

Université de Montréal

Régulation de la protéine C-réactive vasculaire dans le diabète de type 2.

par

Yves Mugabo

Département de nutrition

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de Msc

en Nutrition

août 2010

©Yves Mugabo, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Régulation de la protéine C-réactive vasculaire dans le diabète de type 2.

présenté par :

Yves Mugabo

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Rémi Rabasa-Lhoret, président du jury

Geneviève Renier, directrice de recherche

Eugenio Rasio, membre du jury

Résumé

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de mortalité dans les pays occidentaux et représentent une complication majeure du syndrome métabolique. Il est maintenant largement admis que l'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique et que l'inflammation joue un rôle pathogénique majeur dans l'initiation et la progression de la maladie athéromateuse. Il a été démontré qu'une augmentation des niveaux sériques de la protéine c-réactive (CRP), une protéine de la phase aigüe et un important constituant de la réponse immunitaire de type inné, est associée à un risque cardiovasculaire accru. Ainsi, il a été documenté qu'une augmentation de CRP, tant chez les sujets sains que chez les sujets diabétiques, était associée à une augmentation du risque de morbidité et de mortalité cardiovasculaires.

De multiples évidences suggèrent que la CRP puisse non seulement constituer un marqueur de risque des maladies cardiovasculaires mais aussi représenter un facteur pro-athérogénique direct. La dysfonction endothéliale représente un des stades les plus précoces du processus athérosclérotique et un rôle de la CRP dans la pathogenèse de la dysfonction endothéliale est postulé. Outre son origine systémique, la CRP est produite dans la lésion athérosclérotique et par diverses cellules vasculaires, dont les cellules endothéliales. Afin d'élucider le rôle de la CRP vasculaire dans l'altération de la fonction endothéliale associée au syndrome métabolique, nous avons étudié la régulation de l'expression endothéliale de la CRP par les acides gras libres (AGL) et le rôle de la CRP endothéliale dans l'inhibition de la synthèse d'oxyde nitrique (NO) par les AGL. Nos résultats démontrent que :1) l'acide palmitique (PA) induit l'expression génique de CRP au niveau de cellules endothéliales aortiques humaines (HAECs) en culture et, augmente, de manière dose-dépendante, l'expression protéique de la CRP; 2) La pré-incubation des HAECs avec des antioxydants et des inhibiteurs de la *i*) protéine kinase C (PKC), *ii*) du facteur nucléaire-kappa B, *iii*) des Janus kinases et des protéines de transduction et de régulation de la

transcription et *iv*) des protéines kinases activées par les mitogènes prévient l'effet stimulant du PA sur l'expression protéique et génique de la CRP; 3) Le traitement des HAECs par le PA induit une augmentation de la production des espèces réactives oxygénées, un effet prévenu par les inhibiteurs de la PKC et par l'AICAR(5-amino-4-imidazole carboxamide 1- β -D-ribofuranoside), un activateur de la protéine kinase activée par l'AMP; 4) L'incubation des HAECs en présence de PA résulte enfin en une diminution de la production basale endothéliale de NO, un effet abrogé par la préincubation de ces cellules avec un anticorps anti-CRP.

Dans l'ensemble, ces données démontrent un effet stimulant du PA sur l'expression de la CRP endothéliale via l'activation de kinases et de facteurs de transcription sensibles au stress oxydatif. Ils suggèrent en outre un rôle de la CRP dans la dysfonction endothéliale induite par les AGL.

Mots-clés : Syndrome métabolique, insulino-résistance, stress oxydatif, PA, athérosclérose, maladies cardiovasculaires, cellules endothéliales, inflammation, CRP, diabète de type 2.

Abstract

Atherosclerotic cardiovascular disease is the leading cause of death in western countries and the major complication of metabolic syndrome. It is now widely accepted that atherosclerosis is a chronic inflammatory disease and that inflammation plays a major pathogenic role in the initiation and progression of atherosclerotic disease. It has been demonstrated that increased serum levels of C-reactive protein (CRP), a protein of the acute phase and a major constituent of the innate immune response, is associated with increased cardiovascular risk and that, in both healthy subjects and diabetic patients, high CRP enhances the risk of cardiovascular morbidity and mortality.

Several evidences suggest that CRP may not only be a cardiovascular risk marker but may also represent a direct pro-atherogenic factor. Endothelial dysfunction is a characteristic feature of early-state atherosclerosis and a role of CRP in the pathogenesis of endothelial dysfunction has been proposed. In addition to its systemic origin, CRP is produced in atherosclerotic lesions and by various vascular cells, including endothelial cells. To elucidate the role of CRP in endothelial dysfunction associated with the metabolic syndrome, we studied the regulation of endothelial CRP expression by free fatty acids (FFA) and the role of endothelial CRP as mediator of the inhibitory effect of FFA on nitric oxide (NO) production. Our results demonstrated that: 1) Palmitic acid (PA) induced CRP gene expression in cultured human arterial endothelial cells (HAECs) and increased CRP protein expression in a dose-dependent manner; 2) Pretreatment of HAECs with antioxidants and inhibitors of *i*) protein kinase C (PKC), *ii*) nuclear factor-kappa B, *iii*) Janus kinase and signal transducer and activator of transcription and *iv*) mitogen-activated protein kinases prevented the stimulatory effect of PA on CRP protein and gene expression; 3) Treatment of HAECs by PA led to an increased production of reactive oxygen species, an effect prevented by PKC inhibitors and by AICAR (5-amino-4-imidazole carboxamide 1- β -D-ribofuranoside), an AMP-

activated protein kinase activator; 4) Decreased production of NO was finally observed in PA-treated HAECs, an effect prevented by preincubating endothelial cells with an anti-CRP.

Overall, these data indicate a stimulatory effect of PA on endothelial CRP expression through the activation of oxidative stress-sensitive kinases and transcription factors. They further suggest a role of CRP in FFA-induced endothelial dysfunction.

Keywords: Metabolic syndrome, insulin resistance, oxidative stress, PA, atherosclerosis, cardiovascular diseases, endothelial cells, inflammation, C-reactive protein, type 2 diabetes.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xv
Dédicace.....	xx
Remerciements.....	xxi
I. Introduction.....	22
I.1. Insulinorésistance (IR).....	23
I.1.1. Généralités.....	23
I.1.1.1. Effets biologiques de l'insuline.....	23
A) Effets métaboliques.....	23
B) Effets vasculaires.....	24
I.1.1.2. Voies de signalisation de l'insuline.....	25
I.1.1.3. Définition et étiologie de l'insuline.....	27
A) Définition.....	27
B) Etiologie.....	27
1) Facteurs génétiques.....	27
2) Facteurs environnementaux :	
Diète, obésité et activité physique.....	28
a) Diète.....	28
b) Obésité.....	29
c) Activité physique.....	30
I.1.1.4. Contributions de l'IR des tissus spécifiques.....	31
A) IR au niveau hépatique.....	31
B) IR au niveau du muscle squelettique.....	32
C) IR au niveau du tissu adipeux.....	32
I.1.1.5. Conditions pathologiques associées à l'IR.....	33

A) L'obésité.....	33
B) Le diabète	34
C) IR composante du syndrome métabolique	35
I.1.2. Physiopathologie de l'IR	38
I.1.2.1 Glucotoxicité.....	38
I.1.2.2. Lipotoxicité	39
I.1.2.3. Inflammation.....	40
I.1.3. Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'IR	43
I.1.3.1. Glucotoxicité.....	43
A) Stress oxydatif.....	43
B) Voie de biosynthèse des hexosamines.....	44
C) AGEs.....	46
I.1.3.2. Lipotoxicité	46
I.1.3.3. Inflammation.....	48
I.2. IR et athérosclérose	51
I.2.1. Athérosclérose	51
I.2.1.1. Généralités	51
A) Définition	51
B) Stade de l'athérosclérose.....	51
1) La dysfonction endothéliale	51
2) La strie lipidique	52
3) La lésion avancée ou compliquée.....	53
4) La plaque fibreuse instable	53
I.2.1.2. Physiopathologie de l'athérosclérose	54
I.2.1.3. Facteurs de risque de l'athérosclérose	55
A) Facteurs de risque traditionnels	55
1) Dyslipidémie.....	55
2) Hypertension artérielle	56
3) Hyperglycémie	56

4) Obésité.....	57
5) Tabagisme	57
6) Âge et sexe	58
B) Nouveaux facteurs de risque	58
1) Le stress oxydatif	58
2) L'inflammation	59
3) La dysfonction endothéliale	59
A) Définition	59
B) Mesures cliniques	60
C) Facteurs et mécanismes présidant au développement de la dysfonction endothéliale	62
a) Glucotoxicité	62
b) Lipotoxicité	63
c) Inflammation.....	64
D) Rôle de la dysfonction endothéliale dans la pathogénèse de de l'athérosclérose.....	66
I.2.2. IR et athérosclérose.....	67
I.2.2.1. IR et dysfonction endothéliale	67
A) Signalisation de l'insuline au niveau de l'endothélium vasculaire	67
1) Voies de signalisation régulant la production du NO par l'insuline	67
2) Voies de signalisation régulant la production d'ET-1 et l'expression des molécules d'adhésion par l'insuline	68
B) Action hémodynamique de l'insuline.....	68
C) Relation IR et dysfonction endothéliale. Association et relation bidirectionnelle.....	69

1) Rôle de l'IR dans le développement de la dysfonction endothéliale	69
2) Rôle de la dysfonction endothéliale dans le développement de l'IR	70
I.2.2.2. IR et développement de l'athérosclérose	71
A) Association entre IR et athérosclérose	71
B) Association entre IR et athérosclérose : cause ou épiphénomène ?	72
C) Rôle de l'IR comme facteur de risque cardiovasculaire per se	73
a) Les cellules endothéliales	76
b) Les cellules musculaires lisses	76
c) Les monocytes/macrophages	77
I.3. Inflammation, IR et athérosclérose	78
I.3.1. Généralités	78
I.3.2. Inflammation, IR et athérosclérose	79
I.3.2.1. Rôle de l'inflammation dans l'IR	79
I.3.2.2. Inflammation comme nouveau facteur de risque de l'athérosclérose	79
I.3.2.3. Rôle de l'inflammation dans le développement et la progression de l'athérosclérose	80
I.3.3. Marqueurs inflammatoires : la protéine C-réactive	81
I.3.3.1. Structure	81
I.3.3.2. Génétique	83
I.3.3.3. Rôle biologique	83
I.3.3.4. Mécanisme de régulation	85
I.3.3.5. Facteurs de régulation de la CRP hépatique	86
I.3.3.6. Facteurs de régulation de la CRP vasculaire	87
A) Les adipokines	88

1) La leptine	88
2) Le TNF α	89
3) L'angiotensine II.....	89
4) L'IL-6	89
5) L'adiponectine	90
B) Les cytokines	90
C) Le glucose.....	91
D) La lipopolysaccharide	92
I.3.4. CRP et maladies cardiovasculaires	92
I.3.4.1. CRP : marqueur de risque de maladies cardiovasculaires.....	92
I.3.4.2. CRP : facteur de risque de maladies cardiovasculaires...	94
I.3.4.3. Effets pro-athérogénique de la CRP	96
I.3.5. CRP et IR.....	97
I.3.5.1. CRP : un marqueur de risque du diabète de type 2	97
I.3.5.2. CRP : rôle dans l'IR.....	98
I.4. Problématique, hypothèse et objectifs du projet de recherche.....	100
I.4.1. Problématique.....	100
I.4.2. Hypothèse	100
I.4.3. Objectifs	100
II. Résultats	101
II.1 Article : Palmitate induces C-reactive protéine (CRP) in human aortic endothelial cells. Relevance to fatty acid-induced endothelial dysfunction	102
III. Discussion.....	137
IV. Conclusion et perspectives.....	163
IV.1. Conclusion	163
IV.2. Perspectives.....	163
V. Références	165

Liste des tableaux**Introduction :**

Tableau 1. Comparaison des définitions du syndrome métabolique	37
Tableau 2. Approches utilisées actuellement pour l'évaluation de la fonction endothéliale.....	61
Tableau 3. Principaux stimulateurs de la CRP vasculaire	88

Liste des figures

Introduction :

Figure 1. Caractéristiques générales des voies de signalisation de l'insuline	25
Figure 2. Rôle central des AGL dans l'IR et l'inflammation	42
Figure 3. Rôle des voies sensibles aux nutriments dans l'induction de la résistance à l'insuline	45
Figure 4. Mécanismes d'action cellulaire activant les voies de signalisation pro-inflammatoires impliquées dans l'IR	50
Figure 5. Mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'association et la relation bidirectionnelle entre l'IR et la dysfonction endothéliale	65
Figure 6. Voies de signalisations métaboliques et vasculaires de l'insuline associées à des effets proathérogéniques.....	75
Figure 7. Structure pentamérique de la CRP	82
Figure 8. Effets pro-inflammatoires et pro-athérogéniques de la CRP	95

Article :

Figure 1. Effect of PA on endothelial CRP protein expression and production. Role of ceramide.....	130
Figure 2. Role of oxidative stress and PKC in PA-induced endothelial CRP protein expression.....	131
Figure 3. Effect of PA on endothelial CRP mRNA expression	132

Figure 4. Role of the NF- κ B and Jak/STAT pathways in PA-induced endothelial CRP mRNA expression.....	133
Figure 5. Role of CRP in PA-induced decrease in endothelial NO production. Involvement of AMPK and NF- κ B pathways	134
Figure 6. Relationship among the signaling pathways potentially involved in PA-induced decrease in NO production.	135
 Discussion :	
Figure 9. Voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de la CRP endothéliale par le PA.....	159

Liste des abréviations

All : angiotensine II

ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine

ADN: acide désoxyribonucléique

AGEs : produits terminaux de glycation

AG : acides gras

AGL : acides gras libres

AICAR : 5-amino-4-imidazole carboxamide 1- β -D-ribofuranoside

Akt : protéine kinase B

AMP : adénosine monophosphate

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

AngII : angiotensine II

AP-1 : protéine activée-1

Apo (B) : apolipoprotéine (B)

ARN : acide ribonucléique

AT1R : récepteur de type I de l'angiotensine

ATP : adénosine triphosphate

AVC : accident vasculaire cérébral

C/EBP : "CCAAT/box Enhancer Binding Protein"

CML : cellules musculaires lisses

CoA : coenzyme A

CPT-1 : carnitine palmitoyl transferase

CRP : protéine C-réactive

DAG : diacylglycérol

DHA : acide docosahexaénoïque

ED : dysfonction endothéliale

EGSIR: *“European Group for the Study of insulin Resistance”*

eNOS : oxyde nitrique synthase endothéliale

EPIC : *“European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition”*

ET-1 : endothéline-1

EPA : acide eicosapentaénoïque

ER : reticulum endoplasmique

ERK 1/2: kinases extracellulaires régulées 1/2

FGF : facteur de croissance des fibroblastes

FMD : vasodilatation médiée par le flux

GFAT: glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase

GlucNAc : acétylglucosamine

GLUT-4 : transporteur de glucose-4

Grb2 : protéine 2 liée au récepteur de facteur de croissance

GTP : guanosine triphosphate

HAECs : cellules endothéliales aortiques humaines

HbA1c : hémoglobine glyquée

HDL : lipoprotéines de haute densité

hsCRP : CRP hautement sensible

HOMA: *“Homeostasis model assessment of insulin resistance”*

HOPE: *“Heart Outcomes Prevention Evaluation”*

ICAM-1 : molécule d'adhésion intercellulaire-1

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

IGF-1R : récepteur du facteur de croissance de l'insuline-1

IKK β : kinase I kappa bêta

IL-1 : interleukine-1

IL-1 β : interleukine-1 bêta

IL-6 : interleukine-6

IL-8 : interleukine-8

IL-10 : interleukine-10

IL-17 : interleukine-17

INF- γ : interféron gamma

IMC : indice de masse corporelle

IMT : épaisseur intima-média

IR : insulino-résistance

IRAS : *“Insulin Resistance Atherosclerosis Study”*

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

IRS-2 : substrat du récepteur de l'insuline-2

8-iso-PGF2 α : 8-iso-prostaglandine F2 alpha

JAK: janus kinase

JNK: kinase c-jun N-terminale

JUPITER: *“Justification for the Use of Statins in Prevention-an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin”*

LA : acide linoléique

LCFA-CoA : *“long chain fatty acid acyl CoA”*

LDL : lipoprotéines de basse densité

LIPID: *“Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease”*

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

LPL : lipoprotéine lipase

LPS : lipopolysaccharide

MAC : complexe d'attaque membranaire

MAPK : protéine kinase activée par les mitogènes

MCP-1 : protéine chémoattractive monocytaire-1

M-CSF : facteur macrophagique stimulant des colonies

MMP : métalloprotéinases

MPO : myeloperoxydase

MRFIT: *“Multiple Risk Factor Intervention Trial”*

NAC : N-acétylcystéine

NADH : nicotinamide adénosine dinucléotide (forme réduite)

NADPH: nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate

NAFLD : stéatose hépatique non alcoolique

NF- κ B : facteur nucléaire-kappa B

NO : oxyde nitrique

OA : acide oléique

OIR: obèses insulino-résistants

OIS: obèses insulino-sensibles

OMN: obèses métaboliquement normaux

OxLDL : lipoprotéine de basse intensité oxydée

PA : acide palmitique

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

PBMC : cellules sanguines mononucléées périphériques

PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes

PDK-1 : kinase dépendante des phosphoinositides-1

PI-3K : phosphatidylinositol-3kinase

PIP(3) : phosphatidyl inositol (3,4,5)-triphosphate

PKB : protéine kinase B

PKC : protéine kinase C

PPAR : récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes

RAGE : récepteur des produits terminaux de glycation

RNS : espèces nitrées réactives

ROS : espèces réactives oxygénées

SAA : amyloïde sérique A

ShC : protéine adaptatrice p66

SH2 : domaines homologues Src2

SOCS : suppresseurs de protéines de signalisation de cytokines

SR : récepteur scavenger

SREBP-1 : élément de régulation des stérols-1

STAT : protéines de transduction et de régulation de la transcription

SYK : *“spleen tyrosine kinase”*

TF : facteur tissulaire

TLR-4 : récepteur de type toll-4

TG : triglycérides

TNF α : facteur de nécrose tumorale alpha

TZDs : thiazolidinediones

UCP-1 : protéine découplante-1

UDP : uridine 5' diphosphate

UPR : *“unfolded protein response”*

UKPDS : *“United Kingdom Prospective Diabetes Study”*

VCAM-1 : molécule d'adhésion vasculaire-1

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VLDL : lipoprotéine de très basse densité

vWF : facteur de von Willebrand

Dédicace

A ma très chère épouse qui m'a beaucoup donné.

