll., 1999).

Le glucose est un substrat énergétique pour les macrophages (Calder, 1995). Le glucose stimule la prolifération des macrophages (Liu et coll., 1995), ainsi que leur réponse proliférative au CSF-1 (Sinai et coll., 1996). Les macrophages exposés à des concentrations élevées de glucose

surexpriment les récepteurs du CSF-1 et du PDGF (Sinai et coll., 1996; Inaba et coll., 1996). Le glucose est aussi un facteur stimulant la production d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  par les monocytes humains (Morohoshi et coll., 1996; 1995). Il a été récemment suggéré que l'IL-1 puisse contribuer à la sécrétion accrue de TNF- $\alpha$  en réponse à l'hyperglycémie (Pampfer et coll., 1999). Cette hypothèse ne semble cependant pas supportée par les travaux de Hill et coll. (1998), démontrant que l'hyperglycémie inhibe, en activant la PKC, la relâche d'IL-1 macrophagique. L'inhibition de la relâche d'IL-1 macrophagique induite par l'hyperglycémie a été proposée comme un mécanisme pouvant expliquer la persistance des infections chez les patients diabétiques (Hill et coll., 1998). L'hyperglycémie diminue en outre le phénomène "d'explosion respiratoire" macrophagique (Kwoun et coll., 1997). Tel que mentionné précédemment, la PKC est impliquée dans l'effet de l'hyperglycémie sur la fonction monocyttaire macrophagique. Il a été démontré que les monocytes surexpriment la PKC en réponse au glucose et que l'hyperglycémie est reliée à l'augmentation d'activité membranaire de la PKC monocyttaire chez le patient diabétique de type 2 (Ceolotto et coll., 1999).

### **III.2. LPL et état nutritionnel**

Tel que décrit précédemment, la LPL est régulée par l'état nutritionnel de manière tissu-dépendante (Galan et coll., 1994). Alors que la prise alimentaire augmente rapidement les niveaux d'ARNm et l'activité de la LPL adipocytaire (Bonnet et coll., 1998), le jeûne diminue cette activité et, est associé à une augmentation de sécrétion de la LPL adipocytaire sous forme inactive (Bergo et coll., 1996). Au contraire, au cours du jeûne, une activité élevée de la LPL musculaire, dirige les

triglycérides vers les muscles qui les utilisent comme substrats énergétiques (Ruige et coll., 1999; Olivecrona et Olivecrona, 1995; Chajek-Shaul et coll., 1985).

La LPL est sensible à l'insuline et les agents augmentant la sensibilité à l'insuline accroissent la masse et l'activité de la LPL plasmatique (Shirai et coll., 1999). L'insuline augmente, d'une manière aiguë, l'activité et la sécrétion de la LPL adipocytaire (Picard et coll., 1999; Reynolds et coll., 1990; Semenkovich et coll., 1989; Pradines-Figueres et coll., 1988; Eckel, 1987; Vydelingum et coll., 1983; Ashby et coll., 1978). Alors que l'HI semble responsable du maintien des niveaux d'activité de la LPL adipocytaire, l'activité musculaire de l'enzyme paraît être reliée inversement à la disponibilité et l'utilisation tissulaire de substrats lipidiques tels les AGL (Boivin et Deshaies, 2000). L'insuline inhibe l'activité de la LPL musculaire et diminue l'expression génique de cette enzyme (Laville et coll., 1996; Richelsen et coll., 1993). À l'inverse, la diminution de l'insulinémie durant le jeûne est accompagnée d'une augmentation d'activité de la LPL au niveau musculaire (Seip et coll., 1995; Ladu et coll., 1991; Gorski et coll., 1982). Notons que certaines études ont suggéré que les effets de l'insuline sur les niveaux d'activité de la LPL musculaire puissent être reliés à l'action de l'insuline sur le métabolisme du glucose, plutôt qu'à un effet direct de cette hormone (Ferraro et coll., 1993; Pollare et coll., 1991).

Contrairement à l'activité de la LPL musculaire squelettique, l'activité de la LPL cardiaque est augmentée *in vitro* par l'administration aiguë d'insuline exogène et ne semble pas être dépendante du glucose (Sambandam et coll., 1999).

Il semble que l'expression de la LPL au niveau endothélial puisse aussi être régulée par l'insuline. En effet, il a été rapporté que de courtes périodes d'hypoinsulinémie augmentent les niveaux d'activité de la LPL au niveau de l'endothélium capillaire (Sambandam et coll., 1999). Il



a aussi été suggéré que l'administration aiguë d'insuline puisse stimuler la libération d'un facteur endothélial, responsable de la relâche de la LPL à partir de la membrane plasmique adipocytaire (Knutson, 2000).

Contrairement à la LPL plasmique, adipocytaire et musculaire, la LPL d'origine macrophagique ne semble pas être régulée par l'insuline, cette hormone n'exerçant pas d'effet direct sur les macrophages. Il a été proposé que la diminution de sécrétion de la LPL macrophagique observée chez les souris insulino-déficientes soit reliée à des facteurs secondaires indépendants de l'insuline (Behr et Kraemer, 1988; Behr et Kraemer, 1986a).

### **III.3. LPL macrophagique et glucose**

#### **III.3.1. Rôle du glucose dans l'expression et la production de la LPL macrophagique**

Le glucose est impliqué dans la modulation de plusieurs enzymes régulant le métabolisme lipidique telles que la "fatty acid synthetase", l'enzyme malique, la "glucose-6-phosphate déshydrogénase", la phospholipase A<sub>2</sub>, la PKC, la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase et la 12-lipoxygénase (Patricia et coll., 1999; Kazumi et coll., 1997; Xia et coll., 1995). Le rôle du glucose dans la régulation de la LPL a été peu documenté. Il semble que le glucose augmente *in vitro* l'activité et la synthèse de la LPL par les adipocytes en culture, potentialisant les effets stimulants de l'insuline sur l'activité de la LPL adipocytaire (Ranganathan, 1999; Ong et Kern, 1989). Il a été démontré que l'ingestion de glucose ou l'infusion de glucose/insuline augmentent les niveaux de la LPL dans le tissu adipeux et les diminuent dans le tissu musculaire (Farese et coll., 1991; Lithell et coll., 1978). Au niveau adipocytaire, les concentrations élevées de glucose stimulent la production de la LPL d'une manière traductionnelle et post-traductionnelle, augmentant la synthèse de l'enzyme, sans altérer les niveaux

d'ARNm (Ranganathan 1999; Ong et Kern, 1989). Nos résultats démontrent une régulation différente de la LPL par le glucose au niveau macrophagique. En effet, nos résultats démontrent qu'un environnement hyperglycémique augmente l'expression génique de la LPL macrophagique, sans altérer la stabilité de l'ARNm codant pour cette enzyme. Cette expression génique accrue est associée à une augmentation de la masse immuno-réactive et de l'activité de la LPL. Ces données démontrent que l'effet stimulant du glucose sur la production de la LPL macrophagique s'exerce au niveau transcriptionnel. Parmi les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la LPL et stimulés par le glucose se retrouve le facteur de transcription *c-fos*. En effet, *c-fos* a été impliqué dans la régulation de la LPL adipocytaire et a été trouvé stimulé par le glucose dans un système de cellules mésangiales et de cellules  $\beta$  pancréatiques (Susini et coll., 2000; Ingram et coll., 1999, Kreisberg et coll., 1994; Barcellini-Couget., 1993).

Nos expériences démontrant que des concentrations élevées de glucose augmentent les niveaux d'ARNm de *c-fos* par les macrophages suggèrent l'implication de *c-fos* dans la régulation de la LPL macrophagique par le glucose. Nos résultats, comme ceux générés par Barcellini-Couget et coll. (1993), ne démontrent cependant pas une inhibition complète de l'effet stimulant du glucose sur la LPL macrophagique, par incubation des cellules en présence d'antisense anti-*c-fos*. Ces résultats suggèrent l'implication d'autres systèmes de régulation, outre *c-fos*, dans la régulation de l'expression génique de la LPL macrophagique par le glucose.

Il a été démontré que l'activation du facteur de transcription *c-fos* est induite par les agents activant la PKC. La voie de la PKC est impliquée dans l'effet de divers agents tels le glucose, les acides gras, la LPL et le TNF- $\alpha$  sur l'expression génique adipocytaire et mono-nucléaire (Uchida et coll., 1999; Ranganathan et coll., 1999; Leger et Kadri-Hassani, 1995; Sharma et coll., 1995). La

PKC joue un rôle constitutif dans l'expression génique de la LPL adipocytaire. En effet, l'inhibition de la PKC, diminue la synthèse de la LPL adipocytaire et la régulation traductionnelle de cette dernière est médiée par la PKC (Ranganathan et coll., 1999). Récemment, il a été rapporté que des niveaux élevés de glucose plasmatique augmentent l'activité de la PKC myocardique (Kowluru et coll., 2000). La PKC est aussi impliquée dans l'augmentation de réponse des cellules monocytaires/macrophagiques à la LPL, au cours du processus de différenciation des monocytes en macrophages (Mamputu et Renier, 1999) et médie l'effet du glucose sur la production macrophagique de  $\text{NO}$  induite par l'endotoxine (Lee et coll., 1999a). Une augmentation d'activité de la PKC est associée à l'induction du diabète chez le rat (Tang et coll., 1993). L'activation de la PKC semble responsable de plusieurs anomalies associées au diabète telles la réduction de la relaxation de l'endothélium médiée par le  $\text{NO}$  (Farese, 1996; Tesfamariam et coll., 1991). L'exposition de plusieurs types de cellules à l'environnement hyperglycémique augmente l'activité de la PKC, altérant l'action et la sécrétion d'insuline (Farese, 1996; Thams et coll., 1990). Nos résultats, démontrent que l'inhibition spécifique de la PKC, par la calphostine C, abolit l'effet stimulant du glucose sur l'expression génique de la LPL macrophagique. Ces données, indiquant le rôle crucial de la PKC comme médiateur de l'effet du glucose sur la régulation de l'expression de LPL macrophagique, sont en accord avec celles de Ceolotto et coll. (1999) qui ont récemment démontré l'effet majeur du glucose sur les niveaux d'activation de la PKC monocyttaire *in vivo*.

Il existe dans le promoteur du gène de la LPL une séquence AP-1, identifiée comme étant le site de liaison du facteur de transcription *c-fos* (Kreisberg et coll., 1994; Barcellini-Couget et coll., 1993). Nos analyses démontrent clairement qu'un environnement hyperglycémique augmente la liaison des protéines nucléaires, extraites de macrophages cultivés en présence de hautes

concentrations de glucose, à la séquence régulatrice AP-1. Ces données prises dans leur ensemble suggèrent que l'exposition de macrophages à des hautes concentrations de glucose induit séquentiellement l'activation de la PKC et de c-fos, qui en se liant à la séquence régulatrice AP-1, induit la transcription du gène de la LPL. La demi-vie de l'ARNm de la LPL adipocytaire a été établie à moins de 12 heures (Gimble et coll., 1989). Nous avons obtenu une demi-vie de l'ARNm codant pour la LPL macrophagique de 11 heures, et ce tant en conditions normo- que hyperglycémiques. Ces données démontrant que des concentrations élevées de glucose n'affectent pas la stabilité de l'ARNm de la LPL, ne plaident pas en faveur d'une régulation post-transcriptionnelle de la LPL.

Le TNF- $\alpha$  semble exercer un rôle central dans l'induction de la RI. La neutralisation de cette cytokine chez des souris insulino-résistantes, améliore la captation du glucose médiée par l'insuline (Hotamisligil et coll., 1993). La régulation de la synthèse des transporteurs du glucose et l'interférence de cette cytokine avec les voies de signalisation de l'insuline ont été proposées comme des mécanismes médiant l'effet du TNF- $\alpha$  sur la RI (Qi et Pekela, 2000).

L'incubation de cellules monocytaires humaines en présence de fortes concentrations de glucose plasmatique augmente la sécrétion de TNF- $\alpha$  par ces cellules (Morohoshi et coll., 1996). Nos résultats démontrent que le glucose induit la production parallèle de TNF- $\alpha$  et de LPL par les macrophages humains, suggérant, dans nos conditions expérimentales, l'absence d'effet inhibiteur du TNF- $\alpha$  sur la production de LPL macrophagique. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Friedman et coll. (1988), montrant que le TNF- $\alpha$  n'exerce pas d'effet suppresseur sur l'activité de la LPL produite par les macrophages J774. Ces données sont cependant en opposition avec celles

générees par Tengku-Muhammad et coll. (1999; 1998) qui ont démontré que le TNF- $\alpha$  diminuait, en synergie avec l'IFN- $\gamma$ , l'activité de la LPL sécrétée par les macrophages J774.2. Les raisons de ces résultats contradictoires sont inconnues.

En résumé, notre première publication démontre que des concentrations élevées de glucose induisent *in vitro*, la sécrétion de la LPL macrophagique. L'effet de la LPL sur l'induction du TNF- $\alpha$  précédemment documenté (Renier, 1994) et l'augmentation concomitante de la LPL et du TNF- $\alpha$  induite par les concentrations élevées du glucose suggèrent que l'effet stimulant du glucose sur le TNF- $\alpha$  puisse être médié par la LPL. L'induction de ces deux cytokines pro-athérogéniques en conditions hyperglycémiques suggère un nouveau mécanisme par lequel l'hyperglycémie pourrait favoriser le développement des maladies cardiovasculaires dans le DNID.

### **III. 3.2. Rôle des PPARs dans l'induction de la LPL macrophagique par le glucose**

Tel que mentionné précédemment, les résultats de notre étude démontrant le rôle stimulant du glucose sur l'expression de la LPL macrophagique ont clairement indiqué que l'inhibition de *c-fos*, par technique anti-sense, ne peut supprimer totalement l'augmentation d'expression de la LPL macrophagique induite par le glucose (Sartippour et coll., 1998). Au vu de ces données, nous avons étudié l'implication d'autres facteurs de transcription dans la régulation de l'expression génique de la LPL par le glucose.

Les PPARs sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs stéroïdiens et existant sous trois isoformes: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  et PPAR $\gamma$  (Schoonjans et coll., 1997). Par leur capacité à se lier à des éléments de réponse spécifiques au niveau de l'ADN, appelés

“peroxisome proliferator-response elements” ou PPRE, ils agissent comme des facteurs de transcription, régulant la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (Auwerx et coll., 1996; Schoonjans et coll., 1996a). Les PPARs sont activés par divers ligands. Ces ligands sont soit naturels tels l’insuline et les acides gras, soit synthétiques tels les médicaments. La prostaglandine J2 et les thiazolidinediones se lient au PPAR $\gamma$ , les fibrates et les eicosanoïdes sont des ligands de PPAR $\alpha$  (Rieusset et coll., 1999; Devchand et coll., 1996; Lehmann et coll., 1995; Forman et coll., 1995). Les PPARs constituent des messagers clés entre divers stimuli métaboliques et la régulation de l’expression génique. L’observation que les PPARs sont activés par des métabolites de l’acide arachidonique suggère un rôle de ces facteurs de transcription, non seulement dans le métabolisme lipidique, mais aussi dans le contrôle de l’inflammation. Les PPARs sont impliqués dans diverses maladies métaboliques telles le diabète, la dyslipidémie et l’athérosclérose. Alors que la régulation des PPARs dans le tissu adipeux et musculaire, ainsi que dans les cellules hépatiques est sous contrôle hormonal (Vidal-Puig, 1997), la régulation nutritionnelle de ces facteurs de transcription n’a pas été étudiée. L’observation récente que les PPARs sont exprimés par les macrophages humains (Marx et coll., 1998; Ricote et coll., 1998) et contrôlent l’activation et le métabolisme lipidique des monocytes/macrophages (Chinetti et coll., 1998; Tontonoz et coll., 1998), nous a menés à examiner l’effet du glucose sur l’expression macrophagique des PPARs.

Les PPARs contrôlent l’expression de la LPL, en se liant à la séquence PPRE, présente dans le promoteur du gène de cette enzyme (Schoonjans et coll., 1996a; Auwerx et coll., 1996). Le PPAR $\alpha$  diminue en outre, la production hépatique de l’apo C-III, un inhibiteur de l’activité de la LPL (Lefebvre et coll., 1997). Notre étude démontre pour la première fois que le glucose module de manière différentielle l’expression génique et protéique des PPARs macrophagiques. Nos données

relatives à l'effet stimulant du glucose sur l'expression macrophagique de PPAR $\alpha$ , de PPAR $\beta$  et de la LPL suggèrent que ces facteurs de transcription puissent être impliqués dans l'induction de la LPL par le glucose. Cette hypothèse est appuyée par nos résultats démontrant une augmentation de la liaison des protéines nucléaires, isolées des macrophages traités au glucose, à la séquence PPRE du gène de la LPL, et une inhibition de cet effet par immuno-neutralisation de ces protéines.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction des gènes codant pour PPAR $\alpha$  et  $\beta$  par le glucose sont inconnus. Le glucose pourrait interagir directement avec des éléments répondants au glucose situés dans le promoteur des gènes PPAR $\alpha$  et  $\beta$ . Parmi ces éléments figurent le "cis-acting carbohydrate responsive element" et la protéine stimulatrice ou Sp-1 (Chen et coll., 1998; Shih et Towle, 1994; Gearing et coll., 1994). Nos résultats préliminaires (non publiés) démontrent que le glucose augmente la liaison des protéines nucléaires à ces deux éléments. De manière alternative, le glucose pourrait agir de manière indirecte, en augmentant les concentrations intracellulaires d'acides gras, des métabolites impliqués dans la régulation de l'expression des PPARs (Steineger et coll., 1994).

De manière intéressante, nos travaux ont aussi montré une diminution des niveaux d'ARNm codant pour PPAR $\gamma$ , lors du traitement des cellules macrophagiques par de hautes concentrations en glucose. La diminution d'expression de PPAR $\gamma$ , dans un environnement hyperglycémique, pourrait être due à l'effet stimulant du glucose sur la sécrétion de TNF- $\alpha$ . En effet, une suppression de l'expression de PPAR $\gamma$  par cette cytokine, a été démontrée par diverses équipes de recherche (Tanaka et coll., 1999; Xing et coll., 1997; Zhang et coll., 1996).

L'hyperglycémie est un facteur de risque de développement de l'athérosclérose chez le sujet diabétique et les PPARs ont été postulés comme un lien entre la RI et l'athérosclérose (Plutzky,

1999). L'altération de l'expression des PPARs macrophagiques par le glucose pourrait, en altérant le métabolisme lipidique artériel et la réaction inflammatoire, contribuer à la pathogenèse de l'athérosclérose dans le diabète.

Si le rôle classique de PPAR $\alpha$  consiste à augmenter la captation des AGL par le muscle squelettique, le coeur et le foie et, à stimuler la dégradation  $\beta$ -oxydative de ces substrats, diverses propriétés pro- et anti-athérogéniques de ce facteur ont aussi été décrites. Il a été documenté que l'activation de PPAR $\alpha$  au niveau hépatique diminue *in vivo* les niveaux de lipides plasmatiques (Raspe et coll., 1999) et réduit, chez la souris db/db, les niveaux de triglycérides plasmatiques (Berger et coll., 1999). Il a été aussi suggéré que l'activation de PPAR $\alpha$  par les eicosanoïdes puisse stimuler en retour le catabolisme de ces facteurs par les voies  $\beta$ - et  $\omega$ -oxydatives. Considérant le rôle pro-inflammatoire de certains de ces facteurs lipidiques, cet effet permettrait de limiter l'action de médiateurs pro-inflammatoires et ainsi de réduire la durée de l'inflammation (Pineda et Torra, 1999; Fruchart et coll., 1999). L'activation de PPAR $\alpha$  au niveau des cellules vasculaires (Inoue et coll., 1998; Greene et coll., 1995) s'accompagne cependant, d'effets pro-athérogéniques tels que l'induction de l'apoptose des macrophages dérivés des monocytes (Chinetti et coll., 1998) et la stimulation, chez la souris, de la production de TNF- $\alpha$  plasmatique induite par la LPS (Hill et coll., 1999a). Ces données et nos résultats appuyant un rôle de PPAR $\alpha$  dans l'expression macrophagique de la LPL, une cytokine pro-athérogénique (Auerbach et coll., 1999; Zilversmit et coll., 1973), suggèrent que les bénéfices potentiels relatifs aux propriétés anti-inflammatoires de ce facteur puissent être amoindries, par certains autres de ses effets systémiques pro-inflammatoires (Hill et coll., 1999a).



En ce qui concerne PPAR $\gamma$ , divers effets anti-athérogéniques de ce facteur de transcription ont été rapportés. Ces effets incluent le rôle de PPAR $\gamma$  sur la différenciation adipocytaire, la régulation de l'homéostasie du glucose et son effet inhibiteur sur l'activation des monocytes/macrophages et l'expression de divers facteurs de croissance angiogéniques (Xin et coll., 1999). Ainsi, il a été démontré que PPAR $\gamma$  médie l'effet de divers agents anti-diabétiques, augmentant la sensibilité tissulaire à l'insuline (Brown et coll., 1999; Reginato et Lazar, 1999; Berger et coll., 1999) et que l'activation de PPAR $\gamma$ , par certains agents pharmacologiques, améliorent la RI (Itoh et coll., 1999). L'activation de PPAR $\gamma$  est associée à une amélioration des niveaux de glucose et de triglycérides plasmatiques (Berger et coll., 1999). Chez les sujets obèses, les niveaux d'insuline à jeun et la RI sont inversement reliés à l'expression de PPAR $\gamma$  dans le tissu adipeux. Après perte pondérale, une relation positive entre l'expression adipocytaire de PPAR $\gamma$  et les concentrations plasmatiques d'HDL et d'apoA-1, et une relation négative entre cette expression et les concentrations de LDL et d'apoB sont documentées (Krempler et coll., 2000). Les activateurs du récepteur rétinoïde X ("retinoid X receptor") et de PPAR $\gamma$  diminuent, en outre, la dégénérescence des îlots pancréatiques (Lenhard et coll., 1999) et réduisent le risque cardiovasculaire associé au diabète. Barroso et coll. (1999) ont aussi rapporté que des mutations désactivantes de PPAR $\gamma$  contribuent à la RI et aboutissent au développement du diabète de type 2. Alors que l'expression de PPAR $\gamma$  adipocytaire est diminué par le stress oxydatif et le TNF- $\alpha$  (Tanaka et coll., 1999), l'activation de PPAR $\gamma$  inhibe l'expression des molécules d'adhésion endothéliales VCAM-1 et ICAM-1 et réduit l'activation endothéliale associée au diabète de type 2 (Pasceri et coll., 2000; Delerive et coll., 1999; Ricote et coll., 1998). PPAR $\gamma$  est aussi, un régulateur important des fonctions monocytaires/macrophagiques. En effet, certains activateurs de PPAR $\gamma$  inhibent l'expression de

gènes induits durant les processus de différenciation et d'activation macrophagique tels les gènes codant pour la NO synthase, la gélatinase B et le récepteur scavenger A (Ricote et coll., 1998; Jiang et coll., 1998). L'activation de PPAR $\gamma$  atténue aussi, en inhibant l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, l'expression génique de diverses cytokines pro-athérogéniques telles le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (Su et coll., 1999). Il est cependant à noter que la suppression de ces cytokines n'est observée qu'avec certains activateurs de PPAR $\gamma$  (Thieringer et coll., 2000). PPAR $\gamma$  diminue enfin l'activité de la métalloprotéinase-9, une enzyme de la matrice vasculaire impliquée dans la rupture de la plaque athéromateuse (Marx et coll., 1998).

PPAR $\gamma$  démontre cependant aussi diverses propriétés pro-athérogéniques. Ce facteur est exprimé dans les lésions athéromateuses humaines par les cellules musculaires lisses, les macrophages et les cellules spumeuses (Ricote et coll., 1998a; Marx et coll., 1998; Iijima et coll., 1998). Divers agents présents dans la lésion athéromateuse tels que les LDL oxydées et le M-CSF stimulent l'expression de PPAR $\gamma$  par les macrophages (Ricote et coll., 1999; Ricote et coll., 1998a). Ce facteur de transcription stimule la différenciation des monocytes en macrophages et la captation, par les récepteurs "scavengers", des LDL oxydées (Tontonoz et coll., 1998; Nagy et coll., 1998). Il a été démontré que certains activateurs de PPAR $\gamma$  augmentent aussi l'expression d'ICAM-1 (Chen et coll., 1999a). Leininger et coll. (1999) ont enfin récemment suggéré un rôle inflammatoire de PPAR $\gamma$ , en raison de l'induction de ce facteur de transcription par la LPS.

Les résultats de notre étude indiquent que l'environnement hyperglycémique induit une dysrégulation de l'expression macrophagique des PPARs. Alors que l'induction de PPAR $\alpha$  par de hautes concentrations de glucose pourrait contribuer à la surproduction de LPL et de TNF- $\alpha$  par le macrophage (Hill et coll., 1999a), ce dernier facteur pourrait être responsable de l'inhibition de

l'expression macrophagique de PPAR $\gamma$  (Hill et coll., 1997). En outre, au vu de nos résultats antérieurs, démontrant l'implication de *c-fos* dans l'induction de la LPL macrophagique par le glucose (Sartippour et coll., 1998) et des récentes données, démontrant un effet inhibiteur des PPARs sur l'expression de *c-fos/c-jun* et la voie de signalisation de l'AP-1 (Delerive et coll., 1999; Ricote et coll., 1998), il est aussi possible que la diminution d'expression de PPAR $\gamma$  induite par le glucose, puisse augmenter en activant le *c-fos*, l'expression de la LPL macrophagique (figure 8). Il se peut enfin que la diminution d'expression de cette isoforme dans un contexte hyperglycémique, puisse constituer un mécanisme de défense de l'organisme visant à maintenir l'homéostasie glucidique. Cette hypothèse est appuyée par les observations de Koch et coll. (1999) et Miles et coll. (2000), montrant d'une part une association entre la mutation Pro12Ala du gène de PPAR $\gamma$ 2, observée chez les parents obèses de patients diabétiques de type 2, et l'augmentation de sensibilité à l'insuline et d'autre part une amélioration de sensibilité à l'insuline chez les souris hétérozygotes porteuses d'une déficience en PPAR $\gamma$ .

La dysrégulation des PPARs macrophagiques induite par des concentrations élevées de glucose pourrait, en altérant l'homéostasie vasculaire, favoriser le développement de l'athérosclérose associée au diabète de type 2. Le schéma de la page suivante (figure 8) montre les mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans la surexpression de la LPL macrophagique dans le diabète.