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A mes chers frères et sœurs : Yvonne, Doris, Dave et Yvette.

Je dédie ce mémoire.

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de recherche pour sa direction, son amitié, sa compréhension, son support dans les moments difficiles, ses précieux conseils et surtout pour avoir su me transmettre sa passion pour la recherche.

Je tiens aussi à remercier ma très chère petite sœur, Yvette, pour son aide très précieuse tout au long de ma rédaction.

Merci à Dr Ling et Dr Zead que j'ai eu la chance de côtoyer au cours de mes études et dont les discussions souvent pleines d'humour ont toujours constitué des sources inépuisables d'idées et de réflexions.

I. INTRODUCTION

I.1 Insulino-résistance (IR)

I.1.1 Généralités

I.1.1.1 Effets biologiques de l'insuline

A) Effets métaboliques. L'insuline est une hormone anabolique très puissante qui exerce ses effets métaboliques principalement au niveau du foie, du tissu adipeux et du muscle squelettique (Ferrannini & De Fronzo, 2004). L'insuline stimule le stockage d'énergie en favorisant la synthèse du glycogène aux niveaux hépatiques et musculaires, en augmentant la synthèse et le dépôt des triglycérides (TG) dans le tissu adipeux et enfin en augmentant la synthèse des protéines et en inhibant la protéolyse. L'insuline favorise aussi l'oxydation du glucose, fournissant ainsi une importante source d'énergie sous forme d'adenosine triphosphate (ATP). Dans certaines conditions physiologiques (période de croissance, adolescence, grossesse) et pathophysiologiques (obésité, diabète de type 2, stress, maladies aiguës), l'action cellulaire de l'insuline est altérée et un état de résistance à l'insuline se développe. Afin de compenser l'augmentation de la résistance des tissus à l'action métabolique de l'insuline, le pancréas augmente sa sécrétion d'insuline, phénomène qui sera à l'origine d'une hyperinsulinémie compensatrice systémique (Reaven, 1988).

Une résistance à l'insuline dans le tissu adipeux conduit à une lipolyse accrue avec pour conséquence une élévation des acides gras libres (AGL) circulants. Les manifestations fonctionnelles d'une augmentation du transport des AGL plasmatiques dans le muscle, le foie et les cellules pancréatiques sont une réduction d'action et de sécrétion de l'insuline, deux caractéristiques des troubles métaboliques présents dans le diabète de type 2 (Reaven, 1988). L'insulinorésistance (IR) au niveau adipocytaire est en outre associée à des défauts mitochondriaux (Richardson et al, 2005) responsables d'une diminution d'oxydation des acides gras et d'une accumulation intracellulaire d'esters d'acyl-coenzyme A (CoA) et d'autres produits toxiques provenant du

métabolisme lipidique tels les céramides et diacylglycérol (DAG) qui altèrent l'action de l'insuline dans le muscle squelettique et contribuent à aggraver l'IR (Ferrannini & De Fronzo, 2004; Richardson et al., 2005). Ce phénomène qui se produit en présence d'une hyperglycémie est dû à l'accumulation intracellulaire de malonyl-CoA, qui en inhibant l'activité de la carnitine palmitoyl-transferase (CPT-1), prévient le transport d'acides gras (AG) à longue chaîne du cytosol vers la mitochondrie, et, ce faisant, réduit l'oxydation des AGL et favorise l'accumulation d'esters d'acyl-CoA.

B) Effets vasculaires. Chez des sujets métaboliquement normaux, l'insuline exerce de nombreuses actions visant à maintenir un équilibre au niveau de l'homéostasie cardiovasculaire. Chez l'humain, une perfusion intraveineuse d'insuline stimule la vasodilatation et augmente le flux sanguin de manière oxyde nitrique (NO)-dépendante (Steinberg et al., 1994; Vollenweider et al., 1993). Certaines études (Baron et al., 1990; Scott et al., 2002; Vincent et al., 2006; Hoost et al., 1996), mais pas toutes (Kelly et al., 1988; Hernandez Mijares et al., 1995) ont aussi rapporté qu'une augmentation des niveaux d'insuline suite à une ingestion du glucose induit une augmentation du débit sanguin, diminue la résistance vasculaire, et augmente l'activité sympathique. Outre ses actions vasodilatatrices, l'insuline possède aussi des actions hémodynamiques vasoconstrictrices telles la stimulation de la sécrétion endothéliale d'endothéline-1 (ET-1) et il a été démontré tant chez l'animal (Verma et al., 2001) que chez l'humain (Cardillo et al., 1999) que les actions vasodilatatrices de l'insuline sont potentialisées par le blocage du récepteur de l'ET-1. Une perturbation dans l'équilibre entre les actions vasoconstrictrices et vasodilatatrices de l'insuline constitue un important facteur dans la pathogenèse de la dysfonction endothéliale associée aux états d'IR.

1.1.1.2 Voies de signalisation de l'insuline

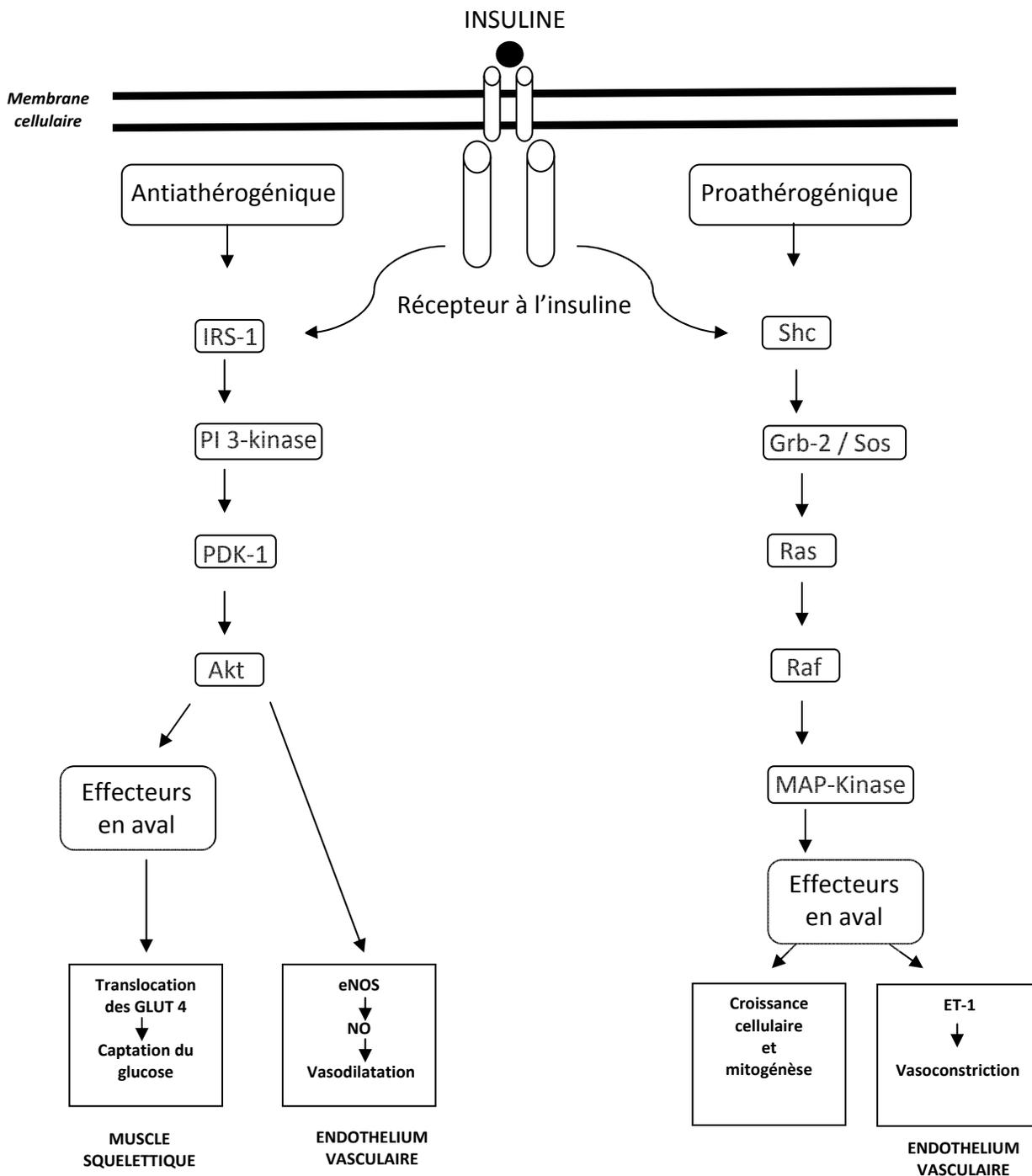


Figure 1. Caractéristiques générales des voies de signalisation de l'insuline

(adapté de Kim et al., *Circulation*, 2006 ; 113 :1888-1904)

Les actions biologiques de l'insuline sont initiées par la liaison de l'insuline à son récepteur à la surface cellulaire. Ce récepteur à activité tyrosine kinase, après activation par son ligand, phosphoryle des substrats intracellulaires, telles que les membres de la famille des substrats du récepteur à l'insuline (IRS) et des protéines adaptatrices p66 (Shc), lesquels servent de protéines d'ancrage pour les molécules de signalisation en aval. Les sous-unités tyrosine des IRS, une fois phosphorylées, se lient de manière spécifique aux domaines homologues Src 2 (SH2) contenus dans des protéines adaptatrices, telles que la sous-unité régulatrice p85 de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) ou la protéine 2 liée au récepteur de facteurs de croissance (Grb-2). Lorsque les domaines SH2 de la sous unité p85 se lient à l'IRS-1 sur les motifs phosphorylés en tyrosine, il y a activation de la sous-unité catalytique p110 de la PI3K. De même, lorsque les domaines SH2 de la Grb-2 se lient à la Shc sur les motifs phosphorylés en tyrosine, ceci permet l'activation du facteur d'échange de nucléotides Sos. L'activation de la PI3K génère des produits lipidiques telles que la phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP(3)). Ceci initie une cascade de phosphorylation de diverses sérines thréonine kinases incluant la protéine kinase-1 phosphoinositide-dépendante (PDK-1) et la sérine/thréonine protéine kinase B (PKB/Akt) dont l'activation culmine dans la plupart des actions métaboliques de l'insuline (Figure 1). Une autre voie de signalisation passe par le facteur Sos, lequel active une protéine liant le guanosine triphosphate (GTP), le Ras, qui initie à son tour une cascade de phosphorylation impliquant le Raf et la voie des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) (Nystrom & Quon, 1999; Reusch et al., 1995). Bien que les voies de transduction du signal insuline constituent un réseau très complexe, il est utile de considérer la voie de la PI3K comme étant la voie principale de signalisation de l'insuline, responsable de la régulation des fonctions métaboliques et les voies des Ras/MAPK comme étant celles qui régulent les fonctions biologiques de croissance, de mitogenèse et de différenciation cellulaire (Figure 1).

1.1.1.3 Définition et étiologie de l'insulinorésistance (IR)

A) Définition. L'IR est typiquement définie par une diminution de sensibilité et ou de réponse des tissus périphériques aux effets métaboliques de l'insuline. Ces derniers incluent les effets inhibiteurs de l'insuline sur la production endogène de glucose par le foie, les effets stimulants de l'insuline sur la captation périphérique du glucose (principalement au niveau du muscle squelettique) et enfin les effets inhibiteurs de l'insuline sur la lipolyse au niveau du tissu adipeux. L'IR est sous contrôle de différents facteurs de risques génétiques et environnementaux et constitue un élément déterminant du diabète de type 2 et de l'obésité. L'IR au niveau du tissu adipeux se traduit par une lipolyse accrue et est associée à une libération systémique accrue d'AGL et de cytokines, facteurs contribuant au développement de l'IR dans le foie et les muscles. Au niveau hépatique, l'IR entraîne une augmentation de la production du glucose, des lipoprotéines de très faibles densité (VLDL) et des TG alors qu'au niveau du muscle squelettique, la captation du glucose est atténuée. La combinaison de lipotoxicité et de glucotoxicité chronique est à l'origine d'une dysfonction des cellules β du pancréas, se traduisant par une diminution de leur masse et de la sécrétion de l'insuline.

B) Étiologie. De nombreux facteurs semblent contribuer au développement de l'IR chez les individus qui en sont atteints. Les sections suivantes discuteront du rôle du patrimoine génétique et des facteurs environnementaux dans la pathogenèse de l'IR.

1) *Facteurs génétiques.* À ce jour, de nombreuses mutations géniques rares associées à l'action de l'insuline ont été associées au syndrome d'IR extrême. Parmi ces mutations, on peut citer : 1) *les mutations du récepteur à l'insuline*, qui se caractérisent par une absence complète du récepteur à l'insuline (Krook, Brueton, O'Rahilly, 1993), 2) *la pseudoacromégalie liée à l'insuline*, qui se traduit probablement par une activation de la voie de signalisation mitogénique suite à une hyperinsulinémie sévère (Dib et al.,

1998), 3) *les mutations au niveau du "peroxisome-activated receptor gamma" (PPAR γ)*, un récepteur nucléaire qui semble jouer un rôle très important dans la différenciation des adipocytes et dans l'action de l'insuline (Tontonoz, Hu & Spiegelman, 1994; Day, 1999; Maeda et al., 2001). 4) *La lipodystrophie*, qui se caractérise par une résistance sévère à l'insuline et par une absence partielle ou complète du tissu adipeux. Il existe deux catégories principales de lipodystrophies : la lipodystrophie familiale partielle, où les patients semblent normaux à la naissance mais perdent le tissu gras sous-cutané des extrémités et fessiers après la puberté (Garg et al., 1999) et la lipodystrophie congénitale généralisée caractérisée par un manque généralisé de tissu adipeux et par une IR dès la naissance ou l'enfance (Seip & Trygstad, 1996).

L'importance des facteurs génétiques dans le développement de l'IR a été suggérée par la forte prévalence d'IR dans certaines populations, particulièrement chez les Indiens Pima dans l'Arizona (Knowler et al., 1990) et les Wanigela vivant en milieu urbain en Papouasie-Nouvelle-Guinée (Diamond, 2003). Dans ces populations, la prévalence de l'IR s'avère supérieure à celle observée dans d'autres groupes ethniques possédant un même style de vie. Un autre argument en faveur de l'étiologie génétique de l'IR est la concordance de près de 100% dans le diagnostic du diabète de type 2 entre des jumeaux monozygotiques mais seulement une concordance de 20% entre des jumeaux dizygotiques (Hales et Barker, 1992). À ce jour, les études sur les facteurs héréditaires de l'IR se sont limitées à des familles avec des formes extrêmes de la maladie. Il semble néanmoins déjà bien établi que l'interaction entre gènes et environnement joue un rôle clé dans l'expression de ce défaut (So et al., 2000).

2) *Facteurs environnementaux : diète, obésité et activité physique*

a) *La diète*. La nutrition joue un rôle important dans le développement de l'IR et du diabète de type 2. Il a été proposé que les nutriments puissent affecter la régulation de l'expression de gènes clés impliqués dans les actions de l'insuline (Laville et al., 2003).

Une diète riche en lipides, et plus particulièrement en AG saturés, augmente l'IR et le risque de diabète (Hodge et al., 2007; Hu, van Dam, & Liu, 2001) tandis que les AG insaturés exercent l'effet contraire (Meyer, Kushi, Jacobs, Jr., & Folsom, 2001 ; Wang, Folsom, Zheng, Pankow, & Eckfeldt, 2003). Une consommation de grains entiers est inversement associée à l'indice "Homeostasis model assessment of insulin resistance" (HOMA-IR) et à une faible prévalence du syndrome métabolique (McKeown et al., 2004). Un faible indice glycémique, en grande partie attribué à une consommation de grains entiers, est aussi inversement associé au syndrome métabolique. Une récente étude a démontré qu'un ratio élevé AG polyinsaturés/saturés est associé à une réduction de risque de diabète indépendamment des autres facteurs de risques environnementaux et génétiques (Harding et al., 2004). Une consommation modérée d'alcool (Carlsson, Hammar, & Grill, 2005; Koppes, Dekker, Hendriks, Bouter, & Heine, 2005) ainsi qu'une consommation élevée de fruits et légumes (Heidemann et al., 2005; Montonen et al., 2005) réduit enfin les risques d'IR et de diabète de type 2.

b) *L'obésité*. L'hypothèse selon laquelle le tissu adipeux, non seulement, emmagasine et libère des AG mais aussi synthétise et libère un grand nombre d'autres composés actifs (Kershaw & Flier, 2004), a fourni un cadre conceptuel qui permet de comprendre comment l'obésité peut entraîner l'apparition de l'IR. Selon ce concept, une augmentation du tissu adipeux permet une libération en grande quantité de composés tels les AGL, l'angiotensine 2 (AII), la résistine, le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) et les interleukines (IL)-6 et -1beta (IL-1 β). Ces facteurs pro-inflammatoires et les AGL relâchés dans la circulation à partir du tissu adipeux altèrent les voies de signalisation de l'insuline dans les tissus non-adipeux, engendrant une IR généralisée. Les mécanismes par lesquels ces facteurs adipocytaires altèrent les actions biologiques de l'insuline seront développés plus loin. Le rôle crucial des AGL dans le développement de l'IR est bien démontré. Ainsi, la plupart des sujets obèses ont des niveaux

plasmatiques d'AGL élevés (Reaven, Hollenbeck, Jeng, et al., 1988) et une augmentation de ces niveaux induit une résistance à l'insuline chez l'homme (Boden, Chen, Ruiz, et al., 1994) alors qu'une diminution des AGL exerce l'effet inverse (Santomauro, Boden, Silva, et al., 1999).

c) *L'activité physique*. L'effet cardioprotecteur de l'exercice s'explique en partie par le fait que l'activité physique régulière améliore les anomalies du syndrome métabolique, entre autres en augmentant la sensibilité à l'insuline et en améliorant le profil lipidique. Une activité physique régulière, soit en moyenne 150 min d'exercice physique d'intensité modérée à élevée par semaine réduit jusqu'à 63% le risque de diabète de type 2 (Yates, Khunti, Bull, Gorely, & Davies, 2007). Chez les individus obèses et diabétiques, l'activité physique diminue les concentrations et sécrétion d'insuline (Giacca, Groenewoud, Tsui, McClean, & Zinman, 1998). Notons également que l'activité physique est indépendamment associée à la prévalence et à l'incidence de diabète de type 2 aussi bien chez l'homme que chez la femme (Laaksonen et al., 2005; Hussain et al., 2007). Des études transversales démontrent d'autre part une association entre l'inactivité physique et les niveaux d'inflammation systémique tant chez des sujets sains (Abramson et al., 2002 ; Fallon et al., 2005 ; Geffken et al., 2001 ; King , Carek , et al., 2003) que des personnes âgées (Bruunsgaard et al., 2003). Des données de deux études longitudinales démontrant qu'un entraînement régulier induit une réduction des niveaux de CRP (Fallon et al., 2005 ; Mattusch et al., 2000) suggèrent que l'activité physique *per se* pourrait inhiber l'inflammation systémique. Petersen et al (Petersen et al., 2005), ont démontré pour leur part qu'un exercice régulier réduisait les niveaux de TNF- α et par conséquent pourrait offrir une protection contre une résistance à l'insuline induite par le TNF- α . Ces données ont été supportées par une étude récente démontrant que l'exercice normalisait la surexpression de TNF- α chez des souris n'exprimant pas le récepteur du TNF- α (Keller et al., 2004).