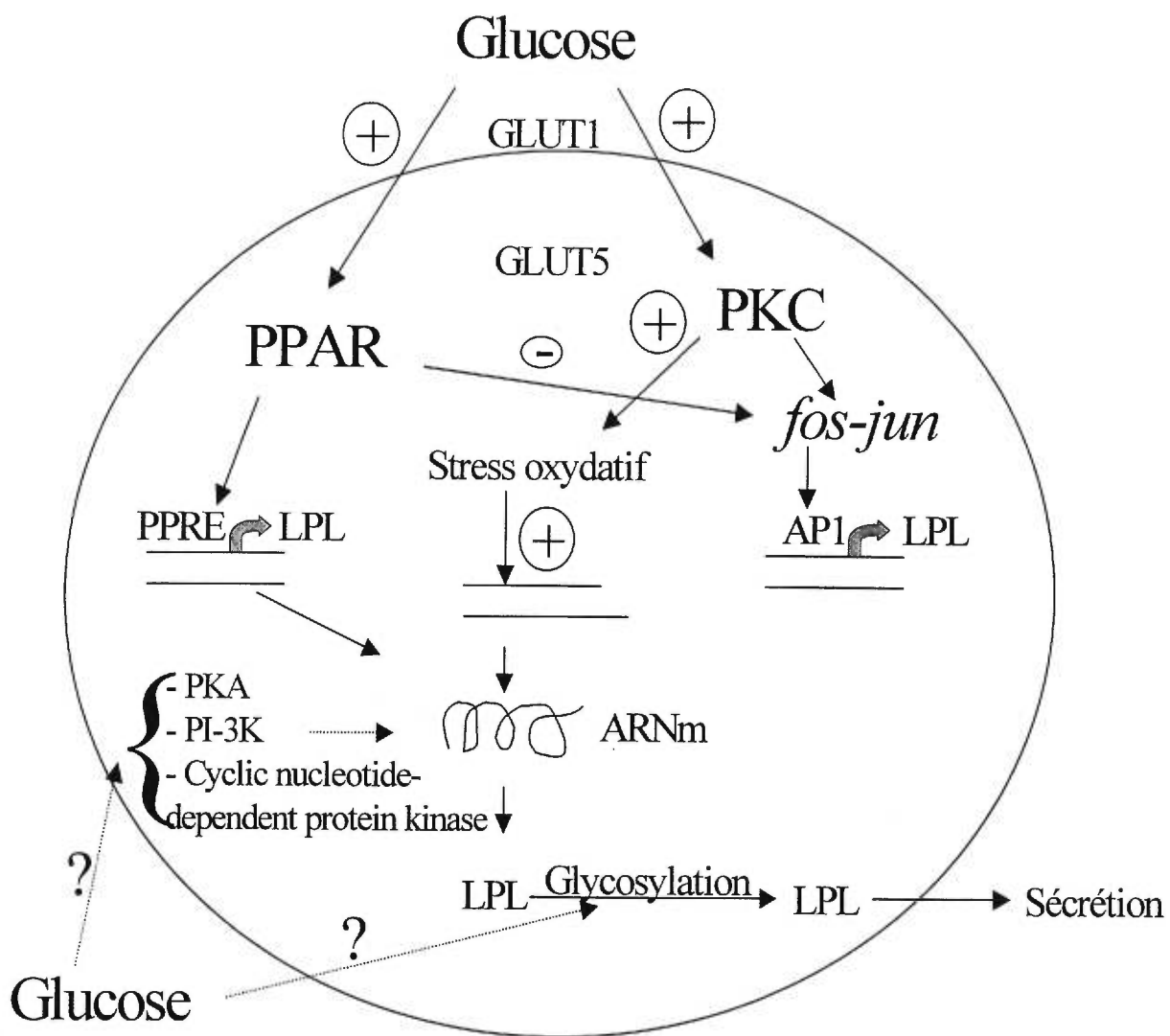


Figure 8. Mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans la surexpression de la LPL macrophagique dans le diabète.

### III.3.3. Régulation de la LPL macrophagique chez le patient diabétique de type 2

Au vu de nos résultats (Sartippour et coll., 1998), démontrant *in vitro* le rôle stimulant du glucose sur la production de LPL macrophagique, nous avons entrepris la caractérisation du système de la LPL macrophagique chez le patient diabétique de type 2. En effet, mis à part l'étude préliminaire de Creedon et coll. (1997), publiée sous forme de résumé, il n'existait au moment de nos travaux aucune étude sur la régulation de la LPL dans le DNID.

Nos résultats ont démontré que les macrophages isolés de patients diabétiques de type 2 surexpriment la LPL, et ce en l'absence de toute hypertriglycémie associée, cette dernière étant impliquée dans l'accélération de l'athérosclérose (Chanu, 1999; Austin, 1998). Ces résultats indiquent de manière claire que la dyslipidémie n'est pas le seul mécanisme responsable de l'induction de la LPL macrophagique dans le diabète. Nos données antérieures démontrant l'effet stimulant du glucose sur l'expression et la sécrétion de la LPL macrophagique, suggèrent que l'hyperglycémie puisse être responsable de l'augmentation d'expression génique et de la synthèse excessive de la LPL dans le diabète. Cette hypothèse est appuyée par nos expériences démontrant que des facteurs périphériques présents dans le sérum des patients diabétiques sont, en partie, responsables de l'augmentation de la synthèse et de l'activité de la LPL chez le patient diabétique de type 2. Outre l'hyperglycémie, plusieurs facteurs présents dans le sérum des patients diabétiques de type 2, tels les AGE et les AGL, pourraient être responsables de l'induction de la LPL macrophagique. Les AGE sont impliqués dans la pathogenèse de l'athérosclérose accélérée du diabète. Il a été bien documenté que des concentrations élevées de glucose favorisent la production de AGE (Taniguchi et coll., 1996) et de radicaux libres (Teshfamarham et coll., 1991). La

myéloperoxydase, sécrétée par les macrophages, contribue, par la production de peroxyde d'hydrogène, à la formation des AGE (Anderson et coll., 1999). Nous avons observé que l'incubation de macrophages en présence de AGE augmente l'expression génique et la masse immuno-réactive de la LPL. Les mécanismes par lesquels les AGE pourraient intervenir dans la modulation de la LPL macrophagique sont multiples. L'un d'eux est l'activation de la voie de la PKC. En effet, les AGE comme le glucose activent la PKC (Chakravarthy et coll., 1998; Aleksandrovski, 1998). L'activation de cette voie de signalisation est responsable de plusieurs anomalies associées aux complications vasculaires du DNID telles la diminution de la  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ , l'activation des "mitogen activated protein kinases (MAP kinases)" et de la phospholipase  $\text{A}_2$ , ainsi que l'augmentation de la matrice extracellulaire, de la production de cytokines, de la perméabilité vasculaire et de la prolifération cellulaire (Tomlinson, 1999; Park et coll., 1999; Ishii et coll., 1998; Koya et King, 1998). La PKC est impliquée dans la régulation de la LPL adipocytaire par le glucose et les inhibiteurs de la PKC diminuent la synthèse de la LPL adipocytaire, en inhibant sa translation (Ranganathan et coll., 1999).

Un autre facteur potentiellement impliqué dans l'induction de la LPL macrophagique par les AGE est le PDGF. En effet, il a été démontré que les AGE induisent la libération de PDGF par les cellules endothéliales (Yoshida et coll., 1998) et que ce dernier en retour, stimule la synthèse de LPL macrophagique (Inaba et coll., 1995). Puisque la PKC médie l'effet stimulant du PDGF sur la LPL (Inaba et coll., 1996; 1995), il est possible que l'induction séquentielle de PDGF et de PKC soit impliquée dans l'effet stimulant des AGE sur la production de LPL macrophagique.

Outre les AGE, les AGL pourraient être impliqués dans l'induction de la LPL macrophagique dans le diabète. La relation liant AGL et LPL a fait l'objet de diverses études et a produit des résultats contradictoires. Boivin et Deshaies, (2000) ont rapporté une relation inverse entre l'activité de la LPL musculaire et les niveaux d'AGL chez le rat *Zucker*. Anderson et coll. (1997) ont pour leur part démontré que les acides gras estérifiés de type oléate, palmitate et myristate, diminuaient l'activité de la LPL exprimée à la surface des cardiomyocytes. Hoefler et coll. (1997) ont rapporté que l'augmentation de production d'AGL par surexpression de la LPL musculaire n'affectait pas les niveaux de production de cette enzyme. Finalement, l'étude de Sambandam et coll. (1999) a elle, démontré que l'induction du diabète augmentait l'activité de la LPL cardiaque chez le rat et que cette augmentation d'activité de la LPL était associée à un apport accru d'AGL au coeur. L'effet de concentrations élevées des AGL sur l'expression de la LPL macrophagique n'a fait pour sa part l'objet d'aucune étude.

L'induction de la LPL chez le patient diabétique de type 2 pourrait enfin représenter un mécanisme visant à compenser la diminution de captation du glucose par les macrophages et à leur fournir l'énergie nécessaire à l'accomplissement de leurs fonctions.

Des concentrations élevées de glucose augmentent la production monocytaire/macrophagique de TNF- $\alpha$  (Sartippour et coll., 1998; Morohoshi et coll., 1996). Tel que mentionné précédemment, le TNF- $\alpha$  est un médiateur de la RI associée au diabète de type 2 et semble exercer un rôle central dans l'induction de la RI. Il interfère directement avec les cascades de signalisation de l'insuline et altère ainsi le transport, stimulé par l'insuline, du glucose (Qi et Pekala, 2000; Hube et Hauner, 1999). Nous avons observé que le glucose induit la production parallèle de TNF- $\alpha$  et de LPL par les

macrophages murins (Sartippour et Renier, 1998), suggérant, dans nos conditions expérimentales, l'absence d'effet inhibiteur du TNF- $\alpha$  sur la production de la LPL macrophagique. Nous avons aussi précédemment rapporté un effet stimulant de la LPL sur la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les monocytes/macrophages (Mamputu et Renier, 1999; Renier et coll., 1994).

Les résultats de notre dernière étude (Sartippour et Renier, 2000a) démontrent que la production de TNF- $\alpha$  macrophagique en réponse à la LPL est accrue chez le patient diabétique de type 2. Les mécanismes potentiellement responsables de cet effet incluent l'activation de la PKC, l'augmentation des niveaux plasmatiques d'AGL et le stress oxydatif. La PKC module la sécrétion du TNF- $\alpha$  macrophagique en réponse à la LPS (West et coll., 1997) et est impliquée dans l'induction du TNF- $\alpha$  par la LPL (Mamputu et Renier, 1999; Renier et coll., 1994a). Elle est activée de manière excessive dans le diabète au niveau de différents tissus tels la vasculature, le rein, la rétine et l'endothélium. Le glucose induit aussi l'expression de la PKC au niveau des cellules musculaires lisses (Ganz et Seftel, 2000). Différentes isoformes de la PKC sont activées par l'hyperglycémie diabétique et sont associés aux anomalies reliées à cette maladie (Aleksandrovski, 1998; Ishii et coll., 1998; Koya et King, 1998).

Les concentrations d'AGL sont augmentées dans le plasma des patients diabétiques (Boden, 1999). L'effet exagéré de la LPL sur la production de TNF- $\alpha$  macrophagique chez les sujets diabétiques pourrait être médié par les AGL. En effet, l'augmentation de production et d'activité de la LPL macrophagique dans le diabète pourrait, en favorisant l'hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycérides, induire la production d'AGL et ces derniers pourraient être responsables de la production accrue de TNF- $\alpha$  macrophagique. L'effet stimulant antérieurement documenté des AGL



sur la production de TNF- $\alpha$  par les lymphocytes et les cellules endothéliales appuie cette hypothèse (Toborek et Henning, 1996; Karsten et coll., 1994).

Le diabète est associé à une augmentation des niveaux du stress oxydatif (Haffner, 2000). Un autre mécanisme potentiellement impliqué dans l'effet stimulant de la LPL sur la sécrétion de TNF- $\alpha$  macrophagique pourrait être le stress oxydatif. En effet, il a été démontré que les radicaux libres induisent la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages (Rojanasakul et coll., 1999). L'implication des radicaux libres dans cet effet semble cependant peu probable, au vu des données générées par Renier et coll. (1996) démontrant un effet inhibiteur des réactifs intermédiaires oxygénés sur la réponse du TNF- $\alpha$  à la LPL. Alternativement, les lipoprotéines oxydées, qui sont préférentiellement formées chez le sujet diabétique (Rabini et coll., 1999; Kreisberg, 1998), pourraient être impliquées dans l'induction du TNF- $\alpha$  macrophagique par la LPL. La LPL macrophagique contribue par ses propriétés enzymatiques et structurales à l'oxydation des lipoprotéines. Elle exerce cet effet d'une part, en diminuant le pH et en facilitant la libération du fer à partir de la transferrine (Balagopalakrishna et coll., 1999) et d'autre part, en favorisant la liaison des lipoprotéines aux protéoglycans (de Beer et coll., 1999) exprimés sur la surface cellulaire. Dans nos conditions expérimentales, il est possible que la surexpression de la LPL macrophagique chez le sujet diabétique, contribue à l'oxydation des lipoprotéines présentes dans le sérum diabétique et induise dès lors par ce mécanisme, l'augmentation de sécrétion du TNF- $\alpha$ . Cette hypothèse est appuyée par les études de Frostegard et coll. (1997) et Jovinge et coll. (1996), démontrant que les LDL oxydées induisent la synthèse de TNF- $\alpha$  par les leucocytes et les monocytes/macrophages. Bien qu'il soit difficile de vérifier cette hypothèse, il est possible que l'induction du TNF- $\alpha$  par la LPL soit plus prononcé, *in vivo*, lorsque la petite taille des LDL des sujets diabétiques rend ces lipoprotéines plus

aptes à traverser l'endothélium vasculaire et à y être oxydées par l'effet des propriétés structurales et enzymatiques de la LPL. Le TNF- $\alpha$  produit dans la paroi vasculaire, en augmentant l'expression du récepteur des LDL oxydées au niveau macrophagique (Moriwaki et coll., 1998) et par ses multiples autres effets pro-athérogéniques, pourrait contribuer à la progression de la lésion athéromateuse, chez le sujet diabétique.

En résumé, les résultats de cette étude suggèrent que la LPL macrophagique pourrait contribuer de manière directe et indirecte au développement accéléré de l'athérosclérose diabétique, par ses propriétés enzymatiques et structurales. Ainsi, l'induction de la LPL macrophagique dans la paroi vasculaire pourrait contribuer de manière directe à l'athérogenèse associée au DNID. La LPL pourrait en outre contribuer de manière indirecte, et par son effet stimulant sur la production de TNF- $\alpha$ , à induire divers processus pro-inflammatoires responsables du développement et de la progression de la lésion athéromateuse, chez le sujet diabétique.

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

#### IV. 1. Conclusions

Les résultats de nos études démontrent que:

- 1) le glucose stimule *in vitro* l'expression et la production de la LPL macrophagique;
- 2) le glucose exerce un effet modulateur direct sur l'expression macrophagique des PPARs et ces derniers semblent impliqués dans l'effet stimulant du glucose sur l'expression de la LPL macrophagique;
- 3) la LPL est induite d'une manière excessive chez le patient diabétique de type 2, des facteurs périphériques altérés dans le diabète sont, au moins, partiellement responsables de cette anomalie.

Prises dans leur ensemble, ces données indiquent une altération de la régulation de la LPL macrophagique dans le diabète de type 2, au moins partiellement attribuable à l'hyperglycémie diabétique.

## IV.2. Perspectives

La régulation de la LPL est tissu-spécifique. Le diabète est associée à une diminution de l'activité de la LPL plasmatique et adipocytaire (Simsolo et coll., 1992; Vessby et coll., 1985). L'activité de la LPL du muscle squelettique est diminuée ou semblable à celle observée chez les sujets sains (Yost et coll., 1995; Pollare et coll., 1991). La production excessive de LPL macrophagique, que nous avons documentée chez le patient diabétique de type 2, suggère son implication dans la pathogenèse de l'athérosclérose associée au diabète. Au vu de ses propriétés pro-athérogéniques dans la paroi vasculaire (Zilverman et coll., 1973), une réduction de la production macrophagique de LPL semble souhaitable. Une stratégie visant à réduire la LPL macrophagique dans le diabète doit cependant tenir compte des éléments suivants: 1) du rôle anti-athérogénique de cette enzyme au niveau périphérique; 2) de son activité adipocytaire réduite dans le diabète, aggravant dès lors la dyslipidémie associée à cette maladie; 3) de la capacité de la LPL à exercer ses effets pro-athérogéniques tant par ses propriétés hydrolytiques que structurales.

Parmi les diverses interventions visant à réduire la sécrétion de la LPL et à retarder le développement et/ou la progression des lésions athéromateuses, on note le contrôle glycémique. En effet, au vu de l'effet stimulant du glucose sur la LPL macrophagique, un bon contrôle glycémique pourrait réduire l'expression et l'activité accrue de la LPL macrophagique observées dans le diabète. L'inhibition des mécanismes potentiellement impliqués dans l'effet stimulant du glucose sur la LPL, incluant l'activation de la PKC, le stress oxydatif et l'altération des PPARs, est une approche complémentaire intéressante à envisager.

Au vu du rôle important de l'activation de la PKC et du stress oxydatif dans la pathogenèse des complications vasculaires du diabète et dans la stimulation de la LPL macrophagique, l'usage d'inhibiteurs de la PKC et d'antioxydants pourrait s'avérer utile dans la prévention des maladies cardiovasculaires associées au diabète. La présence de différentes isoformes de la PKC et les possibles effets secondaires relatifs à l'inhibition de cette voie représentent cependant les limitations de cette approche. L'effet bénéfique d'une supplémentation en vitamines et antioxydants dans la prévention des événements cardiovasculaires associés au diabète, reste à être prouvé et aucune recommandation sinon la consommation de fruits et légumes riches en antioxydants ne peut être actuellement émise pour les patients diabétiques

Les PPARs contrôlent l'expression de la LPL (Schoonjans et coll., 1996; Auwerx et coll., 1996). Les activateurs de PPAR $\alpha$  et  $\gamma$  augmentent l'expression génique de la LPL (Raspe et coll., 1999). Les activateurs de PPAR $\alpha$  diminuent en outre, la production hépatique de l'apo C-III, un inhibiteur de l'activité de la LPL (Lefebvre et coll., 1997). Les activateurs des PPAR $\alpha$  et  $\gamma$  sont administrés dans le but de corriger la dyslipidémie et l'hyperglycémie associées au diabète. L'altération de sécrétion de la LPL macrophagique dans le DNID, la régulation macrophagique différentielle des PPARs par le glucose (Sartippour et Renier, 2000), la contribution de PPAR $\alpha$  dans l'induction du TNF- $\alpha$  par la LPS (Hill et coll., 1999) et les effets anti- et pro-athérogéniques des PPARs suggèrent la nécessité d'évaluer plus amplement les effets à long terme des activateurs des PPARs sur l'athérogenèse associée au diabète. En dépit de cela, l'inhibition spécifique de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de la LPL macrophagique tels les PPARs constitue cependant une voie de recherche prometteuse visant à réduire la surexpression de la LPL chez le patient diabétique de type 2.

En raison des effets anti-athérogéniques de la LPL au niveau périphérique, des interventions visant à bloquer la LPL par l'administration d'anticorps monoclonaux anti-LPL (Sato et coll., 1999) ne sont pas souhaitables. Cependant l'usage d'oligonucléotides anti-sens ciblant la LPL macrophagique dans la paroi vasculaire pourrait, en inhibant la production locale de cette enzyme par les macrophages, s'avérer utile. L'effet stimulant de la LPL sur le TNF- $\alpha$  suggère enfin l'usage d'inhibiteurs des voies de signalisation impliquées dans l'induction de cette cytokine pro-athérogénique par la LPL.

Les facteurs génétiques et environnementaux impliqués dans le développement du diabète et de l'athérosclérose sont multiples. L'altération du système de la LPL macrophagique semble une des multiples conséquences des altérations métaboliques associées au diabète. Le développement de nouvelles thérapies nutritionnelles et médicamenteuses visant à réduire l'expression de cette enzyme dans la paroi artérielle pourrait contribuer à réduire le développement des complications macrovasculaires associées au diabète. Un tel développement requiert une amélioration de nos connaissances sur le contrôle de la LPL macrophagique dans le diabète ainsi que la mise sur le marché de nouvelles drogues inhibant de manière spécifique la LPL macrophagique.

## V. RÉFÉRENCES



Abe H, Bandai A, Makuuchi M, Idezuki Y, Nozawa M, Oka T, Osuga J, Wanatabe Y, Inaba T, Yamada N. Hyperinsulinemia accelerates accumulation of cholesterol ester in aorta of rats with transplanted pancreas. *Diabetologia* 39:1276-1283, 1996.

Abplanalp W, Scheiber MD, Moon K, Kessel B, Liu JH, Subbiah MT. Evidence for the role of high density lipoproteins in mediating the antioxidant effect of estrogens. *Eur J Endocrinol* 142:79-83, 2000.

Agerbaek M, Kristensen IB, Pedersen EM. A histomorphometric method for evaluating topographic differences in degree of early atherosclerosis within the human aorta. *APMIS* 107:863-868, 1999.

Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, Milos PM. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1518-1525, 1999.

Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Al-Majali KM, Trembling PM, Mann CJ, Shoulders CC, Graf D, St Lezin E, Kurtz TW, Kren V, Pravenec M, Ibrahim A, Abumard NA, Stanton LW, Scott J. Identification of Cd36 (fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* 21:76-83, 1999.

Aizawa T, Katakura M, Taguchi N, Koboyashi H, Aoyagi E, Hashizume K, Yoshizawa K. Ketoacidosis-onset noninsulin dependent diabetes in Japanese subjects. *Am J Med* 310:198-201, 1995.

Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15:539-553, 1998.

Aleksandrovski YA. Molecular mechanisms of diabetic complications. *Biochemistry* 63:1249-1257, 1998.

Alexander JK. The cardiomyopathy of obesity. *Prog Cardiovasc Disc* 27:325-333, 1985.

Alexowicz JM, Kumar D, Smorgorzewski M. Polymorphonuclear leukocytes in non-insulin dependent diabetes mellitus: abnormalities in metabolism and function. *Ann Intern Med* 123:919-924, 1995.

Allison BA, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A, Eriksson P. Effects of native, triglyceride-enriched, and oxidatively modified LDL on plasminogen activator inhibitor-1 expression in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1354-1360, 1999.

Amatruda JM.  $\alpha$ -glucosidase inhibitors in the treatment of diabetes. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 643-646, 1996.

Amberger A, Maczek C, Jurgens G, Michaelis D, Schett G, Trieb K, Eberl T, Jindal S, Xu Q, Wick G. Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins. *Cell Stress Chaperones* 2:94-103, 1997.

Anastasiou E, Lekakis JP, Alevizaki M, Papamichael CM, Megas J, Souvatzoglou A, Stamatelopoulos SF. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in women with previous gestational diabetes. *Diabetes Care* 21:2111-2115, 1998.

Andalibi A, Liao F, Imes S, Fogelman AM, Lusis AJ. Oxidized lipoproteins influence gene expression by causing oxidative stress and activating the transcription factor NF $\kappa$ B. *Biochem Soc Trans* 21:651-655, 1993.

Anderson JW, Hanna TJ. Impact of nondigestible carbohydrates on serum lipoproteins and risk for cardiovascular disease. *J Nutr* 129(7 Suppl):1457S-1466S, 1999.

Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates Nepsilon-(carboxymethyl) lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J Clin Invest* 104:103-113, 1999.

- Anderson LG, Carroll R, Ewart HS, Acharya A, Severson DL. Fatty acids reduce heparin-releasable LPL activity in cultured cardiomyocytes from rat heart. *Am J Physiol* 273(4 Pt 1):E759-767, 1997.
- Andersson Y, Majd Z, Lebevre AM, Martin G, Sechkin AV, Kosykh V, Fruchart JC, Najib J, Steals B. Developmental and pharmacological regulation of apolipoprotein C-II gene expression. Comparison with apo C-I and apo C-III gene regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:115-121, 1999.
- Arava Y, Adamsky K, Ezerzer C, Ablamunits V, Walker MD. Specific gene expression in pancreatic beta-cells: cloning and characterization of differentially expressed genes. *Diabetes* 48:552-556, 1999.
- Asakura E, Tojo N, Tanabe T. Monocyte proliferation induced by modified serum is associated with endogenous M-CSF production: evidence for involvement of a signalling pathway via scavenger receptors. *Cell Prolif* 32:185-194, 1999.
- Ashby P, Bennet DP, Spencer IM, Robinson DS. Post-translational regulation of lipoprotein lipase activity in adipose tissue. *Biochem J* 176:865-872, 1978.
- Auerbach BJ, Bisgaier CL, Wolle J, Saxena U. Oxidation of low density lipoprotein greatly enhances their association with lipoprotein lipase anchored to endothelial cell matrix. *J Biol Chem* 271:1329-1335, 1996.
- Auerbach BJ, Cain W, Ansong M, Newton RS, Saxena U, Bisgaier CL. Lipoprotein lipase greatly enhances the retention of lipoprotein(a) to endothelial cell-matrix. *Atherosclerosis* 142:89-96, 1999.
- Austin MA. Plasma triglyceride as a risk factor for cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 14 Suppl B:14B-17B, 1998.
- Austin MA, Edwards KL. Small, dense low density lipoproteins, the insulin resistance syndrome and non-insulin-dependent diabetes. *Curr Opin Lipidol* 7:167-171, 1996.
- Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertroglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 81(4A):7B-12B, 1998.

- Austin MA, Stephens K, Walden CE, Wijsman E. Linkage analysis of candidate genes and the small, dense low-density lipoprotein phenotype. *Atherosclerosis* 142:79-87, 1999.
- Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K. Lipoprotein lipase: recent contributions from molecular biology. *Crit Rev Clin Lab Sci* 29:243-268, 1992.
- Auwerx JH, Deeb S, Brunzell JD, Wolfbauer G, Chait A. Lipoprotein lipase gene expression in THP-1 cells. *Biochemistry* 28:4563-4567, 1989.
- Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, Steals B. Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR. *Atherosclerosis* 124(suppl):S29-S37, 1996.
- Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, Steals B. Regulation of triglyceride metabolism by PPARs: fibrates and thiazolidinediones have distinct effects. *J Atheroscler Thromb* 3:81-89, 1996.
- Aviram M, Bierman EL, Chait A. Modification of low density lipoprotein by lipoprotein lipase or hepatic lipase induces enhanced uptake and cholesterol accumulation in cells. *J Biol Chem* 263:15416-15422, 1988.
- Avramoglu RK, Cianflone K, Sniderman AD. Role of the neutral lipid accessible pool in the regulation of secretion of apoB-100 lipoprotein particles by HepG2 cells. *J Lipid Res* 36:2513-2528, 1995.
- Babaev VR, Fazio S, Gleaves LA, Carter KJ, Semenkovich CF, Linton MF. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo. *J Clin Invest* 103:1697-1705, 1999.
- Babirak S, Brown BG, Brunzell JD. Familial combined hyperlipidemia and abnormal lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb* 12:1176-1183, 1992.
- Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis: A multifactorial disease. *Circulation* 87(suppl II):II-3-II-16, 1993.

- Badimon JJ, Meyer B, Feigen LP, Baron DA, Chesebro JH, Fuster V, Badimon L. Thrombosis triggered by severe arterial lesions is inhibited by oral administration of a glycoprotein IIb/IIIa antagonist. *Eur J Clin Invest* 27:568-574, 1997.
- Balagopalakrishna C, Paka L, Pillarisetti S, Goldberg IJ. Lipolysis-induced iron release from diferric transferrin: possible role of lipoprotein lipase in LDL oxidation. *J Lipid Res* 40:1347-1356, 1999.
- Bang HO, Dyerberg J, Sinclair HM. The composition of Eskimo food in North Western Greenland. *Am J Clin Nutr* 33:2657-2661, 1980.
- Barcellini-Couget S, Pradines-Figueres A, Roux P, Dani C, Ailhaud G. The regulation by growth hormone of lipoprotein lipase gene expression is mediated by c-fos protooncogene. *Endocrinology* 132:53-60, 1993.
- Barnett AH, Eff C, Leslie RDG, Pyke DA. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 20:87-93, 1981.
- Bar-On H, Ben-Sasson R, Ziv E, Arar N, Shafrir E. Irreversibility of nutritionally induced NIDDM in *Psammomys obesus* is related to beta-cell apoptosis. *Pancreas* 18:259-265, 1999.
- Barranco JG. Glucose control guidelines: current concepts. *Clin Nutr* 17 Suppl 2:7-17, 1998.
- Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Dominant negative mutations in human PPAR gamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402:880-883, 1999.
- Barzilai N, She L, Liu BQ, Vuguin P, Cohen P, Wang J, Rossetti L. Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes* 48:94-98, 1999.
- Bastard JP, Jardel C, Guerre-Millo M, Hainque B. Hexose transporters in humans: their role in insulin sensitivity of peripheral tissues. *Rev Med Intern* 19:108-118, 1998.

- Bauters C, Van Belle E, McFadden E, Bertrand M. Current data on atheromatous plaques and their evolution. *Arch Mal Coeur Vaiss* 91:9-12, 1998.
- Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40:405-412, 1991.
- Becque MD, Catch VL, Rocchini AP, Marks CR, Moorehead C. Coronary risk incidence of obese adolescents: reduction of exercise plus diet intervention. *Pediatrics* 81:605-612, 1988.
- Behr SR, Kraemer FB. Effects of activation on lipoprotein lipase secretion by macrophages. Evidence for autoregulation. *J Exp Med* 164:1362-1367, 1986.
- Behr SR, Kraemer FB. Insulin deficiency decreases lipoprotein lipase secretion by murine macrophages. *Diabetes* 37:1076-81, 1988.
- Behr SR, Kraemer FB. Regulation of the secretion of lipoprotein lipase by mouse peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Acta* 889:346-54, 1986.
- Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8342-8346, 1991.
- Beisiegel U, Heeren J. Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors. *Proc Nutr Soc* 56:731-731, 1997.
- Bell DS. Diabetes mellitus and coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 7:715-722;1996.
- Bell RA, Howard D, Norman M, Butts J, Lengerich EJ. Medical examiner cases associated with previously undiagnosed diabetes mellitus, North Carolina, 1994. *South Med J* 91:151-154, 1998.
- Bengtsson G, Olivecrona T. Lipoprotein lipase. Mechanism of product inhibition. *Eur J Biochem* 106:557-562, 1980.

Benlian P, De Gennes JL, Foubert L, Zhang H, Gagné SE, Hayden M. Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. *N Engl J Med* 335:848-854, 1996.

Bennett PH. Definition, Diagnosis, and classification of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. In: Kahn CR, Weir GC eds. *Joslin's Diabetes mellitus*, 13th ed, Lea & Febiger, Pennsylvania 193-200, 1994.

Bennett PH. Epidemiology of non-insulin-dependent-diabetes. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 455-459, 1996.

Bennett PH, Knowler WC. Increasing prevalence of diabetes in the Pima (American) Indians over a ten years period. In: *Diabetes Waldhausl WK* ed. Excerpta Medica, Amsterdam 507-511, 1980.

Bennett PH, Rushforth NB, Miller M, LeCompte PM. Epidemiologic studies of diabetes in the Pima Indians. *Rec Prog Hormone Res* 32:333-371, 1976.

Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, Powell EE, Undlien DE, Pritchard LE, Merriman ME, Kawaguchi Y, Dronsfield MJ, Pociot F. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet* 9:284-291, 1995.

Ben-Zeev O, Stahnke G, Liu G, Davis RC, Doolittle MH. Lipoprotein lipase and hepatic lipase: the role of asparagine-linked glycosylation in the expression of a functional enzyme. *J Lipid Res* 35:2049-2959, 1994.

Berger J, Leibowitz MD, Doebber TW, Elbrecht A, Zhang B, Zhou G, Biswas C, Cullinan CA, Hayes NS, LI Y, Tanen M, Ventre J, Wu MS, Berger GD, Mosley R, Marquis R, Santini C, Sahoo SP, Tolman RL, Smith RG, Moller DE. Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$  and PPAR  $\delta$  ligands produce distinct biological effects. *J Biol Chem* 274:6718-6725, 1999.

Bergman RN, Mittelman SD. Central role of the adipocyte in insulin resistance. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9:205-221, 1998.

Bergö M, Olivecrona G, Olivecrona T. Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increase on fasting. *Biochem J* 313(Pt 3):893-898, 1996.

Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Rad Biol Med* 201:707-727, 1996.

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 S, Fuchs J, Seligsohn U, Kariv N, Hazaz B, Rotenberg Z, Weinberger I, Agmon J, Pinkhas J, Aronson M. Possible role of fibrinogen in the aggregation of white blood cells. *Thromb Haemost* 58:749-752, 1987.

Berman DM, Rogus EM, Busby-Whitehead MJ, Katznel LI, Goldberg AP. Predictors of adipose tissue lipoprotein lipase in middle-aged and older men: relationship to leptin and obesity, but not cardiovascular fitness. *Metabolism* 48:183-189, 1999.

Bisgaier CL, Essenburg AD, Barnett BC, Auerbach BJ, Haubenwallner S, Leff T, White AD, Creeger P, Pape ME, Rea TJ, Newton RS. A novel compound that elevates high density lipoprotein and activates the peroxisome proliferator activated receptor. *J Lipid Res* 39:17-30, 1998.

Bjorntorp P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Ann Med* 24:465-468, 1994.

Bjorntorp P. Neuroendocrine ageing. *J Intern Med* 238:401-404, 1995.

Black RA, Rauch CT, Koslosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivadan S, Nelson N, Bolani N, Schooley KA, Gerhart M, avis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that release tumor-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* 385:729-733, 1997.



Blakenhom DH, Nessim SA, Johnson RL, Sanmarco ME, Azen SP, Cashin-Hemphill L. Beneficial effects of combined colestipol-niacin therapy on coronary atherosclerosis and coronary venous bypass grafts. *JAMA* 257:3233-3240, 1987.

Blakesley VA, LeRoith D. The role of growth factors in the pathogenesis of diabetic vascular complications. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 824-831, 1996.

Bloomgarden ZT. American diabetes association annual meeting, 1998. Insulin resistance, exercise, and obesity. *Diabetes Care* 22:517-522, 1999.

Boden G. Free fatty acids (FFA), a link between obesity and insulin resistance. *Front Biosci* 15:D169-175, 1998.

Boivin A, Deshaies Y. Contribution of hyperinsulinemia to modulation of lipoprotein lipase activity in the obese Zucker rat. *Metabolism* 49:134-140, 2000.

Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intracellular adhesion molecule 1(ICAM-1),  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin, and GP1 $\beta$ . *J Exp Med* 187:329:339, 1998.

Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Beaudeux JL, Peynet J, Legrand A, Delattre J. High density lipoproteins (HDL) and the oxidative hypothesis of atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 37:939-948, 1999.

Bonnet M, Faulconnier Y, Flechet J, Hocquette JF, Leroux C, Langin D, Martin P, Chilliard Y. Messenger RNAs encoding lipoprotein lipase, fatty acid synthase and hormone-sensitive lipase in the adipose tissue of underfed-refed ewes and cows. *Reprod Nutr Dev* 38:297-307, 1998.

Boréon J, Olin K, Lee I, Chait A, Wight T, Innearity TL. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest* 101:2658-2664, 1998.

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394(6696):894-897, 1998.

Boring L, Gosling L, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV Jr, Broxmeyer HE, Charo IF. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest* 100:2552-2561, 1997.

Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A Quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 247:1049-1057, 1995.

Boutin P, Gresh L, Cisse A, Hara M, Bell G, Babu S, Eisenbarth G, Froguel P. Missense mutation Gly574Ser in the transcription factor HNF-1 $\alpha$  is a marker of atypical diabetes mellitus in African-American children. *Diabetologia* 42:380-381, 1999.

Brannon PM, Cheung AH, Bensadoun A. Synthesis of lipoprotein lipase in cultured avian granulosa cells. *Biochim Biophys Acta* 531:96-108, 1978.

Bratusch-Marrain PR, Komjati M, Waldhausl WK. Efficacy of pulsatile versus continuous insulin administration on hepatic glucose production and glucose utilization in type I diabetic humans. *Diabetes* 35:922-926, 1986.

Braun JEA, Severson DL. Lipoprotein lipase release from cardiac myocytes is increased by decavanadate but not insulin. *Am J Physiol* 262:E663-E670, 1992.

Braun JEA, Severson DL. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* 287:337-347, 1992a.

Briaud I, Rouault C, Reach G, Poitout V. Long-term exposure of isolated rat islets of Langerhans to supraphysiologic glucose concentrations decreases insulin mRNA levels. *Metabolism* 48:319-323, 1999.

Brown KK, Henke BR, Blanchard SG, Cobb JE, Mook R, Kaldor I, Kliwer SA, Lehmann JM, Lenhard JM, Harrington WW, Novak PJ, Faison W, Binz JG, Hashim MA, Oliver WO, Brown HR,

Parks DJ, Plunket KD, Tong WQ, Menius JA, Adkinson K, Noble SA, Willson TM. A novel N-aryl tyrosine activator of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  reverses the diabetic phenotype of the Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 48:1415-1424, 1999.

Brown BG, Fuster V. Impact of management in stabilization of coronary disease. In: Fuster V, Ross R and Topol EJ (eds). *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p191-205, 1996.

Brown G, Albers JJ, Fisher LD, Schaeffer SM, Lin JT, Kaplan C, Zhao XQ, Bisson BD, Fritzpatrick VF, Dodge MT. Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N Engl J Med* 323:1289-1298, 1990.

Brownlee M. Negative consequences of glycation. *Metabolism* 49(2 Suppl 1):9-13, 2000.

Brozinick JT Jr, Etgen GJJ, Yaspelkis BB3d, Ivy JL, Kang HY. Effects of exercise training on muscle GLUT-4 protein content and translocation in obese Zucker rats. *Am J Physiol* 265:E419-427, 1993.

Bruce C, Chouinard RA Jr, Tall AR. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu Rev Nutr* 18:297-330, 1998.

Bruckert E, Emmerich J. Le cholestérol lié aux HDL, un facteur de risque cardiovasculaire pris en défaut. *STV* 9:203-205, 1997.

Bruckert E, Dejager S. La lipoprotéine lipase: une enzyme clé du métabolisme lipidique. *Rev Pract* 44:1487-93, 1994.

Brunzell JD, Miller NE, Alaupovic P. Familial chylomicronemia due to a circulating inhibitor of lipoprotein lipase activity. *J Lipid Res* 24:12-29, 1983.

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

- Buchwald H, Varco RC, Matt JP. Effect of partial ileal bypass surgery on mortality and morbidity from coronary heart disease in patients with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 323:946-955, 1990.
- Burchfiel CM, Sharp DS, Curb JD, Rodriguez BL, Abbott RD, Arakaki R, Yano K. Hyperinsulinemia and cardiovascular disease in elderly men. The Honolulu Heart Program. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:450-457, 1998.
- Bursell SE, King GL. Can protein kinase C inhibition and vitamin E prevent the development of diabetic vascular complications? *Diabetes Res Clin Pract* 45:169-182, 1999.
- Byrne CD. Triglyceride-rich lipoproteins: are links with atherosclerosis mediated by a procoagulant and proinflammatory phenotype? *Atherosclerosis* 145:1-15, 1999.
- Byrne CD, Wareham NJ, Hales CN. The role of insulin and proinsulin in the regulation of triglyceride metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105 Suppl 2:29-35, 1997.
- Byrne GI, Kalayoglou MV. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: links to the disease process. *Am Heart J* 138(5 Pt 2):S488-490, 1999.
- Calabresi L, Donati D, Pazzucconi F, Sirtori CR, Franceschini G. Omacor in familial combined hyperlipidemia: effects on lipid and low density lipoprotein subclasses. *Atherosclerosis* 148:387-396, 1999.
- Caldara R, Sanseverino R, L Francois N, Martin X, Martinenghi S, Dubernard JM. Pancreas transplantation: long-term results. *Clin Transplant* 5:260-266, 1991.
- Calder PC. Fuel utilization by cells of the immune system. *Proc Nutr Soc* 54:65-82, 1995.
- Campbell JH, Campbell GR. The cell biology of atherosclerosis--new developments. *Aust N Z J Med* 27:497-500, 1997.
- Camps L, Reina M, Llobera M, Vilaro S, Olivecrona T. Lipoprotein lipase: cell origin and functional distribution. *Am J Physiol* 258:C673-C681, 1990.

- Capers Q 4<sup>th</sup>, Alexander RW, Lou P, DeLeon H, Wicox JN, Ishizaka N, Howard AB, Taylor WR. Monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues of hypertensive rats. *Hypertension* 30:1397-1402, 1997.
- Casaroli-Marano RP, Garcia R, Vilella E, Olivecrona G, Reina M, Vilaro S. Binding and intracellular trafficking of lipoprotein lipase and triacylglycerol-rich lipoproteins by liver cells. *J Lipid Res* 39:789-806, 1998.
- Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 256:2835-2838, 1986.
- Catellier C. Nouvelle classification et critères diagnostiques du diabète sucré. *Info-Diabète* 2(2):1-10, 1983.
- Centers for Disease Control and Prevention: Births and Deaths: United States, 1996. In: *Monthly Vital Statistics Report* 46 (Suppl.2), 1997.
- Ceolletto G, Gallo A, Miola M, Sartori M, Trevisan R, Del Prato S, Semplicini A, Avogaro A. Protein kinase C activity is regulated by plasma glucose concentration in human monocytes in vivo. *Diabetes* 48:1316-1322, 1999.
- Cerami A, Stevens VJ, Monnier VM. Role of nonenzymatic glycosylation in the development of the sequelae of diabetes mellitus. *Metabolism* 28 (Suppl 1):431-437, 1979.
- Ceriello A. Hyperglycaemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Nutr Metab* 12:42-46, 1999.
- Ceriello A, Bortolotto N, Falletti E, Taboga C, Tonutti L, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A, Bartoli E. Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care* 20:194-197, 1997.
- Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A. Metabolic control may influence the increased superoxide generation in diabetic serum. *Diabetic Med* 8:540-542, 1991.

Cervený JD, Leder RD, Weart CW. Issue surrounding tight glycemic control in people with type 2 diabetes mellitus. *Ann Pharmacother* 32:896-905, 1998.

Chait A, Iverius PH, Brunzell JD. Lipoprotein lipase secretion by human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 69:490-493, 1982.

Chajek T, Stein O, Stein Y. Pre- and postnatal development of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride hydrolase activity in rat tissues. *Atherosclerosis* 26:549-561, 1977.

Chajek-Shaul T, Friedman G, Stein O, Etienne J, Stein Y. Endogenous plasma lipoprotein lipase activity in fed and fasting rats may reflect the functional pool of endothelial lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* 837:271-278, 1985..

Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW, McAuley E, Archer DB. Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. *Diabetes* 47:945-952, 1998.

Chan BL, Lisanti MP, Rodriguez-Boulan E, Saltiel AR. Insulin-stimulated release of lipoprotein lipase by metabolism of its phosphatidylinositol anchor. *Science* 241:1670-1672, 1988.

Chan YC, Shukla N, Abdus-Samee M, Berwanger CS, Stanford J, Singh M, Mansfield AO, Stansby G. Anti-heat-shock protein 70 kDa antibodies in vascular patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 18:381-385, 1999.

Chanu B. Hypertriglyceridemia: danger for the arteries. *Press Med* 28:2011-2017, 1999.

Chappell DA, Fry GL, Waknitz MA, Muhonen LE, Pladet MW, Iverius PH, Strickland DK. Lipoprotein lipase induces catabolism of normal triglyceride-rich lipoproteins via the low density receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in vitro. A process facilitated by cell-surface proteoglycans. *J Biol Chem* 268:14168-14175, 1993.

Chappell DA, Medh JD. Receptor-mediated mechanisms of lipoprotein remnant catabolism. *Prog Lipid Res* 37:393-422, 1998.

- Chatterjee S, Ghosh. Oxidized low density lipoprotein stimulates aortic smooth muscle cell proliferation. *Glycobiology* 6:303-311, 1996.
- Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 16:117-142, 1995.
- Cheatham B, Kahn CR. The biochemistry of insulin action. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 139-147, 1996.
- Chen C, Hosokawa H, Bumbalo LM, Leahy JL. Regulatory effects of glucose on the catalytic activity and cellular content of glucokinase in the pancreatic  $\beta$ -cell. *J Clin Invest* 94:1616-1620, 1994.
- Chen CH, Jiang W, Via DP, Luo S, Li TR, Lee YT, Henry PD. Oxidized low-density lipoprotein inhibit endothelial cell proliferation by suppressing basic fibroblast growth factor expression. *Circulation* 101:171-177, 2000.
- Chen NG, Sarabia SF, Malloy PJ, Zhao XY, Feldman D, Reaven GM. PPAR $\gamma$  agonists enhance human vascular endothelial adhesiveness by increasing ICAM-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 263:718-722, 1999a.
- Chen X, Iqbal N, Boden G. The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects. *J Clin Invest* 103:365-372, 1999.
- Chen YD, Howard J, Huang V, Kraemer FB, Reaven GM. Dissociation between plasma triglyceride concentration and tissue lipoprotein lipase deficiency in insulin-deficient rats. *Diabetes* 29:643-647, 1980.
- Chen YQ, Su M, Walia RR, Hao Q, Civington JW, Vaughan DE. Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273:8225-8231, 1998.

Chiac MC. The role of adhesion molecules in atherosclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 35:573-602, 1998.

Chiasson JL, Josse RG, Hunt JA, Palmason C, Rodger NW, Ross SA, Ryan EA, Tan MH, Wolever TM. The efficacy of acarbose in the treatment of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. A multicenter controlled clinical trial. *Ann Intern Med* 121:928-935, 1994.

Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Steals B. Activation of proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 273:25573-24580, 1998.

Chisolm GM 3rd, Hazen SL, Fox PL, Cathcart MK. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms. *J Biol Chem* 274:25959-25962, 1999.

Chobanian AV, Dzau VJ. Renin angiotensin system and atherosclerotic vascular disease. In: Fuster V, Ross R and Topol EJ (eds). *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p 237-242, 1996.

Choi WH, O'Rahilly S, Buse JB. Molecular scanning of insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene in NIDDM subjects. *Diabetes* 40:1712-1718, 1991.

Chopra M, Thurnham DI. Antioxidants and lipoprotein metabolism. *Proc Nutr Soc* 58:663-671, 1999.

Chow CK, Thacker RR, Changchit C. Lower levels of Vit C and carotenes in plasma of cigarette smokers. *J Am Coll Nutr* 5:305-312, 1986.

Chukwuma C Sr, Tuomilehto J. The "thrifty" hypotheses: clinical and epidemiological significance for non-insulin-dependent diabetes mellitus and cardiovascular disease risk factors. *J Cardiovasc Risk* 5:11-23, 1998.

Cicala C, Cirino G. Linkage between inflammation and coagulation: an update on the molecular basis of the crosstalk. *Life Sci* 62:1817-1824, 1998.



Cigolini M, Targher G, Seidell JC, Schiavon R, Tonoli M, Muggeo M, De Sandre G. Plasma factor VII and its relation to adipose tissue fatty acids and other atherogenic risk factors in healthy men. *Eur J Clin Invest* 26:247-253, 1996.

Claise C, Edeas M, Chaouchi N, Chalas J, Capel L, Kalimoultou S, Vazquez A, Lindenbaum A. Oxidized-LDL induce apoptosis in HUVEC but not in endothelial cell line EA.hy 926. *Atherosclerosis* 147:95-104,1999.

Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1987-1994, 1995.

Cohn JS, Marcoux C, Davignon J. Detection, Quantification, and characterization of potentially atherogenic triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2474-2486, 1999.

Cole SA, Hixson JE. Baboon lipoprotein lipase: cDNA sequence and variable tissue-specific expression of two transcripts. *Gene* 161:265-269, 1995.

Coleman WC, Brand PW. The diabetic foot. In: *Ellenberg Rifkin's Diabetes Mellitus*. 5th ed. Porte D Jr, Sherwin RS, Eds. Stanford, CT, Appelton Lange, p. 1159-1182, 1997.

Collinet M, Berthelon M, Benit P, Laborde K, Desbuquois B, Munnich A, Robert JJ. Familial hyperproinsulinemia due to a mutation substituting histidine for arginine at position 65 in proinsulin: identification of the mutation by restriction enzyme mapping. *Eur J Pediatr* 157:456-460, 1998.

Connors B, Lee WH, Wang G, Evans AP, Bohlen HG. Aldose reductase and IGF-1 gene expression in aortic and arteriolar smooth muscle during hypo- and hyperinsulinemic diabetes. *Microvasc Res* 53:53-62, 1997.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal -weight and obese humans. *N Engl J Med* 292-295, 1996.

- Consigny PM. Pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Roentgenol* 164:553-558, 1995.
- Cooper AD. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res* 38:2173-2192, 1997.
- Coppack SW, Yost TJ, Fisher RM, Eckel RH, Miles JM. Periprandial systemic and regional lipase activity in normal humans. *Am J Physiol* 270:E718-E722, 1996.
- Cosentino F, Luscher TF. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol* 32 Suppl 3:S54-61, 1998.
- Creedon G, Sexton D, Griffin M, O'Meara N, Collins P. Lipoprotein lipase in human monocyte-derived macrophages isolated from type II diabetic subjects. *Biochem Soc Trans* 25:134S, 1997.
- Cryer A. Comparative biochemistry and physiology of lipoprotein lipase, in Borensztajn J (ed): *Lipoprotein Lipase*. Chicago, Evener, 1987;277-328, 1987.
- Cryer A, Jones HM. Changes in the lipoprotein lipase (clearing-factor lipase) activity of white adipose tissue during development of the rat. *Biochem J* 172:319-325, 1978.
- Cullen P, Assmann G. High risk strategies for atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 286:31-45, 1999.
- Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Mahamad N, 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.
- Dahlquist G. The aetiology of type I diabetes: an epidemiological perspective. *Acta Paediatr* 425 suppl:5-10, 1998.
- Dahlquist GG. Viruses and other perinatal exposures as initiating events for beta-cell destruction. *Ann Med* 29:413-417, 1997.
- Dam P. Gestational diabetes mellitus and subsequent development of overt diabetes mellitus. *Dan Med Bull* 45:495-509, 1998.

Danesh J, Collins R, Petro R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* 350:43043-43046, 1997.

Danesh J, Peto R. Risk factors for coronary heart disease and infection with *Helicobacter pylori*: meta-analysis of 18 studies. *BMJ* 316:1130-1132, 1998.

Darley-Usmar V, Halliwell B. Blood radicals. Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharmaceu Res* 13:649-661, 1996.

Dart AM, Chin-Dusting JP. Lipids and the endothelium. *Cardiovasc Res* 43:308-322, 1999.

Daumerie CM, Woollett LA, Dietschy JM. Fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89:10797-10801, 1992.

Davies EL, Shennan KI, Docherty K, Bailey CJ. Expression of GLUT2 in insulin-secreting AtT20 pituitary cells. *J Mol Endocrinol* 20:75-82, 1998.

Dawber TR. The Framingham Study: *The Epidemiology of Atherosclerosis Disease*. Cambridge, Ma: Harvard University Press, 1980.

Day C. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet Med* 16:179-192, 1999.

de Beer F, Hendriks WL, van Vark LC, Kamerling SW, van Dijk KW, Hofker MH, Smelt AH, Havekes LM. Binding of beta-VLDL to heparan sulfate proteoglycans requires lipoprotein lipase, whereas ApoE only modulates binding affinity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:633-637, 1999.

De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA Jr, Libby P. The  $\omega$ -3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 14:1829-1836, 1994.

de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N. Mediterranean alpha linolenic acid rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 343:1454-1459, 1994.

De Sanctis JB, Varesio L, Radzioch D. Prostaglandins inhibit lipoprotein lipase gene expression in macrophages. *Immunology* 81:605-610, 1994.

de Sonnaville JJJ, Snoek FJ, Colly LP, Devillé W, Wijkkel D, Heine RJ. Well-being and symptoms in relation to insulin therapy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 21:919-924, 1998.

de Villiers WJ, Smart EJ. Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. *J Leukoc Biol* 66:740-746, 1999.

de Vries HE, Buchner B, van Berkel TJ, Kuiper J. Specific interaction of oxidized low-density lipoprotein with macrophage-derived foam cells isolated from rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:638-645, 1999.

DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 35:389-397, 1992.

DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. *Diabetologia* 35:389-394, 1992.

DeFronzo RA, Ferrannini F. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerosis cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:173-194, 1991.

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

Delisle HF, Ekoe JM. Prevalence of non-insulin dependent diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in two Algonquin communities in Quebec. *Can Med Assoc J* 148:41-47, 1993.

DeLong P, O'sullivan MG, Huggins E, Hubbard CL, McCall C. Bacterial lipopolysaccharide induction of the prostaglandin G/H synthase 2 gene causes thromboxane-dependent pulmonary hypertension in rabbits. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:493-499, 1999.

- Deshaies Y, Geloën A, Paulin A, Bukowiecki LJ. Restoration of lipoprotein lipase activity in insulin-deficient rats by insulin infusion is tissue-specific. *Can J Physiol Pharmacol* 69:746-751, 1991.
- Després JL, Marette A. Relation of components of insulin resistance syndrome to coronary disease risk. *Curr Opin Lipidol* 5:274-289, 1994.
- Després JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A, Bouchard C. Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb* 10:497-511, 1990.
- Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vasquez M, Gonzalez FJ, Whali W. The PPAR $\alpha$ -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384:39-43, 1996.
- Dichtl W, Stiko A, Eriksson P, Goncalves I, Calara F, Banfi C, Ares MP, Hamsten A, Nilsson J. Oxidized LDL and lysophosphatidylcholine stimulate plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:3025-3032, 1999.
- Dietschy JM, Woollett LA, Spady DK. The interaction of dietary cholesterol and specific fatty acids in the regulation of LDL receptor activity and plasma LDL-cholesterol concentrations. In: Nutrition in Cardiovascular-Cerebrovascular Diseases. *Annal NY Acad Sci* 676:11-26, 1993.
- Dimmeler S, Hermann C, Zeiher AM. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis? *Eur Cytokine Netw* 9:697-698, 1998.
- Dixon JL, Stoops JD, Parker JL, Laughlin MH, Weisman GA, Sturek M. Dyslipidemia and vascular dysfunction in diabetic pigs fed an atherogenic diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2981-2992, 1999.
- Dolhofer R, Wieland OH. Glycosylation of serum albumin: elevated glycosyl albumin in diabetic patients. *FEBS Lett* 103:282-286, 1979.
- Doll R, Petro R, Hall E, Wheatley K, Gray R. Mortality in relation to consumption of alcohol: 13 years observations in male British doctors. *BMJ* 309:911-918, 1994.

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

Dong C, Lei XX. Biomechanics of cell rolling: shear flow, cell-surface adhesion, and cell deformability. *J Biochem* 33:35-43, 2000.

Drouet L, Mazoyer C, Sollier BD, Hainaud P, Ripoll L. Participation des mécanismes de la thrombose et de l'hémostase aux étapes initiales de l'athérosclérose. *Arch Mal Coeur Vaiss* 91 (V):41-51, 1998.

Drouin P. Insulin therapy for non-insulin-dependent diabetes: minimal or intensive. *Diabetes Metab* 23 Suppl 3:36-43, 1997.

Duplaà C, Couffinahl T, Labat L, Fawaz J, Moreau C, Bietz I, Bonnet J. Monocyte adherence to endothelial cells in patients with atherosclerosis: relationships with risk factors. *Eur J Clin Invest* 23:474-479, 1993.

Durinovic-Bello I. Autoimmune diabetes: the role of T cells, MHC molecules and autoantigens. *Autoimmunity* 27:159-177, 1998.

Eastman RC, Siebert CW, Harris M, Gorden P. Clinical review 51: Implications of the Diabetes Control and Complications Trial. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1105-1107, 1993.

Ebara T, Ramakrishnan R, Steiner G, Shachter NS. Chylomicronemia due to apolipoprotein CIII overexpression in apolipoprotein E-null mice. Apolipoprotein CIII-induced hyperglyceridemia is not mediated by effects on apolipoprotein E. *J Clin Invest* 99:2672-2681, 1997.

Eckel RH, Fujimoto WY, Brunzell JD. Insulin regulation of lipoprotein lipase in cultured 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 84:1069-1075, 1978.

Eckel RH. Adipose tissue lipoprotein lipase, in Borensztajn J(ed): *Lipoprotein Lipase*. Chicago, Evener, 79-132, 1987.

Eckel RH. Lipoprotein lipase, a multifunctional enzyme relevant to common metabolic disease. *N Engl J Med* 320:1060-1068, 1989.

Edelman SV, Henry RR. Intensive insulin therapy for patients with type II diabetes. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 647-660, 1996.

Egger M, Smith GD, Pfluger D, Altpeter E, Elwood PC. Triglyceride as a risk factor for ischaemic heart disease in British men: effect of adjusting for measurement error. *Atherosclerosis* 143:275-284, 1999.

Eisenberg S, Sehayek E, Olivecrona T, Vlodavsky I. Lipoprotein lipase enhances binding of lipoprotein to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J Clin Invest* 90:2013-2021, 1992.

Elbein SC, Yeager C, Kwong LK, Lingam A, Inoue I, Lalouel JM, Wilson DE. Molecular screening of the lipoprotein lipase gene in hypertriglyceridemic members of familial noninsulin-dependent diabetes mellitus families. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1450-1456, 1994.

Ellard S, Bulman MP, Frayling TM, Allen LI, Dronsfield MJ, Tack CJ, Hattersley AT. Allelic dropout in exon 2 of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene hinders the identification of mutations in three families with maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes* 48:921-923, 1999.