1.1.1.4 Contributions de l'IR des tissus spécifiques

Comme cité précédemment, l'insuline exerce ses effets métaboliques principalement au niveau du foie, du tissu adipeux et du muscle squelettique (Ferrannini & De Fronzo, 2004). Des défauts dans la capacité de l'insuline à stimuler la captation du glucose au niveau du muscle squelettique et de supprimer la production hépatique du glucose et la lipolyse au niveau du tissu adipeux tendent à coexister chez des individus insulino-résistants (Groop et al, 1989). Donc il s'avère primordial d'évaluer les effets de l'IR dans chacun de ces tissus.

A) IR au niveau hépatique. L'insuline agit au niveau hépatique via son récepteur à activité tyrosine kinase afin de freiner la production hépatique de glucose, stimuler la synthèse de glycogène et la lipogénèse et induire l'exportation de TG sous-forme de VLDL. Dans l'IR hépatique, la production hépatique de glucose est augmentée essentiellement par l'activation de la voie de la gluconéogenèse, ce qui entraîne une hyperglycémie à jeun. La lipogénèse au niveau hépatique reste pour sa part augmentée probablement à cause d'une activation directe du facteur de transcription SREBP-1. En raison d'une disponibilité accrue d'AG, il y a production élevée de VLDL riches en TG. Un déséquilibre entre la voie de la synthèse des TG et les voies d'oxydation des AG est à l'origine d'une stéatose métabolique (Capeau, 2008). Une augmentation intracellulaire de composés dérivés des AG est responsable de l'activation de diverses kinases sensibles au stress, entraînant une phosphorylation des résidus sérines des IRS et diminuant ainsi la transmission du signal de l'insuline (Petersen & Shulman, 2006). De manière intéressante, une diminution d'IR résultant d'une perte de poids chez des sujets obèses ou d'un traitement par des agents insulinosensibilisateurs tels les thiazolidinediones (TZD) est associée à une diminution de la stéatose hépatique (Petersen, Dufour, Befroy, et al., 2005; Tiikkainen et al., 2004; Utzschneider et al., 2006).

B) IR au niveau du muscle squelettique. Le muscle squelettique est quantitativement le tissu le plus important impliqué dans l'homéostasie glucidique, puisqu'il capte à peu près 80% du glucose ingéré (Warram et al., 1990). De ce fait, une diminution de la capacité de l'insuline à stimuler la captation du glucose par ce tissu est d'une importance considérable pour l'homéostasie glucidique de l'organisme. Chez les individus insulino-résistants, la captation du glucose et la synthèse de glycogène dans le muscle sont fortement réduites (Kelly, Mokan, & Mandarino, 1992). Tsao et collègues (Tsao et al., 1999) ont documenté l'absence d'hyperglycémie chez des souris dont l'expression génique du transporteur de glucose GLUT4 est supprimée, ce qui laisse croire que les anomalies du métabolisme glucidique au niveau musculaire chez des patients insulino-résistants et diabétiques de type 2 ne s'explique pas seulement par le fait que la captation du glucose induite par l'insuline est altérée. À ce sujet, il est important de rappeler le rôle central attribué au tissu adipeux viscéral dans la pathogenèse de l'IR (Bjorntorp, 1990), qui en libérant une quantité accrue d'AGL dans le système porte, serait à l'origine d'une IR au niveau musculaire en inhibant la captation du glucose.

C) IR au niveau du tissu adipeux. Le rôle du tissu adipeux viscéral dans les maladies métaboliques telles que le diabète de type 2, l'IR et le syndrome métabolique, a fait l'objet de plusieurs travaux ces dernières années et plusieurs études récentes ont pu démontrer que l'adiposité viscérale et non l'adiposité sous-cutanée ou totale, est associée de manière indépendante à l'IR (Lebovitz & Banerji, 2005). L'IR au niveau du tissu adipeux est caractérisée par une diminution de la suppression de la lipolyse par l'insuline avec augmentation de la libération d'AGL dans la circulation. La capacité de l'insuline à réguler les niveaux plasmatiques d'AGL est altérée chez les individus obèses et non obèses insulino-résistants (Campbell, Carlson, Nurjhan, 1994; Jensen et al., 1989; Abbasi et al., 2000.) et ce défaut apparaît très tôt chez les individus qui ont des

prédispositions génétiques à la résistance à l'insuline (Eriksson et al., 1999; Gelding et al., 1995). Cette altération métabolique contribue au développement de l'IR au niveau hépatique et musculaire.

1.1.1.5 Conditions pathologiques associées à l'IR

A) L'obésité. L'obésité représente le principal facteur de risque de développement de l'IR chez les enfants et les adolescents (Caprio, 2002), et le couple IR/hyperinsulinémie est considéré comme un lien entre l'obésité, les anomalies métaboliques et les risques cardiovasculaires associés (Weiss & Kaufman). Environ 55% de la variation de sensibilité à l'insuline peut s'expliquer par l'adiposité totale, et ce après ajustement pour d'autres facteurs confondants, telles que l'âge, le sexe, l'ethnie et le stade de développement pubertaire (Caprio, 2002). Les individus obèses présentent une hyperinsulinémie et une IR avec un métabolisme glucidique diminué de 40% comparativement aux individus non obèses (Caprio, Bronson et al., 1996). Une étude menée récemment chez des adolescents américains a montré l'existence d'une résistance à l'insuline chez près de 50% des sujets obèses (Lee et al., 2006), l'adiposité étant le facteur le plus important affectant la sensibilité à l'insuline. A noter cependant que Stefan et al. (Stefan et al., 2008) ont démontré récemment l'existence de sujets obèses métaboliquement normaux (OMN) et ont proposé un mécanisme pour expliquer ce phénomène. Ces sujets atteints d'obésité métaboliquement bénigne présentent des quantités de gras viscéral, hépatique et musculaire moindres que celles retrouvées chez des sujets obèses insulino-résistants. Ces caractéristiques métaboliques suggèrent que les OMN ont une meilleure capacité à capter les AGL au niveau du tissu adipeux et pourraient expliquer, du moins en partie, l'augmentation de sensibilité à l'insuline rapportée chez ces sujets. Ces données ont été appuyées par les travaux de Saccurro et al., (Saccurro et al., 2008) qui ont documenté, chez les OMN, des niveaux d'AGL

similaires à ceux des sujets normaux et nettement inférieurs à ceux rencontrés chez des sujets obèses insulino-résistants (OIR) et chez des sujets de poids normal mais métaboliquement obèses.

Plusieurs facteurs métaboliques et inflammatoires diffèrent entre obèses insulino-résistants (OIR) et obèses insulino-sensibles (OIS). En effet, malgré le fait qu'ils aient un excès de gras corporel, les OIS ont un profil métabolique favorable, caractérisé par une sensibilité à l'insuline élevée, une tension artérielle normale et des profils lipidique, inflammatoire et hormonal normaux (TG bas, faibles concentrations de CRP, niveaux élevés d'adiponectine et de HDL cholestérol et moindre quantité de gras ectopique) (Aguilar-Salinas et al., 2008; Brochu et al., 2001; Karelis et al., 2005). Outre le fait qu'ils présentent un profil métabolique proche de celui des individus jeunes et maigres (Dvorak et al., 1999), les OIS présentent des incidences faibles de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires (Meigs et al., 2006). Récemment il a été proposé qu'un profil inflammatoire favorable puisse faire partie du profil métabolique protecteur retrouvé chez les OIS. Ainsi, Karelis et al. (Karelis et al., 2004) ont démontré que les individus OMN avaient 92,7% de moins de CRP que ceux présentant un profil métabolique défavorable. L'observation que ces différences dans les niveaux de CRP étaient abolies lors du contrôle de la quantité de gras viscéral, suggère que les faibles niveaux de CRP retrouvés chez les OMN soient attribuables à la faible quantité de gras viscéral présente chez ces individus.

B) Le diabète. Le diabète est une pathologie caractérisée par une hyperglycémie chronique ainsi que par des perturbations du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines imputables à des défauts de sécrétion d'insuline, d'action de l'insuline ou des 2. Il existe 3 formes principales de diabète : le diabète de type 1, le diabète de type 2 et le diabète de grossesse. Le diabète de type 2 est la forme la plus

répandue. Le diabète de type 2 résulte d'un double défaut : l'altération de l'action de l'insuline et l'altération de la fonction des cellules β du pancréas, donc de la sécrétion de l'insuline. L'altération de l'action de l'insuline se produit quand les tissus cibles ne sont plus capables de répondre aux concentrations normales d'insuline présentes dans la circulation. Cette anomalie entraîne une hyperinsulinémie compensatrice afin de maintenir l'euglycémie. Au fil du temps, une détérioration fonctionnelle des cellules β peut empêcher le maintien des niveaux élevés de sécrétion d'insuline. Se développent alors progressivement une intolérance au glucose et éventuellement un diabète de type 2 (DeFronzo, Bonadonna, Ferrannini, 1992). En plus de causer une hyperglycémie dans le diabète de type 2, la RI et l'hyperinsulinémie compensatrice jouent un rôle dans d'autres anomalies métaboliques et vasculaires.

C) IR composante du syndrome métabolique. Le syndrome métabolique, un état d'IR également connu sous le nom de syndrome X ou de syndrome d'IR, a attiré la plus grande attention en raison de son impact sur la santé publique. Les critères de diagnostic du syndrome métabolique les plus couramment utilisés aux États-Unis sont ceux du National Cholesterol Education Program / Adult Treatment Panel III (NCEP / ATPIII) (Executive Summary of the third report of NCEP, 2001). L'Organisation Mondiale de la Santé (Alberti & Zimmet, 1998) et le "European Group for the Study of Insulin Resistance" (EGSIR) (Balkau & Charles, 1999) ont, eux aussi, établi leurs propres critères pour définir le syndrome métabolique. Ces trois définitions sont en accord sur les composantes essentielles du syndrome métabolique soit l'intolérance au glucose, l'obésité, l'hypertension et la dyslipidémie, mais cependant différent sur d'autres critères (Tableau 1). Les définitions de l'OMS et l'EGSIR sont les plus proches, incluant toutes les deux l'intolérance au glucose ou la résistance à l'insuline comme composante essentielle du syndrome métabolique (Alberti & Zimmet, 1998; Balkau & Charles, 1999), ce critère n'étant pas inclu dans la définition du NCEP/ATP III.

L'IR est la théorie la plus largement acceptée pour expliquer la physiopathologie du syndrome métabolique. Cependant, des études épidémiologiques indiquent qu'une importante proportion de patients souffrant de syndrome métabolique n'ont pas de signes d'IR, et que la corrélation entre la résistance à l'insuline et les différents composantes de ce syndrome est modérée (Mikhail, 2009). Si l'IR joue un rôle important dans le développement de l'hyperglycémie et de la dyslipidémie (Reaven, 1988 ; Cersosimo et al., 2006), l'implication de l'IR dans l'hypertension semble moins évidente (Hanley, Karter, Festa et al., 2002). L'obésité est considérée par plusieurs comme le facteur pathogénique du syndrome métabolique, pouvant être à l'origine ou pouvant aggraver l'IR (Bouchard et al., 1993; Despres, 1991). Cependant, comme l'IR, l'obésité n'est pas universelle chez les sujets présentant un syndrome métabolique et certains sujets obèses n'ont pas d'anomalies métaboliques (Messier, Karelis, Robillard et al., 2010).

WHO, 1999	European Group for the Study of Insulin Resistance, 1999	ATP III, 2001
Diabetes or impaired fasting glycaemia or impaired glucose tolerance or insulin resistance (hyperinsulinaemic, euglycaemic clamp-glucose uptake in lowest 25%)	Insulin resistance—hyperinsulinaemia: top 25% of fasting insulin Values from non-diabetic population	
Plus 2 or more of the following Obesity: BMI 30 or waist-to-hip ratio >0.9 (male) or >0.85 (female) Dyslipidaemia: triglycerides ≥ 1.7 mmol/L or HDL cholesterol <0.9 (male) or <1.0 (female) mmol/L Hypertension: blood pressure $>140/90$ mm Hg Microalbuminuria: albumin excretion >20 $\mu\text{g}/\text{min}$	Plus 2 or more of the following Central obesity: waist circumference >94 cm (male) or >80 cm (female) Dyslipidaemia: triglycerides >2.0 mmol/L or HDL cholesterol <1.0 mmol/L Hypertension: blood pressure $\geq 140/90$ mm Hg and/or medication Fasting plasma glucose ≥ 6.1 mmol/L	3 or more of the following Central obesity: waist circumference >102 cm (male), >88 cm (female) Hypertriglyceridaemia: triglycerides ≥ 1.7 mmol/L Low HDL cholesterol: <1.0 mmol/L (male), <1.3 mmol/L (female) Hypertension: blood pressure $\geq 135/85$ mm Hg or medication Fasting plasma glucose ≥ 6.1 mmol/L

Tableau 1. Comparaison des définitions du syndrome métabolique (adapté de Eckel et al., *Lancet*, 2005 ; 365 :1415-1428).

I.1.2 Physiopathologie de l'IR

L'IR est associée à diverses anomalies métaboliques, incluant l'hyperglycémie, la dyslipidémie et l'inflammation dont le rôle dans le développement de l'IR semble aujourd'hui clairement établi. Les termes "glucotoxicité", "lipotoxicité" ou encore "glucolipotoxicité" représentent actuellement des concepts populaires qui relatent les influences néfastes ou toxiques causées par un excès de glucose et/ou de lipides sur certains tissus insulino-sensibles. Dans un sens, ces concepts peuvent apparaître paradoxaux puisque des niveaux physiologiques de glucose et de lipides sont essentiels aux fonctions biologiques de la majorité des tissus. De ce fait, il existe un spectre allant des conditions normoglycémiques et normolipidémiques aux anomalies hyperglycémiques et hyperlipidémiques qui doit être pris en compte, surtout dans la pathologie de l'IR. Le terme "toxicité", qui implique l'existence de dommages, mène à la considération que dans certains circonstances, les niveaux de glucose et de lipides entrant ou synthétisés dans les tissus peuvent devenir si élevés qu'ils induisent des pathologies.

I.1.2.1 Glucotoxicité

Une des composantes non génétique acquise de l'IR est la glucotoxicité. Le terme glucotoxicité peut se définir comme étant un taux durablement élevé de glucose dans le sang induisant des effets néfastes sur la sécrétion et l'action de l'insuline (Rosetti, Giaccari, DeFronzo, 1990). La glucotoxicité doit être prise en compte dans la physiopathologie de l'IR car son effet néfaste est réversible par normalisation de la glycémie. (Rosetti, Smith, Shulman et al., 1987). La validité du concept de glucotoxicité a été vérifiée dans des modèles animaux chez qui une élévation discrète de la glycémie est produite par pancréatectomie partielle (Girard, 1999). Dans ces modèles, une perte de cellules β et le développement d'un diabète franc est observé. Il

est important de noter qu'indépendamment des anomalies primitives de la cellule β , le potentiel insulino-sécréteur est altéré au cours de l'évolution du diabète et porte à la fois sur la fonction (avec une réversibilité possible) et sur la quantité de cellules β (une étape non retour). Les mécanismes par lesquels l'hyperglycémie cause l'IR seront discutés dans la section suivante.

1.1.2.2 Lipotoxicité

Les patients diabétiques ou avec syndrome métabolique présentent une dyslipidémie typique caractérisée par une hypertriglycéridémie, une augmentation des niveaux sériques d'ApoB, des particules denses de lipoprotéines de faible densité (LDL), et une diminution des taux sériques des lipoprotéines de haute densité (HDL). Ces patients présentent en outre des niveaux élevés d'AGL dans leur circulation. Il a été bien démontré que l'augmentation des taux plasmatiques d'AGL observée dans les états insulino-résistants constitue un facteur majeur du développement de l'IR (Burant, Sreenan, Hirano, et al., 1997; Reaven, Hollenbeck, Jeng, et al., 1988). Les effets toxiques des AGL ou lipotoxicité s'exercent principalement au niveau du muscle squelettique et du foie. Au niveau du muscle, les AGL induisent une diminution de captation du glucose alors qu'au niveau hépatique, ils accroissent la gluconéogenèse (Lam et al., 2003). Le phénomène de lipotoxicité s'exerce enfin au niveau des cellules β du pancréas (Prentki and Nolan, 2006). Une exposition prolongée des cellules β à des concentrations élevées d'AG diminue le potentiel de sécrétion de l'insuline par ces cellules. Malgré l'avancement des connaissances relatives aux mécanismes par lesquels les AGL induisent l'IR au niveau hépatique et musculaire, on ignore encore si les événements initiaux menant au développement de l'IR au niveau musculaire découlent d'un effet direct des AG dans le muscle ou sont secondaires à l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux ou le foie (Kraegen & Cooney, 2008).

1.1.2.3 Inflammation

L'IR est accompagnée d'une réponse inflammatoire à bas bruit et pour cette raison, il a été proposé que l'inflammation puisse contribuer de manière majeure au développement de l'IR. Plusieurs médiateurs produits par les cellules immunitaires et les adipocytes ont été identifiés comme participants potentiels au développement de l'IR associée à l'obésité. Parmi eux, se retrouvent des cytokines, un grand nombre de molécules produites par le tissu adipeux, appelées les adipokines, et enfin les AGL. Divers facteurs de transcription et kinases ont également été impliqués dans le développement de l'IR associée à l'obésité (Tilg & Moschen, 2008).

Le tissu adipeux, et plus spécifiquement le tissu adipeux viscéral, ont reçu un intérêt considérable de la part de la communauté scientifique en tant que sites pathogéniques majeurs de l'IR associée à l'obésité. Adipocytes et macrophages infiltrant le tissu adipeux obèse sont tous deux d'importantes sources de diverses molécules inflammatoires incluant le TNF- α , l'IL-1 et 6, la résistine, la leptine, l'adiponectine, la protéine chémoattractante des monocytes (MCP)-1, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1) et l'angiotensinogène et semblent, à ce titre, tous deux participer à la pathogénèse de l'IR induite par l'inflammation. Puisque la majeure partie des lipides accumulés est stockée dans les adipocytes, il est généralement assumé que les adipocytes initient le processus inflammatoire et que les macrophages servent à amplifier le signal (Shoelson et al., 2006).

Les AGL sont d'autres facteurs stimulant l'inflammation dans le tissu adipeux, le muscle et le foie. Ils exercent cet effet en activant des voies de signalisation pro-inflammatoires (Itani et al., 2002) (Figure 2). Plusieurs événements précoces existent pour expliquer l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires par les AGL. Premièrement, une augmentation d'AGL plasmatique mène à une accumulation intramyocellulaire de DAG et à une activation de nombreuses isoformes de la protéine

kinase C (PKC) (Itani et al., 2002; Boden, She, Mozzoli, et al., 2005). Gao et al. ont récemment démontré que l'activation de la kinase Ikappa (IKK) par les AGL, une kinase impliquée dans l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) au niveau des adipocytes était PKC-dépendante (Gao et al., 2004). Donc, l'activation de PKC médiée par le DAG peut être un effecteur en amont de l'activation du NF- κ B. Deuxièmement, quelques évidences récentes suggèrent que l'activation de l'IKK et du NF- κ B induite par les AGL puisse être, du moins en partie, médiée par les "Toll like receptor-4" (TLR-4) (Shi et al., 2006), des récepteurs essentiels au développement de la réponse immunitaire innée en réponse aux pathogènes et à la production de cytokines inflammatoires (Medzhitov, 2001). Troisièmement, il a été démontré que l'obésité et les AGL génèrent un stress du réticulum endoplasmique (ER) pouvant mener à une activation de l'IKK et de la kinase c-jun N-terminal (JNK), une MAPK sensible au stress oxydatif, et pouvant donc générer une réponse inflammatoire (Ozcan et al., 2004) (Figure 2).

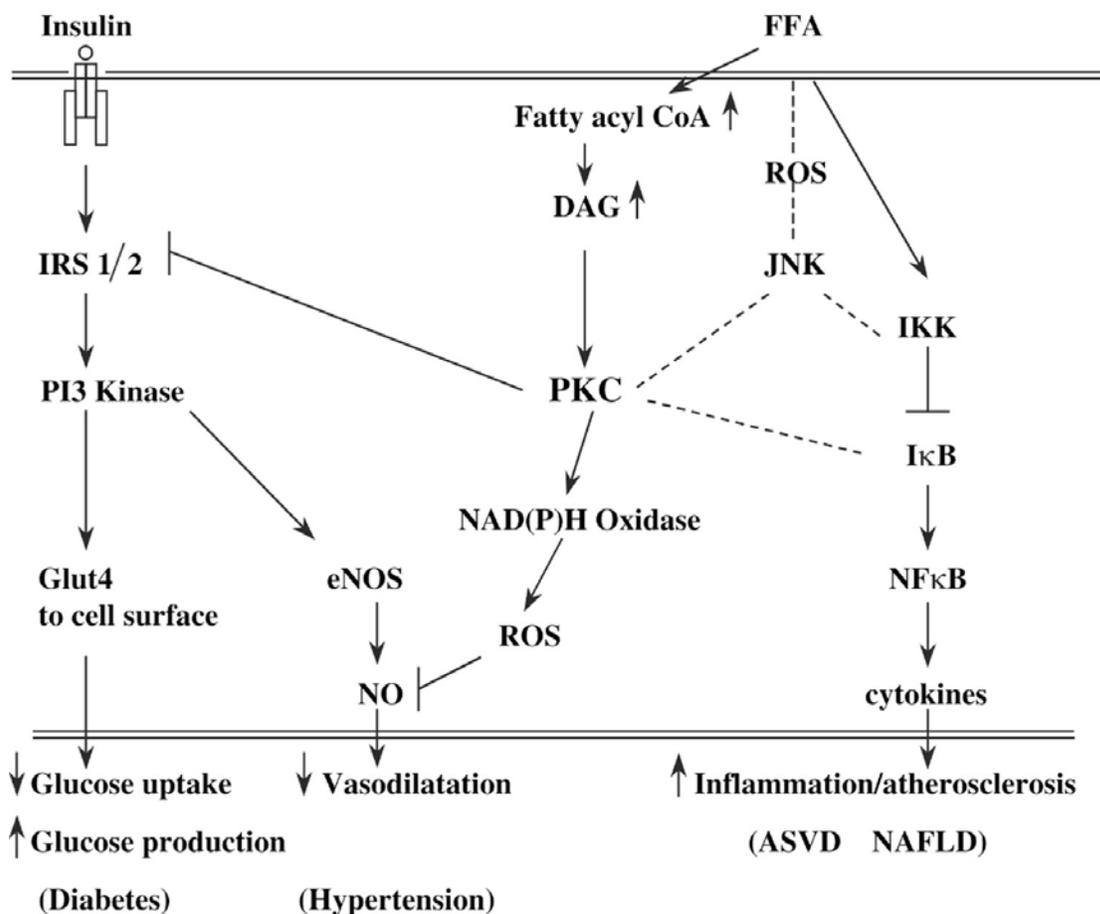


Figure 2. Rôle central des AGL dans l'IR et l'inflammation (Boden, *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, 2008; 37 : 635-646).

À ce jour, les résultats d'études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ont pu démontrer le rôle de divers médiateurs inflammatoires et de voies de signalisation dans la pathogenèse de l'IR. Ainsi, il a été documenté que la suppression de l'IKK β améliore l'IR induite par l'obésité chez l'animal, soulignant les rôles potentiels du NF- κ B et des cellules inflammatoires dans la pathogenèse de l'IR (Arkan et al., 2005). Sur la base de ces données, les scientifiques évaluent aujourd'hui la possibilité que des thérapies anti-inflammatoires telles que les salicylates, les statines, les TZD puissent améliorer ou inhiber l'IR. À ce jour, très peu de données sont disponibles à ce sujet.

Outre le tissu adipeux, le foie est aussi le siège d'un état inflammatoire dans l'obésité, tel que reflété par l'induction de gènes inflammatoires au niveau hépatique au cours de l'expansion du tissu adipeux (Cai et al., 2005). Cette réponse inflammatoire aiguë au niveau hépatique, similaire à celle retrouvée dans le tissu adipeux obèse, pourrait être imputable à l'accumulation de lipides au niveau des hépatocytes. Alternativement, il est possible que des substances pro-inflammatoires présentes dans la veine porte et potentiellement produites par le gras abdominal puissent initier les réactions inflammatoires au niveau hépatique (Fontana, et al., 2007). Indépendamment du mécanisme qui prévaut, l'essentiel à retenir est qu'il y a activation du NF- κ B et surexpression de cytokines pro-inflammatoires dans le foie stéatosique et que ces médiateurs participent au développement de l'IR (Emanuelli et al., 2001). Les mécanismes par lesquels les cytokines pro-inflammatoires induisent l'IR seront discutés ci-dessous.

I.1.3 Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'IR

I.1.3.1 Glucotoxicité

L'hyperglycémie associée à l'intolérance au glucose et au diabète cause l'IR en augmentant le stress oxydatif, la formation de produits terminaux de glycation (AGEs) et le flux à travers la voie de biosynthèse des hexosamines et finalement en activant la voie du DAG et de la PKC (Brownlee, 2005; Goldberg & Dansky, 2006; Reusch, 2003).

A) Stress oxydatif. L'hyperglycémie augmente la production d'espèces réactives oxygénées (ROS). Cet effet est inhibé en présence de découpleurs de la phosphorylation oxydative mitochondriale ou par surexpression cellulaire de la "uncoupling protein-1" (UCP-1) ou de la superoxyde manganèse dismutase. Ces traitements préviennent en outre l'activation de la PKC induite par le glucose, la

formation des AGEs, l'accumulation de sorbitol et l'activation du facteur nucléaire NF- κ B (Nishikawa et al., 2000). Une augmentation de ROS se traduit par une IR accompagnée d'une altération de la translocation des transporteurs de glucose GLUT4 stimulée par l'insuline et de la captation du glucose. Les antioxydants, tels l'acide α -lipoïque, préviennent les effets délétères des ROS sur le transport du glucose *in vivo* et *in vitro* (Maddoux et al., 2001; Rudich et al., 1998; Haber et al., 2003). Une augmentation du stress oxydatif est associée à la stimulation de nombreuses sérine/thréonine kinases et à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et de la protéine activatrice-1 (AP-1), qui contribuent au développement de l'IR. Ainsi l'activation des JNK, PKC et de l'IKK β mène à la phosphorylation de la sérine de l'IRS-1 et altère la capacité de ces IRS-1 de fixer et activer la PI3K. La diminution de l'activation des kinases en aval, telles l'Akt et la PKC- ζ , se traduit par une diminution de la translocation des GLUT4 et du transport du glucose (Furukawa et al., 2004; Gao et al., 2002; Hirosumi et al., 2002). Les ROS activent en outre des voies de signalisation pro-inflammatoires, menant à la phosphorylation de l'IKK β et du NF- κ B (Kamata et al., 2005). L'activation du NF- κ B et de l'AP-1 régule la transcription de divers gènes pro-inflammatoires, telles les IL-1 et -6 et le TNF α . La contribution de l'inflammation dans l'IR sera discutée en détails plus loin.

B) Voie de biosynthèse des hexosamines. Une augmentation du flux du glucose via la voie de biosynthèse des hexosamines est un autre mécanisme par lequel l'hyperglycémie pourrait induire l'IR (Buse, 2006). La glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) est le facteur enzymatique limitant de cette voie (Figure 3), dont le produit final est l'uridine 5'-diphosphate (UDP)-N-acétylglucosamine (GlcNAc). Ce dernier est le substrat de la O-GlcNAc transférase, responsable de la modification post-traductionnelle des protéines. Une surexpression de GFAT chez la souris cause l'IR (Veerababu et al., 2000). La voie de biosynthèse des hexosamines peut agir comme un senseur nutritionnel qui joue un rôle dans l'IR et les complications vasculaires en

causant des modifications de la O-GlcNAc. Ainsi, une augmentation de O-GlcNacylation, un type de O-glycosylation d'une protéine où la GlcNAc s'attache aux résidus sérine et thréonine via les liaisons O-glycosidiques, peut, en altérant des protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline dont l'IRS-1 (Rossetti, 2000), induire une réduction de la translocation des GLUT4 stimulée par l'insuline et une diminution de la captation du glucose (Ball, Berkaw, Buse, 2006; Baron et al., 1995).

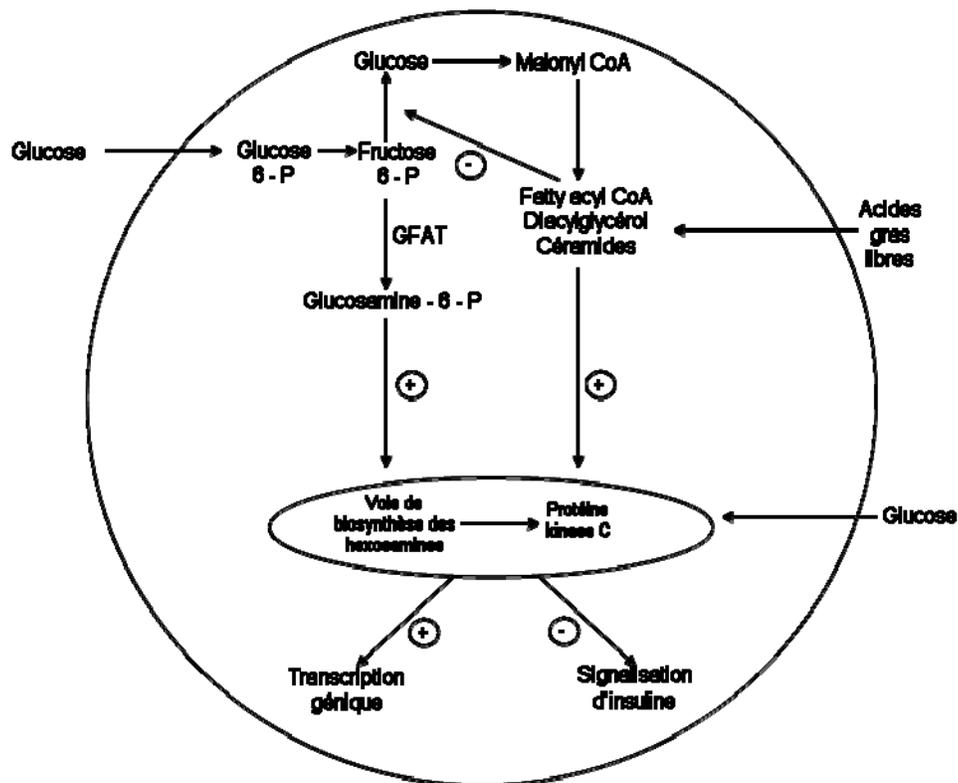


Figure 3. Rôle des voies sensibles aux nutriments dans l'induction de la résistance à l'insuline (adapté de *Joslin's Diabetes Mellitus*, 14^{ème} édition, 2005)

C) AGEs. Les AGEs sont des protéines ou des lipides qui subissent une glycosylation ou une glycooxydation non-enzymatique après contact avec l'aldose (Schmidt et al., 1994; Goldin et al., 2006). La formation d'AGEs est stimulée par l'hyperglycémie et le stress oxydatif (Nishikawa et al., 2000). Ces produits terminaux de glycation inhibent la phosphorylation de la tyrosine des IRS-1 et IRS-2 stimulée par l'insuline, menant à une altération de l'activité de la PI3K et de l'Akt (Miele et al., 2003). Les AGEs augmentent aussi la production des ROS et activent une voie de signalisation pro-inflammatoire menant à l'activation du NF- κ B (Hofmann et al 1999). Au niveau des cellules endothéliales, les AGEs diminuent la biodisponibilité du NO et l'expression de la synthase endothéliale du NO (eNOS) en accélérant la dégradation de l'ARN messenger (ARNm) du eNOS (Bucala, Tracey, Cerami, 1991; Rojas et al., 2000; Xu et al., 2003; Chakravarthy et al., 1998). Les AGEs augmentent aussi l'expression de l'ET-1 au niveau des cellules endothéliales, via l'activation du NF- κ B (Quehenberger et al., 2000). L'altération de la voie PI3K/Akt/eNOS et de la production de l'ET-1 par les AGEs cause l'IR et la dysfonction endothéliale (ED). Il est maintenant bien connu qu'une IR est à l'origine d'une ED et qu'une ED peut être aussi à l'origine d'une IR (Muniyappa et al., 2007). Cette relation bidirectionnelle entre IR et ED sera développée plus loin.

1.1.3.2 Lipotoxicité

Il a été démontré que les AGL pouvaient induire un défaut dans le transport du glucose stimulé par l'insuline (Boden & Chen, 1995; Dresner et al., 1999). S'il est démontré que les AGL peuvent directement altérer les voies de signalisation de l'insuline en stimulant la phosphorylation des sites sérine/thréonine de l'IRS-1 et -2, une hypothèse de plus en plus largement acceptée est que l'IR hépatique et périphérique puisse résulter de l'accumulation intracellulaire de divers métabolites impliqués dans la ré-estérification des AGL. Les AGL plasmatiques peuvent entrer facilement dans la

cellule où ils sont, soit oxydés pour donner de l'énergie sous-forme d'ATP soit ré-estérifiés pour stockage sous-forme de TG. Par conséquent, il n'est pas étonnant qu'une augmentation des concentrations plasmatiques d'AGL soit associée à une accumulation intracellulaire de TG (Boden, Lebed, Schatz, et al., 2001). Pour des raisons encore peu connues, une augmentation des niveaux d'AGL plasmatiques entraînent aussi une accumulation de nombreux métabolites impliqués dans la réestérification des AGL, tels les "long-chain fatty acyl-CoA" (LCFA-CoA) et le DAG (Itani et al., 2002) (Figure 3), un puissant activateur des isoformes classiques et nouvelles de la PKC (Farese, 2000). En plus de la PKC, plusieurs autres kinases à activité sérine/thréonine dépendante telles que l'IKK- β et la JNK peuvent aussi être activées par une augmentation aiguë du niveau d'AGL plasmatique (Boden, She, Mozzoli et al., 2005; Hotamisligil, 2005). Les mécanismes par lesquels les AGL activent ces kinases peuvent comprendre la formation de ROS médiée par les AGL (Inoguchi, Li, Umeda, et al. 2000), l'activation de la voie du TLR4 (Shi et al., 2006) ou le stress du ER (Hotamisligil, 2005). Une fois activées, une ou plusieurs de ces kinases peuvent interrompre la signalisation de l'insuline en diminuant la phosphorylation de la tyrosine de l'IRS-1 et -2 (Yu, Chen, Cline, et al., 2002). De là résultera une inhibition de l'activité de la voie de l'IRS/PI3 kinase/Akt qui contrôle la majorité des actions de l'insuline telles que la captation du glucose, la synthèse du glycogène, la glycogénolyse et la lipolyse (Saltiel & Kahn, 2001). Les AGL peuvent aussi interférer avec le transport du glucose stimulé par l'insuline en modulant la transcription génétique et la stabilité de l'ARNm du GLUT4 (Long & Pekala, 1996; Armoni et al., 2005) et une inhibition de l'expression hépatique du récepteur de l'insuline par le palmitate a été récemment documentée (Ruddock et al. J Biochem 144 :599, 2008).

Les céramides, des produits issus du métabolisme d'AG saturés à longue chaîne, inhibent pour leur part l'activation de l'Akt et la translocation des GLUT4 (Chavez

et al., 2003). Les niveaux de céramides dans le muscle squelettique des sujets obèses sont augmentés (Adams et al., 2004) et la surexpression de céramidase, protège contre l'IR induite par les AGL *in vitro* (Chavez et al., 2005).