Enas EA, Jacob ST. Emerging noninvasive biochemical measures: potential explanation for ethnic differences in cardiovascular risk. *Arch Intern Med* 159:1812-1813, 1999.

Endres S, Ghorbani R, Kelly VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW, Cannon JG, Rogers TS, Klempner MS, Weber PC. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med* 320:265-271, 1989.

Enerbäck S, Gimble JM. Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochim Biophys Acta* 1169:107-125, 1993.

- Erkelens DW. Diabetic dyslipidaemia. *Eur Heart J* 19 (Suppl H):H27-H30, 1998.
- Eschwege E, Richard JL, Thibault N, Ducimetiere P, Warnet JM, Claude JR, Rosselin GE. Diabetes, Hyperglycemia, hyperinsulinemia and risk of cardiovascular mortality. Findings of the Paris Prospective Survey, 10 years later. *Rev Epidemiol Sante Publique* 33:352-357, 1985.
- Esposito C, Geralch H, Brett J, Stern D, Vlassara H. Endothelial receptor-mediated binding of glucose modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med* 170:1378-1407, 1992.
- Eurospire Study Group. A European Society of cardiology survey of secondary prevention of coronary heart disease: principal results. *Eur Heart J* 18:1569-1582, 1997.
- Evans AJ, Sawyez CG, Wolfe BM, Connelly PW, Maguire GF, Huff MW. Evidence that cholesteryl ester and triglyceride accumulation in J774 macrophages induced by very low density lipoprotein subfractions occurs by different mechanisms. *J Lipid Res* 34:703-717, 1993.
- Evans RW, Shaten BJ, Day BW, Kuller LH. Prospective association between lipid soluble antioxidants and coronary heart disease in men. The Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol* 147:180-186, 1998.
- Ewart HS, Carroll R, Severson DL. Lipoprotein lipase activity in rat cardiomyocytes is stimulated by insulin and dexamethasone. *Biochem J* 327:439-442, 1997.
- Ewart HS, Carroll R, Severson DL. Lipoprotein lipase activity is stimulated by insulin and dexamethasone in cardiomyocytes from diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 77:571-578, 1999.
- Expert committee on the classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 22 (suppl 1):S5-S19, 1999.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20:1183-1197, 1997.



- Fabricant CG. Herpes virus-induced atherosclerosis. *Diabetes* 30:29-31, 1981.
- Faegerman O. The relationship of triglycerides and LDL cholesterol to coronary heart disease. In: Jacobot B, Mathé D, Fruchart JC eds. *Atherosclerosis XI*. P 605-607, 1998.
- Faggiotto A, Ross R. Studies of hypercholesterolemia in nonhuman primate, part II: fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 4:341-356, 1984.
- Fajans SS. Definition and classification of diabetes including maturity-onset diabetes of the young. In: Fajans SS. *Diabetes Mellitus: definition, classification, Tests*. In: DeGroot LJ, ed. *Endocrinology* 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1412-1452, 1995.
- Fajans SS, Cloutier MC, Crowther RL. The banting memorial lecture. Clinical and etiological heterogeneity of idiopathic diabetes mellitus (Banting Memorial Lecture). *Diabetes* 27:1112-1125, 1978.
- Farese RV Jr, Yost TJ, Eckel RH. Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism* 40:214-216, 1991.
- Farese RV. Protein kinase C. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 187-197, 1996.
- Fatourae N, Deng X, De Champlain A, Guidoin R. Concentration polarization of low density lipoprotein (LDL) in the arterial system. *Ann N Y Acad Sci* 858:137-146, 1998.
- Favero J, Lafont V. Effector pathways regulating T cell activation. *Biochem Pharmacol* 56:1539-1547, 1998.
- Fernandez-Borja M, Bellido D, Vilella E, Olivecrona G, Vilaro S. Lipoprotein lipase-mediated uptake of lipoprotein in human fibroblasts: evidence for an LDL receptor-independent internalization pathway. *J Lipid Res* 37:464-481, 1996.

- Ferns GA, Forster L, Stewart-Lee A, Nourooz-Zadeh J, Anggard EE. Probucol inhibits mononuclear cell adhesion to vascular endothelium in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis* 199:171-181, 1993.
- Fernyhough P, Diemel LT, Brewster WJ, Tomlinson DR. Deficits in sciatic nerve neuropeptide content coincide with a reduction in target tissue nerve growth factor mRNA in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Neuroscience* 62:337-344, 1994.
- Ferrannini E. Insulin and blood pressure: possible role of hemodynamics. *Clin Exp Hypertens [A]* 14:271-284, 1992.
- Ferraro RT, Eckel RH, Larson DE, Fontvieille AM, Rising R, Jensen DR, Ravussin E. Relationship between skeletal muscle lipoprotein lipase activity and 24-hour macronutrient oxidation. *J Clin Invest* 92:441-445, 1993.
- Fisher RM, Hymphries SE, Talmud PJ. Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 135:145-159, 1997.
- Fitzgerald GA, Oates JA, Nowak J. Cigarette smoking and hemostatic function. *Am Heart J* 115:267-271, 1988.
- Flier JS. Syndrome of insulin resistance: from patient to gene and back again. *Diabetes* 41:1207-1219, 1992.
- Folsom AR, Wu KK, Rasmussen M, Chambless LE, Aleksic N, Nieto FJ. Determinants of population changes in fibrinogen and factor VII over 6 years: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:610-616, 2000.
- Fontbonne A, Eschwege E, Cambien F, Richard JL, Ducimetiere P, Thibault N, Warnet JM, Claude JR, Rosselin GE. Hypertriglyceridemia as a risk factor of coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes. Results from the 11-year follow-up of the Paris Prospective Study. *Diabetologia* 37:300-304, 1989.

- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-deoxy- $\delta$  12,14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR $\gamma$ . *Cell* 83:803-812, 1995.
- Foubert L, Benlian P, Turpin G. La lipoprotéine lipase: enzyme multifonctionnelle du métabolisme des lipoprotéines. *Press Med* 25:207-210, 1996.
- Fox C, Harris S, Brough E. Diabetes among native Canadians in Northwestern Ontario. 10 years later. *Chronic Dis Canada* 15:92-96, 1994.
- Frayn KN. Non esterified fatty acid metabolism and postprandial lipaemia. *Atherosclerosis* 141 Suppl 1:S41-S46, 1998.
- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47:412-426, 1982.
- Frei B. On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:196-204, 1999.
- Fremont L, Duranthon V, Gozzelino MT, Mahe S. Activation of trout adipose tissue lipoprotein lipase by trout apoproteins. *Biochimie* 69:773-779, 1987.
- Friedman EA. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 22 Suppl 2:B65-71, 1999.
- Friedman G, Chajek-Shaul T, Gallily R, Stein O, Shiloni E, Etienne J, Stein Y. Modulation of lipoprotein lipase activity in mouse peritoneal macrophages by recombinant human tumor necrosis factor. *Biochim Biophys Acta* 25:201-207, 1988.
- Frostegard J, Huang YH, Ronnelid J, Schafer-Elinder L. Platelet-activating factor and oxidized LDL induce immune activation by a common mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 :963-968, 1997.

- Fruchart JC, Duriez P, Steals B. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 10:245-257, 1999.
- Fuller JH, Shipley MJ, Rose G, Jarrett RJ, Keen H. Coronary-heart-disease risk and impaired glucose tolerance. The Whitehall study. *Lancet* 1(8183):1373-1376, 1980.
- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 326:311-318, 1992.
- Gajdusek C, DiCorleto P, Ross R, Schwartz SM. An endothelial cell-derived growth factor. *J Cell Biol* 85:467-472, 1980.
- Galan X, Llobera M, Ramirez J. Lipoprotein lipase and hepatic lipase in wistar and sprague-Dawley rat tissues. Differences in the effects of gender and fasting. *Lipids* 29:333-336, 1994.
- Galle J, Heermeier K, Wanner C. Atherogenic lipoproteins, oxidative stress, and cell death. *Kidney Int* 56 Suppl 71:S62-65, 1999.
- Gardner G, Banka CL, Roberts KA, Mullick AE, Rutledge JC. Modified LDL-mediated increases in endothelial layer permeability are attenuated with 17 beta-estradiol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:854-861, 1999.
- Ganz MB, Seftel A. Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E146-E152, 2000.
- Garvey WT, Maianu L, Huecksteadt TP, Birnbaum MJ, Molina JM, Ciaraldi TP. Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J Clin Invest* 87:1072-1081, 1991.
- Garvey WT, Maianu L, Zhu JH, Brechtel-Hook G, Wallace P, Baron AD. Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J Clin Invest* 101:2377-2386, 1998.

Gaudet D, Vohl MC, Julien P, Tremblay G, Perron P, Gagné C, Bergeron J, Moorjani S, Després JP. Relative contribution of low-density lipoprotein receptor and lipoprotein lipase gene mutations to angiographically assessed coronary artery disease among French Canadians. *Am J Cardiol* 82:299-305, 1998.

Gavin LA, Cavalieri RR, Moeller M, McMahon FA, Castle JN, Gulli R. Brain lipoprotein lipase is responsive to nutritional and hormonal modulation. *Metabolism* 36:919-924, 1987.

Gearing KL, Crickmore A, Gustafsson JA. Structure of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$  gene. *Biochem Biophys Res Commun* 199:255-263, 1994.

Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleukin-1 $\beta$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:19-27, 1996.

Gerbitz KD, Gempel K, Brdiczka D. Mitochondria and diabetes: genetic, biochemical and clinical implication of the cellular energy circuit. *Diabetes* 45:113-126, 1996.

Gerich JE, Van Haeften T. Insulin resistance versus impaired insulin secretion as the genetic basis for type II diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 5:144-148, 1998.

Gerrity RG, Naito HK, Richardson ME, Schwartz CJ. Dietary induced atherogenesis in swine; morphology of the intima in prelesion stages. *Am J Pathol* 95:775-792, 1979.

Gerstein HC, Pais P, Pogue J, Yusuf S. Relationship of glucose and insulin levels to the risk of myocardial infarction: a case-control study. *J Am Coll Cardiol* 33:612-619, 1999.

Getz S. The involvement of lipoproteins in atherogenesis evolving concepts. *Ann NY Acad Sci* 598:17-28, 1990.

Ghosh S, Scork NJ. Genetic analysis of NIDDM: the study of quantitative traits. *Diabetes* 45:1-14, 1996.

- Giacca A, Groenewoud Y, Tsui E, McClean P, Zinman B. Glucose production, utilization, and in response to moderate exercise in obese subjects with type 2 diabetes and mild hyperglycemia. *Diabetes* 47:1763-1770, 1998.
- Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol* 152:353-358, 1998.
- Gianturco SH, Bradley WA, Gotto AM Jr, Morrisett JD, Peavy DL. Hypertriglyceridemic very low density lipoproteins induce triglyceride synthesis and accumulation in mouse peritoneal macrophages. *J Clin Invest* 70:168-178, 1982.
- Gianturco SH, Bradley WA. Pathophysiology of triglyceride-rich lipoproteins in atherothrombosis: cellular aspects. *Clin Cardiol* 22(6 Suppl):7-14, 1999.
- Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia: autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 90:456-461, 1992.
- Gidh-Jain M, Takeda J, Xu LZ, Lange AJ, Vionnet N, Stoffel M, Froguel P, Velho G, Sun F, Cohen D. Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: implications for structure/function relationships. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1932-1936, 1993.
- Gimble JM, Dorheim MA, Cheng Q, Pekela P, Enerback S, Ellingdworth L, Kincade PW, Wang CS. Response of bone marrow stromal cells to adipogenic antagonists. *Mol Cell Biol* 9:4587-4595, 1989.
- Girndt M, Lengler S, Kaul H, Sester U, Sester M, Kohler H. Prospective crossover trial of the influence of vitamin E-coated dialyzer membranes on T-cell activation and cytokine induction. *Am J Kidney Dis* 35:95-104, 2000.

Girona J, La Ville AE, Heras M, Olive S, Masana L. Oxidized lipoproteins including HDL and their lipid peroxidation products inhibit TNF- $\alpha$  secretion by THP-1 human macrophages. *Free Radic Biol Med* 23:658-667, 1997.

Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-267, 1996.

Glacov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. Hemodynamics and atherosclerosis: insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med* 112:1018-1031, 1988.

Gohra H, Mc Donald TO, Verrier ED, Aziz S. Endothelial loss and regeneration in a model of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* 60:96-102, 1995.

Goldberg IJ, Soprano DR, Wyatt ML, Vanni TM, Kirchgessner TG, Schotz MC. Localization of lipoprotein lipase mRNA in selected rat tissues. *J Lipid Res* 30:1569-1577, 1989.

Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* 37:693-707, 1996.

Goldman R. Control of lipoprotein lipase secretion by macrophages: effect of macrophage differentiation agents. *Leukocyte Biol* 47:79-86, 1990.

Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman LE, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. III. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new, inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 52:1544-1568, 1973.

Gomez-Perez FJ, Aguilar-Salinas CA, Lopez-Alverenga JC, Perez-Jauregui J, Guillen-Pineda LE, Rull JA. Lack of agreement between the World Health Organization Category of impaired glucose tolerance and the American Diabetes Association category of impaired fasting glucose. *Diabetes Care* 21:1886-1888, 1998.

Goodpaster BH, Kelley DE, Wing RR, Meier A, Thaete FL. Effects of fat loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. *Diabetes* 48:839-847, 1999.

- Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 79:8-15, 1989.
- Gorski J, Stankiewicz-Choroszuca B. The effect of hormones on lipoprotein lipase activity in skeletal muscles of the rat. *Horm Metab Res* 14:189-191, 1982.
- Gotlieb AI, Langille BL. The role of rheology in atherosclerotic coronary artery disease. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol.1. Philadelphia: Lippincott-Raven: 595-606, 1996.
- Gottsater A, Ahmed M, Fernlund P, Sundkvist G. Autonomic neuropathy in Type 2 diabetic patients is associated with hyperinsulinaemia and hypertriglyceridemia. *Diabet Med* 16:49-54, 1999.
- Greene DA, Lattimer SA. Impaired rat sciatic nerve sodium-potassium adenosine triphosphatase in acute streptozotocin diabetes and its correction by dietary myo-inositol supplementation. *J Clin Invest* 72:1058-1063, 1983.
- Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G, Nimer SD. Isolation of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma cDNA expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr* 4:281-299, 1995.
- Griffin BA, Minihane AM, Furlonger N, Chapman C, Murphy M, Williams D, Wright JJ, Williams CM. Inter-relationships between small, dense low-density lipoprotein (LDL), plasma triacylglycerol and LDL apoprotein B in an atherogenic lipoprotein phenotype in free-living subjects. *Clin Sci (Cloch)* 97:269-276, 1999.
- Grimaldi A, Heurtier A. Diagnostic for type 2 diabetes. *Rev Prat* 1;49:16-21, 1999.
- Gronholdt ML, Dalager-Pedersen S, Falk E. Coronary atherosclerosis: determinants of plaque rupture. *Eur Heart J* 19 Suppl C:C24-29, 1998.



Groop LC, Kankuri M, Schalin-Jantti C, Ekstrand A, Nikula-Ijas P, Widen E, Kuismanen E, Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Saloranta C. Association between polymorphism of the glycogen synthase gene and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 328:10-14, 1993.

Grundy SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 81(4A):18B-25B, 1998.

Grundy SM. Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 83(9B):25F-29F, 1999.

Grundy SM, Vega GL. Two different views of the relationship of hypertriglyceridemia to coronary heart disease. Implications for treatment. *Arch Intern Med* 152:28-34, 1992.

Gu K, Cowie CC, Harris MI. Mortality in adults with and without diabetes in a national cohort of the U.S. population, 1971-1993. *Diabetes Care* 21:1138-1145, 1998.

Guerrero-Romero F, Rodriguez-Moran M, Alvarado-Ruiz R. Concordance between the 1997 fasting American Diabetes Association criteria and the World Health Organization Criteria in healthy Mexican subjects. *Diabetes Care* 22:527-531, 1999.

Guillermo E, Garavaglia E, Messerli FH, Nunez BD, Schmieder RE, Grossman E. Myocardial contractility and left ventricular function in obese patients with essential hypertension. *Am J Cardiol* 62:594-597, 1988.

Guivernau M, Meza N, Barja P, Roman O. Clinical and experimental study on the long-term effect of dietary  $\gamma$ -linolenic acid on plasma lipids, platelet aggregation, thromboxane formation, and prostacyclin production. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 51:311-316, 1994.

Gupta S, Letham EW, Carrington D, Mendall MA, Kaski JC, Camm AJ. Elevated Chlamydia pneumoniae antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation* 96:404-7, 1997.

Guyton JR, Lenz ML, Mathews B, Hughes H, Karsan D, Selinger E, Smith CV. Toxicity of oxidized low density lipoproteins for vascular smooth muscle cells and partial protection by antioxidants. *Atherosclerosis* 118:237-249, 1995.

Ha H, Kim KH. Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes Res Clin Pract* 45:147-151, 1999.

Hachulla E, Para HJ. The mysteries of lipoprotein (a): a bridge between thrombosis and atheroma. *Rev Med Interne* 12:192-197, 1991.

Haffner SM. Clinical relevance of the oxidative stress concept. *Metabolism* 49 (2 Suppl 1):30-34, 2000.

Haffner SM, D'Agostino RJr, Mykkanen L, Tracy R, Howard B, Rewers M, Selby J, Savage PJ, Saad MF. Insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. Relationship to cardiovascular risk factors: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care* 22:562-568, 1999.

Haffner SM, Stern MP, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK. Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes? *JAMA* 263:2893-2898, 1990.

Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Michell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes* 41:715-722, 1992.

Hager J, Hansen L, Vaisse C, Vionnet N, Phillippi A, Poller W, Velho G, Carcassi C, Contu L, Julier C. A missense mutation in the glucagon receptor gene is associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nat Genet* 9:299-304, 1995 .

Hahn L, Mattsson LA, Anderson B, Tengborn L. The effects of oestrogen replacement therapy on haemostatic variables in postmenopausal women with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Blood Coagul Fibrinolysis* 10:81-86, 1999.

Hajjar KA. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest* 91:2873-2879, 1993.

Hajjar DP, Haberland ME. Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs. *J Biol Chem* 272:22975-22978, 1997.

Hakim AA, Petrovitch H, Burchfield CM, Ross GW, Rodriguez BL, White LR, Yano K, Curb JD, Abbott RD. Effects of walking on mortality among nonsmoking retired men. *N Engl J Med* 338:94-99, 1998.

Halle M, Berg A, Northoff H, Keul J. Importance of TNF- $\alpha$  and leptin in obesity and insulin resistance: a hypothesis on the impact of physical exercise. *Exerc Immunol* 4:77-94, 1998.

Hamada Y, Nishimura C, Koh N, Sakakibara F, Nakamura J, Tanimoto T, Hotta N. Influence of interindividual variability of aldose reductase protein content on pyololpathway metabolites and redox state in erythrocytes in diabetic patients. *Diabetes Care* 21:1014-1018, 1998.

Hammes HP, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, Preissner KT. Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nat Med* 2:529-533, 1996.

Hammes HP, Brownlee M, Lin J, Schleicher E, Bretzel RG. Diabetic retinopathy risk correlates with intracellular concentrations of the glycoxidation product Nepsilon-(carboxymethyl) lysin independently of glycohaemoglobin concentrations. *Diabetologia* 42(5):603-607, 1999.

Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11555-11558, 1991.

Hanefeld M, Koehler C, Schaper F, Fuecker K, Henkel E, Temelkova-Kurktschiev T. Postprandial plasma glucose is an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in non-diabetic individuals. *Atherosclerosis* 144:220-235, 1999.

Hansson GK. Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 8:301-311, 1997.

Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 9:567-578, 1989.

Harats D, Ben-Naim M, Dabach Y, Hollander G, Stein O, Stein Y. Cigarette smoking renders LDL susceptible to peroxidative modification and enhanced metabolism by macrophages. *Atherosclerosis* 79:245-252, 1989.

Harats D, Chevion S, Nahir M. Citrus fruit supplementation reduces lipoprotein oxidation in young men investing a diet high in saturated fat: presumptive evidence for an interaction between vitamins C and E in vivo. *Am J Clin Nutr* 67:240-248, 1998.

Hardman AE. The influence of exercise on postprandial triacylglycerol metabolism. *Atherosclerosis* 141 Suppl 1:S93-S100, 1998.

Hardman AE. Physical activity, obesity and blood lipids. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 3:S64-S71, 1999.

Harris MI. Prevalence of non-insulin-dependent diabetes and impaired glucose tolerance. In: Harris MI. NIDDM: epidemiology and scope of the problem. *Diabetes Spectrum* 9:26-29, 1996.

Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, Byrd-Holt DD. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care* 21:518-524, 1998.

Harris MI, Hadden WC, Knowler WC, Bennett PH. International criteria for the diagnosis of diabetes and impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 8:562-567, 1985.

Harris SB, Gittelsohn J, Hanley A, Barnie A, Wolever TMS, Gao J, Logan A, Zinman B. The prevalence of NIDDM and associated risk factors in Native Canadians. *Diabetes Care* 20:185-197, 1997.

Harris SB, Perkins BA, Whalen-Brough E. Non-insulin-dependent diabetes mellitus among First Nations children. New entity among First Nations people of north western Ontario. *Can Fam Physician* 42:869-876, 1996a.

Harris T, Cook D, Cappuccio FP. New diagnostic criteria for diabetes mellitus. Subjects with impaired glucose tolerance but normal fasting values will not be identified. *BMJ* 20:318:531-537, 1999.

Harris WS, Lu G, Rambjor GS, Walen AI, Ontko JA, Cheng Q, Windsor SL. Influence of n-3 fatty acid supplementation on the endogenous activities of plasma lipases. *Am J Clin Nutr* 66:254-260, 1997a.

Hauner H. Abdominal obesity and coronary heart disease. Pathophysiology and clinical significance. *Hez* 20:47-55, 1995.

Hayden MR, Ma Y, Brunzell JD, Henderson HE. Genetic variants affecting human lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Curr Opin Lipidol* 2:104-109, 1991.

Hayden MR, Kastelein JJ, Funke H, Brunzell JD, Ma Y. Phenotypic variation of mutations in the human lipoprotein lipase gene. *Biochem Soc Trans* 21:506-509, 1993.

Health Canada. *Canadians and Heart Health: Reducing the risk*. Ottawa, ON: Health Canada, 1995.

Heart and Stroke Foundation of Canada: *Heart Disease and Stroke in Canada*. Ottawa, Canada, 1997.

Hegele RA, Harris SB, Hanley AJG, Azouz H, Connelly PW, Zinman B. Absence of association between genetic variation of the  $\beta$ 3-adrenergic receptor and metabolic phenotypes in Oji-Cree. *Diabetes Care* 21:851-854, 1998.

Henderson HE, Kastelein JJ, Zwinderman AH, Gagne E, Jukema JW, Reymers PW, Groenemeyer BE, Lie KI, Bruschke AV, Hayden MR, Jansen H. Lipoprotein lipase activity is decreased in a large cohort of patients with coronary artery disease and is associated with changes in lipids and lipoproteins. *J Lipid Res* 40:735-743, 1999.

Hendriks WL, van der Boom H, van Vark LC, Havekes LM. Lipoprotein lipase stimulates the binding and uptake of moderately oxidized low-density lipoprotein by J774 macrophages. *Biochem J* 314:563-568, 1996.

Hendriks WL, van der Boom H, van Vark LC, Havkes LM. Lipoprotein lipase stimulates the binding and uptake of moderately oxidized low-density lipoprotein by J774 macrophages. *Biol J* 314:653-658, 1996.

Hendriks WL, Vandermandebeer F, Vanvlijmen BJM. Uptake by J774 macrophages of very-low-density lipoproteins isolated from apoE-deficient mice is mediated by a distinct receptor and stimulated by lipoprotein lipase. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1997;17:498-504.

Hendrix MG, Salimans MM, Van Boven CP, Bruggeman CA. High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *Am J Pathol* 136:23-28, 1990.

Herren B, Raines EW, Ross R. Expression of a disintegrin-like protein in cultured human vascular cells and in vivo. *FASEB J* 11:173-180, 1997.

Hietanen E, Greenwood MRC. A comparison between lipoprotein lipase activity and adipocyte differentiation in growing male rats. *J Lipid Res* 18:480-490, 1977.

Hill JO, Melanson EL. Overview of the determinants of overweight and obesity: current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exerc* 31(11 Suppl):S515-521, 1999.

Hill JR, Kwon G, Marshall CA, McDaniel ML. Hyperglycemic levels of glucose inhibit interleukin 1 release from RAW 264.7 murine macrophages by activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 273:3308-3313, 1998.

Hill MR, Clarke S, Rodgers K, Thornhill B, Peters JM, Gonzalez FJ, Gimble JM. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$  activators on tumor necrosis factor expression in mice during endotoxemia. *Infect Immun* 67:3488-3493, 1999a.

Hill MR, Young MD, McCurdy CM, Gimble JM. Decreased expression of murine PPAR $\gamma$  in adipose tissue during endotoxemia. *Endocrinology* 138:3073-3076, 1997.

Hiltunen TP, Luoma JS, Nikkari T, Yla-Herttuala S. Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerosis lesions: marked

induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development. *Circulation* 97:1079-1086, 1998.

Hirano T. Lipoprotein abnormalities in diabetic nephropathy. *Kidney International* 56 (Suppl 71):S-S24, 1999.

Hishikawa K, Oemar BS, Tanner FC, Nakaki T, Fujii T, Luscher TF. Overexpression of connective tissue growth factor gene induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 100:2108-2112, 1999.

Hocquette JF, Graulet B, Olivecrona T. Lipoprotein lipase activity and mRNA levels in bovine tissues. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 121:201-212, 1998.

Hodis HN, Mack WJ. Triglyceride-rich lipoproteins and progression of atherosclerosis. *Eur Heart J* 19 Suppl A:A40-44, 1998.

Hoefler G, Noehammer C, Levak-Frank S, el-Shabrawi Y, Schauer S, Zechner R, Radner H. Muscle-specific overexpression of human lipoprotein lipase in mice causes increased intracellular free fatty acids and induction of peroxisomal enzymes. *Biochimie* 79:163-168, 1997.

Hoffmeister A, Rothenbacher D, Wanner P, Bode G, Persson K, Brenner H, Hombach V, Koenig W. Seropositivity to chlamydial lipopolysaccharide and *Chlamydia pneumoniae*, systemic inflammation and stable coronary artery disease: negative results of a case-control study. *J Am Coll Cardiol* 35:112-118, 2000.

Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovascular Risk* 3:213-219, 1996.

Hokanson JE, Austin MA. Triglyceridemia is a cardio-vascular risk factor independent from HDL-cholesterol level: meta-analysis of prospective studies based on general population. *J Cardiovasc Risk* 3:213-219, 1996.

Hokanson JE, Brunzell JD, Jarvik GP, Wijsman EM, Austin MA. Linkage of low-density lipoprotein size to the lipoprotein lipase gene in heterozygous lipoprotein lipase deficiency. *Am J Hum Genet* 64:608-618, 1999.

Hokanson JE. Functional variants in the lipoprotein lipase gene and risk cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 10:393-399, 1999.

Holvoet P. Endothelial dysfunction, oxidation of low-density lipoprotein, and cardiovascular disease. *Ther Apher* 3:287-293, 1999.

Hong Y, Rice T, Gagnon J, Despres JP, Nadeau A, Perusse L, Bouchard C, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC. Familial clustering of insulin and abdominal visceral fat: the HERITAGE family study. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4239-4245, 1998.

Horrocks LA, Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid. *Pharmacol Res* 40:211-225, 1999.

Horton ES. Exercise in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 638-643, 1996.

Horton ES. NIDDM-the devastating disease. *Diab Res Clin Prac* 28 Suppl:S3-S11, 1995.

Hotamisligil G, Murray D, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4854-4858, 1994.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson KL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409-2415, 1995.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91, 1993.

Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43:1271-1278, 1994.



Hou J, Said C, Franchi D, Dockstader P, Chatterjee NK. Antibodies to glutamic acid decarboxylase and P2-C peptides in sera from coxsackie virus B4-infected mice and IDDM patients. *Diabetes* 43:1260-1266,1994.

Howard BV. Macrovascular complications of diabetes mellitus. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 792-797, 1996.