1.1.3.3 Inflammation

Le diabète, l'obésité et d'autres troubles métaboliques chroniques sont associés à un état pro-inflammatoire caractérisé par une augmentation de marqueurs de l'inflammation dans la circulation ainsi que par une infiltration du tissu adipeux par des macrophages activés (Weisberg et al., 2003; Xu, Barnes, Yang et al., 2003). L'inflammation induit l'IR par l'action de divers médiateurs et l'activation de divers mécanismes cellulaires et moléculaires (Wellen & Hotamisligil, 2005). La cytokine pro-inflammatoire dont l'implication dans l'IR a été la plus largement étudiée est le TNF- α . Le TNF- α active une variété de sérine kinases, telles que la JNK, l'IKK β , et la kinase associée au récepteur de l'IL-1 (Nguyen et al., 2005; Gao et al., 2003; de Alvaro et al., 2004; Kim, Yeh, Ver, et al., 2005), qui augmentent directement ou indirectement la phosphorylation de la sérine des IRS-1 et -2, et par ce fait diminuent l'activité de la PI3 kinase et de l'Akt. Les cytokines pro-inflammatoires telles le TNF- α , l'IL-1 ou l'IL-6 induisent aussi les suppresseurs de protéines de signalisation de cytokines (SOCS) dont l'augmentation d'expression interfère avec l'interaction du récepteur à l'insuline avec l'IRS-1 et augmente de manière accrue la dégradation protéasomique de l'IRS-1 (Emmanuelli et al., 2001).

Outre les cytokines pro-inflammatoires, les ROS et le stress du ER activent aussi la JNK et l'IKK β (Shoelson et al., 2006) (Figure 4). Ces effets induisent une phosphorylation en sérine de l'IRS-1 et causent l'IR. Le rôle des ROS dans le développement de l'IR induite par l'obésité est appuyé par l'observation d'une augmentation des marqueurs systémiques de stress oxydatif avec l'adiposité (Keaney et al., 2003). L'accroissement des niveaux de stress oxydatif pourrait résulter de l'activation

de la NADPH oxidase par les lipides adipocytaires (Furukawa et al., 2004). Supportant un rôle du stress oxydatif dans le développement de l'IR, il a été démontré que le N-acétyl cystéine (NAC), un antioxydant, réduit les ROS et améliore la sensibilité à l'insuline d'animaux hyperglycémiques (Lin et al., 2005). L'effet des ROS sur l'IR pourrait impliquer des mécanismes pro-inflammatoires, puisque le stress oxydatif est responsable d'une augmentation de la production du TNF- α , de l'IL-6 et du MCP-1 et d'une diminution de la production de l'adiponectine. L'accumulation de lipides active aussi la "unfolded protein response" (UPR) qui augmente le stress du ER dans le tissu adipeux et le foie (Ozsan et al., 2004).

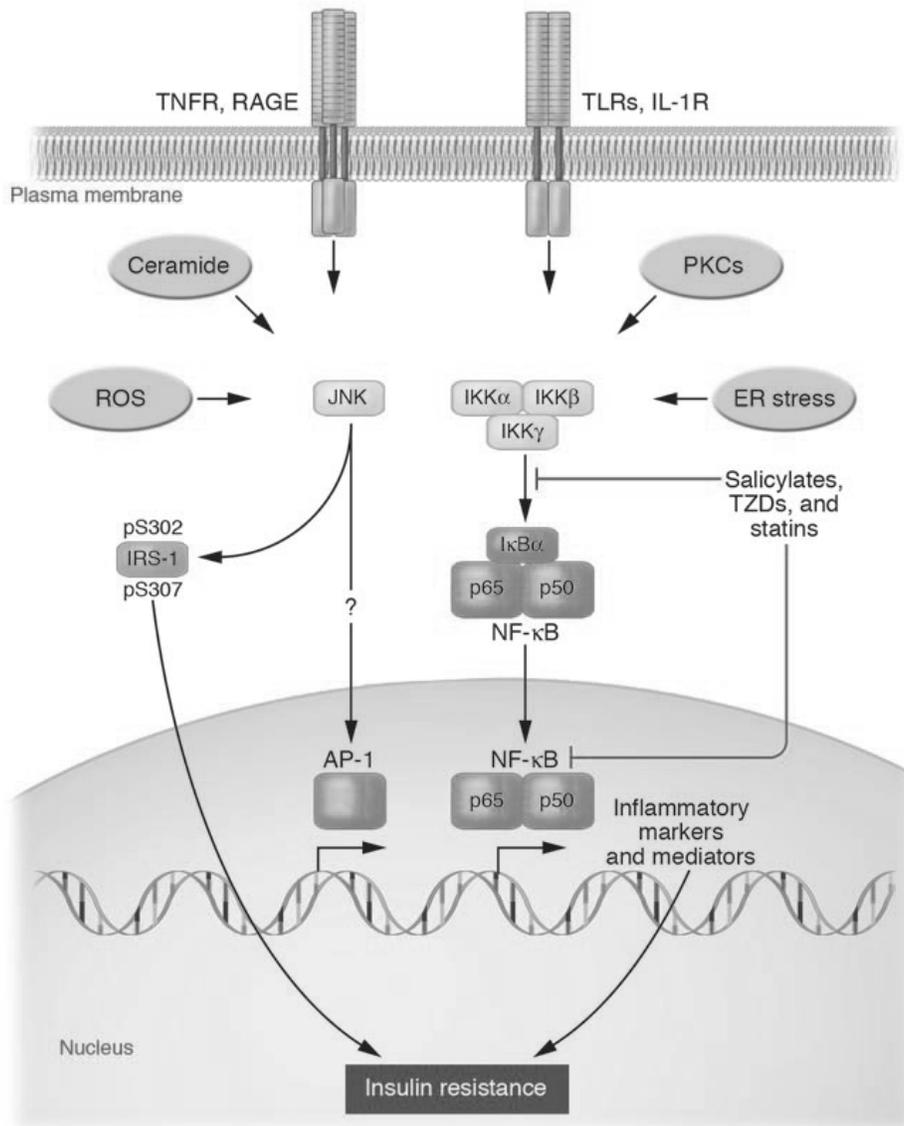


Figure 4. Mécanismes d'action cellulaire activant les voies de signalisation pro-inflammatoires impliquées dans l'IR (Shoelson et al. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 1793-1801).

I.2 IR et athérosclérose

I.2.1 Athérosclérose

I.2.1.1 Généralités

A) Définition. Les maladies cardiovasculaires représentent l'une des principales causes de mortalité de par le monde (Braunwald,1997). Le processus pathogénique majeur sous jacent aux maladies cardiovasculaires est l'athérosclérose. La lésion athéromateuse se caractérise d'un point de vue macroscopique par un épaissement de la paroi artérielle, une perte de son élasticité et un rétrécissement de sa lumière suite à l'infiltration et l'accumulation de lipides dans l'espace sous-endothélial. Bien que la présence de cellules inflammatoires dans les plaques d'athérome soit connue depuis le XIX^e siècle (Virchow, 1856), ce n'est que bien plus tard que Schwartz avancera l'hypothèse selon laquelle l'athérosclérose est une maladie inflammatoire impliquant la participation active des monocytes/macrophages (Schwartz et al., 1985). Aujourd'hui, il est communément reconnu que l'athérosclérose est une condition inflammatoire chronique caractérisée par un influx de cellules inflammatoires dans la paroi artérielle et par la production de molécules pro-inflammatoires dont le développement implique des interactions entre les lipoprotéines plasmatiques, les cellules vasculaires et la matrice extracellulaire de la paroi artérielle (Tiong & Brieger, 2005).

B) Stades de l'athérosclérose. L'athérosclérose est un processus pathologique progressif qui se déroule en 4 étapes : la dysfonction endothéliale, la strie lipidique, la lésion avancée ou compliquée et la plaque fibreuse instable.

1) *La dysfonction endothéliale (ED).* La première étape de l'athérosclérose est caractérisée par l'altération de la fonction endothéliale. Elle précède la lésion fibro-lipidique et contribue à son développement (Lusis, 2000). La définition, les mesures cliniques, les mécanismes physiopathologiques et le rôle de la ED dans la pathogenèse de l'athérosclérose seront développés dans la section I.2.1.3.

2) *La strie lipidique*. La strie lipidique est caractérisée par une accumulation dans l'espace sous-endothélial de cellules inflammatoires, en particulier les monocytes/macrophages et les lymphocytes T, et de cellules musculaires lisses (CML). L'infiltration de ces cellules à travers l'endothélium et leur accumulation dans l'espace sous-endothélial est favorisée par divers facteurs chémoattractants dont les LDL oxydées (oxLDL), le MCP-1, l'IL-8, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et le facteur macrophagique stimulant des colonies (M-CSF), un facteur important pour la survie et la multiplication des macrophages dans la lésion (Worthley et al., 2001). Au stade de strie lipidique, se retrouvent deux acteurs essentiels, d'une part les particules de LDL cholestérol qui, après accumulation dans l'espace sous-endothélial, subissent des processus d'oxydation, de glycation et d'agrégation et d'autre part, les monocytes qui, après adhésion aux cellules endothéliales activées, pénètrent l'espace sous-endothélial. Les monocytes se différencient dans l'espace sous endothélial en macrophages, qui en captant les oxLDL via des récepteurs "*scavengers*" tels que le récepteur scavenger de type A (SR-A) et le CD36, se transforment en cellules spumeuses (Rosenfeld et al., 1990; Ross, 1999). En plus d'accélérer la formation des cellules spumeuses, les oxLDL induisent aussi leur nécrose (Schwartz, Valente, Sprague, Kelley, & Nerem, 1991), et contribuent à la formation d'une masse croissante de lipides extracellulaires. Les oxLDL stimulent aussi la sécrétion de cytokines par les cellules spumeuses, l'expression du M-CSF (Worthley et al.; 2001) et celle du MCP-1 par les cellules endothéliales (Ross, 1999). On assiste dès lors à un cercle vicieux où l'inflammation induit la modification des LDL qui à leur tour, favorisent la réponse inflammatoire. La strie lipidique est visible chez 65% des enfants âgés de 12 à 14 ans (Worthley, Osende, Helft, Badimon, & Fuster, 2001) et est décelée macroscopiquement par un

épaississement jaunâtre de l'intima. Elle est réversible par modification des facteurs de risques impliqués (Ross, 1995).

3) *La lésion avancée ou compliquée.* La plaque fibreuse se caractérise par la formation d'une coiffe fibreuse constituée en grande partie de macrophages, de CML, de collagène, de fibres élastiques et de protéoglycans recouvrant un core lipidique (Lusis, 2000). L'accumulation de lipides extracellulaires, la formation de cellules spumeuses et leur apoptose, la réduction de la matrice extracellulaire et des CML, l'inflammation chronique et la revascularisation font partie de plusieurs phénomènes pathologiques à l'origine de la lésion avancée (Stary, 2000). À ce stade, on peut observer une accumulation de calcium au niveau des lésions (Stary et al., 1995). À ce sujet, il est utile de rappeler qu'une augmentation de la quantité de calcium dans les artères coronaires est associée à une incidence accrue de lésions obstructives et de futurs accidents cardiovasculaires (Arad, Spadaro, Goodman, Newstein, & Guerci, 2000). Lors de l'épaississement de la lésion, se produit un phénomène de remodelage vasculaire visant à contrebalancer la croissance interne de la plaque par une dilatation structurale (Glagov, Zarins, Giddens, & Ku, 1988). Ce phénomène qui amincit et fragilise la média n'est cependant pas sans limite et une rupture de la plaque avec formation d'un thrombus, en obstruant partiellement ou totalement la lumière artérielle, peut alors produire des événements cliniques, tels l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral ou l'occlusion vasculaire périphérique.

4) *La plaque fibreuse instable.* Il est maintenant admis que la survenue d'accidents cardiovasculaires suite à la rupture de la plaque dépend davantage de la composition et de la vulnérabilité de la plaque que de l'importance de la sténose (Lusis, 2000). La coiffe fibreuse est une structure fibromusculaire qui recouvre la masse lipidique et est constituée principalement de CML ainsi que de protéines de la matrice extracellulaire (protéoglycans, collagène et élastine). Une érosion ou un amincissement de cette coiffe

est considéré comme un signe précurseur de rupture de la plaque et de sa vulnérabilité. La dégradation de la matrice extracellulaire par diverses protéases et l'inhibition de la synthèse de cette matrice sont responsables de la formation de plaques fibreuses minces et vulnérables. Plusieurs paramètres caractérisent une plaque vulnérable à savoir une lésion de grand volume, un large noyau lipidique couvrant près de 40% du volume de la plaque, une coiffe fibreuse très mince, une infiltration de cellules inflammatoires et un niveau de néo-vascularisation élevé (Shah, 2003). La perte de collagène peut être également à l'origine d'un amincissement de la plaque. L'interféron- γ (INF- γ), produit par les lymphocytes T, peut être responsable de cette perte en diminuant l'expression de collagène par les CML et en induisant leur apoptose (Libby, 1995). L'infection et la réponse immunitaire locale peuvent moduler l'instabilité de la plaque suite à la production de métalloprotéinases (MMP) par les macrophages (Thompson, Kienast, Pyke, Haverkate, & van de Loo, 1995). La calcification peut également influencer la stabilité de la plaque (Shah, 2003). Une étape importante dans le processus d'instabilité de la plaque est la formation d'un thrombus, constitué de plaquettes adhérentes et de fibres. Ce phénomène est dû à une rupture de la plaque accompagnée d'une libération dans la circulation sanguine du facteur tissulaire (TF), une protéine clé de la cascade de coagulation, présente dans le core lipidique. Notons que la plupart des ruptures se produisent aux extrémités de la lésion, riches en cellules spumeuses, suggérant un rôle pathogénique de l'inflammation dans le processus thrombotique (Richardson, Davies, & Born, 1989).

1.2.1.2 Physiopathologie de l'athérosclérose

Au cours du dernier siècle, 3 hypothèses majeures de l'athérogenèse ont été proposées : l'hypothèse de réponse au dommage, l'hypothèse de réponse à la rétention et l'hypothèse d'oxydation. L'hypothèse de réponse au dommage, énoncée par Russel

Ross (Ross & Harker, 1976), perçoit le dommage endothélial comme l'élément clé du processus athérosclérotique, précédant la migration et la prolifération des CML, le dépôt lipidique et l'accumulation de la matrice extracellulaire. Cette hypothèse a été élargie pour inclure la ED comme évènement initiateur crucial de la réponse inflammatoire associée à l'athérosclérose. L'hypothèse de réponse à la rétention proposée par Tabas (Williams & Tabas, 1995) présente pour sa part la rétention et l'accumulation de lipides comme l'évènement central du processus athéromateux. Enfin, l'hypothèse oxydative de l'athérosclérose énoncée par Witztum (Witztum, 1994) met l'emphase sur le rôle des oxLDL comme facteur immunogénique stimulant le recrutement des monocytes dans la paroi et responsable de l'accumulation de lipides dans les macrophages.

1.2.1.3 Facteurs de risque de l'athérosclérose

A) Facteurs de risques traditionnels. Les facteurs de risque traditionnels des maladies cardiovasculaires sont la dyslipidémie, l'hypertension artérielle, l'hyperglycémie, l'obésité, le tabagisme, l'âge et le sexe. L'IR est étroitement associée à plusieurs de ces facteurs de risque et est considérée comme un mécanisme physiopathologique présidant au développement de certaines de ces anomalies. Ces facteurs et leur relation avec l'IR seront rapidement décrits ci-dessous.

1) Dyslipidémie. La plupart des patients avec syndrome métabolique présentent des anomalies du profil lipidique à l'origine d'une inflammation vasculaire, de dommages au niveau endothélial et de la formation de plaques d'athéromes (Eckel, Grundy, Zimmet, 2005). Cette dyslipidémie athérogénique se définit par une hypertriglycéridémie avec augmentation des VLDL et un niveau élevé d'ApoB, une diminution des HDL et une augmentation des LDL petites et denses, toutes des anomalies qui sont des facteurs de risque majeurs de maladies cardiovasculaires (Laura et al. 2005; Bae et al., 2001)

Le facteur déterminant de l'augmentation des VLDL associées à l'IR est l'augmentation du flux des AGL vers le foie. L'insuline a pour effet d'inhiber la synthèse de VLDL et d'activer la lipoprotéine lipase (LPL). Chez les sujets insulino-résistants, il y a augmentation de la synthèse hépatique des VLDL et diminution de l'activité de la LPL, le tout résultant en une augmentation des niveaux de VLDL plasmatiques (De Fronzo, 2006).

2) *Hypertension artérielle*. L'hypertension artérielle représente un facteur de risque majeur des maladies cardiovasculaires. En tant que facteur pro-oxydant, elle peut induire la ED et la production accrue de cytokines pro-inflammatoires (Reaven, Lithell & Landsberg, 1996). L'hypertension artérielle est étroitement associée au développement de l'obésité (Tai, Demissie, Cupple, et al., 2002). La relation entre IR et hypertension n'est cependant pas claire. Dans les états d'IR, l'effet vasodilatateur de l'insuline peut être atténué, même si la réabsorption rénale du sodium est préservée (Kuroda, Uzu, Fujii, et al., 1999). Les AGL peuvent, à leur tour, être à l'origine d'une vasoconstriction. En effet, il a été démontré que l'infusion d'AGL dans la circulation portale active le système nerveux sympathique et augmente la tension artérielle chez l'animal (Grekin et al., 1995).

3) *Hyperglycémie*. L'IR est associée à un défaut de transport du glucose dans les tissus périphériques et à une altération de l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production hépatique et rénale de glucose (Unger, 2002). Les études épidémiologiques ont démontré une relation étroite entre maladies cardiovasculaires et les niveaux de la glycémie. De manière intéressante, cette relation est déjà observée pour des valeurs de glycémie bien inférieures à celles associées au diabète franc (Coutinho et al., 1999). Divers mécanismes et voies biochimiques sont impliqués dans l'effet pro-athérogénique de l'hyperglycémie. Parmi eux, on reconnaît l'importance de l'augmentation de la glycation non-enzymatique de protéines et de lipides, avec formation d'AGEs.

L'hyperglycémie augmente aussi le stress oxydatif et accroît le flux à travers la voie de biosynthèse de l'hexosamine (Rosen et al., 2001). Au niveau des cellules endothéliales, la voie de biosynthèse de l'hexosamine est impliquée dans l'augmentation de l'expression de médiateurs pro-athérogénique tels le TNF α et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1) (Buse, 2006). L'hyperglycémie active enfin la voie de la PKC qui est impliquée dans la ED, l'inflammation, le stress oxydatif, le remodelage vasculaire et la thrombose.