Howard BV. Insulin resistance and lipid metabolism. *Am J Cardiol* 84(1A):28J-32J, 1999.

Hu J, Norman M, Wallenstein M, Gennser G. Increased large arterial stiffness and impaired acetylcholine induced skin vasodilatation in women with previous gestational diabetes mellitus. *Br J Obstet Gynaecol* 105:1279-1287, 1998.

Huang CN, Lee KC, Wu HP, Tai TY, Lin BJ, Chuang LM. Screening for the Gly40Ser mutation in the glucagon receptor gene among patients with type 2 diabetes or essential hypertension in Taiwan. *Pancreas* 18:151-155, 1999.

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

Hugh P, Barrett R. Kinetics of triglyceride rich lipoproteins: chylomicrons and very low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 141 Suppl 1:S35-S40, 1998.

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

Humphreys P, McCarthy M, Tuomilehto J, Tuomilehto-wolf E, Stratton I, Morgan R, Rees A, Owens D, Stengard J, Nissinen A. Chromosome 4q locus associated with insulin resistance in Pima Indians. Studies in three European NIDDM populations. *Diabetes* 43:800-804, 1994.

- Hunink MGM, Goldman L, Tosteson ANA. The recent decline in mortality from the coronary heart disease, 1980-1990. The effect of secular trends in risk factors and treatment. *JAMA* 277:535-542, 1997.
- Hunt JV, Smith CC, Wolff SP. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39:1420-1424, 1990.
- Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiai H, Seino Y, Yamada Y. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic  $\beta$ -cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 48:927-932, 1999.
- Iijima K, Yoshizumi M, Ako J, Eto M, Kim S, Hashimoto M, Sugimoto N, Liang Y-Q, Sudoh N, Toba K, Ouchi Y. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247:353-356, 1998.
- Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiCiara M, Medoff BD, Cybulsky MI. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Cir Res* 85:199-207, 1999.
- Imbeault P, Almeras N, Richard D, Despres JP, Tremblay A, Mauriege P. Effect of a moderate weight loss on adipose tissue lipoprotein lipase activity and expression: existence of sexual variation and regional differences. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:957-965, 1999.
- 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. Involvement of platelet-derived growth factor in diabetic angiopathy. *Diabetes* 45:507-512, 1996.
- Inaba T, Kawamura M, Gotoda T, Harada K, Shimada M, Ohsuga J, Shimano H, Akanuma Y, Yazaki Y, Yamada N. Effects of platelet-derived growth factor on the synthesis of lipoprotein lipase in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:522-528, 1995.
- Ingram AJ. Mesangial cell signaling cascades in response to mechanical strain and glucose. *Kidney* 56:1721-1728, 1999.

Ishii H, Koya D, King GL. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med* 76:21-31, 1998.

Islam KN, Devaraj S, Jialal I. Alpha-tocopherol enrichment of monocytes decreases agonist-induced adhesion to human endothelial cells. *Circulation* 98:2255-2268, 1998.

Itakura H, Matsumoto A, Naganawa S, Ohkushi N, Itoh H, Ikemoto S. The effect of dietary oils on tissue-specific expression of apo A-1 mRNA in the rat. *Am NY Acad Sci* 598:352-355, 1990.

Itoh H, Doi K, Tanaka T, Fukunaga Y, Hosada K, Inoue G, Nishimura H, Yoshimasa Y, Yamori Y, Nakao K. Hypertension and insulin resistance: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:558-560, 1999.

Jackiewicz TA, McGeachie JK, Tennant M. Structural recovery of small arteries following clamp injury: a light and electron microscopic investigation in the rat. *Microsurgery* 17:674-680, 1996.

Jackson LA, Campbell LA, Schmidt RA, Kuo CC, Cappuccio AL, Lee MJ, Grayston JT. Specificity of detection of *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular atheroma: evaluation of the innocent bystander hypothesis. *Am J Pathol* 150:1785-1790, 1997.

Janka HU. Increased cardiovascular morbidity and mortality in diabetes mellitus: identification of high risk factors. *Diabetes Res Clin Pract* 30 (Suppl.):85-88, 1996.

Jansen H, Breedveld B, Schoonderwoerd K. Role of lipoprotein lipase in postprandial lipid metabolism. *Atherosclerosis* 141 Suppl 1:S31-34, 1998.

Jansen H, Hop W, van Tol A, Bruschke AVG, Birkenhäger JC. Hepatic lipase and lipoprotein lipase are not major determinants of the low density lipoprotein subclass pattern in human subjects with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 107:45-54, 1994.

Jarrett RJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and coronary heart disease: chicken, egg, or neither? *Diabetologia* 26:99-102, 1984.

Jarrett RJ, Shipley MJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and cardiovascular disease: putative association via common antecedents: further evidence from the Whitehall Study. *Diabetologia* 31:737-740, 1988.

Jarvi AE, Karlstrom BE, Granfeldt YE, Bjorck IE, Asp NG, Vessby BO. Improved glycemic control and lipid profile and normalized fibrinolytic activity on a low-glycemic index diet in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 22:10-18, 1999.

Jenkins DJA, Jenkins AL. Dietary therapy in non-insulin-dependent diabetes mellitus: spreading the nutrient load. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 631-638, 1996.

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

Jiang XC, Moulin P, Quinet E, Goldberg IJ, Yacoub LK, Agellon LB, Compton D, Schnitzer-Polokoff R, Tall AR. Mammalian adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer protein mRNA. *J Biol Chem* 266:4631-4639, 1991.

Jiang ZY, Towler HMA, Luthert P, Lightman S. Pathophysiology of diabetic retinopathy. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 719-727, 1996.

Jonasson L, Bondjers G, Hansson GK. Lipoprotein lipase in atherosclerosis: its presence in smooth muscle cells and absence from macrophages. *J Lipid Res* 28:437-445, 1987.

Jonasson L, Hansson GK, Bondjers G, Noe L, Etienne J. Interferon- $\gamma$  inhibits lipoprotein lipase in human monocyte-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1053:43-48, 1990.

Jong MC, Hendriks WL, van Vark LC, Dahlmans VE, Groener JE, Havekes LM. Oxidized VLDL induces less triglyceride accumulation in J774 macrophages than native VLDL due to an impaired extracellular lipolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:144-151, 2000.

Jovens J, Villabona C, Vilella E. Pattern of hyperlipoproteinemia in human nephrotic syndrome: Influence of renal failure and diabetes mellitus. *Nephron* 64:565-569, 1993.

Jovinge S, Ares MPS, Kallin B, Nilsson J. Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to Ox-LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1573-1579., 1996.

Juan CC, Fang VS, Kwok CF, PerngJC, Chou YC, Ho LT. Exogenous hyperinsulinemia causes insulin resistance, hyperendothelinemia, and subsequent hypertension in rats. *Metabolism* 48:465-471, 1999.

Jukema JW, van Boven AJ, Groenemeijer B, Zwinderman AH, Reiber JH, Bruschke AV, Henneman JA, Molhoek GP, Bruin T, Jansen H, Gagne E, Hayden MR, Kastelein JJ. The Asp9 Asn mutation in the lipoprotein lipase gene is associated with increased progression of coronary atherosclerosis. REGRESS Study Group, Interuniversity Cardiology Institute, Utrecht, The Netherlands. Regression Growth Evaluation Statin Study. *Circulation* 94:1913-1918, 1996.

Julien P, Gagne C, Murthy MR, Levesque G, Moorjani S, Cadelis F, Hayden MR, Lupien PJ. Dyslipidemia associated with heterozygous lipoprotein lipase mutations in the French-Canadian population. *Hum Mutat Suppl* 1:S148-153, 1998.

Julien P, Vohl MC, Gaudet D, Gagne C, Levesque G, Despres JP, Cadelis F, Brun LD, Nadeau A, Ven Murthy MR. Hyperinsulinemia and abdominal obesity affect the expression of hypertriglyceridemia in heterozygous familial lipoprotein lipase deficiency. *Diabetes* 46:2063-2068, 1997.

Jump DB, Clarke SD. Regulation of gene expression by dietary fat. *Ann Rev Nutr* 19:63-90, 1999.

Kagawa Y, Nishizawa M, Suzuki M, Miyatake T, Hammamoto T, Goto K, Motonaga E, Izumikawa H, Hirata H, Ebihara A. Eicosapolyenoic acid of serum lipids of japanese islanders with low incidence of cardiovascular diseases. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 28:441-453, 1982.

Kahn CR, Vicent D, Doria A. Genetics of non-insulin-dependent (typeII) diabetes mellitus. *Ann Rev Med* 47:509-531, 1996.

Kahn CR. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43:1066-1084, 1994.

Kalayoglou MV, Miranpuri GS, Golenbock DT, Byrne GI. Characterization of low-density lipoprotein uptake by murine macrophages exposed to chlamydia pneumoniae. *Microbes Infect* 1:409-418, 1999.

Kamanna VS, Pai R, Ha H, Kirschenbaum MA, Roh DD. Oxidized low-density lipoprotein stimulates monocyte adhesion to glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 55:2192-2202, 1999.

Kameoka K, Isotani H, Tanaka K, Kitaoka H, Ohsawa N. Impaired insulin secretion in Japanese diabetic subjects with an A-to-G mutation at nucleotide 8296 of the mitochondrial DNA in tRNA. *Diabetes Care* 21:2034-2035, 1998.

Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* 48:2398-2406, 1999.

Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham Study. *Circulation* 59:8-13, 1979.

Kannel WB. Lipids, diabetes and coronary artery disease: insights from the Framingham Study. *Am Heart J* 110:1100-1107, 1985.

Kannel WB. Range of serum cholesterol values in the population developing coronary artery disease. *Am J Cardiol* 76:69C-77C, 1995.

Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Ann Intern Med* 74:1-12, 1971.

Kaplan M, Aviram M. Oxidized LDL binding to a macrophage-secreted extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 237:271-276, 1997.

Kaplan M, Aviram M. Oxidized low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. *Clin Chem Lab Med* 37:777-787, 1999.

Karpe F, Olivecrona T, Olivecrona G, Samra JS, Summers LKM, Humphreys SM, Frayn KN. Lipoprotein lipase transport in plasma: role of muscle and adipose tissues in regulation of plasma lipoprotein lipase concentrations. *J Lipid Res* 39:2387-2393, 1998.

Karpe F, Olivecrona T, Walldius G, Hamsten A. Lipoprotein lipase in plasma after an oral fat load: relation to free fatty acids. *J Lipid Res* 33:974-984, 1992.

Karsten S, Schafer G, Schauder P. Cytokine production and DNA synthesis by human peripheral lymphocytes in response to palmitic, stearic, oleic, and linoleic acid. *J Cell Physiol* 16:15-22, 1994.

Katsuda S, Boyd HC, Fligner C, Ross R, Gown AM. Human atherosclerosis. III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. *Am J Pathol* 140:907-914, 1992.

Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, Depinho R, Charron MJ. Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* 377:151-155, 1995.

Katz SS, Shipley GG, Small DM. Physical chemistry of the lipids of human atherosclerotic lesions: demonstration of a lesion intermediate between fatty streaks and advanced plaques. *J Clin Invest* 58:200-211, 1976.

Kawada N, Mizogushi Y, Kobayashi K, Monna T, Morisawa S. Calcium-dependent prostaglandin biosynthesis by lipopolysaccharide-stimulated rat Kupffer Cells. *Prost Leuko Ess Fatty acids* 47:209-214, 1992.

Kawakami, Murase T, Ishibashi S, Mori N, Takaku F. Lipoprotein lipase in mouse peritoneal macrophages: the effects of insulin and dexamethasone. *J Biochem* 100:1373-78, 1986.

- Kawate R, Yamakido M, Nishimoto Y, Bennett PH, Hamman RF, Knowler WC. Diabetes mellitus and its vascular complications in Japanese migrants on the island of Hawaii. *Diabetes Care* 2:161-170, 1979.
- Kazumi T, Odaka H, Hozumi T, Ishida Y, Amano N, Yoshino G. Effects of dietary fructose or glucose on triglyceride production and lipogenic enzyme activities in the liver of wistar fatty rats, an animal model of NIDDM. *Endocr J* 44:239-245, 1997.
- Kellner-Weibel G, Geng YJ, Rothblat GH. Cytotoxic cholesterol is generated by the hydrolysis of cytoplasmic cholesteryl ester and transported to the plasma membrane. *Atherosclerosis* 146:309-319, 1999.
- Kelly DE, Mookan M, Mandarino LJ. Intracellular defects in glucose metabolism in obese patients with NIDDM. *Diabetes* 41:698-706, 1992.
- Kenny SJ, Aubert RE, Geiss LS. Prevalence and incidence of non-insulin-dependent diabetes. In *Diabetes in America*. 2nd ed. National Diabetes Data Group, Eds. Bethesda, MD, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, (NIH publ. no. 95-1468); 47-68, 1995.
- Kern PA. Potential role of TNF- $\alpha$  and lipoprotein lipase as candidate genes for obesity. *J Nutr* 127:1917S-1922S, 1997.
- Kern PA, Martin RA, Carty J, Goldberg IJ, Ong JM. Identification of lipoprotein lipase immunoreactive protein in pre- and postheparin plasma from normal subjects and patients with type I hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res* 31:17-26, 1990.
- Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 92:2111-2119, 1995.



Kestin M, Clifton P, Belling GB, Nestel PJ. n-3 fatty acids of marine origin lower systolic blood pressure and triglycerides but raise LDL cholesterol compared with n-3 and n-6 fatty acids from plants. *Am J Clin Nutr* 51:1028-1034, 1990.

Keys A, Menotti A, Aravanis C, Blackburn H, Djordevic BS, Buzina R, Dontas AS, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N. The seven countries study: 2,289 deaths in 15 years. *Prev Med* 13:141-154, 1984.

Kiens B, Lithell H, Kiens KJ. Effects of insulin and exercise on muscle lipoprotein lipase activity in man and its relation to insulin action. *J Clin Invest* 84:1124-29, 1989.

Kirchgessner TG, LeBoeuf RC, Langner CA, Zollman S, Chang CH, Taylor BA, Schotz MC, Gordon JI, Lusis AJ. Genetic and developmental regulation of the lipoprotein lipase gene: loci distal and proximal to the lipoprotein lipase structural gene control enzyme expression. *J Biol Chem* 264:1473-1482, 1989.

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* 87:9010-9014, 1990.

Klein R, Klein BEK. Vision disorders in diabetes. In: *Diabetes in America*. 2nd ed. Harris MI, Cowie CC, Reiber G, Boyko E, Stern M, Bennett P Eds. Washington DC, U.S. Govt. Printing Office 293-338, 1995.

Klein R. Kelly West Lecture 1994: hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care* 18:258-268, 1995.

Klingenspor M, Ebbinghaus C, Husshorst G, Stohr S, Spiegelhalter F, Haas K, Heldmaier G. Multiple regulatory steps are involved in the control of lipoprotein lipase activity in brown adipose tissue. *J Lipid Res* 37:1685-1695, 1996.

- Klouché M, Gottschling S, Gerl V, Hell W, Husmann M, Dorweiler B, Messner M, Bhakdi S. Atherogenic properties of enzymatically degraded LDL: selective induction of MCP-1 and cytotoxic effects on human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1376-1385, 1998.
- Knobler H, Savion N, Shenkman B, Kotev-Emeth S, Varon D. Shear-induced platelet adhesion and aggregation on subendothelium are increased in diabetic patients. *Thromb Res* 90:181-190, 1998.
- Knowler WC, Pettitt DJ, Bennett PH. Diabetes incidence in Pima Indians: contributions of obesity and parental and parental diabetes. *Am J Epidemiol* 113:144-156, 1981.
- Knowler WC, Williams RC, Pettitt DJ, Steinberg AG. Gm 3; 5,13, 14 and type 2 diabetes mellitus: an association in American Indians with genetic admixture. *Am J Hum Genet* 43:520-526, 1988.
- Keys A. Coronary heart disease, serum cholesterol, and the diet. *Acta Med Scand* 207:153-160, 1980.
- 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. *J Clin Invest* 90:439-446, 1992.
- Kishi Y, Schmelzer JD, Yao JK, Zollman PJ, Nickander KK, Tritschler HJ, Low PA. Alpha lipoic acid: effect on glucose uptake, sorbitol pathway, and energy metabolism in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 48:2045-2051, 1999.
- Kleinman JC, Donahue RP, Harris MI, Finucane FF, Madans JH, Brock DB. Mortality among diabetics in a national sample. *Am J Epidemiol* 128:389-401, 1988.
- Knudsen P, Eriksson J, Lahdenperä S, Kahri J, Groop L, Taskinen MR and the Botnia Study Group. Changes of lipolytic enzymes cluster with insulin resistance syndrome. *Diabetologia* 38:344-350, 1995.

- Knudsen P, Murtomaki S, Antikainen M, Ehnholm S, Lahdenpera S, Ehnholm C, Taskinen MR. The Asn-291→Ser and Ser-477→Stop mutations of the lipoprotein lipase gene and their significance for lipid metabolism in patients with hypertriglyceridaemia. *Eur J Clin Invest* 27:928-935, 1997.
- Knutson VP. The release of lipoprotein lipase from 3T3-L1 adipocytes is regulated by microvessel endothelial cells in an insulin-dependent manner. *Endocrinology* 141:693-701, 2000.
- Ko GT, Chan JC, Yeung VT, Chow CC, Li JK, Lau MS, MacKay IR, Rowley MJ, Zimmet P, Cockram CS. Antibodies to glutamic acid decarboxylase in young chinese diabetic patients. *Ann Clin Biochem* 35 (Pt 6):761-767, 1998.
- Kobayashi J, Tashiro J, Murano S, Morisaki N, Saito Y. Lipoprotein lipase mass and activity in post-heparin plasma from subjects with intra-abdominal visceral fat accumulation. *Clin Endocrinol* 48:515-520, 1998.
- Kohn RR, Schnider SL. Glycosylation of human collagen. *Diabetes* 31 (Suppl 3):47-51, 1982.
- Koopmans SJ, Kushwaha RS, DeFronzo RA. Chronic physiologic hyperinsulinemia impairs suppression of plasma free fatty acids and increases de novo lipogenesis but does not cause dyslipidemia in conscious normal rats. *Metabolism* 48:330-337, 1999.
- Kounnas MZ, Chappell DA, Strickland DA, Argraves WS. Glycoprotein 330, a member of the low density lipoprotein receptor family, binds lipoprotein lipase in vitro. *J Biol Chem* 268:14176-14181, 1993.
- Kowluru RA, Engerman RL, Kern TS. Diabetes-induced metabolic abnormalities in myocardium: effect of antioxidant therapy. *Free Radic Res* 32:67-74, 2000.
- Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47:859-866, 1998.
- Kraemer FB. Role of lipoprotein lipase and apolipoprotein E secretion by macrophages in modulating lipoprotein uptake. Possible role in acceleration of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes* 41 Suppl 2:77-80, 1992.

- Kraemer FB, Chen YD, Reaven GM. Hypertriglyceridemia and lipoprotein lipase activity in experimental uremia. *Nephron* 30:274-278, 1982.
- Krausz Y, Bar-On H, Shafir E. Origin and pattern of glucocorticoid-induced hyperlipidemia in rats: dose-dependent bimodal changes in serum lipids and lipoproteins and relation to hepatic lipogenesis and tissue lipoprotein lipase activity. *Biochim Biophys Acta* 663:69-82, 1981.
- Kreisberg JJ, Radnik RA, Ayo SH, Garoni J, Saikumar P. High glucose elevates c-fos and c-jun transcripts and proteins in mesangial cell cultures. *Kidney Int* 46:105-112, 1994.
- Krempler F, Breban D, Oberkofler H, Esterbauer H, Hell E, Paulweber B, Patsch W. Leptin, peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , and CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$  mRNA expression in adipose tissue of humans and their relation to cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:443-449, 2000.
- Kriska AM, LaPorte RE, Pettitt DJ, Charles MA, Nelson RG, Kuller LH, Bennett PH, Knowler WC. The association of physical activity with obesity, fat distribution and glucose tolerance in Pima Indians. *Diabetologia* 36:863-869, 1993.
- Kristal B, Shurtz-Swirskik R, Chezar J, Manster J, Levy R, Shapiro G, Weissman I, Shasha SM, Sela S. Participation of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 11:921-928, 1998.
- Kuo C, Campbell LA. Is infection with *Chlamydia pneumoniae* a causative agent in atherosclerosis? *Mol Med Today* 4:426-430, 1998.
- Kusari J, Verma US, Buse JB. Analysis of the gene sequences of the insulin receptor and the insulin-sensitive glucose transporter (GLUT-4) in patients with common type non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 88:1323-1330, 1991.
- Kuusisto J, Mykänen L, Pyörälä K, Laasko M. NIDDM and its metabolic control predict coronary heart disease events in elderly subjects. *Diabetes* 43:960-967, 1994.

- Kwoun MO, Ling PR, Ludon E, Imrich A, Qu Z, Palombo J, Bistrrian BR. Immunologic effects of acute hyperglycemia in nondiabetic rats. *J Parenter Enter Nutr* 21:91-95, 1997.
- Laakso M, Lehto S, Penttila I, Pyorala K. Lipids and lipoproteins predicting coronary heart disease mortality and morbidity in patients with non-insulin-dependent diabetes. *Circulation* 88:1421-1430, 1993.
- Laakso M. Insulin resistance and coronary heart disease. *Curr Opinion Lipidol* 7:217-226, 1996.
- Laasko M, Kuusisto J. Epidemiological evidence for the association of hyperglycemia and atherosclerosis vascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Med* 28:415-418, 1996a.
- Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schönbein GW. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 16:292-303, 1998.
- Ladu MJ, Kapsas H, Palmer WK. Regulation of lipoprotein lipase in muscle and adipose tissue during exercise. *J Appl Physiol* 71:404-409, 1991.
- Lala HP, Scoppola A, Motti C, Cortese C, Caccesse D, Menzinger G. Apolipoprotein E genotype and cholesterogenesis in polygenic hypercholesterolemia. *Metabolism* 47:97-100, 1998.
- Lalouel JM, Wilson DE, Iverius PH. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase: molecular and genetic aspects. *Curr Opin Lipidol* 3:86-95, 1992.
- Lamarche B, Lewis GF. Atherosclerosis prevention for the next decade: risk assessment beyond low density lipoprotein cholesterol. *Can J Cardiol* 14:841-851, 1998.
- Lang DA, Matthews DR, Burnett M, Turner RC. Brief, irregular oscillations of basal plasma insulin and glucose concentrations in diabetic man. *Diabetes* 30:435-439, 1981.

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

Leahy JL, Bonner-Weir S, Weir GC.  $\beta$ -cell dysfunction induced by hyperglycemia: Current ideas on mechanism of impaired glucose-induced insulin secretion. *Diabetes Care* 15:442-455, 1992.

Lebovitz HE. Oral antidiabetic agents. In: Kahn CR, Weir GC eds. *Joslin's Diabetes mellitus*, 13th ed, Lea & Febiger, Pennsylvania 508-529, 1994.

Lee SH, Woo HG, Kim JY, Moon CH. Augmentation effects of high glucose on endotoxin-induced nitric oxide production in murine macrophages. *Adv Exp Med Biol* 469:426-430, 1999a.

Lee C, Sigari F, Segrado T, Horkko S, Hama S, Subbaiah PV, Miwa M, Navab M, Witztum JL, Reaven PD. All apoB-containing lipoproteins induce monocyte chemotaxis and adhesion when minimally modified. Modulation of lipoprotein bioactivity by platelet-activating factor acetylhydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1437-1446, 1999.

Lefebvre AM, Peinado-Onsurbe J, Leitersdorf I, Briggs MR, Paterniti JR, Fruchart JC, Fievet C, Auwerx J, Steals B. Regulation of lipoprotein metabolism by thiazolidinediones occurs through a distinct but complementary mechanism relative to fibrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1756-1764, 1997.

Leger CL, Kadri-Hassani N. Modulation by some fatty acids of protein kinase C-dependent NADPH oxidase in human adherent monocyte: mechanism of action, possible implication in atherogenesis. *C R Seances Soc Biol Fil* 189:765-779, 1995.

Legrand A, Mayer EP, Dalvi SS, Nachtigal M. Transformation of rabbit vascular smooth muscle cells by human cytomegalovirus morphological transforming region 1. *Am J Pathol* 151:1387-1395, 1997.

- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *J Biol Chem* 270:12953-12956, 1995.
- Lehto S, Rönnemaa T, Haffner SM, Pyörälä K, Kallio V, Laakso M. Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. *Diabetes* 46:1354-1359, 1997.
- Leininger MT, Portocarrero CP, Houseknecht KL. Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$  expression in porcine white blood cells: dynamic regulation with acute endotoxemia. *Biochem Biophys Res Commun* 263:749-753, 1999.
- Lenhard JM, Lancaster ME, Paulik MA, Weiel JE, Binz JG, Sundseth SS, Gaskill BA, Lightfoot RM, Brown HR. The RXR agonist LG100268 causes hepatomegaly, improves glycaemic control and decreases cardiovascular risk and cachexia in diabetic mice suffering from pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. *Diabetologia* 42:545-554, 1999.
- Lerman A, Burnett JC Jr. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* 86:III12-19, 1992.
- Leslie RD. United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS): what now or so what? *Diabetes Metab Res Rev* 15:65-71, 1999.
- Levy RI. Declining mortality in coronary heart disease. *Arteriosclerosis* 1:312-325, 1981.
- Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Weller B, Steiner G. Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. *J Clin Invest* 95:158-166, 1995.
- Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation* 96:4095-4103, 1997.
- Libby P, Hansson GK. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest* 64:5-15, 1991.

- Libby P, Warner SJC, Salomon RN, Birinyi LK. Production of platelet-derived growth factor-like mitogen by smooth muscle cells from human atheroma. *N Engl J Med* 318:1493-1498, 1988.
- Lithell H, Boberg J, Hellsing K, Lundqvist G, Vessby B. Lipoprotein-lipase activity in human skeletal muscle and adipose tissue in the fasting and the fed states. *Atherosclerosis* 30:89-94, 1978.
- Littorin B, Sundkvist G, Hagopian W, Landin-Olsson M, Lernmark A, Östman J, Arnqvist HJ, Blohmé G, Bolinder J, Eriksson JW, Lithner F, Scherstén B, Wibell L. Islet cell and glutamic acid decarboxylase antibodies present at diagnosis of diabetes predict the need for insulin treatment. *Diabetes Care* 22:409-412, 1999.
- Liu J, Kazakoff K, Pour PM, Adrian TE. The intracellular mechanism of insulin resistance in the hamster pancreatic ductal adenocarcinoma model. *Pancreas* 17:359-366, 1998.
- Llorente-Cortes V, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:738-746, 1998.
- Lookene A, Savonen R, Olivecrona G. Interaction of lipoproteins with heparan sulfate proteoglycans and with lipoprotein lipase. Studies by surface plasmon resonance technique. *Biochemistry* 36:5267-5275, 1997.
- Lorenzi M. Glucose toxicity in the vascular complications of diabetes: the cellular perspective. *Diabetes Metab Rev* 8:85-103, 1992.
- Lorenzo A, Razzaboni B, Weir GC, Yankner BA. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature* 368:756-760, 1994.
- Losonczy KG, Harris TB, Havlik RJ. Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of all-cause and coronary disease mortality in older persons: the Established Populations for Epidemiologic Studies of the Elderly. *Am J Clin Nutr* 64:190-195, 1996.
- Lougheed M, Zhang HF, Steinbrecher UP. Oxidized low density lipoprotein is resistant to cathepsins and accumulates within macrophages. *J Biol Chem* 266:14519-14525, 1991.