4) *Obésité*. L'obésité constitue un facteur indépendant prédictif des maladies coronariennes (Manson et al., 1995). Le paramètre le plus fiable pour estimer le risque cardiovasculaire associé à l'obésité est la mesure du tour de taille. Des études métaboliques ont associé le tour de taille "per se" à une augmentation d'événements cardiovasculaires, à des niveaux accrus d'insuline à jeun, et à une augmentation de l'IR (Deprès, 1992). En plus d'être le principal site de stockage d'énergie de l'organisme, le tissu adipeux blanc sécrète tel que nous l'avons vu antérieurement différentes hormones et médiateurs pro-inflammatoires qui, en affectant le métabolisme glucidique et en altérant les effets de l'insuline (Havel, 2002; Rajala & Scherer, 2003), contribuent à la pathogenèse de plusieurs complications métaboliques de l'obésité telles que le diabète de type 2 et l'athérosclérose (Festa, D'Agostino, Howard, et al., 2000).

5) *Tabagisme*. Le tabagisme constitue sans aucun doute un facteur de risque très important des maladies cardiovasculaires et les fumeurs, indépendamment de leur sexe, présentent un risque accru de morbidité et de mortalité cardiovasculaire comparativement aux non fumeurs (Burns, 2003; Hennekens, 1997). L'augmentation du risque cardiovasculaire est proportionnelle à l'intensité et à la durée du tabagisme. Les mécanismes impliqués incluent la diminution des niveaux plasmatiques d'antioxydants, la production de radicaux libres et l'induction d'un état de ED (Lehr, 2000).

6) *Âge et sexe*. Le risque cardiovasculaire augmente avec l'âge (Wick, Berger, Jansen-Durr, & Grubeck-Loebenstein, 2003). Ce fait a été mis en relation avec l'accumulation de radicaux libres dans la circulation sanguine (Ferrucci et al., 2002), l'augmentation de l'adiposité viscérale (Cefalu, Wang, Werbel, et al., 1995; Shimokata, Tobin, Muller, et al., 1989), le niveau de protéines inflammatoires circulantes et l'accumulation intracellulaire de TG (Petersen, Befroy, Dufour, et al., 2003), tous des paramètres intimement reliés au développement de l'IR. Le sexe semble lui aussi jouer un rôle important dans la survenue des maladies cardiovasculaires. Une étude chez des hommes et femmes de moins de 60 ans a pu démontrer que le risque de développer des maladies cardiovasculaires était plus de deux fois supérieur chez l'homme à celui observé chez la femme, mais qu'une fois la ménopause atteinte, le risque augmentait chez ces femmes pouvant même dépasser celui des hommes (Goldschmid, et al., 1994). Ce changement a été attribué à la diminution des oestrogènes circulants, entraînant une augmentation de l'adiposité abdominale et une altération du profil lipidique (Milewicz, Tworowska, & Demissie, 2001).

B) Nouveaux facteurs de risque. Les nouveaux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires incluent le stress oxydatif, l'inflammation et la ED.

1) *Le stress oxydatif*. Plusieurs évidences indiquent que le stress oxydatif joue un rôle important dans la pathogenèse de l'athérosclérose (Lusis, 2000). Le niveau de différents marqueurs de stress oxydatif, tels le 8-iso-prostaglandine F2 alpha (8-iso-PGF₂α) (Patrono & FitzGerald, 1997), la nitrotyrosine (Shishehbor et al., 2003), les oxLDL (Holvoet et al., 2001) et la myeloperoxydase (MPO) (Brennan et al., 2003; Zhang et al., 2001) prédit indépendamment le risque de maladies cardiovasculaires et d'infarctus du myocarde. La Framingham Heart Study a aussi montré que les niveaux de 8-iso-PGF₂α urinaires sont associés au ratio cholestérol total/HDL cholestérol et au risque de

développer des maladies cardiovasculaires (Keaney et al., 2003). En outre, des études récentes ont démontré que des médicaments connus pour leurs effets cardioprotecteurs, comme l'atorvastatine et la fenofibrate, diminuaient respectivement les niveaux des oxLDL et des AG (Singh et al., 2008; Rosenson et al., 2007). Heitzer et al. (Heitzer et al. 2001) ont pour leur part démontré que chez les patients souffrant d'une maladie coronarienne, le stress oxydatif associé à la ED, pouvait prédire le risque de futurs événements cardiovasculaires.

2) *L'inflammation*. Le rôle de l'inflammation dans la pathogenèse de l'athérosclérose sera développé plus loin (Voir section 1.3. Inflammation, IR et athérosclérose)

3) *La dysfonction endothéliale (ED)*.

A) Définition. L'endothélium vasculaire est constitué d'une mono-couche de cellules endothéliales qui jouent un rôle de barrière dynamique pour maintenir l'homéostasie vasculaire. Les fonctions normales des cellules endothéliales incluent le maintien du tonus et de la perméabilité vasculaire, le maintien de l'équilibre entre la production de facteurs pro- et anti-coagulants ainsi que le maintien et la formation de la matrice du tissu conjonctif. Ces fonctions sont assurées par plusieurs molécules effectrices produites par l'endothélium telles que le NO, l'ET-1, l'AngII, le facteur de von Willebrand (vWF), les cytokines et les molécules d'adhésion (Ross, 1999). Le terme dysfonction endothéliale (ED) traduit une altération du phénotype endothélial se caractérisant par une diminution de la biodisponibilité du NO, une augmentation de la production par l'endothélium de substances vasoconstrictrices (Bonetti, Lerman, & Lerman, 2003), pro-inflammatoires et pro-thrombotiques, et une anomalie de la vasoréactivité se caractérisant par une vasodilatation inadéquate et/ou une vasoconstriction paradoxale en réponse aux stimuli qui induisent la relâche de NO. Le déficit en NO résulte pour sa part d'une diminution de synthèse et/ou de relâche du NO

en association avec une consommation exagérée de NO par des niveaux élevés de ROS ou d'espèces nitrées réactives (RNS).

B) Mesures cliniques. L'évaluation directe de la production endothéliale de NO *in vivo* est un défi en raison de sa demi-vie extrêmement courte (~5 secondes) et de ses faibles concentrations (aux alentours du picomolaire). Pour cette raison, la fonction endothéliale est souvent mesurée *in vivo* en documentant la réponse artérielle à différents stimuli (Table 2) (Barac, Campia, Panza, 2007). Une méthode commune pour évaluer la fonction endothéliale est la mesure de la vasodilatation en réponse à l'augmentation du débit régional (flow-mediated dilatation : FMD) de l'artère brachiale suite à une période d'ischémie transitoire. Le diamètre artériel est mesuré par angiographie quantitative ou échographie à haute résolution. Cette dernière méthode est la plus précise et permet lorsqu'elle est couplée au Doppler, de mesurer en continu le diamètre et le débit artériel. La mesure de changements au niveau de la circulation sanguine périphérique (mesurés par plethysmographie) suite à une perfusion intra-artérielle de substances stimulant la production du NO telles que l'acétylcholine est pour sa part une mesure de fonction endothéliale utilisée principalement en recherche. Finalement, la mesure des niveaux plasmatiques de biomarqueurs de la ED, de l'inflammation et du stress oxydatif est aussi utilisée comme indicateur de ED (Barac, Campia, Panza, 2007).

Measure of Endothelial Function	Method	Stimuli
<i>Endothelium-Dependent Vascular Tone</i>		
Coronary arteries	Coronary Angiography to follow changes in vessel diameter	Acetylcholine, bradykinin or substance-P Flow-mediated dilation induced by adenosine or papaverine
Peripheral arteries	High-resolution Ultrasonography with Doppler to follow changes in vessel diameter and blood flow.	Shear stress-induced NO production- Flow-mediated dilation
	Forearm perfusion technique where blood flow is measured noninvasively using strain gauge plethysmography	Acetylcholine, bradykinin or substance-P
	Applanation tonometry to measure changes in pulse wave form and augmentation index Peripheral artery tonometry with plethysmography	β 2-agonist Reactive hyperemia
<i>Surrogate Markers of Endothelial Activation</i>		
Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)	Plasma, ELISA	
Intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)	Plasma, ELISA	
P- and E-selectin	Plasma, ELISA	
Circulating endothelial progenitor cells (EPCs)	Immunomagnetic separation or flow cytometry	
von Willebrand factor (vWf)	Plasma, ELISA	

Tableau 2. Approches utilisées actuellement pour l'évaluation de la fonction endothéliale (adapté de Muniyappa et al., *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, 2008, 37: 685-711).

C) Facteurs et mécanismes présidants au développement de la ED. La glucotoxicité, la lipotoxicité et l'inflammation, dont nous avons vu le rôle clé dans la pathogénie de l'IR, affectent aussi les principales voies de signalisation de l'insuline au niveau de l'endothélium vasculaire (à savoir les voies PI3K et MAPK). L'atteinte parallèle de ces voies au niveau des principaux tissus cibles périphériques de l'insuline et au niveau des tissus vasculaires permet de comprendre le couplage synergique existant entre IR et ED.

a) *Glucotoxicité.* Des études ont démontré que la perfusion aiguë de glucose dans l'artère brachiale de sujets en bonne santé diminuait la vasodilatation endothélium-dépendante et que cet effet était inhibé par l'ascorbate (Beckman et al., 2001). Un effet similaire était noté chez les individus insulino-résistants ou diabétiques de type 2 (Calles-Escandon, Cipolla, 2001). L'hyperglycémie induit la ED par les mêmes mécanismes que ceux par lesquels elle induit l'IR. Ces mécanismes sont le stress oxydatif, la formation des AGEs et l'augmentation de flux du glucose à travers la voie de biosynthèse des hexosamines (Figure 5). Les cellules endothéliales exposées à des concentrations élevées de glucose montrent une réduction de l'activation d'Akt et du eNOS stimulée par l'insuline (Du, Edelstein, Dimmeler et al., 2001). Les mécanismes impliqués dans ces effets sont l'augmentation de la production des ROS, l'augmentation de la O-GlcNacylation du eNOS, de l'activité de la PKC et de la formation de AGEs (Muniyappa, Montagnani, Koh, Quon, 2007; Du, Edelstein, Dimmeler et al., 2001). La production de superoxyde "scavenge" le NO et produit des peroxynitrites qui réduisent la biodisponibilité du NO et altèrent la vasodilatation. Les ROS activent aussi la voie de la PKC, dont certains isotypes sont impliqués dans l'inactivation du eNOS. L'hyperglycémie induit aussi l'apoptose des cellules endothéliales et l'expression endothéliale de molécules d'adhésion et pro-inflammatoires via l'augmentation de production des ROS et l'activation de la PKC. Au niveau endothélial, l'hyperglycémie

accroît le flux au niveau de la voie de biosynthèse des hexosamines. Il a été démontré que la glucosamine, un produit de cette voie, altère *in vitro* la production de NO par l'endothélium et qu'une administration intraveineuse aiguë de glucosamine diminue le débit sanguin artériel et le recrutement capillaire (Wallis et al. 2005). Notons qu'en plus d'affecter la voie PI3K/Akt/eNOS, l'hyperglycémie stimule aussi la sécrétion d'ET-1 par les cellules endothéliales et augmente de manière significative l'ET-1 plasmatique chez des individus insulino-résistants (Desideri et al., 1997).

b) Lipotoxicité. La dyslipidémie associée à l'IR et l'augmentation des AGL plasmatiques sont impliquées dans la pathogenèse de la ED. Ces facteurs exercent leurs effets délétères sur l'endothélium vasculaire par les mêmes mécanismes que ceux par lesquels ils induisent l'IR, à savoir le stress oxydatif, l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires et la formation de céramides (Figure 5).

In vivo, l'infusion de lipides chez l'humain augmente la production de ROS et l'inflammation et induit, de par ces effets, une altération de la vasodilatation de l'artère brachiale. Une surexpression d'UCP-2 ou une inhibition de la voie NF- κ B/IKK β préviennent l'inhibition de la production de NO et l'altération de la fonction endothéliale par les AGL. *In vitro*, le traitement de cellules endothéliales par des AGL inhibe l'activation par l'insuline de diverses enzymes telles la PI3K, la kinase dépendante des phosphoinositides-1 (PDK1), l'Akt et le eNOS (Du, Edelstein, Obici et al., 2006; Kim, Tysseling, Rice, et al., 2005; Wang, Zhang, Youker et al., 2006). Une augmentation des niveaux cellulaires de métabolites lipidiques tels que le DAG, les céramides et les acyl-CoA à longues chaînes activent diverses sérines kinases comme la PKC et l'IKK β qui causent l'IR en augmentant la phosphorylation du résidu sérine de l'IRS-1 (Du, Edelstein, Obici et al., 2006; Kim, Tysseling, Rice, et al., 2005; Wang, Zhang, Youker et al., 2006). L'altération de la voie PI3K diminue l'activité du eNOS, augmente de manière accrue le stress oxydatif induit par les AGL et diminue la biodisponibilité du NO. Les

AGL et les céramides augmentent aussi la production de ROS (Du, Edelstein, Obici et al., 2006) qui en complexant le NO induisent la production de peroxy-nitrite. Les données démontrant qu'une réduction des niveaux d'AGL induit une amélioration des actions vasodilatatrices de l'insuline suggèrent que les effets vasculaires et métaboliques de l'insuline soient couplés aux changements des niveaux d'AGL. À noter qu'une perfusion d'AGL chez l'homme augmente aussi de manière accrue la production d'ET-1 médiée par l'insuline (Piatti et al., 1996). Une diminution de l'oxydation lipidique réduit la production d'ET-1 en réponse à l'insuline et augmente de manière simultanée la biodisponibilité du NO et la captation du glucose (Monti et al., 2006). Ces études suggèrent que dans le contexte d'une altération de la voie PI3K par les AGL, l'insuline stimule la sécrétion d'ET-1, ce qui se traduit par une vasoconstriction relative et une IR.

c) Inflammation. La ED, comme l'IR, est caractérisée par une augmentation des niveaux sériques de divers marqueurs inflammatoires. (Kim, Montagnani, Koh, 2006; Koh, Han, Quon, 2005) (Figure 5). Comme vu précédemment, les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-1 β activent au niveau des cellules endothéliales des sérines kinases telles que la JNK et l'IKK β , qui en activant les facteurs NF- κ B et AP-1, inhibent l'activation de eNOS stimulée par l'insuline (Gustafson et al., 2007; Anderson, Rahmutula, Gardner, 2004; Eringa et al., 2004; Zhang, Wheatley, Richards, et al., 2003) et induisent l'expression endothéliale de diverses molécules pro-inflammatoires et d'adhésion. L'IL-6 (Andreozzi, Laratta, Procopio, et al., 2007) et la protéine C-réactive (CRP) (Schwartz, Osborne-Lawrence, Hahner, et al., 2007; Xu, Morita, Ikeda, et al., 2006) inhibent aussi l'augmentation d'activité du eNOS et la production de NO induite par l'insuline en diminuant l'activation de la voie PI3K/Akt/eNOS. Le TNF α augmente aussi la sécrétion de l'ET-1 en activant la voie des MAPK (Sury, Frese-Schaper, et al., 2006), un effet aussi observé lors de l'incubation

des cellules endothéliales en présence de CRP (Xu, Morita, Ikeda, et al., 2006). À noter que la CRP régule en outre l'expression endothéliale de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, du MCP-1 et de diverses molécules d'adhésion (Jialal et al., 2004; Verma et al., 2006). *In vivo*, il a été observé chez le rat qu'une perfusion systémique de TNF α induisait une diminution du débit sanguin périphérique et du recrutement capillaire induits par l'insuline (Zhang, Wheatley, Richards, et al., 2003). Des études chez l'humain ont pour leur part démontré que des concentrations plasmiques élevées de TNF α inhibaient de manière simultanée la captation du glucose et la vasodilatation endothélium-dépendante induites par l'insuline (Rask-Madsen, Dominguez, Ihlemann et al., 2003).

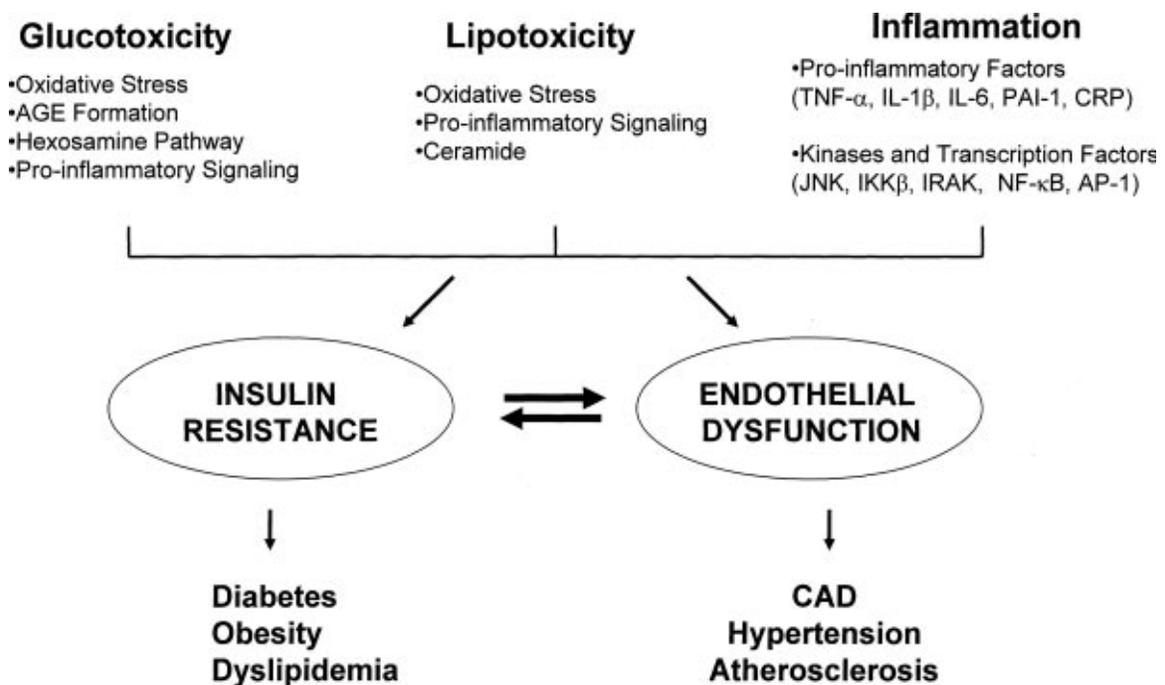


Figure 5. Mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'association et la relation bidirectionnelle entre l'IR et la dysfonction endothéliale (Kim et al., 2006, *Circulation* ; 113 : 1888–1904).