- Lowe GDO, Fowkes FGR, Dawes J, Donnan PT, Lennie SE, Housley E. Blood viscosity, fibrinogen and activation of coagulation and leukocytes in peripheral arterial disease and the normal population in the Edinburgh artery study. *Circulation* 87:1915-1920, 1993.
- Lowe LP, Liu K, Greenland P, Metzger BE, Dryer AR, Stamler J: Diabetes, asymptomatic hyperglycemia, and 22-year mortality in black and white men: The Chicago Heart Association Detection Project in Industry study. *Diabetes Care* 20:163-169, 1997.
- Luo J, Rizkalla SW, Vidal H, Oppert JM, Colas C, Boussairi A, Guerre-Milo M, Chapuis AS, Chevalier A, Durand G, Slama G. Moderate intake of n-3 fatty acids for 2 months has no detrimental effect on glucose metabolism and could ameliorate the lipid profile in type 2 diabetic men. Results of a controlled study. *Diabetes Care* 21:717-724, 1998.111.
- Ma J, Folsom AR, Lewis L, Eckfeld JH. Relation of plasma phospholipid and cholesterol ester fatty acid composition to carotid artery intima-media thickness. The Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr* 65:551-559, 1997.
- Ma Y, Wilson BI, Bijovoet S, Henderson HE, Cramb E, Roederer G, Ven Murthy MR, Julien P, Bakker HD, Kastelein JJ. A missense mutation (Asp250Asn) in exon 6 of the human lipoprotein lipase gene causes chylomicronemia in patients of different ancestries. *Genomics* 13:649-653, 1992.
- Ma YH, Burin T, Tuzgol S, Wilson BI, Roederer G, Liu MS, Davignon J, Kastelein JJ, Brunzell JD, Hayden MR. Two naturally occurring mutations at the first and second bases of codon aspartic acid 156 in the proposed catalytic triad of human lipoprotein lipase. In vivo evidence that aspartic acid 156 is essential for catalysis. *J Biol Chem* 267:1918-1923, 1992.
- Maheux P, Azhar S, Kern PA, Chen YD, Reaven GM. Relationship between insulin-mediated glucose disposal and regulation of plasma and adipose tissue lipoprotein lipase. *Diabetologia* 40:850-858, 1997.
- Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH. Homocysteine as a risk factor for vascular disease: enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2074-2081, 1997.

- Makita T, Tanaka A, Nakano T, Nakajima K, Numano F. Importance of glycation in the acceleration of low density lipoprotein uptake into macrophages in patients with diabetes mellitus. *Int Angiol* 18:149-153, 1999.
- Makoveichuk E, Lookene A, Olivecrona G. Mild oxidation of lipoproteins increases their affinity for surfaces covered by heparan sulfate and lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun* 252:703-710, 1998.
- Mamleeva FR, Efendieva JB, Nikitin YP. Dietary fat and disease patterns in Chukotka Native adults. *In J Circumpolar Health* 57 Suppl 1:325-328,1998.
- Mamputu JC, Desfaits AC, Renier G. Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *J Lipid Res* 38:1722-1729, 1997.
- Mamputu JC, Renier G. Differentiation of human monocytes to monocyte-derived macrophages is associated with increased lipoprotein lipase-induced tumor necrosis factor- alpha expression and production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:1405-1411, 1999.
- Mann WA, Meyer N, Berg D, Greten H, Beisiegel U. Lipoprotein lipase compensates for the defective function of apo E variants in vitro by interacting with proteoglycans and lipoprotein receptors. *Atherosclerosis* 145:61-19, 1999.
- Marcovina SM, Koschinsky ML. Lipoprotein (a) as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 82:57U-66U, 1998.
- Markovic TP, Jenkins AB, Campbell LV, Furler SM, Kraegen EW, Chisholm DJ. The determinants of glycemic responses to diet restriction and weight loss in obesity and NIDDM. *Diabetes Care* 21:687-694, 1998.
- Martin JD, Yidegiligne HM. Diabetes mellitus in the First Nations population of British Columbia, Canada. *Int J Circumpolar Health* 57 suppl 1:335-339, 1998.
- Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J. Macrophages in human atheroma contain PPAR $\gamma$ : differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )

- expression and reduction of MMP-9 activity through PPAR $\gamma$  activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol* 153:17-23, 1998.
- Mas JL. Prévention des infarctus cérébraux liés à l'athérosclérose. *Arch Mal Coeur Vais* 91(V):65-73, 1998.
- Mason TM, Goh T, Tchipashvili V, Sandhu H, Gupta N, Lewis GF, Giacca A. Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. *Diabetes* 48:524-530, 1999.
- Massaro M, Carluccio MA, De Caterina R. Direct vascular antiatherogenic effects of oleic acid: a clue to the cardioprotective effects of the Mediterranean diet. *Cardiologia* 44:507-513, 1999.
- Massi-Benedetti M, Federici MO. Cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: the role of hyperglycemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107 Suppl 4:S120-S123, 1999.
- Massy ZA, Keane WF. Pathogenesis of atherosclerosis. *Semin Nephrol* 16:12-20, 1996.
- Mather KJ, Kwan F, Corenblum B. Hyperinsulinemia in polycystic ovary syndrome correlates with increased cardiovascular risk independent of obesity. *Fert Steril* 73:150-156, 2000.
- Matschinsky FM. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic  $\beta$ -cells and hepatocytes. *Diabetes* 39:647-652, 1990.
- Matschinsky FM, Liang Y, Kesavan P, Wang L, Froguel P, Velho G, Cohen D, Permutt MA, Tanizawa Y, Jetton TL. Glucokinase as pancreatic  $\beta$  cell glucose sensor and diabetes gene. *J Clin Invest* 92:2092-2098, 1993.
- Mattson FH, Grundy SM. Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J Lipid Res* 26:194-202, 1985.
- Mattsson Hultén L, Lindmark H, Diczfalusy U, Björkhen I, Ottoson M, Liu Y, Bondjers G, Wiklund O. Oxysterols present in atherosclerotic tissue decrease the expression of lipoprotein lipase messenger RNA in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 97:461-468, 1996.

- May Y, Henderson HE, Murthy V. A mutation in the human lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in French Canadians. *N Engl J Med* 324:1761-1766, 1991.
- Mc Lenachan JM, Williams JK, Fish RD, Ganz P, Selwyn AP. Loss of flow-mediated endothelium-dependent dilation occurs early in the development of atherosclerosis. *Circulation* 84:1273-1278, 1991.
- McClain DA, Henry RR, Ulrich A, Olefsky JM. Restriction-fragment-length polymorphism in insulin-receptor gene and insulin resistance in NIDDM. *Diabetes* 37:1071-1075, 1988.
- Medh JD, Bowen SL, Fry GL, Ruben S, Andracki M, Inoue I, Lalouel JM, Strickland DK, Chappell DA. Lipoprotein lipase binds to low density lipoprotein receptors and induces receptor-mediated catabolism of very low density lipoproteins in vitro. *J Biol Chem* 271:17703-17080, 1996.
- Meigs JB, Mittleman MA, Nathan DM, Tofler GH, Singer DE, Murphy-Sheehy PM, Lipinska I, D'Agostino RB, Wilson PW. Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: the Framingham Offspring Study. *JAMA* 283:221-228, 2000.
- Mekki N, Christofilis MA, Charbonnier M, Atlan-Gepner C, Defoort C, Juhel C, Borel P, Portugal H, Pauli AM, Vialettes B, Lairon D. Influence of obesity and body fat distribution on postprandial lipemia and triglyceride-rich lipoproteins in adult women. *J Clin Endocrinol Metab* 84:184-191, 1999.
- Mellish JE, Iverson SJ, Bowen WD, Hammill MO. Fat transfer and energetics during lactation in the hooded seal: the roles of tissue lipoprotein lipase in milk fat secretion and pup deposition. *J Comp Physiol* 169:377-390, 1999.
- Melnick JL, Adam E, Debaque ME. Cytomegalovirus and atherosclerosis. *Eur Heart J* 14:Suppl K30-38, 1993.

Melvin DR, Marsh BJ, Walmsley AR, James DE, Gould GW. Analysis of amino and carboxy terminal GLUT-4 targeting motifs in 3T3-L1 adipocytes using an endosomal ablation technique. *Biochemistry* 38:1456-1462, 1999.

Merat S, Casanada F, Sutphin M, Palinski W, Reaven PD. Western diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by a fructose-rich diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1223-30, 1999.

Merkel M, Kako Y, Radner H, Cho IS, Ramasamy R, Brunzell JD, Goldberg IJ, Breslow JL. Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases very low density lipoprotein uptake: direct evidence that lipoprotein lipase bridging occurs in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13841-13846, 1998.

Mero N, Suurinkeroinen L, Syvanne M, Knudsen P, Yki-Jarvinen H, Taskinen MR. Delayed clearance of postprandial large TG-rich particles in normolipidemic carriers of LPL Asn291Ser gene variant. *J Lipid Res* 40:1663-1670, 1999.

Metcalf PA, Folsom AR, Davis CE, Wu KK, Heiss G. Haemostasis and carotid artery wall thickness in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 47:25-35, 2000.

Milburn JL, Hirose H, Lee YH, Nagasawa Y, Ogawa A, Ohneda M, Beltrandel Rio H, Newgard CB, Johnson JH, Unger H. Pancreatic  $\beta$ -cells in obesity: evidence for induction of functional, morphologic and metabolic abnormalities by increased long-chain fatty acids. *J Biol Chem* 270:1295-1299, 1995.

Miles PD, Barak Y, He W, Evans RM, Olefsky JM. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR- $\gamma$  deficiency. *J Clin Invest* 105:287-292, 2000.

Min C, Kang E, Yu SH, Shinn SH, Kim YS. Advanced glycation end products induce apoptosis and procoagulant activity in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes Res Clin Pract* 46:197-202, 1999.

- Mingrone G, Henriksen FL, Greco AV, Krogh LN, Capristo E, Gastaldelli A, Castagneto M, Ferrannini E, Gasbarrini G, Beck-Nielsen H. Triglyceride-induced diabetes associated with familial lipoprotein lipase deficiency. *Diabetes* 48:1258-1263, 1999.
- Minnich A, Baloukas J, Roederer G, Lussier-Cacan S, Davignon J, Genest J Jr. Lipoprotein lipase gene mutations in coronary artery disease. *Can J Cardiol* 14:711-716, 1998.
- Moazed TC, Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA. Murine models of *Chlamydia pneumoniae* infection and atherosclerosis. *J Infect Dis* 175:883-890, 1997.
- Moazed TC, Kuo CC, Patton DL, Grayston JT, Campbell LA. Experimental rabbit models of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Am J Pathol* 148:667-676, 1996.
- Mohamed N, Douley J. Gestational diabetes and subsequent development of NIDDM in aboriginal women of northwestern Ontario. *Int J Circumpolar Health* 57 suppl 1:355-358, 1998.
- Mohan V, Deepa R, Bhatia E, Singh AK, Hitman GA, Zimmet PZ, MacKay IR. Antibodies to pancreatic islet cell antigens in diabetes seen in Southern India with particular reference to fibrocalculous pancreatic diabetes. *Diabet Med* 15:156-159, 1998.
- Mohan V, Snehalatha C, Ramachandran A, Jayashree R, Viswanathan M. Pancreatic beta-cell function in tropical pancreatic diabetes. *Metabolism* 32:1091-1092, 1983.
- Mohan V, Vijayaprabha R, Rema M, Premalatha G, Poongothai S, Deepa R, Bhatia E, Mackay IR, Zimmet P. Clinical profile of lean NIDDM in South India. *Diabetes Res Clin Pract* 38:101-108, 1997.
- Moller AM, Dalgaard LT, Ambye L, Hansen L, Schmitz O, Hansen T, Pederson O. A novel Phe75fsdelT mutation in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in a Danish pedigree with maturity-onset diabetes of the young. *J Clin Endocrinol Metab* 84(1):367-369, 1999.
- Moncada S, Whittle BJ. Biological actions of prostacyclin and its pharmacological use in platelet studies. *Adv Exp Med Biol* 192:337-358, 1985.

- Mori N, Gotoda T, Ishibashi S, Shimano H, Harada K, Inaba T, Takaku F, Yazaki Y, Yamada N. Effects of human recombinant macrophage colony-stimulating factor on the secretion of lipoprotein lipase from macrophages. *Arterioscler Thromb* 11:1315-1321, 1991.
- Moriwaki H, Kume N, Kataoka H, Murase T, Nishi E, Sawamura T, Masaki T, Kita T. Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human and murine macrophages: upregulated expression by TNF- $\alpha$ . *FEBS Lett* 440:29-32, 1998.
- Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F. Glucose-dependent interleukin-6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. *Diabetes* 45:954-959, 1996.
- 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.
- Morrison N, Dooley J. The Sioux Lookout Program: diabetes prevention and management in northwestern Ontario. *Int J Circumpolar Health* 57 Suppl 1:364-369, 1998.
- Morwessel NJ. The genetic basis of diabetes mellitus. *AACN Clin Issues* 9:539-554, 1998.
- Mruk JS, Webster MWI, Heras M, Reid JM, Grill DE, Chesebro JH. Flavone-8-acetic acid (flavonoid) profoundly reduces platelet-dependent thrombosis and vasoconstriction after deep arterial injury in vivo. *Circulation* 101:324-328, 2000.
- Mulder M, Lombardi P, Jansen H, van Berkel TJ, Frants RR, Havekes LM. Heparan sulphate proteoglycans are involved in the lipoprotein lipase-mediated enhancement of the cellular binding of very low density and low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 185:582-587, 1992.
- Mune M, Yukawa S, Kishino M, Otani H, Kimura K, Nishikawa O, Takahashi T, Kodama N, Saika Y, Yamada Y. Effects of vitamin E on lipid metabolism and atherosclerosis in ESRD patients. *Kidney Int* 56 Suppl 71:S126-129, 1999.

- Murohara T, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Yasue H. Cigarette smoke extracts contracts isolated porcine coronary arteries by superoxide anion-mediated degradation of EDRF. *Am J Physiol* 266:H 874-H 880, 1994.
- Nadler JL, Winer L. Free radicals, nitric oxide, and diabetic complications. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 840-847, 1996.
- Nakamura N, Hamazaki T, Kobayashi M, Ohta M, Okuda K. Effects of eicosapentaenoic acids on remanant-like particles, cholesterol concentrations and plasma fatty acid composition in patients with diabetes mellitus. *In Vivo* 12:311-314, 1998.
- Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the Apo-Edeficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:842-851, 1998.
- Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 100:2680-2690, 1997.
- Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D'armiento FP, Palinski W. Influence of maternal hypercholesterolemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet* 354(9186)1234-1241, 1999.
- Natarajan R, Gonzales N, Lanting L, Nadler J. Role of the lipoxygenase pathway in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hyperthrophy. *Hypertension* 23(1 Suppl):I 142-147, 1994.
- Natarajan R, Rosdahl J, Gonzales N, Bai W. Regulation of 12-lipoxygenase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 30:873-879, 1997.
- Nathan DM. Prevention of long-term complications of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Invest Med* 18:332-339, 1995.



- Naylor CD, Chen E. Population-wide mortality trends among patients hospitalized for acute myocardial infarction: The Ontario experience 1981-1991. *J Am Coll Cardiol* 24:1431-1438, 1994.
- Negre-Salvayre A, Alomar Y, Trolly M. Ultraviolet-treated lipoproteins as a model system for the study of the biological effects of lipid peroxides on cultured cells. III: the protective effects of antioxidants (probucol, catechi, vitamin E) against cytotoxicity of LDL occurs in two different ways. *Biochim Biophys Acta* 1096:291-300, 1991.
- Negri M, Sheiban I, Arigliano PL, Tonnis S, Montresor G, Carlini S, Manzato F. Interrelation between angiographic severity of coronary artery disease and plasma levels of insulin, C-peptide and plasminogen activator inhibitor-1. *Am J Cardiol* 72:397-401, 1993.
- Nesher R, Gross DJ, Donath MY, Cerasi E, Kaiser N. Interaction between genetic and dietary factors determines beta-cell function in *Psammomys obesus*, an animal model of type 2 diabetes. *Diabetes* 48:731-737, 1999.
- Newby AC, Zaltsman AB. Fibrous cap formation or destruction-the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res* 41:345-360, 1999.
- Nicholson AC, Hajjar DP. Herpesviruses and thrombosis: activation of coagulation on the endothelium. *Clin Chim Acta* 286:23-29, 1999.
- Nicholson AC, Hajjar DP. Herpesviruses in atherosclerosis and thrombosis. Etiologic agents or ubiquitous bystanders? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:339-348, 1998.
- Nomura T, Hagino Y, Gotoh M, Iguchi A, Sakamoto N. The effects of streptozotocin diabetes on tissue specific lipase activities in the rat. *Lipids* 19:594-599, 1984.
- Nordesgaard BG, Abildgaard S, Wittrup HH, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A. Heterozygous lipoprotein lipase deficiency: frequency in the general population, effect on plasma lipid levels, and risk of ischemic heart disease. *Circulation* 96:1737-1744, 1997.
- Nordestgaard BG, Nielsen LB. Arteriosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 5:252-257, 1994.

- Norman RA, Bogardus C, Ravussin E. Linkage between obesity and a marker near the tumor necrosis factor- $\alpha$  locus in Pima indians. *J Clin Invest* 96:158-162, 1995.
- Nosadini R, Abaterruso C, Dalla Vestra M, Bortoloso E, Saller A, Bruseghin M, Sfriso A, Trevisan M. Efficacy of antihypertensive therapy in decreasing renal and cardiovascular complications in diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 13 Suppl 8:44-48, 1998.
- Nygård O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 337:230-236, 1997.
- O'Brien KD, Gordon D, Deeb S, Ferguson M, Chait A. Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 89:1544-1550, 1992.
- Obunike JC, Paka S, Pillarisetti S, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase can function as a monocyte adhesion protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1414-1420, 1997.
- Obunike JC, Pillarisetti S, Paka L, Kako Y, Butteri MJ, Ho YY, Wagner WD, Yamada N, Mazzone T, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ. The heparin-binding proteins apolipoprotein E and lipoprotein lipase enhance cellular proteoglycan production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:111-118, 2000.
- Obunike JC, Sivaram P, Pkac L, Low MG, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase degradation by adipocytes: receptor-associated protein (RAP)-sensitive and proteoglycan-mediated pathways. *J Lipid Res* 37:2439-2449, 1996.
- Ogorelkova M, Gruber A, Utermann G. Molecular basis of congenital lp (a) deficiency: a frequent apo (a) null mutation in caucasians. *Hum Mol Genet* 8:2087-2096, 1999.
- Ohlsson BG, Englund MC, Karlsson AL, Knutsen E, Erixon C, Skribeck H, Liu Y, Bondjers G, Wiklund O. Oxidized low density lipoprotein inhibits lipopolysaccharide-induced binding of nuclear factor-kappa B to DNA and the subsequent expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  in macrophages. *J Clin Invest* 98:78-89, 1996.

- Ohni M, Mishima K, Nakajima K, Yamamoto M, Hata Y. Serum triglycerides and blood coagulation factors VII and X, and plasminogen activator inhibitor-1. *J Atheroscler Thromb* 2 Suppl 1:S41-46, 1995.
- Ohno T, Kiton J, Yamashita K, Ichikawa Y, Hori F, Terada M, Tanaka S, Namikawa T. Toxin-induced IDDM (insulin dependent diabetes mellitus) in the musk shrew. *Life Sci* 63:455-462, 1998.
- Olansky L, Welling C, Gidding S. A variant insulin promotor in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 98:1596-1602, 1992.
- Olivecrona G, Olivecrona T. Clearance of artificial triacylglycerol particles. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1:143-151, 1998.
- Olivecrona T, Bengtsson G. Lipoprotein lipase. In: *Lipases*. Borgstrom B, Brockman H eds. Elsevier. Amsterdam p206-261, 1984.
- Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Curr Opin Lipidol* 1:187-196, 1993.
- Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase and hepatic liapse. *Curr Opinion Lipidol* 1:222-230, 1990.
- Olivecrona T, Bergö M, Hultin M, Olivecrona G. Nutritional regulation of lipoprotein lipase. *Can J Cardiol* 11 (Suppl):73G-78G, 1995.
- O'looney p, Vander Maten M, Vahouny GV. Insulin-mediated modifications of myocardial lipoprotein lipase and lipoprotein metabolism. *J biol Chem* 258:12994-13001, 1983.
- Olsson U, Bondjers G, Camejo G. Fatty acids modulate the composition of extracellular matrix in cultured human arterial smooth muscle cells by altering the expression of genes for proteoglycan core proteins. *Diabetes* 48:616-622, 1999.
- Omenn GS, Beresford SAA, Motulsky AG. Preventing coronary heart disease: B vitamins and homocysteine. *Circulation* 97:421-424, 1998.

Ong JM, Kern PA. Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J Clin Invest* 84:305-311, 1989a.

Ong JM, Kern PA. The role of glucose and glycosylation in the regulation of lipoprotein lipase synthesis and secretion in rat adipocytes. *J Biol Chem* 264:3177-82, 1989.

Ong JM, Simsolo RB, Saffari B, Kern PA. The regulation of lipoprotein lipase gene expression by dexamethasone in isolated rat adipocytes. *Endocrinology* 130:2312-2316, 1992.

Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S, Lowe JE, Abdel-Aleem S. Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism* 48:1414-1417, 1999.

Orchard TJ. Glycemic control and CAD risk: a heretical thought. *Diabetes Care* 22:1220, 1999.

Ornish D, Brown SE, Schewitz LW, Billings JH, Armstrong WT, Ports TA, McLanahan SM, Kirkeeide RL, Brand RJ, Gould KL. Can lifestyle changes reverse coronary heart disease? The Lifestyle heart Trial. *Lancet* 336:129-133, 1990.

Owens GK, Wise G. Regulation of differentiation/maturation in vascular smooth muscle cells by hormones and growth factors. *Agents Actions Suppl* 48:3-24, 1997.

Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 75:487-517, 1995.

Padines-Figueres A, Vannier C, Ailhaud G. Short-term stimulation by insulin of lipoprotein lipase secretion in adipose cells. *Biochem Biophys Res Commun* 154:982-990, 1988.

Palkama T. Induction of interleukin-1 production by ligands binding to the scavenger receptor in human monocyte and th THP-1 cell line. *Immunology* 74:432-438, 1991.

Pampfer S, Cordi S, Dutrieux C, Vanderheyden I, Marchand C, De Hertogh R. Interleukin-1 $\beta$  mediates the effect of high D-glucose on the secretion of TNF- $\alpha$  by mouse uterine epithelial cells. *Cytokine* 11:500-509, 1999.

- Pandit MK, Burke J, Gustafson AB, Minocha A, Peiris AN. Drug-induced disorders of glucose tolerance. *Ann Intern Med* 118:529-539, 1993.
- Pan WH, Cedress LB, Liu K, Dyer A, Schoenberger JA, Shekelle RB, Stamler R, Smith D, Collette P, Stamler J. Relationship of clinical diabetes and asymptomatic hyperglycemia to risk of coronary heart disease mortality in men and women. *Am J Epidemiol* 123:504-516, 1986.
- Paolisso G, Esposito R, D'Alessio MA, Barbieri M. Primary and secondary prevention of atherosclerosis: is there a role for antioxidants? *Diabetes Metab* 25:298-306, 1999.
- Park C, Kim JR, Shim JK, Kang BS, Park YG, Nam KS, Lee YC, Kim CH. Inhibitory effects of streptozotocin, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleukin-1 $\beta$  on glucokinase activity in pancreatic islets and gene expression of GLUT2 and glucokinase. *Arch Biochem Biophys* 15;362:217-224, 1999a.
- Park JS, Park JH, Kang JY, Yang WS, Kim SB, Park SW, Park SJ. Hyperfibrinogenemia is an independent risk factor for atherosclerotic renal artery stenosis. *Am J Nephrol* 19:649-654, 1999.
- Parthasarathy S, Printz DJ, Boyd D, Joy L, Steinberg D. Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by scavenger receptor. *Arteriosclerosis* 6:505-510, 1986.
- Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activators. *Circulation* 25:235-238, 2000.
- Patricia MK, Kim JA, Harper CM, Shih PT, Berliner JA, Natarajan R, Nadler JL, Hedrick CC. Lipoxigenase products increase monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2615-2622, 1999.
- Patsch J. Influence of lipolysis on chylomicron clearance and HDL cholesterol levels. *Eur Heart J* 19 Suppl H:H2-H6, 1998.

- Peinado-Onsurbe J, Steals B, Deeb S, Auwerx J. Lipoprotein lipase expression in undifferentiated hepatoma cells is regulated by progesterone and protein kinase A. *Biochemistry* 31:10121-10128, 1992.
- Pellicano R, Broutet N, Ponzetto A, Megraud F. Helicobacter pylori: from the stomach to the heart. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 11:1335-1337, 1999.
- Peterson J, Bihain BE, Bentsson-Olivecrona G, Deckelbaum RJ, Carpentier Y, Olivecrona T. Fatty acid control of lipoprotein lipase: a link between energy metabolism and lipid transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:909-913, 1990.
- Phillips C, Murugasu G, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH. Improved metabolic control reduces the number of postprandial apolipoprotein B-48-containing particles in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 148:283-291, 1999.
- Picard F, Naimi N, Richard D, Deshaies Y. Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes* 48:452-459, 1999.
- Pi-Sunyer FX, Maggio CA, McCarron DA, Reusser ME, Stern JS, Haynes RB, Oparil S, Kris-Etherton P, Resnick LM, Chait A, Morris CD, Hatton DC, Metz JA, Snyder GW, Clark S, McMahon M. Multicenter randomized trial of a comprehensive prepared meal program in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22:191-197, 1999.
- Pineda Torra I, Gervois P, Steals B. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging. *Curr Opin Lipidol* 10:151-159, 1999.
- Plutzky J. Atherosclerotic plaque rupture: emerging insights and opportunities. *Am J Cardiol* 84(1A):15J-20J, 1999.
- Pociot F, Norgaard K, Hobolth N, Andersen O, Nerup J. A nationwide population-based study of the familial aggregation of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in Denmark. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Diabetologia* 36:870-875, 1993.

Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest* 103:1547-1560, 1999.

Pollare T, Vessby B, Lithell H. Lipoprotein lipase activity in skeletal muscle is related to insulin sensitivity. *Arterioscler Thromb* 11:1192-1203, 1991.

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.

Postic C, Shiota M, Niswender KD, Jetton TL, Chen Y, Moates JM, Shelton KD, Linder J, Cherrington AD, Magnuson MA. Dual role for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J Biol Chem* 274:305-315, 1999.

Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H. Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance-a population-based twin study. *Diabetologia* 42:139-145, 1999.

Previato L, Parrott CL, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr. Transcriptional regulation of the human lipoprotein lipase gene in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 266:18958-18963, 1991.

Prochazka M, Lillioja S, Tait JF, Knowler WC, Mott DM, Spraul M, Bennett PH, Bogardus C. Linkage of chromosomal markers on 4q with a putative gene determining maximal insulin action in Pima Indians. *Diabetes* 42:514-519, 1993.

Prohaszka Z, Duba J, Lakos G, Kiss E, Varga L, Janoskuti L, Czaszar A, Karadi I, Nagy K, Singh M, Romics L, Fust G. Antibodies against human heat-shock protein (HSP) 60 and mycobacterial hsp65 differ in their antigen specificity and complement-activating ability. *Int Immunol* 11:1363-1370, 1999.

Pruneta V, Pulcini T, Lalanne F, Marcais C, Berthezene F, Ponsin G, Moulin P. VLDL-bound lipoprotein lipase facilitates the cholesterol ester transfer protein-mediated transfer of cholesteryl esters from HDL to VLDL. *J Lipid Res* 40:2333-2339, 1999.

Pugliese G, Tilton RG, Speedy A, Santarelli E, Eades DM, Province MA, Kilo C, Sherman WR, Williamson JR. Modulation of hemodynamics and vascular filtration changes in diabetic rats by dietary myoinositol. *Diabetes* 39:312-322, 1990.

Pyorala K, Laasko M, Uusistupa M. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev* 3:463-524, 1987.

Qi C, Pekala PH. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance in adipocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 223:128-135, 2000.

Quinones-Galvan A, Sironi AM, Baldi S, Galetta F, Garbin U, Fratta-Pasini A, Cominacini L, Ferrannini E. Evidence that acute insulin administration enhances LDL cholesterol susceptibility to oxidation in healthy humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2928-2932, 1999.

Rabini RA, Tesei M, Galeazzi T, Dousset N, Ferretti G, Mazzanti L. Increased susceptibility to peroxidation of VLDL from non-insulin-dependent diabetic patients: a possible correlation with fatty acid composition. *Mol Cell Biochem* 199:63-67, 1999.

Radermecker R, Scheen AJ, Letiexhe MR, Lefebvre PJ, De Mol P. Viral implications in the etiopathogenesis of type I diabetes: current update. *Rev Med Liege* 53:597-602, 1998.

Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 69:S30-S37, 1993.

Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, Tripathi S, Laufs U, Tripathi J, Chai NN, Xu XP, Jovinge S, Shah PK, Libby P. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 274:11924-11929, 1999a.

Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, Meisel S, Xu XO, Chai NN, Fishbein MC, Kaul S, Cercek B, Sharifi B, Shah PK. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation* 99:3103-3109, 1999.



- Ramos P, Martin-Hidalgo A, Herrera E. Insulin-induced up-regulation of lipoprotein lipase messenger ribonucleic acid and activity in mammary gland. *Endocrinology* 140:1089-1093, 1999.
- Rand ML, Sangar W, Hancock MA, Taylor DM, Marcovina SM, Packam MA, Kosschinsky ML. Apolipoprotein (a) enhances platelet responses to the thrombin receptor-activating peptide SFLLRN. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1393-1399, 1998.
- Rangan GK, Wang Y, Tay YC, Harris DC. Inhibition of Nf $\kappa$ B activation with antioxidants is correlated with reduced cytokine transcription in PTC. *Am J Physiol* 277(5 Pt 2):F779-789, 1999.
- Ranganathan G, Kaakaji R, Kern PA. Role of protein kinase C in the translational regulation of lipoprotein lipase in adipocytes. *J Biol Chem* 274:9122-9127, 1999.
- Ranganathan G, Kern PA. In vitro transcription and translation of lipoprotein lipase. *Methods Mol Biol* 109:337-341, 1999.123
- Ranganathan G, Vu D, Kern PA. Translational regulation of lipoprotein lipase by epinephrine involves a trans-acting binding protein interacting with 3' untranslated region. *J Biol Chem* 272:2515-2519, 1997.
- Ranganathan S, Kern PA. Thiazolidinediones inhibit lipoprotein lipase activity in adipocytes. *J Biol Chem* 273:26117-26122, 1998.
- Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* 70:593-, 1992.
- Raspe E, Madsen L, Lefebvre AM, Leitersdorf I, Gelman L, Peinado-Onsurbe J, Dallongeville J, Fruchart JC, Berge R, Steals B. Modulation of rat liver apolipoprotein gene expression and serum lipid levels by tetradecylthioacetic acid (TTA) via PPAR $\alpha$  activation. *J Lipid Res* 40:2099-2110, 1999.
- Ravandi A, Kuksis A, Shaikh NA. Glycated phosphatidylethanolamine promotes macrophage uptake of low density lipoprotein and accumulation of cholesteryl esters and triacylglycerols. *J Biol Chem* 274:16494-16500, 1999.

- Raynolds M, Awald PD, Gordon DF, Gutierrez-Hartmann A, Rule DC, Wood WM, Eckel RH. Lipoprotein lipase gene expression in rat adipocytes is regulated by isoproterenol and insulin through different mechanisms. *Molecular Endocrinology* 4:1416-1422, 1990.
- Reaven GM. Banting lecture 1988: role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-1607, 1988.
- Reaven GM. Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Phys Rev* 75:437-486, 1995.
- Reaven GM. Syndrome X. *Blood Press Suppl* 4:13-16, 1992.
- Reaven GM, Brand RJ, Chen Y-DI, Mathur AK, Goldfine I. Insulin resistance and insulin secretion are determinants of oral glucose tolerance in normal individuals. *Diabetes* 42:1324-1332, 1993.
- Reaven GM, Laws A. Insulin resistance, compensatory hyperinsulinemia, and coronary heart disease. *Diabetologia* 37:948-952, 1994.
- Reckless J, Rubin EM, Verstuyft JB, Metcalfe JC, Grainger DJ. Monocyte chemoattractant protein-1 but not tumor necrosis factor-alpha is correlated with monocyte infiltration in mouse lipid lesions. *Circulation* 99:2310-2316, 1999.
- Reginato MJ, Lazar MA. Mechanisms by which Thiazolidinediones enhance insulin action. *Trend Endocrinology & metabolism* 10:9-13, 1999.
- Reiber GE, Boyko EJ, Smith DG. Lower extremity foot ulcers and amputations in diabetes. In: *Diabetes in America*. 2nd ed. Harris MI, Cowie CC, Reiber G, Boyko E, Stern M, Bennett P Eds. Washington DC, U.S. Govt. Printing Office 409-428, 1995.
- Renier G, Desfaits AC, Lambert A, Mikhail R. Role of oxidant injury on macrophage lipoprotein lipase (LPL) production and sensitivity to LPL. *J Lipid Res* 37:799-809, 1996.
- Renier G, Lambert A. Lipoprotein lipase synergizes with interferon gamma to induce macrophage nitric oxide synthetase mRNA expression and nitric oxide production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:392-399, 1995.

Renier G, Olivier M, Skamene E, Radzioch. Induction of tumor necrosis factor  $\alpha$  gene expression by lipoprotein lipase requires protein kinase C activation. *J Lipid Res* 35:1413-21, 1994a.

Renier G, Skamene D, DeSanctis J, Radzioch D. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice. *Arterioscler Thromb* 13:1515-1524, 1993.

Renier G, Skamene E, DeSanctis JB, Radzioch D. Induction of tumor necrosis factor  $\alpha$  gene expression by lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 35:271-278, 1994.

Reymer PW, Gagne E, Groenmeyer BE, Zhang H, Forsyth I, Jansen H, Seidell JC, Kromhout D, Lie KE, Kastelein J. A lipoprotein lipase mutation (Asn291Ser) is associated with reduced HDL cholesterol levels in premature atherosclerosis. *Nat Genet* 10:28-34, 1995.

Rhodes CJ, Alarcon C. What beta cell defect could lead to hyperproinsulinemia in NIDDM? *Diabetes* 43:511-517, 1994.

Rich SS. Positional cloning strategies to identify causal genes for non-insulin-dependent diabetes mellitus. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 561-565, 1996.

Richardson M, Hadcock SJ, Dereske M, Cybulsky MI. Increased expression in vivo of VCAM-1 and E-selectin by the aortic endothelium of normolipemic and hyperlipemic diabetic rabbits. *Arterioscler Thromb* 14:760-769, 1994.

Richelsen B, Pedersen SB, Moller-Pedersen T, Schmitz O, Moller N, Borglum JD. Lipoprotein lipase activity in muscle tissue influenced by fatness, fat distribution and insulin in obese females. *Eur J Clin Invest* 23:226-233, 1993.

Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7614-7619, 1998a.

Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol* 66:733-739, 1999.

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

Ridray S. Hyperinsulinemia and smooth muscle cell proliferation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19 Suppl 1:S39-S51, 1995.

Rieusset J, Andreelli F, Auboeuf D, Roques M, Vallier P, Riou JP, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in human adipocytes. *Diabetes* 48:699-705, 1999.

Rimm EB, Klatsky A, Grobbee D, Stampfer MJ. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits? *BMJ* 31:731-736, 1996.

Rimm EB, Willett WC, Hu FB, Sampson L, Colditz GA, Manson JE, Hennekens C, Stampfer MJ. Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA* 279:359-364, 1998.

Rinninger F, Kaiser T, Mann WA, Meyer N, Greten H, Beisiegel U. Lipoprotein lipase mediates an increase in the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesteryl esters by hepatic cells in culture. *J Lipid Res* 39:1335-1348, 1998.

Robertson WB, Stron JP. Atherosclerosis in persons with hypertension and diabetes mellitus. *Lab Invest* 18:538-551, 1968.

Robinson K, Arheart K, Refsum H, Brattstrom L, Boers G, Ueland P, Rubba P, Palma-Reis R, Meleady R, Daly L, Witteman J, Graham I. Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation* 97:437-443, 1998.

- Robinson N, Fuller JH. Severe life events and their relationship to the aetiology of insulin-dependent (type 1) diabetes mellitus. *Ped Adol Endocrinol* 15:129-133, 1986.
- Roche HM, Gibney MJ. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and triacylglycerol metabolism in the postprandial state. *Lipids* 34 Suppl:S259-S265, 1999.
- Rodrigues B, Cam MC, Jian K, Lim F, Sambandam N, Shepherd G. Differential effects of streptozotocin-induced diabetes on cardiac lipoprotein lipase activity. *Diabetes* 46:1346-1353, 1997.
- Rogers WJ, Bowlby LJ, Chandra NA. Treatment of myocardial infarction in the United States (1990 to 1993): Observations from the national registry of myocardial infarction. *Circulation* 90:2103-2114, 1994.
- Rojanasakul Y, Ye J, Chen F, Wang L, Cheng N, Castranova V, Vallyathan V, Shi X. Dependence of NF-kappa B activation and free radical generation on silica-induced TNF- $\alpha$  production in macrophages. *Mol Cell Biochem* 200:119-125, 1999.
- Rosenfeld ME, Ross R. Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 10:680-687, 1990.
- Ross R. Atherosclerosis- An inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126, 1999.
- Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Ann Rev Physiol* 57:791-804, 1995.
- Ross R. Mechanisms of atherosclerosis- a review. *Adv Nephrol* 19:79-86, 1990.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for 1990s. *Nature* 362:801-809, 1993.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: An update. *N Engl J Med* 314:488-500, 1986.
- Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med* 295:420-425, 1976.
- Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 86:675-684, 1977.

Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 180:1332-1339, 1973.

Rothwell PM, Villagra R, Gibson R, Donders RC, Warlow CP. Evidence of a chronic systemic cause of instability of atherosclerotic plaques. *Lancet* 355(9197):19-24, 2000.

Rudel LL, Johnson FL, Sawyer JK, Wilson MS, Parks JS. Dietary polyunsaturated fat modifies low-density lipoproteins and reduces atherosclerosis of nonhuman primates with high and low diet responsiveness. *Am J Clin Nutr* 62:463S-470S, 1995.

Ruge T, Bergo M, Hultin M, Olivecrona G, Olivecrona T. Nutritional regulation of binding sites for lipoprotein lipase in rat heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E211-218, 2000.

Ruige JB, Dekker JM, Nijpels G, Popp-Snijders C, Stehouwer CD, Kostense PJ, Bouter LM, Heine RJ. Hyperproinsulinemia in impaired glucose tolerance is associated with a delayed insulin response to glucose. *Diabetologia* 42:177-180, 1999.

Rumsey SC, Obunike JC, Arad Y, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase-mediated uptake and degradation of low density lipoproteins by fibroblasts and macrophages. *J Clin Invest* 90:1504-1512, 1992.

Saffari B, Ong JM, Kern PA. Regulation of adipose tissue lipoprotein lipase gene expression by thyroid hormone in rats. *J Lipid Res* 33:241-249, 1992.

Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, Huttunen JK, Valtonen V. Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 2(8618):983-986, 1988.

Saito T, Ookubo R, Kuriyama M, Saano R, Ichinose A. Lipoprotein (a) concentration and molecular weight of apolipoprotein (a) in patients with cerebrovascular disease and diabetes mellitus. *Thromb Res* 87:527-538, 1997.

- Sakashita T, Takahashi Y, Kinoshita T, Yoshimoto T. Essential involvement of 12-lipoxygenase in regiospecific and stereospecific oxidation of low density lipoprotein by macrophages. *Eur J Biochem* 265:825-831, 1999.
- Sakurai Y, Teruya K, Shimada N, Umeda T, Tanaka H, Muto T, Kondo T, Nakamura K, Yoshizawa N. Association between duration of obesity and risk of non insulin-dependent diabetes mellitus. The Sotetsu Study. *Am J Epidemiol* 149:256-260, 1999.
- Samad F, Yamamoto K, Loskutoff DJ. Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor- $\alpha$  and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 97:37-46, 1996.
- Sambandam N, Abrahani MA, St Pierre E, Al-Atar O, Cam MC, Rodrigues B. Localization of lipoprotein lipase in the diabetic heart: regulation by acute changes in insulin. *Arterioscler thromb Vasc Biol* 19:1526-1534, 1999.
- Sanchez-Cabezudo M, Rodenas S, Cuesta C. Relation of abnormal composition of lipoproteins to HbA1c levels in non-insulin dependent diabetes. *Rev Esp Fisiol* 50:145-153, 1994.
- Sanjeevi CB, Hagopian WA, Landin-Olsson M, Kochum I, Woo W, Palmer JP, Lernmark A, Dahlquist G. Association between autoantibody markers and subtypes of DR4 and DR4-DQ in Swedish children with insulin-dependent diabetes reveals closer association of tyrosine pyrophosphatase autoimmunity with DR4 than DQ8. *Tissue Antigens* 51:281-286, 1998.
- Santamarina-Fojo S, Dugi KA. Structure, function and role of lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 5:1117-1125, 1994.
- Santamarina-Fojo S. The familial chylomicronemia syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 27:551-567, 1998.
- Santanam N, Ramachandran S, Parthasarathy S. Oxygen radicals, antioxidants, and lipid peroxidation. *Semin Reprod Endocrinol* 16:275-280, 1998.

Sartippour MR, Lambert A, Laframboise M, St.-Jacques P, Renier G. Stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression and production. *Diabetes* 47:431-438, 1998.

Sartippour MR, Renier G. Differential regulation of macrophage peroxisome proliferator-activated receptor expression by glucose. Role of peroxisome proliferator-activated receptors in lipoprotein lipase gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:104-110, 2000.

Sartippour MR, Renier G. Upregulation of macrophages lipoprotein lipase in patients with type 2 diabetes. Role of peripheral factors. *Diabetes* 49:597-602, 2000a.

Sato K, Akiba Y, Chida Y, Takahashi K. Lipoprotein hydrolysis and fat accumulation in chicken adipose tissues are reduced by chronic administration of lipoprotein lipase monoclonal antibodies. *Poult Sci* 78:1286-1291, 1999.

Savonen R, Nordstoga K, Christophersen B, Lindberg A, Shen Y, Hultin M, Olivecrona T, Olivecrona G. Chylomicron metabolism in an animal model for hyperlipoproteinemia type I. *J Lipid Res* 40:1336-1346, 1999.

Saxena U, Goldberg IJ. Interaction of lipoprotein lipase with glycosaminoglycans and apolipoprotein C-II: effects of free fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1043:161-168, 1990.

Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Jenner JL, McNamara JR, Ordovas JM, Davis CE, Abolafia JM, Lippel K, Levy RI. Lipoprotein (a) levels and risk of coronary heart disease in men. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *JAMA* 271:999-1003, 1994.

Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Cellular receptors for advanced glycation end products: implication for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol* 14:1521-1528, 1994.

Schmidt AM, Hori O, Cao R, Yan SD, Brett J, Wautier JL, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto M, Stern D. RAGE, a novel cellular receptor for advanced glycation end products. *Diabetes* 45 (Suppl 3):S77-S80, 1996.



- Schoonjans K, Martin G, Steals B, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol* 8:159-166, 1997.
- Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Steals B, Auwerx J. PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 15:5336-5348, 1996a.
- Schoonjans K, Steals B, Auwerx J. The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1303:93-109, 1996.
- Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol* 71:9B-14B, 1993.
- Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelly JL, Cayatte AJ, Rozek MM. Pathogenesis of the atherosclerotic lesions: implications for diabetes mellitus. *Diabetes Care* 15:1156-1167, 1992.
- Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague A, Kelly JL, Nerem RM. The pathogenesis of atherosclerosis: An overview. *Clin Cardiol* 14:1-6, 1991.
- Schwartz RS, Brunzell JD, Bierman EL. Elevated adipose tissue lipoprotein lipase in the pathogenesis of obesity in the Prader-Willi syndrome. *Trans Assoc Am Physicians* 92:89-95, 1979.
- Schwenke DC, Behr SR. Vitamin E combined with selenium inhibits atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits independently of effects on plasma cholesterol concentrations. *Circ Res* 83:366-377, 1998.
- Schwenke DC. Antioxydants and atherogenesis. *J Nutr Biochem* 9:424-445, 1998.
- Scott CH, Sutton MS. Homocysteine: evidence for a causal relationship with cardiovascular disease. *Cardiol Rev* 7:101-107, 1999.
- Segasothy M, Phillips PA. Vegetarian diet: panacea for modern lifestyle diseases? *QMJ* 92:531-544, 1999.

- Sehayek E, Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G, Vlodaysky I, Levkovitz H, Avner R, Eisenberg S. Binding to heparan sulfate is a major event during catabolism of lipoprotein lipase by HepG2 and other cell cultures. *Atherosclerosis* 114:1-8, 1995.
- Seip RL, Angelopoulos TJ, Semenkovich CF. Exercise induces human lipoprotein lipase gene expression in skeletal muscle but not adipose tissue. *Am J Physiol* 268(2Pt 1):E229-236, 1995.
- Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR, van Garderen E, van den Ingh TS, Rijnberk A. Effects of progestin administration on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and glucose homeostasis in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 51:345-354, 1997.
- Semenkovich CF, Chen SH, Wims M, Luo CC, Li WH, Chan L. Lipoprotein lipase and hepatic lipase mRNA tissue specific expression, developmental regulation, and evolution. *J Lipid Res* 30:423-431, 1989.
- Semenkovich CF, Coleman T, Daugherty A. Effects of heterozygous lipoprotein lipase deficiency on diet-induced atherosclerosis in mice. *J Lipid Res* 39:1141-1151, 1998.
- Semenkovich CF, Luo CC, Nakanishi K, Chen SH, Smith LC, Chan L. In vitro expression and site-specific mutagenesis of the cloned human lipoprotein lipase gene. Potential N-linked glycosylation site asparagine 43 is important for both enzyme activity and secretion. *J Biol Chem* 265:5429-5433, 1990.
- Serban MG, Negru Y. Lipoproteins, lipidic peroxidation and total antioxidant capacity in serum of aged subjects suffering from hyperglycemia. *Rom J Intern Med* 36:65-70, 1998.
- Shantaram V. Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension. *Clin Exp Hypertens* 21:69-77, 1999.
- Sharma N, Desigan B, Ghosh S, Sanyal SN, Ganguly NK, Majumdar S. The role of oxidized HDL in monocyte/macrophage functions in the pathogenesis of atherosclerosis in Rhesus monkeys. *Scand J Clin Lab Invest* 59:215-225, 1999.

Sharma P, Ryves WJ, Gordge PC, Evans AT, Shaun N, Thomas B, Parker PJ, Evans FJ. Properties of a resiniferatoxin-stimulated, calcium inhibited but phosphatidylserine-dependent kinase, which is *distinct from protein kinase C isotopes alpha, beta 1, gamma, delta, epsilon and eta*. *J Pharm Pharmacol* 47:297-306, 1995.

Sharma R, Coats AJ, Anker SD. The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: cytokines, nitric oxide, and endothelin-1. *Int J Cardiol* 72:175-186, 2000.

Sharrett AR, Sorlie PD, Chambless LE, Folsom AR, Hutchinson RG, Heiss G, Szklo M. Relative importance of various risk factors for asymptomatic carotid atherosclerosis versus coronary heart disease incidence: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 149:843-852, 1999.

Shaw JE, de Courten M, Boyko EJ, Zimmet PZ. Impact of new diagnostic criteria for diabetes on different populations. *Diabetes Care* 22:762-766, 1999a.

Shaw JE, Zimmet PZ, De Courten M, Dowse GK, Chitsn P, Gareeboo H, Hemraj F, Fareed D, Tuomilehto J, Alberti KGMM. Impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 22:399-402, 1999.

Shaw JT, Lovelock PK, Kesting JB, Cardinal J, Duffy D, Wainwright B, Cameron DP. Novel susceptibility gene for late-onset NIDDM is localized to human chromosome 12q. *Diabetes* 47:1793-1796, 1998.

Shepherd G, Cam MC, Sambandam N, Abrahani MA, Rodrigues B. Streptozotocin-induced diabetes enhances cardiac heparin-releasable lipoprotein lipase activity in spontaneously hypertensive Rats. *Hypertension* 31:878-884, 1998.

Shih H, Towle HC. Definition of the carbohydrate response element of the rat S14 gene: contest of the CAGTG motif determines the specificity of carbohydrate regulation. *J Biol Chemistry* 269:9380-9387, 1994.

Shimada M, Ishibashi S, Inaba T, Yagyu H, Harada K, Osuga JI, Ohashi K, Yazaki Y, Yamada N. Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7242-7246, 1996.

Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 31:23-37, 1999.

Shirai K, Itoh Y, Sasaki H, Totsuka M, Murano T, Wanatabe H, Miyashita Y. The effect of insulin sensitiser, troglitazone, on lipoprotein lipase mass in preheparin serum. *Diabetes Res Clin Pract* 46:35-41, 1999.

Shuldiner AR, Silver KD. Candidate genes for non-insulin-dependent diabetes mellitus. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 565-574, 1996.

Shuster CB, Herman IM. The mechanics of vascular cell motility. *Microcirculation* 5:239-257, 1998.

Sich D, Saidi Y, Giral P, Lagrost L, Egloff M, Auer C, Gautier V, Turpin G, Beucler I. Hyperalphalipoproteinemia: characterization of a cardioprotective profile associating increased high-density lipoprotein2 levels and decreased hepatic lipase activity. *Metabolism* 47:965-973, 1998.

Sima A, Popov D, Starodub O, Stancu C, Cristea C, Stern D, Simionescu M. Pathobiology of the heart in experimental diabetes: immunolocalization of lipoproteins, immunoglobulin G, and advanced glycation endproducts proteins in diabetic and/or hyperlipidemic hamster. *Lab Invest* 77:3-18, 1997.

Simsolo RB, Ong JM, Saffari B, Kern PA. Effect of improved diabetes control on the expression of lipoprotein lipase in human adipose tissue. *J Lipid Res* 33:89-95, 1992.

Sinai A, Liu YJ, Cohen DJ, Ooi BS. Hyperglycemia augments macrophage growth responses to colony-stimulating factor-1. *Metabolism* 45:1125-1129, 1996.

Sing K, Ballantyne CM, Ferlic L, Brugada R, Cushman I, Dunn JK, Herd JA, Pownall HJ, Gotto AM, Marian AJ. Lipoprotein lipase gene mutations, plasma lipid levels, progression/regression of

coronary atherosclerosis, response to therapy, and future clinical events. Lipoproteins and Coronary Atherosclerosis Study. *Atherosclerosis* 144:435-442, 1999.

Singh-Bist A, Komaromy MC, Kraemer FB. Transcriptional regulation of lipoprotein lipase in the heart during development in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 202:838-843, 1994.

Siow RC, Sato H, Leake DS, Ishii T, Bannai S, Mann GE. Induction of antioxidant stress proteins in vascular endothelial and smooth muscle cells: protective action of vitamin C against atherogenic lipoproteins. *Free Radic Res* 31:309-318, 1999.

Smith EB, Keen GA, Grant A, Stirk C. Fate of fibrinogen in human arterial intima. *Arteriosclerosis* 10:263-275, 1990.

Smith JK, Dukes R, Douglas JE, Krishnaswamy G, Berk S. Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease. *JAMA* 281:1722-1727, 1999.

Smith SK. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Hum Reprod Update* 4:509-519, 1998.

Sola R, La Ville AE, Richard JL, Motta C, Bargallo MT, Girona J, Masana L, Jacotot B. Oleic acid rich diet protects against the oxidative modification of high density lipoprotein. *Free Radic Biol Med* 22:1037-1045, 1997.

Somani BL, Bangar SS, Bhalwar R. American Diabetes Association Criteria for diabetes diagnosis. *Diabetes Care* 22:366, 1999.

Soulis T, Sastra S, Thallas V, Mortensen SB, Wilken M, Clausen JT, Bjerrum OJ, Petersen H, Lau J, Jerums G, Boel E, Cooper ME. A novel inhibitor of advanced glycation end-product formation inhibits mesenteric vascular hypertrophy in experimental diabetes. *Diabetologia* 42:472-479, 1999.

Sozmen B, Delen Y, Girgin FK, Sozmen EY. Catalase and paraoxonase in hypertensive type 2 diabetes mellitus: correlation with glycemic control. *Clin Biochem* 32:423-427, 1999.

- Spiegelman BM, Choy L, Hotamisligil GS, Graves RA, Tontonoz P. Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J Biol Chem* 268:6823-6826, 1993.
- Spooner PM, Chernick SS, Garrison MM, Scow RO. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity and release in 3T3-L1 adipocytes. Separation and dependence of hormonal effects on hexose metabolism and synthesis of RNA and protein. *J Biol Chem* 254:10021-10029, 1979.
- Sprecher DL. Triglycerides as a risk factor of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 82(12A):49U-56U, 1998.
- Sprecher DL, Harris BV, Stein EA, Bellet PS, Keilson LM, Simbartl LA. Higher triglycerides, lower high-density lipoprotein cholesterol, and higher systolic blood pressure in lipoprotein lipase-deficient heterozygotes. A preliminary report. *Circulation* 94:3239-3245, 1996.
- Springer TA, Cybulsky MI. Traffic signals on endothelium for leukocytes in health, inflammation, and atherosclerosis. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol.1. Philadelphia: Lippincott-Raven :511-538, 1996.
- St. Clair RW. Pathogenesis of atherosclerosis. *Cardiol Rev* 5:14-71, 1997.
- Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-year cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 16:434-444, 1993.
- Stanton AV. Haemodynamics, wall mechanics and atheroma: a clinician's perspective. *Proc Inst Mech Eng* 213:385-390, 1999.
- Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions: A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 85:391-405, 1992.
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wisler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of

atherosclerosis. A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 14:840-856, 1994.

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glacov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1512-1531, 1995.

Steals B, Schoonjans K, Fruchart JC, Auwerx J. The effects of fibrates and thiazolidinediones on plasma triglyceride metabolism are mediated by distinct peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). *Biochimie* 79:95-99, 1997.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khou JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320:913-924, 1989.

Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Hojnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 97:2601-2620, 1996.

Steiner G, Tkac I, Uffelman KD, Lewis GF. Important contribution of lipoprotein particle number to plasma triglyceride concentration in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 137:211-214, 1998.

Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3893-3897, 1995.

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

- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheedeman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxydant Study (CHAOS). *Lancet* 347:781-786, 1996.
- Stern MP. Diabetes and cardiovascular disease. The "common soil" hypothesis. *Diabetes* 44:369-374, 1995.
- Stevens MJ, Hosaka Y, Masterson JA, Jones SM, Thomas TP, Larkin DD. Downregulation of the human taurine transporter by glucose in cultured retinal pigment epithelial cells. *Am J Physiol* 277(4 Pt 1):E760-E771, 1999.
- Stins MF, Maxfield FR, Goldberg IJ. Polarized binding of lipoprotein lipase to endothelial cells. Implications for its physiological actions. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 12:1437-1446, 1992.
- Stolar MW. Atherosclerosis in diabetes: the role of hyperinsulinemia. *Metabolism* 37(2 Suppl 1):1-9, 1988.
- Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD. A novel therapy for colitis utilizing PPAR- $\gamma$  ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 104:383-389, 1999.
- Suarez G, Rajaram R, Oronsky AL. Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructation). Comparison with the Maillard reaction initiated by glucose. *J Biol Chem* 264:3674-3679, 1989.
- Sugarman J, Percy C. Prevalence of diabetes in Navajo Indian community. *Am J Pub Health* 79:511-513, 1989.
- Susini S, Van Haasteren G, Li S, Prentki M, Schlegel W. Essentiality of intron control in the induction of c-fos by glucose and glucoincretin peptides in INS-1 $\beta$ -cells. *FASEB* 14:128-136, 2000.
- Swei A, Lacy F, DeLano FA, Schmid-Schönbein GW. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension* 30:1628-1633, 1997.



Syvanne M, Nieminen MS, Frick MH, Kauma H, Majahalme S, Virtanen V, Kesaniemi YA, Pasternack A, Ehnholm C, Taskinen MR. Association between lipoproteins and the progression of coronary and vein-graft atherosclerosis in a controlled trial with gemfibrozil in men with low baseline levels of HDL cholesterol. *Circulation* 98:1993-1999, 1998.

Tabas I. Phospholipid metabolism in cholesterol-loaded macrophages. *Curr Opin Lipidol* 8:263-267, 1997.

Tabas I, Li Y, Brocia RW, Xu SW, Swenson TL, Williams KJ. Lipoprotein lipase and sphingomyelinase synergistically enhance the association of atherogenic lipoproteins with smooth muscle cells and extracellular matrix. A possible mechanism for low density lipoprotein and lipoprotein(a) retention and macrophage foam cell formation. *J Biol Chem* 268:20419-20432, 1993.