D) Rôle de la ED dans la pathogenèse de l'athérosclérose. La ED contribue au développement et à la progression de l'athérosclérose en favorisant les processus de coagulation, d'adhésion cellulaire et d'inflammation, en induisant un déséquilibre entre la vasoconstriction et la vasodilatation et en stimulant le transport de lipoprotéines athérogéniques vers l'espace sous-endothélial. La ED représente l'anomalie la plus précoce dans le développement de l'athérosclérose, précédant les altérations morphologiques et histologiques vasculaires (Widlansky, Gokce, Kearney, et al., 2003). Des études *in vitro* ont démontré que l'endothélium vasculaire perd sa barrière de protection naturelle et ses propriétés anti-inflammatoires très tôt dans le processus athérosclérotique, avant même qu'une accumulation de lipides ne soit détectable et surtout bien avant que les signes cliniques apparaissent (King, Hachiya, Kwok, et al., 1990; Ross, 1999). L'hypertension, le tabagisme et une exposition chronique à des concentrations élevées de lipoprotéines exprimant l'Apo B-100 altèrent la fonction endothéliale et accélèrent le processus athérosclérotique (Cersosimo & DeFronzo, 2006). La ED (Hollenberg, Klein, Parrillo, et al., 2001) a été associée à la morbidité et à la mortalité cardiovasculaire (Pearson, Mensah, Alexander, et al., 2003; Festa, D'Agostino, Tracy, et al., 2002) et représente une composante importante du syndrome métabolique. Des évidences cliniques appuient le concept que des interventions visant à améliorer ou restaurer la fonction endothéliale puissent prévenir ou ralentir, du moins en partie, la progression de l'athérosclérose et réduire la morbidité et la mortalité cardioasculaire (Cersosimo & DeFronzo, 2006).

I.2.2 IR et athérosclérose

I.2.2.1 IR et dysfonction endothéliale (ED)

A) Signalisation de l'insuline au niveau de l'endothélium vasculaire.

1) *Voies de signalisation régulant la production du NO par l'insuline.* Un des principaux effets vasculaires de l'insuline consiste à stimuler la production endothéliale de NO (Zeng, Quon, 1996). Les voies de signalisation de l'insuline au niveau de l'endothélium vasculaire menant à l'activation de eNOS et à l'augmentation de la production de NO sont tout à fait distinctes et indépendantes des mécanismes classiques calcium-dépendants utilisés par les récepteurs couplés aux protéines G tel que le récepteur à l'acétylcholine (Montagnani, Chen, Barr, Quon, 2001). Ces voies de signalisation impliquent séquentiellement la phosphorylation de l'IRS-1 du récepteur à l'insuline, la liaison et l'activation de la PI3K, la phosphorylation de la PDK-1 et l'activation de l'Akt (Montagnani, Chen, Barr, Quon, 2001; Zeng, Quon, 1996; Zeng, Nystrom, Ravichandran et al., 2000; Montagnani, Ravichandran, Chen, et al., 2002). La phosphorylation de eNOS sur la sérine 1177 par l'Akt induit une augmentation de l'activité de eNOS et de la production du NO (Montagnani, Chen, Barr, Quon, 2001; Dimmeler, Flemming, Fisslthaler et al., 1999) (Figure 1). Si l'activation de la PI3K est nécessaire pour induire la production endothéliale du NO en réponse à l'insuline (Zeng, Quon, 1996; Zeng, Nystrom, Ravichandran et al., 2000; Montagnani, Ravichandran, Chen, et al., 2002) elle n'est cependant pas suffisante (Montagnani, Chen, Barr, Quon, 2001; Zeng, Quon, 1996). En plus de la phosphorylation, d'autres modifications post-transductionnelles telles que la palmitoylation (Erwin, Mitchell, Sartoretto, et al., 2006), la nitrosylation (Erwin, Mitchell, Sartoretto, et al., 2006; Erwin, Lin, Golan et al., 2005) et la O-GlcNacylation (Du, Edelstein, Dimmeler, et al., 2001) sont des mécanismes de

régulation importants de l'activité de eNOS qui peuvent contribuer à la production du NO qu'elle soit basale ou stimulée par l'insuline.

2) *Voies de signalisation régulant la production d'ET-1 et l'expression des molécules d'adhésion par l'insuline.* L'insuline stimule *in vitro* la production d'ET-1 par les cellules endothéliales aortiques en activant la voie des MAPK (Potenza et al., 2005). Cet effet est indépendant de l'activation de la PI3K puisque la wortmannin, un inhibiteur des PI3K mais non des MAPK, n'inhibe pas la sécrétion d'ET-1 stimulée par l'insuline, alors que le PD98059, un inhibiteur spécifique des MAPK, bloque complètement cet effet. L'insuline stimule aussi par l'activation des MAPK l'expression endothéliale des molécules d'adhésion cellulaire vasculaire-1 (VCAM-1) et de la E-sélectine (Montagnani, Golovchenko, Kim et al., 2002). Fait intéressant, cet effet biologique de l'insuline apparaît amplifié par blocage des voies de signalisation PI3K-dépendantes (Montagnani, Golovchenko, Kim et al., 2002).

B) Actions hémodynamiques de l'insuline. L'injection intraveineuse d'insuline chez l'humain stimule la vasodilatation et augmente le débit sanguin de manière NO-dépendante (Steinberg, Brechtel, Johnson, et al., 1994; Vollenweider, Tappy, Randin, et al., 1993). Une augmentation des niveaux d'insuline qui accompagne une ingestion d'un repas mixte ou de glucose mène aussi à une augmentation du débit sanguin périphérique, diminue la résistance vasculaire et augmente l'activité nerveuse sympathique (Barron, Laasko, Brechtel, et al., 1990; Scott, Greenwood, Vacca, et al., 2002; Vincent, Clerk, Lindner, et al., 2006; Hoost, Kelbaek, Rasmussen et al., 1996). Ces effets surviennent à des concentrations physiologiques d'insuline et dans un espace de temps relativement court (30-60 min). L'action vasodilatatrice de l'insuline implique de nombreux processus hétérogènes temporaires qui se produisent en plusieurs étapes (Vincent, Dawson, Clark, et al., 2002). Premièrement, une dilatation d'artérioles terminales augmente le nombre de capillaires perfusés (recrutement capillaire) sans

modification concomitante du débit sanguin périphérique total. Survient ensuite une dilatation des gros vaisseaux résistants qui augmente le débit sanguin périphérique global (Barron, Brechtel-Hook, Johnson, et al., 1996). La réponse vasodilatatrice globale induite par l'insuline est une intégration du recrutement capillaire accru et d'une élévation du débit sanguin.

C) Relation IR et ED. Association et relation bidirectionnelle. De manière intéressante, certains des mécanismes impliqués dans la pathogenèse de l'IR, contribuent aussi à la ED (Figure 5). En particulier, l'hyperglycémie dans le diabète mène à une glucotoxicité, laquelle est à l'origine d'une IR et d'une ED. De même, des niveaux élevés d'AGL dans le diabète, l'obésité et la dyslipidémie mènent à une lipotoxicité, autre mécanisme commun de l'IR et de la ED. Un état pro-inflammatoire associé aux maladies métaboliques et cardiovasculaires représente une troisième catégorie des mécanismes communs entre l'IR et la ED. Ces mécanismes interagissent à plusieurs niveaux pour créer des relations bidirectionnelles entre l'IR et la ED (Kim, Montagnani, Kohn et al., 2006).

1) Rôle de l'IR dans le développement de la ED. Chez les individus avec IR métabolique, l'on retrouve un déficit de vasodilatation en réponse à l'insuline. Ainsi, une diminution de la capacité de l'insuline à augmenter le débit sanguin a été démontrée chez des sujets obèses, dans le diabète de type 2 et dans le syndrome ovarien polykystique (Paradisi, Steinberg, Hempfling, et al., 2001; Clerk, Vincent, Jahn, et al., 2006; Hermann, Li, Dominguez, et al., 2006; Rask-Madsen, Ihlemann, Krarup, et al., 2001). Une diminution du débit sanguin stimulée par l'insuline et de la captation du glucose est aussi présente chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension, l'angine microvasculaire et l'insuffisance cardiaque. La co-existence d'une IR et d'une ED est aussi notée chez les descendants de sujets diabétiques (Goldfine, Beckman, Betensky, et al., 2006; Tesauro, Rizza, Iantorno, et al.,

2007; Balletshofer, Rittig, Enderle, et al., 2000). Au niveau cellulaire, la principale caractéristique de l'IR est une altération sélective de la voie de signalisation de la PI3K alors que la voie Ras/MAPK est inaltérée. Au niveau vasculaire, l'hyperinsulinémie compensatrice associée à l'IR stimule la voie des MAPK et entraîne un déséquilibre entre les actions vasodilatatrices et vasoconstrictrices dont résulte une accentuation des effets hypertenseur et pro-athérogénique de l'insuline (Kim, Montagnani, Kohn et al, 2006). La glucotoxicité, la lipotoxicité et l'inflammation affectent, via de multiples mécanismes, les voies de la PI3K et des MAPK au niveau endothélial et induisent de ce fait une altération simultanée des actions à la fois vasculaire et métabolique de l'insuline.

2) Rôle de la ED dans le développement de l'IR. Des études suggèrent que la ED puisse constituer un facteur indépendant de prédiction de l'incidence du diabète (Meigs, Hu, Rifai et al., 2004; Meigs, O'Donnell, Tofler, et al., 2006; Song, Manson, Tinker, et al., 2007; Donahue, Rejman, Rafalson, et al., 2007). Les résultats de la Framingham Offspring Study ont démontré que certains marqueurs plasmatiques de la ED, tels que le PAI-1 et le vWF, augmentaient le risque de développer le diabète indépendamment d'autres facteurs de risque tels que l'obésité, l'IR et l'inflammation (Meigs, O'Donnell, Tofler, et al., 2006). De plus, une autre étude faite chez des femmes post-ménopausées, la Women's Health Initiative Observational Study, a documenté que des niveaux circulants élevés d'ET-1 et de molécules d'adhésion vasculaire intercellulaire-1 (ICAM-1) étaient associés à une augmentation du risque de développer le diabète (Song, Manson, Tinker, et al., 2007). Prise dans leur ensemble, ces études supportent le rôle potentiel de la ED dans le développement de l'IR. Le rôle primordial de l'endothélium dans la régulation des actions métaboliques de l'insuline a été démontré chez les souris (n'exprimant pas le eNOS) insulino-résistantes et hypertendues, chez qui une diminution de la densité capillaire est documentée (Duplain, Burcelin, Sartori, et al., 2001; Kubis, Richer, Domergue, et al., 2002). Chez ces animaux, la captation du glucose médiée par

l'insuline est réduite de 40%, ce qui représente une quantité plus ou moins équivalente à celle attribuée au recrutement capillaire chez des rongeurs saints. Bien que les souris présentant une déficience partielle en eNOS (eNOS +/-) soient insulinosensibles et normotendues, elles développent une IR et une hypertension lorsque soumises à un régime riche en graisses (Cook, Hugli, Egli, et al., 2004). Ces données suggèrent qu'un défaut partiel au niveau de la fonction endothéliale caractérisé par une diminution de la biodisponibilité du NO, est suffisant pour causer des anomalies cardio-métaboliques (IR et dyslipidémie) dans certaines conditions pathologiques telles que l'excès calorique, l'inactivité physique et l'inflammation.

1.2.2.2 IR et développement de l'athérosclérose

A) Association entre IR et athérosclérose. Plusieurs études cliniques ont pu démontrer au cours des dernières années que le traitement de patients insulino-résistants avec des statines ou des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), diminuait la mortalité cardiovasculaire chez ces sujets (Razani et al., 2008). À titre illustratif, dans une étude incluant plus de 20000 personnes adultes souffrant de diabète ou d'athérosclérose, la *"Heart Protection Study"* (Heart Protection Study Collaborative Group, 2002; Collins, Armitage, Parish, et al., 2003) a démontré que l'administration de simvastatine diminuait le taux d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) d'approximativement 25%. Dans une sous-analyse portant sur 5348 personnes souffrant de diabète de type 2, une réduction d'événements vasculaires a été notée suite au traitement par cette statine. De manière intéressante, ces effets bénéfiques ont été notés chez un nombre considérable de patients avec des niveaux de LDL cholestérol en dessous de 3 mmol/l. L'étude d'intervention *"Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease"* (LIPID) a démontré pour sa part que l'administration de pravastatine à des sujets intolérants au glucose et insulino-résistants

diminuait la mortalité et les évènements vasculaires (Keech, et al., 2003). L'étude de prévention "*Heart Outcomes Prevention Evaluation*" (HOPE) (Yusuf, et al., 2000) menée chez 9000 patients souffrant de diabète ou de maladie vasculaire a démontré que l'administration de ramipril, un inhibiteur de ACE, diminuait la mortalité et le nombre d'évènements vasculaires chez les 3577 participants souffrant de diabète. Dans cette étude, le ramipril diminuait aussi l'apparition du diabète, fait suggérant que l'inhibition du système de l'angiotensine puisse accroître la sensibilité à l'insuline et protéger ainsi les cellules β du pancréas d'une hypersécrétion continue. De plus, plusieurs études ont pu démontrer des relations entre les niveaux d'insuline et le risque cardiovasculaire. Ainsi, l'étude prospective de Paris (Ducimetiere, et al., 1980) et de Finlande (Pyorala, 1979) ainsi que l'étude d'intervention "*Multiple Risk Factor Intervention Trial*" (MRFIT) (Orchard, et al., 1994) ont démontré des relations positives entre les niveaux d'insuline et les évènements athérosclérotiques. Plusieurs évidences selon lesquelles l'IR est impliquée dans l'athérosclérose proviennent de l'étude "*Insulin Resistance Atherosclerosis Study*" (IRAS). Cette étude a vérifié la possibilité que la sensibilité à l'insuline puisse être associée à l'athérosclérose et a démontré une relation inverse entre l'épaisseur intima-média (IMT) de la carotide et la sensibilité à l'insuline. Cependant, cette relation était seulement présente chez quelques groupes ethniques spécifiques et n'était plus significative après ajustement de la variable de tolérance au glucose (Howard, et al., 1996).

B) Association entre IR et athérosclérose : cause ou épiphénomène ?

L'association entre IR et athérosclérose peut être interprétée de deux façons. La première est que l'IR joue un rôle causal dans la pathogenèse de l'athérosclérose; la seconde est que l'IR et l'athérosclérose partagent une étiologie commune, tout en ayant leur évolution propre. Les résultats de plusieurs études indiquent que l'IR est un facteur important dans le développement de l'athérosclérose chez les patients souffrant de

diabète, d'obésité ou de syndrome métabolique. (Bressler et al., 1996; Reaven, 2002; Haffner et al., 1999; Kendall et al., 2003) et il existe aussi des évidences que l'IR pourrait être directement athérogénique. Alternativement, comme stipulé précédemment la relation existant entre IR et athérosclérose pourrait être due au fait que ces deux entités partagent une étiologie commune, comme l'inflammation, le stress mitochondrial ou le stress du ER. Nous avons déjà discuté le rôle de l'inflammation dans l'IR. Nous discuterons de son rôle dans le développement et la progression de l'athérosclérose dans la section 1.3.2.

C) Rôle de l'IR comme facteur de risque cardiovasculaire per se. L'IR au niveau des tissus métaboliques et vasculaires est associée à divers effets pro-athérogéniques (Figure 6). Ces effets résultent de l'inhibition de la voie de la PI3K en présence d'une signalisation non altérée de la voie des MAPK.

Au niveau des tissus métaboliques, l'activation de la voie de la PI3K par l'insuline induit des effets majoritairement anti-athérogéniques. L'inhibition de cette voie associée à l'IR induit une multitude d'altérations métaboliques telles l'hyperglycémie et l'augmentation des niveaux circulants d'AGL qui stimulent la sécrétion hépatique des VLDL, eux-mêmes à l'origine des taux élevés de LDL, des particules fortement pro-athérogéniques. Outre son effet sur la voie de la PI3K, l'insuline active aussi la voie des MAPK (Figure 1). Au niveau métabolique, cette voie semble être reliée à la survie et à la prolifération cellulaire, mais il est probable qu'elle soit associée au processus athérosclérotique au niveau vasculaire (Figure 1).

Au niveau des tissus vasculaires, l'insuline, en activant la voie de la PI3K, exerce divers effets anti-athérogéniques (de la Motte, Hascall, Drazba, et al., 2003). Ces effets incluent la stimulation de la synthèse endothéliale du NO, dont les effets anti-athérogéniques incluent des effets anti-inflammatoires et anti-thrombotiques, le maintien de la quiescence des CML et la prévention de l'apoptose des monocytes/macrophages

(Figure 6). À l'inverse, l'activation de la voie des MAPK par l'insuline, dont on sait qu'elle n'est pas altérée au cours des états d'IR, induit des effets pro-athérogéniques tels que la migration et la prolifération des CML et l'expression de récepteurs CD36 au niveau macrophagique (Figure 6). Donc l'IR est associée à un déséquilibre entre les actions anti-athérogéniques et pro-athérogéniques de l'insuline, phénomène pouvant contribuer au développement de l'athérosclérose. Les principales cellules impliquées dans l'athérosclérose sont les cellules endothéliales, les CML et les monocytes/macrophages.