Takagi A, Ikeda Y, Tsutsumi Z, Shoji T, Yamamoto A. Molecular studies on primary lipoprotein lipase (LPL) deficiency. *J Clin Invest* 89:581-591, 1992.

Takahashi S, Suzuki J, Kohno M et al. Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 270:15747-54, 1995.

Tallquist MD, Soriano P, Klinghoffer RA. Growth factor signaling pathways in vascular development. *Oncogene* 18(55):7917-7932, 1999.

Tanaka S, Yashiro A, Tasaki H, Nakashima Y. Enhanced macrophage uptake of lipoprotein (a) after Ca<sup>2+</sup>-induced aggregate-formation. *Lipids* 33:385-392, 1998.

Tanaka T, Itoh H, Doi K, Fukunaga Y, Hosoda K, Shintani M, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Saito T, Inoue G, Nishimura H, Yoshimasa Y, Nakao K. Down regulation of peroxisome proliferator-activated receptor expression by inflammatory cytokines and its reversal by thiazolidinediones. *Diabetologia* 42 702-710, 1999.

Tang EY, Parker PJ, Beattie J, Houslay MD. Diabetes induces selective alterations in the expression of protein kinase C isoforms in hepatocytes. *FEBS Lett* 326: 117-123, 1993.

Tangney CC, Rosenson RS. Antioxidants in coronary heart disease: Vitamin E and beta carotene In: *UpToDate* vol. 7, No. 3, PP1-10, 1999.

Taniguchi N, Kaneto H, Asahi M, Takahashi M, Wenyi C, Higashiyama S, Fujii J, Suzuki K, Kayanoki Y. Involvement of glycation and oxidative stress in macroangiopathy. *Diabetes* 45 Supply 3:S81-S83, 1996.

Taskinen MR. Insulin resistance and lipoprotein metabolism. *Curr Opinion Lipidol* 6:153-160, 1995.

Taskinen MR. Lipoprotein lipase in diabetes. *Diabetes Metab Rev* 3:551-570, 1987.

Tattersal RB, Fajans SS. A difference between the inheritance of classic juvenile-onset and maturity-onset diabetes of young people. *Diabetes* 24:44-53, 1975.

Tavangar K, Murata Y, Pedersen ME, Goers JF, Hoffman AR, Kraemer FB. Regulation of lipoprotein lipase in the diabetic rat. *J Clin Invest* 90:1672-1678, 1992.

Taylor R, Bennett P, Uili R, Joffres M, Germain R, Levy S, Zimmet P. Diabetes in Wallis Polynesians: a comparison of residents of Wallis Island and first generation migrants in Noumea, New Caledonia. *Diabetes Res Clin Pract* 1:169-175, 1985.

Taylor SI, Wertheimer E, Accili D, Cama A, Barbetti F, Quon MJ, de la Luz Sierra M, Suzuki Y, Koller E, Levy-Toledano R, Wertheimer E. Mutations in the insulin receptor gene. *Endocr Rev* 13:566-595, 1992.

Tengku-Muhammad TS, Hughes TR, Cryer A, Ramji DP. Differential regulation of lipoprotein lipase in macrophages J774.2 cell line by cytokines. *Cytokine* 8:525-533, 1996.

Tengku-Muhammad TS, Hughes TR, Cryer A, Ramji DP. Involvement of both the tyrosine kinase and the phosphatidylinositol-3' kinase signal transduction pathways in the regulation of lipoprotein lipase expression in J774.2 macrophages by cytokines and lipopolysaccharide. *Cytokine* 11:463-468, 1999.

- Tengku-Muhammad TS, Cryer A, Ramji DP. Synergism between interferon  $\gamma$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  in the regulation of lipoprotein lipase in the macrophage J774.2 cell line. *Cytokine* 10:38-48, 1998.
- Tengku-Muhammad TS, Hughes TR, Cryer A, Ramji DP. Synergism between lipopolysaccharide and interferon gamma in the regulation of lipoprotein lipase in macrophages. *Cytokine* 11:408-415, 1999.
- Terrettaz J, Cusin I, Etienne J, Jeanrenaud B. In vivo regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in normal rats made hyperinsulinemic and in hyperinsulinemic genetically-obese (fa/fa) rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 18:9-15, 1994.
- Tesfamariam B, Brown JL, Cohen RA. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest* 86:1643-1648, 1991.
- Thams P, Capito K, Hedekov CJ, Kofod H. Phorbol-ester-induced down-regulation of protein kinase C in mouse pancreatic islets. Potentiation of phase 1 and inhibition of phase 2 of glucose-induced insulin secretion. *Biochem J* 265:777-787, 1990.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977-986, 1993.
- Thieringer R, Fenyk-Melody JE, Le Grand CB, Shelton BA, Detmers PA, Somers EP, Carbin L, Moller DE, Wright SD, Berger J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor does not inhibit IL-6 or TNF- $\alpha$  responses of macrophages to lipopolysaccharide in vitro or in vivo. *J Immunol* 164:1046-1054, 2000.
- Thomas MJ, Rudel LL. Dietary fatty acids, low density lipoprotein composition and oxidation and primate atherosclerosis. *J Nutr* 126(4 Suppl):1058S-1062S. 1996.

- Tilton RG, Chang K, Nyengaard JR, Van den Enden M, Ido Y, Williamson JR. Inhibition of sorbitol dehydrogenase. Effects on vascular and neural dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 44:234-242, 1995.
- Tilton RG, Chang K, Pugliese G, Eades DM, Province MA, Sherman WR, Kilo C, Williamson JR. Prevention of hemodynamic and vascular albumin filtration changes in diabetic rats by aldose reductase inhibitors. *Diabetes* 38:1258-1270, 1989.
- Tirosh A, Potashnik R, Bashab N, Rudich A. Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 274:10595-10602, 1999.
- Tkac I, Kimball B, Lewis G, Uffelman K, Steiner G. The severity of coronary atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus is related to the number of circulating triglyceride-rich lipoprotein particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:3633-3638, 1997.
- Toborek M, Henning B. Is endothelial cell autocrine production of tumor necrosis factor a mediator of lipid-induced endothelial dysfunction? *Med Hypotheses* 47:377-382, 1996.
- Tomlinson DR, Mayer JH. Reversal of deficits in axonal transport and nerve conduction velocity by treatment of streptozotocin diabetic rats with *myo*-inositol. *Exp Neurol* 89:420-427, 1985.
- Tomlinson DR. Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications. *Diabetologia* 42:1271-1281, 1999.
- Tomlinson DR, Stevens EJ, Diemel LT. Aldose reductase inhibitors and their potential for the treatment of diabetic complications. *Trends Pharmacol Sci* 15:293-297, 1994.
- Tonotonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPAR $\gamma$  promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93:241-252, 1998.
- Trap-Jensen J. Effects of smoking on the heart and peripheral circulation. *Am Heart J* 115:263-71, 1988.

Trevisan R, Vedovato M, Tiengo A. The epidemiology of diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 13 Suppl 8:2-5, 1998.

Trevisan R, Viberti GC. Pathophysiology of diabetic nephropathy. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 727-737, 1996.

Trezzini C, Jungi TW, Maly FE, Vittoz M, Peterhans E. Low-affinity interaction of fibrinogen carboxy-gamma terminus with human monocytes induces an oxidative burst and modulates effector functions. *Biochem Biophys Res Commun* 165:7-13, 1989.

Tribble DL. Antioxydant consumption and risk of coronary heart disease: Emphasis on vitamin C, vitamin E, and  $\beta$ -carotene. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 99:591-598, 1999.

Tribble DL, van den Berg JJ, Motchnik PA. Oxidative susceptibility of low density lipoprotein subfractions is related to their ubiquinol-10 and alpha-tocopherol content. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1183-1188, 1994.

Trufakin Va, Gaidul KV. Russian Academy of Medical Sciences (RAMS), Siberian Branch, activity in solving the medical problems of Russian Circumpolar regions. *Int J Circumpolar Health* 57 Suppl 1:717-718, 1998.

Tsao TS, Stenbit AE, Factor SM, Chen W, Rossetti L, Charron MJ. Prevention of insulin resistance and diabetes in mice heterozygous for CLUT4 ablation by transgenic complementation of GLUT4 in skeletal muscle. *Diabetes* 48:775-782, 1999.

Tschoepe D, Roesen P. Heart disease in diabetes mellitus: a challenge for early diagnosis and intervention. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 106:16-24, 1998.

Tsuchida K, Makita Z, Yamagishi S, Atsumi T, Miyoshi H, Obara S, Ishida M, Ishikawa S, Yasumura K, Koike I. Suppression of transforming growth factor beta and vascular endothelial

- growth factor in diabetic nephropathy in rats by a novel advanced glycation end product inhibitor, OPB-9195. *Diabetologia* 42:579-588, 1999.
- Tsujita M, Yokoyama S. Selective inhibition of free apolipoprotein-mediated cellular lipid efflux by probucol. *Biol Chemistry* 35:13011-13020, 1996.
- Tsutsumi K, Inoue Y, Shima A, Iwasaki K, Kawamura M, Murase T. The novel compound NO-1886 increases lipoprotein lipase activity with resulting elevation of high density lipoprotein cholesterol, and long-term administration inhibits atherogenesis in the coronary arteries of rats with experimental atherosclerosis. *J Clin Invest* 92:411-417, 1993.
- Tummalapalli CM, Tyagi SC. Responses of vascular smooth muscle cell to extracellular matrix degradation. *J Cell Biochem* 75:515-527, 1999.
- Tuomilehto J, Lounamaa R, Tuomilehto-Wolf E, Reunanen A, Virtak E, Kaprio EA, Akerblom HK. Epidemiology of childhood diabetes mellitus in Finland- Background of a nationwide study of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 35:70-76, 1992.
- Turcotte LP. Role of fats in exercise. Type and quality. *Clin Sports Med* 18:485-498, 1999.
- Turner NC, Clapham JC. Insulin resistance, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes, pathologic mechanism and treatment: current status and therapeutic possibilities. *Prog Drug Res* 51:33-94, 1998.
- Uchida Y, Ohba K, Ogawa A, Wada K, Yoshioka T, Muraki T. Protein kinase C mediates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inhibition of obese gene expression and leptin secretion in brown adipocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360:691-698, 1999.
- UK Prospective Diabetes Study 27: plasma lipids and lipoproteins at diagnosis of NIDDM by age and sex. *Diabetes Care* 20:1683-1687, 1997.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352:837-853, 1998.

Umekawa T, Yoshida T, Sakane N, Kogure A, Kondo M, Honjyo H. Trp64rg mutation of beta3-adrenoceptor gene deteriorates lipolysis induced by beta3-adrenoceptor agonist in human omental adipocytes. *Diabetes* 48:117-120, 1999.

Unger RH, Foster DW. *Diabetes Mellitus*. In: Williams Textbook of Endocrinology, 9th Ed. Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM and Larsen OR ed. Philadelphia, p 973-1059, 1998.

Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF Jr, Loscalzo J. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 272:17012-17017, 1997.

US Renal Data System: *USRDS 1998 Report*. Bethesda, MD, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, 1998.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Hotamisligil GS. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology* 139:4832-4838, 1998.

Valera A, Pujol A, Pelegin M. Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9151-9154, 1994.

Van Assche FA, Holemans K, Aerts L. Fetal growth and consequences for later life. *J Perinat Med* 26:337-346, 1998.

van Barligen HHJJ, de Jong H, Erkelens DW, de Bruin TWA. Lipoprotein lipase-enhanced binding of human triglyceride-rich lipoproteins to heparan sulfate: modulation by apolipoprotein E and apolipoprotein C. *J Lipid Res* 37:754-763, 1996.

van Barlingen HHJJ, Kleinveld HA, Erkelens DW, de Bruin TWA. Lipoprotein lipase-enhanced binding of lipoprotein(a) [Lp(a)] to heparan sulfate is improved by apolipoprotein E (apo E) saturation: secretion-capture process of apo E is a possible route for the catabolism of Lp(a). *Metabolism* 46:650-655, 1997.

- van Bennekum AM, Kako Y, Weinstock PH, Harrison EH, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase expression level influences tissue clearance of chylomicron retinyl ester. *J Lipid Res* 40:565-574, 1999.
- van Golde PH, Sloots LM, Vermeulen WP, Wielders JP, Hart HC, Bouma BN, van de Wiel A. The role of alcohol in the anti low density lipoprotein oxidation activity of red wine. *Atherosclerosis* 147:365-370, 1999.
- Van Reyk DM, Jessup W. The macrophage in atherosclerosis: modulation of cell function by sterols. *J Leukoc Biol* 66:557-561, 1999.
- Van Tits LJ, Demacker PN, de Graaf J, Hak-Lemmers HL, Stalenhoef AF. Alpha-tocopherol supplementation decreases production of superoxide and cytokines by leukocytes ex vivo in both normolipidemic and hypertriglyceridemic individuals. *Am J Clin Nutr* 71:458-464, 2000.
- Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res Clin Exp* 18:87-98, 1995.
- Vanhoutte PM, Scott-Burden T. The endothelium in health and disease. *Texas Heart Inst J* 21:62-67, 1994.
- Vaziri ND, Liang K, Barton CH. Effect of increased afterload on cardiac lipoprotein lipase and VLDL receptor expression. *Biochim Biophys Acta* 1436:577-584, 1999.
- Verges B. Risque cardio-vasculaire et dyslipidémies. *Annal Endocrinol* 59:335-343, 1998.
- Verhaeghe R. Epidemiology and prognosis of peripheral obliterative arteriopathy. *Drugs* 56 Suppl 3:1-10, 1998.
- Verhoef P, Stampfer MJ. Prospective studies of Homocysteine and cardiovascular disease. *Nutr Rev* 53:283-288, 1995.
- Vessby B, Selinus I, Lithell H. Serum lipoprotein and lipoprotein lipase in overweight, type II diabetics during and after supplemented fasting. *Arteriosclerosis* 5:93-100, 1985.



- Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues: effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 99:2416-2422, 1997.
- Vydelingum N, Drake RL, Etienne J, Kissebach AH. Insulin regulation of fat cell ribosomes, protein synthesis, and lipoprotein lipase. *Am J Physiol* 245:E121-131, 1983.
- Vinik AI, Newlon P, Milicevic Z, McNitt P, Stansberry KB. Diabetic neuropathies: an overview of clinical aspects. In: *Diabetes Mellitus*, edited by Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, and Jerrold M. Olefsky. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 737-751, 1996.
- Virtanen SM, Saukkonen T, Savilahti E, Ylonen K, Rasanen L, Aro A, Knip M, Tuomilehto J, Akerblom HK. Diet, Cow's milk protein antibodies and the risk of IDDM in Finnish children. *Diabetologia* 37:381-387, 1994.
- Visioli F, Bellomo G, Montedodro G, Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 117:25-32, 1995.
- Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Excessive nonenzymatic glycosylation of peripheral and central nervous system myelin components in diabetic rats. *Diabetes* 32:670-674, 1983.
- Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: Role in normal tissue remodelling. *Science* 240:1546-1548, 1988.
- Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Il YM, Steffes M. Advanced glycation end-products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11704-11708, 1994.
- Vogt BW, Scleicher ED, Wieland OH.  $\epsilon$ -Amino-lysine-bound glucose in human tissues obtained at autopsy: increase in diabetes mellitus. *Diabetes* 31:1123-1127, 1982.
- Vollmer E, Brust J, Roessner A, Bosse A, Burwikel F, Kaesberg R, Harrach B, Robenek H, Böcker W. Distribution patterns of apolipoproteins A1, A2, and B in the wall of atherosclerotic vessels. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 419:79-88, 1991.

Von Rokitansky C. *A manual of pathological anatomy*, vol 4. Berlin, Sydenham Society, p 261, 1852.

Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, Manning B, Strosberg AD, Stern MP, Raben N. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the  $\beta$ 3-adrenergic receptor gene. *N Engl J Med* 333:343-347, 1995.

Wang CS, Hartsuck J, McConathy WJ. Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* 1123:1-17, 1992.

Wang J, Takeuchi T, Tanaka S, Kubo SK, Kayo T, Lu D, Takata K, Koizumi A, Izumi T. Mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest* 103:27-37, 1999.

Wang X, Greilberger J, Levak-Frank S, Zimmermann R, Zechner R, Jurgens G. Endogenously produced lipoprotein lipase enhances the binding and cell association of native, mildly oxidized and moderately oxidized low-density lipoprotein in mouse peritoneal macrophages. *Biochem J* 343 Pt2:347-353, 1999a.

Wang Y, Qian R, Ma X. Changes of activity of liver glycogen synthase in experimental diabetes mellitus rats. *Chin Med J (Engl)* 111(1):32-34, 1998.

Wang Z, Gleichmann H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 47:50-56, 1998.

Wareham NJ, Byrne CD, Williams R, Day NE, Hales CN. Fasting proinsulin concentrations predict the development of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22:262-270, 1999.

Warram JH, Rich SS, Krolewsi AS. Epidemiology and genetics of diabetes mellitus. In: Kahn CR, Weir GCeds. *Joslin s Diabetes mellitus*, 13th ed, Lea & Febiger, Pennsylvania 201-215, 1994.

Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 96:2882-2891, 1995.

Weaver JU, Kopelman PG, Hitman GA. Central obesity and hyperinsulineamia in women are associated with polymorphism in the 5N flanking region of the human insulin gene. *Euro J Clin Invest* 22:265-270, 1992.

Weber C, Erl W, Weber K, Weber PC. Incresed adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers. *Circulation* 93:1488-1492, 1996.

Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. *Diabetes Care* 21:1167-1172, 1998.

Wei M, Mitcell BD, Haffner SM, Stern MP. The effects of cigarette smoking, diabetes, high cholesterol, and hypertension on all-cause mortality and cardiovascular disease mortality in Mexican Americans: the San Antonio Heart Study. *Am J Epidemiol* 144:1058-1065, 1996.

Weisburger JH. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food Chem Toxicol* 37:943-948, 1999.

Weissberg P. Mechanisms of modifying atherosclerotic disease- from lipids to vascular biology. *Atherosclerosis* 147 Suppl 1:S3-10, 1999.

White JR, Chait A, Klebanoff SJ, Deeb S, Brunzell JD. Bacterial lipopolysaccharide reduces macrophage lipoprotein lipase levels: an effect that is independent of tumor necrosis factor. *J Lipid Res* 29:1379-1385, 1988.

Wiesenthal SR, Sandhu H, McCall RH, Tchpashvili V, Yoshii H, Polonsky K, Shi ZQ, Lewis GF, Mari A, Giacca A. Free fatty acids impair hepatic insulin extraction in vivo. *Diabetes* 48:766-774, 1999.

Wild SH, Dunn CJ, McKeigue PM, Comte S. Glycemic control and cardiovascular disease in type 2 diabetes: a review. *Diabetes Metab Res Rev* 15:197-204, 1999.

Williams CB, Iqbal S, Zawacki CM, Yu D, Brown MB, Herman WH. Effect of selective screening for gestational diabetes. *Diabetes Care* 22:418-421, 1999.

- Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol* 9:471-474, 1998.
- Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Circulation* 15:551-561, 1995.
- Willis J, Scott R, Brown L, Zimmet P, MacKay I, Rowley M. Type 1 diabetes in insulin-treated adult-onset diabetic subjects. *Diabetes Res Clin Pract* 42:49-53, 1998.
- Willnow TE, Golstein JL, Orth K, Brown MS, Herz J. Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J Biol Chem* 267:26172-26180, 1992.
- Wilson PW, Cupples LA, Kannel WB. Is hyperglycemia associated with cardiovascular disease? The Framingham Study. *Am Heart J* 121:586-590, 1991.
- Wilson PW, Anderson KM, Harris T, Kannel WB, Castelli WP. Determinants of change in total cholesterol and HDL-C with age: the Framingham Study. *J Gerontol* 49:M252-257, 1994.
- Wiseman SA, Mathot JN, de Fouw NJ, Tijburg LB. Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis* 120:15-23, 1996.
- Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Abildgaard S, Steffensen R, Schnohr P, Nordestgaard BG. A common substitution (Asn291Ser) in lipoprotein lipase is associated with increased risk of ischemic heart disease. *J Clin Invest* 99:1606-1613, 1997.
- Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A Meta-Analysis. *Circulation* 99:2901-2907, 1999.
- Wolff SP, Jiang ZY, Hyunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and aging. *Free Radic Biol Med* 10:339-352, 1991.

- Wong H, Davis RC, Thuren T, Goers JW, Nikazy J, Waite M, Schotz MC. Lipoprotein lipase domain function. *J Biol Chem* 269:10319-10323, 1994.
- Woo KS, Chook P, Lolin YI, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS. Folic acid improves arterial endothelial function in adults with hyperhomocystinemia. *J Am Coll Cardiol* 34:2002-2006, 1999.
- World Health Organization, WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus, second report, *Tech Rep Ser 646*, WHO, Geneva, 1980.
- World Health Organization. Classification of atherosclerotic lesions. *WHO Tech Rep Serv* 143:1-20, 1985a.
- World Health Organization. Diabetes mellitus: Report of a WHO study group. *Tech Rep Ser* 727:1-113, 1985.
- Wu SM, Pizzo SV. Low-density lipoprotein receptor-related protein/ $\alpha$ 2-macroglobulin receptor on murine peritoneal macrophages mediates the binding and catabolism of low-density lipoprotein. *Arch Biochem Biophys* 326:39-47, 1996.
- Wu QD, Wang JH, Fennessy F, Redmond HP, Bouchier-Hayes H. Taurine prevents high-glucose-induced human vascular endothelial cell apoptosis. *Am J Physiol* 227(6 Pt 1):C1229-1238, 1999.
- Xia P, Kraemer RM, King GL. Identification of the mechanism for the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2. *J Clin Invest* 96:733-740, 1995.
- Xiang AH, Peters RK, Trigo E, Kjos SL, Lee WP, Buchanan TA. Multiple metabolic defects during late pregnancy in women at high risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 48:848-854, 1999.
- Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME. Peroxisome proliferator-activated receptor ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 274:9116-9121, 1999.

Xing H, Northrop JP, Grove JR, Kilpatrick KE, Su JL, Ringold GM. TNF $\alpha$ -mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPAR $\gamma$  without effects on Pref-1 expression. *Endocrinology* 138:2776-2783, 1997.

Xiu L, Zhang Q, Yu B. Clinical characterizations of familial diabetes mellitus associated with mitochondrial gene mutation. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih* 77:418-21, 1997.

Yagyu H, Ishibashi S, Chen Z, Osuga J, Okazaki M, Perrey S, Kitamine T, Shimada M, Ohashi K, Harada K, Shionoiri F, Yahagi N, Gotoda T, Yazaki Y, Yamada N. Overexpressed lipoprotein lipase protects against atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *J Lipid Res* 40:1677-1685, 1999.

Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Yamamoto Y, Yamamoto H. Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia* 41:1435-1441, 1998.

Yamamoto M, Egusa G, Okubo M, Yamakido M. Dissociation of microangiopathy and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 21:1451-1454, 1998.

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 CW, Hattori M, Vlassara H, He CJ, Carome MA, Yamato E, Elliot S, Striker GE, Striker LJ. Overexpression of TGF- $\beta$ 1 mRNA is associated with upregulation of glomerular tenascin and laminin gene expression in diabetic NOD mice. *J Am Soc Nephrol* 5:, 1610-1617, 1995.

Yang JM, Cho CH, Kong KA, Jang IS, Kim HW, Juhn YS. Increased expression of Galphaq protein in the heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Mol Med* 31:179-184, 1999.

Yao Z, McLeod RS. Synthesis and secretion of hepatic apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1212:152-166, 1994.115.

Yin B, Loike JD, Kako Y, Weinstock PH, Breslow JL, Silverstein SC, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase regulates Fc receptor-mediated phagocytosis by macrophages maintained in glucose-deficient medium. *J Clin Invest* 100:649-657, 1997.

Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Goldberg IJ, Steinberg D, Witztum JL. Macrophages and smooth muscle cells express lipoprotein lipase in human and atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10143-10147, 1991.

Yla-Herttuala S, Palinski W, Butler SW, Picard S, Steinberg D, Witztum JL. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Throm* 14:32-40, 1994.

Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 84:1086-1095, 1989.

Ylitalo R, Jaakkola O, Lehtolainen P, Yla-Herttuala S. Metabolism of modified LDL and foam cell formation in murine macrophage-like RAW 264 cells. *Life Sci* 64:1955-1965, 1999.

Yoon JW, Ray UR. Perspectives on the role of viruses in insulin-dependent diabetes. *Diabetes Care* 8(Suppl 1):39-44, 1985.

Yoshida N, Yoshikawa T, Manabe H, Terrasawa Y, Kondo M, Noguchi N, Niki E. Vitamin E protects against polymorphonuclear leukocyte-dependent adhesion to endothelial cells. *J Leukoc Biol* 65:757-763, 1999.

Yoshida S, Yamada K, Hamaguchi K, Nishimura M, Hatakeyama E, Tsuchida H, Sakamoto K, Kashiwabara H, Yokoyama T, Ikeda K, Horiuchi S. Immunohistochemical study of human advanced glycation end-products (AGE) and growth factors in cardiac tissues of patients on maintenance dialysis and with kidney transplantation. *Clin Nephrol* 49:273-280, 1998.

- Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Apella E, Leonard EJ. Purification and aminoacid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood mononuclear leukocytes. *J Immunol* 142:1956-1962, 1989.
- Yost TJ, Froyd KK, Jensen DR, Eckel RH. Change in skeletal muscle lipoprotein lipase activity in response to insulin/glucose in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 44:786-790, 1995.
- Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148:209-214, 1999.
- Yudkin JS. Abnormalities of coagulation and fibrinolysis in insulin resistance. Evidence for a common antecedent? *Diabetes Care* 22 Suppl 3:C25-C30, 1999.
- Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342:154-160, 2000.
- Yutani C, Imakita M, Ishibashi-Ueda H, Tsukamoto Y, Nishida N, Ikeda Y. Coronary atherosclerosis and interventions: pathological sequences and restenosis. *Pathol Int* 49:273-290, 1999.
- Zampelas A, Peel AS, Gould BJ, Wright J, Williams CM. Polyunsaturated fatty acids of the n-6 and n-3 series: effects on postprandial lipid and apolipoprotein levels in healthy men. *Eur J Clin Nutr* 48:842-848, 1994.
- Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkowski D, White-Carrington S, Spiegelman BM, Moller DE. Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  gene expression contributes to the antidiapogenic effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Mol Endocrinol* 10:1457-1466, 1996.
- Zhang HY, Reddy S, Kotchen TA. A high sucrose, high linoleic acid diet potentiates hypertension in the Dahl salt sensitive rat. *Am J Hypertens* 12(2Pt 1):183-187, 1999.



Zhang Q, Cavallero E, Hoffmann MM, Cavanna J, Kay A, Charles A, Braschi S, Marz W, Perlemuter L, Jacotot B, Galton DJ. Mutations at the lipoprotein lipase gene locus in subjects with diabetes mellitus, obesity and lipaemia. *Clin Sci (Colch)* 93:335-342, 1997.

Zhou J, Chew M, Ravn HB, Falk E. Plaque pathology and coronary thrombosis in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 230:3-11, 1999.

Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Mol Cell Biochem* 182:153-60, 1998.

Zilversmit DB. A proposal linking atherogenesis to the interaction of endothelial lipoprotein lipase with triglyceride-rich lipoproteins. *Circ Res* 33:633-638, 1973.

Zilversmit DB. Atherogenesis: a post prandial phenomenon. *Circulation* 60:473-485, 1979.

Zilversmit DB. Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clin Chem* 41:153-158, 1995.

Zimmet P, Turner R, McCarty D, Rowley M, Mackay I. Crucial points at diagnosis. Type 2 diabetes or slow type 1 diabetes. *Diabetes Care* 22 Suppl 2:B59-64, 1999.

Zimmet P, Whithouse S. Biomodality of fasting and two-hour glucose tolerance distributions in a micronesian population. *Diabetes* 27:793-800, 1978.

Zimmet PZ. The pathogenesis and prevention of diabetes in adults: genes, autoimmunity, and demography. *Diabetes Care* 18:1050-1064, 1995.