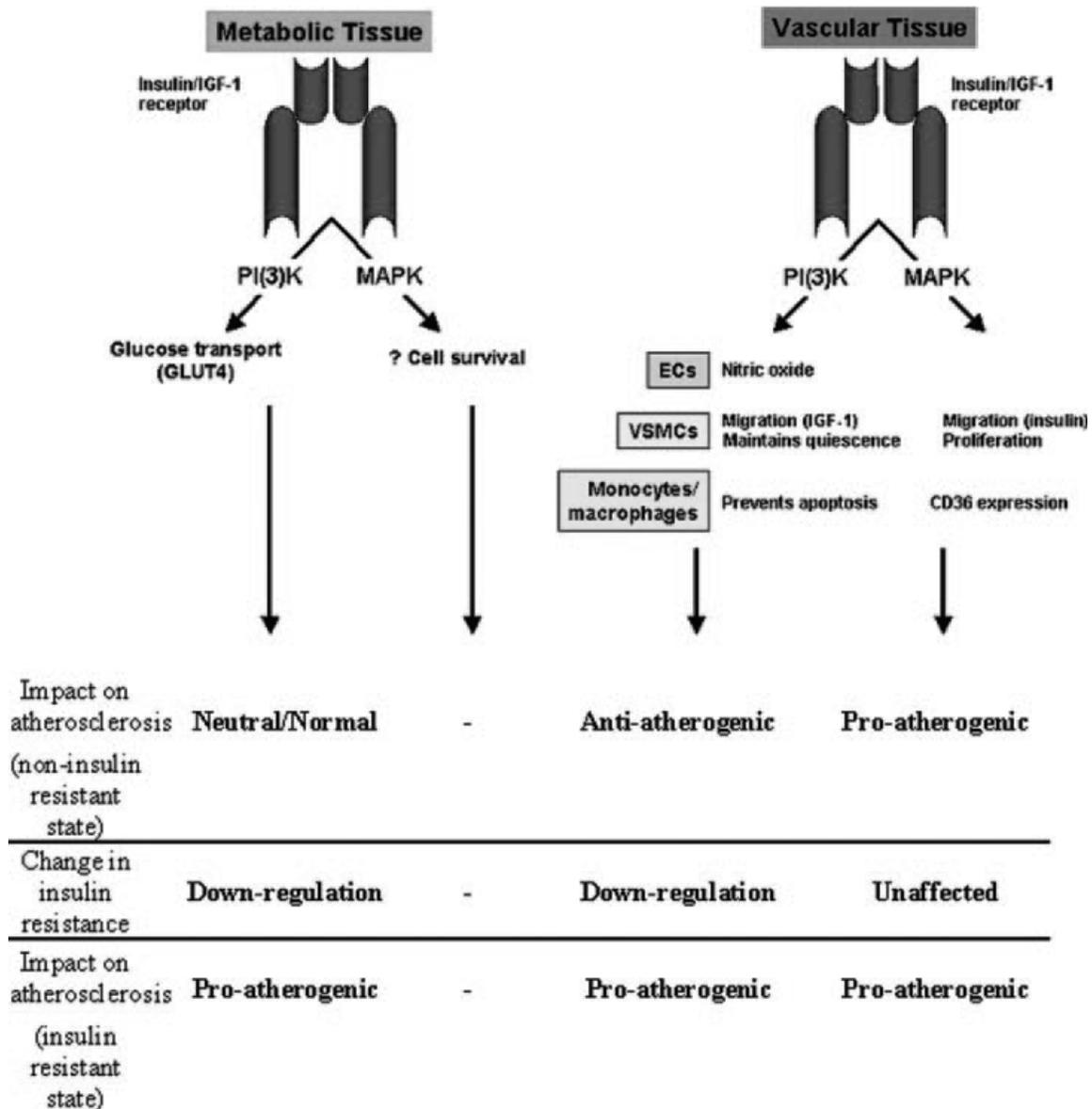


Figure 6. Voies de signalisation métaboliques et vasculaires de l'insuline associées à des effets pro-athérogéniques (Nigro et al., *End. Rev.*, 2006; 27: 242–259).

a) *Les cellules endothéliales*. La stimulation des récepteurs à l'insuline au niveau de la surface endothéliale active la voie de la PI3K et mène à une augmentation de l'expression de eNOS (Kuboki, Jiang, Takahara, et al., 2000). Cette production de NO stimulée par l'insuline est à l'origine de divers effets anti-athérogéniques, dont la vasodilatation, l'inhibition de la prolifération des CML, la régulation de l'angiogenèse ainsi que des effets anti-inflammatoires et anti-thrombotiques. Les effets anti-inflammatoires incluent la diminution d'expression des molécules d'adhésion et de diverses cytokines pro-inflammatoires. Les effets anti-thrombotiques consistent en une diminution de l'adhésion plaquettaire et une augmentation de la production des prostacyclines. L'insuline augmente d'autre part, de manière temps- et dose-dépendante, la production d'ET-1 par les cellules endothéliales *in vitro* (Hu, Levin, Pedram, Frank, 1993) et une étude faite chez des rats Sprague-Dawley diabétiques traités avec des doses élevées d'insuline démontre une augmentation des niveaux d'ET-1 plasmatique (Hu, Levin, Pedram, Frank, 1993). L'ET-1 exerce de multiples effets pro-athérogéniques, dont la vasoconstriction, l'augmentation de perméabilité vasculaire, la prolifération des CML, l'augmentation de production endothéliale et monocytaire d'IL-6 et l'augmentation de synthèse des prostaglandines par les CML. Ces données démontrent que l'IR peut être à l'origine d'une diminution de la production de NO et d'une augmentation de l'expression d'ET-1 par les cellules endothéliales, ce qui mène à un déséquilibre entre la vasodilatation et la vasoconstriction, un élément clé dans le développement de l'athérosclérose.

b) *Les cellules musculaires lisses (CML)*. Les récepteurs à l'insuline sont aussi exprimés par les CML (Borneflidt, Gidlof, Wasteson, et al., 1991) et possèdent une structure et une fonctionnalité similaire à ceux des tissus métaboliques (Jialal, Crettaz, Hachiya, et al., 1985). L'activation des voies de signalisation de l'insuline au niveau des CML est à l'origine d'événements cellulaires pro-athérogéniques telles que la migration et la

prolifération cellulaire. L'insuline induit la migration des CML via l'activation de la voie des MAPK (Wang, Gurevich, Draznin, 2003) (Figure 6), alors qu'elle induit la quiescence de ces cellules à travers l'activation de la voie PI3K (Wang, Gurevich, Draznin, 2003 ; Xi, Graf, Goetze, et al., 1997). L'insuline peut aussi agir en synergie avec d'autres facteurs de croissance athérogéniques tel que le PDGF qui induit la prolifération et la migration des CML (Banskota, Taub, Zellner, & King, 1989). Lors de l'IR, la combinaison PDGF/insuline est pro-athérogénique (Wang, Gurevich, Draznin, 2003). Il semble que l'insuline exerce ses effets pro-athérogéniques au niveau des CML, au moins en partie, via les récepteurs de l'IGF-I (IGF-IR).

c) Les monocytes / macrophages. Les récepteurs à l'insuline et les IGF-IR sont aussi présents au niveau des monocytes/macrophages circulants (Bar, Kahn, & Koren, 1977 ; Zoppini, Galante, Zardini, & Muggeo, 1994). La signalisation de l'insuline au niveau des ces cellules se déroule de la même façon que dans les tissus métaboliques, les cellules endothéliales et les CML, sauf que l'IRS-1 nécessaire pour la signalisation de l'insuline au niveau des cellules endothéliales et CML est indétectable au niveau des monocytes/macrophages (Bar, Kahn, & Koren, 1977 ; Welham, Bone, Leving, et al., 1997). Une réduction du nombre de récepteurs à l'insuline, ainsi qu'une diminution de la phosphorylation et de la signalisation en aval de l'IRS-2 est documentée au niveau des macrophages des souris obèses et insulino-résistantes (Liang, Han, Okamoto, et al., 2004). Un défaut de signalisation de l'insuline relatif à la réduction de l'activité tyrosine-kinase du récepteur est aussi observé dans les monocytes de sujets non obèses insulino-résistants (Frittitta, Grasso, Munguira, et al., 1993). Les macrophages de souris obèses et insulino-résistantes montrent pour leur part une augmentation d'expression du CD36, le ligand des oxLDL, ce qui implique l'IR au niveau macrophagique dans la formation des cellules spumeuses (Liang, Han, Okamoto, et al., 2004), un élément clé dans le processus athérosclérotique.

I.3 Inflammation, IR et athérosclérose

I.3.1 Généralités

La possibilité que l'inflammation puisse être impliquée dans diverses complications métaboliques a été suggérée il y a plus d'un siècle, quand il a été démontré que des doses élevées de salicylate de sodium (5.0-7.5g/j) diminuaient la glycosurie chez des patients diabétiques (Ebstein, 1876; Williamson, 1901; Shoelson, 2002). Durant les 10 dernières années, il est devenu évident que l'IR était associée à un état inflammatoire à bas bruit et dès lors, un rôle de l'inflammation dans la pathogenèse de l'IR a été proposé. Récemment, l'action hypoglycémiant des salicylates a été réinvestiguée et la voie IKK β /NF- κ B a été identifiée comme la cible moléculaire de ces composés (Yuan et al., 2001; Hundal et al., 2002; Shoelson, Lee, & Yuan, 2003). L'augmentation des niveaux plasmatiques de divers marqueurs et médiateurs de l'inflammation, tels le fibrinogène, la CRP, l'IL-6, le PAI-1, l'acide sialique et le nombre de leucocytes chez les individus insulino-résistants et souffrant de maladies cardiovasculaires ainsi que leur association avec l'incidence du diabète de type 2 et de l'athérosclérose (Schmidt et al., 1999; Duncan et al., 2003; Pradhan et al., 2001; Barzilay et al., 2001; Vozarova et al., 2002; Festa et al., 2002; Freeman et al., 2002; Ford, 2002; Prince, Larkins, & Alford, 1981; Nakanishi et al., 2002; Spranger et al., 2003) suggèrent un rôle de l'inflammation comme facteur étiologique commun de l'IR et de l'athérosclérose.

I.3.2 Inflammation, IR et athérosclérose

I.3.2.1 Rôle de l'inflammation dans l'IR

Voir section précédente.

I.3.2.2 Inflammation comme nouveau facteur de risque de l'athérosclérose

Suite à l'hypothèse formulée par Schwartz décrivant l'athérosclérose comme une maladie inflammatoire impliquant la participation active des monocytes/macrophages (Schwartz et al., 1985) et suite au travail de Liuzzo en 1994 montrant un rôle des marqueurs inflammatoires systémiques comme facteurs de risque cardiovasculaire (Liuzzo et al., 1994), de nombreuses études ont examiné l'association entre marqueurs inflammatoires et morbidité/mortalité cardiovasculaire. À titre d'exemple, il a été démontré que des marqueurs d'inflammation sous-clinique, en particulier la CRP et l'IL-6, sont de puissants facteurs de prédiction de l'athérosclérose (Pradhan et al., 2001; Festa et al., 2002; Ridker, Rifai, Stampfer & Hennekens, 2000) et une association a été établie entre les concentrations sériques des molécules d'adhésion et de l'IL-6 et l'athérome infraclinique (Amar, Fauvel, Drouet, et al., 2006; Bongard, Elias, Bal dit Sollier, et al., 2002). En outre, une relation indépendante a été observée entre les niveaux plasmatiques de la CRP (Danesh, Wheeler, Hirschfield, et al., 2004), et de l'IL-6 (Ridker, Rifai, Stampfer, et al., 2000) et le risque d'infarctus du myocarde. Finalement, des études randomisées ont démontré que les statines, réduisaient les niveaux circulants de CRP et, ce faisant, diminuaient de manière significative le risque cardiovasculaire chez des patients ou sujets sains avec des niveaux normaux de LDL cholestérol mais élevés en CRP (Ridker, Rifai, Clearfield, et al., 2001; Ridker, Cannon, Morrow, et al., 2005). À ce titre, l'étude "*Justification for the Use of Statins in Prevention-an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin*" (JUPITER) (Ridker, Danielson, Fonseca,

et al., 2008) a évalué l'effet de la rosuvastatine en prévention primaire d'accidents cardio-vasculaires. Les principaux critères d'inclusion dans l'étude JUPITER étaient: l'âge : supérieur à 50 ans pour les hommes et à 60 ans pour les femmes, l'absence d'antécédents d'affections cardio-vasculaires, un taux de LDL cholestérol inférieur à 130 mg/dl (3,4 mmol/dl) et un taux de CRP hautement sensible (hsCRP) supérieur à 2mg/l. Après une durée de traitement moyenne de 1,9 ans, le risque d'accidents cardio-vasculaires a diminué de 44% dans le groupe ayant reçu la rosuvastatine.

1.3.2.3 Rôle de l'inflammation dans le développement et la progression de l'athérosclérose

L'athérosclérose est initiée par des changements de nature inflammatoire au niveau endothélial où l'on observe une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion. Les monocytes se lient aux molécules d'adhésion exprimées à la surface endothéliale et migrent vers l'intima sous l'influence de diverses molécules pro-inflammatoires telles que le MCP-1 et les oxLDL. Dans l'intima, les monocytes se transforment en macrophages puis en cellules spumeuses. Les lymphocytes T sont également présents dans l'intima où en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires, ils contribuent à amplifier la réponse inflammatoire locale. Suite à ces événements inflammatoires, se forme la lésion initiale de l'athérosclérose, la strie lipidique. L'inflammation est aussi à l'origine de la progression de la strie lipidique vers la lésion avancée. Au cours de cette progression, une large panoplie de molécules synthétisées par les cellules spumeuses, telles que les cytokines et les MMP, facilitent la dégradation du collagène, l'affaiblissement de la coiffe fibreuse, l'érosion de l'endothélium et contribuent éventuellement à la rupture de la plaque. Donc, l'inflammation joue un rôle central dans l'athérosclérose depuis son initiation, en passant par son développement, jusqu'à sa phase critique, la rupture de la plaque.

I.3.3 Marqueurs inflammatoires : la protéine C- Réactive (CRP)

I.3.3.1 Structure

La CRP est une molécule de reconnaissance de modèle calcium-dépendante appartenant à la famille des pentraxines. Elle est composée de 5 sous-unités identiques polypeptidiques et non glycosylées de configuration pentamérique (Shrive, Cheetham, Holden, et al., 1996) (Figure 7). Ces sous-unités contiennent 206 acides aminés chacune et sont associées entre elles par des liaisons non covalentes (Thompson, Pepys, & Wood, 1999). Chaque protomère est composée de deux feuilletts β stratifiés ayant une topologie aplatie de Jellyroll similaire à celle des lectines (Shrive, Cheetham, Holden, et al., 1996 ; Thompson, Pepys, & Wood, 1999). Sur chaque protomère se trouve une face de reconnaissance avec un site de liaison de la phosphocholine constitué de deux ions calciques coordonnés et adjacents à une poche hydrophobe. Ce site de liaison est localisé sur la face concave de la molécule. La co-structure de la CRP et de la phosphocholine suggère que la phénylalanine 66 (Phe66) et le glutamate 81 (Glu81) soient les 2 résidus clés responsables de la liaison de la phosphocholine à la CRP (Thompson, Pepys, & Wood, 1999). Le Phe66 permet des interactions hydrophobes avec les groupements méthyl de la phosphocholine tandis que le Glu81 se trouve sur l'extrémité opposée de la poche où il interagit avec la choline azotée chargée positivement. Le rôle important joué par ces deux résidus a été confirmé par des études de mutagenèse (Agrawal, Simpson, Black, et al., 2002 ; Black, Agrawal, & Samols, 2003). Notons par ailleurs que la face opposée du pentamère, contenant une seule hélice α , est la face effectrice où le facteur du complément C1q se lie et où le récepteur Fc γ R semble se fixer.

Il est important de noter qu'il existe des variations considérables entre les CRP de différentes espèces qui montrent des différences quant à la spécificité de liaison des

ligands, la présence et la nature de la glycosylation, l'assemblage des protomères, la capacité de précipiter les ligands, le comportement comme protéine de phase aiguë et la capacité d'activer le complément (Oliveira, Gotschlich, & Liu 1980 ; de Beer, et al., 1982 ; Baltz, et al., 1982).

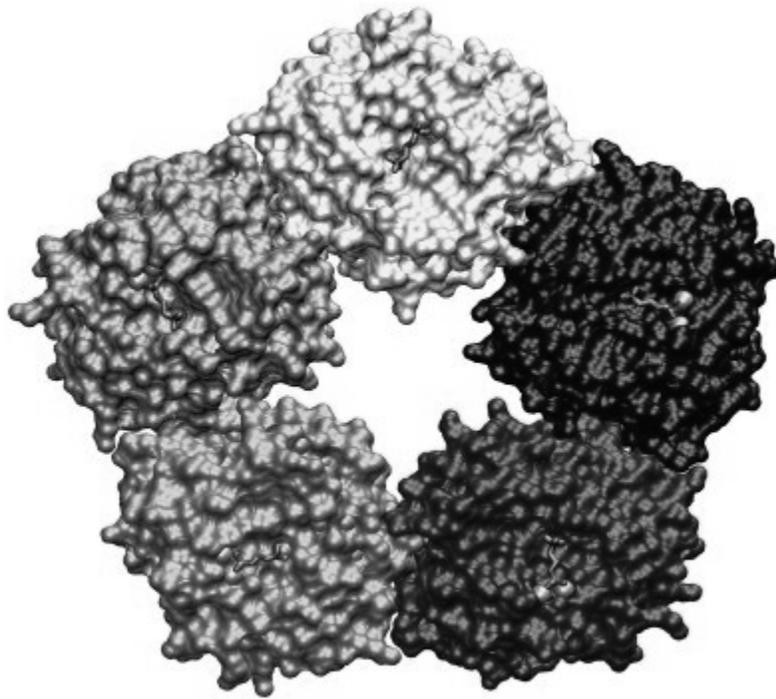


Figure 7. Structure pentamérique de la CRP.

1.3.3.2 Génétique

Le gène de la CRP, localisé sur le bras court du chromosome 1, contient un seul intron qui sépare la région codant pour le peptide signal de celle codant pour la protéine mature. Il existe une composante héréditaire de l'ordre de 40% des niveaux de base de la CRP plasmatique (Kluft & de Maat, 2003) et des études récentes ont pu associer trois polymorphismes du gène de la CRP à des changements de ses niveaux plasmatiques (Zee & Ridker, 2002 ; Szalai, McCrory, Cooper, et al., 2002 ; Brull, Serrano, Zito et al., 2003). L'identification de variations au niveau du gène de la CRP pourrait permettre l'identification de génotypes présentant un risque cardiovasculaire (Verma et al., 2004). Il est postulé que ces polymorphismes pourraient accroître le risque cardiovasculaire en déstabilisant la structure pentamérique de la CRP, favorisant ainsi sa forme monomérique ou en augmentant la stabilité de la liaison de la CRP monomérique sur la membrane des cellules endothéliales, ce qui se traduit par une activation de ces cellules (Khreiss, Jozsef, Potempa, et al., 2004).

1.3.3.3 Rôle biologique

La CRP est une protéine de la phase aiguë et un important constituant de la réponse immunitaire de type inné. Sa concentration moyenne chez les sujets sains est inférieure à 1 mg/L et peut augmenter de 100 à 1000 fois au cours de la réponse inflammatoire accompagnant certains événements pro-inflammatoires tels qu'une lésion tissulaire ou une infection (Pepys & Baltz, 1983). Après avoir atteint leur pic (35 à 50h), les concentrations plasmatiques de CRP se normalisent rapidement suite à l'élimination du stimulus inflammatoire. Pour cette raison et du fait que la CRP est stable pendant l'entreposage et n'est pas affectée par les variations diurnes, ni par l'âge et le sexe et possède une demi-vie plasmatique de 19 heures (Yeh & Willerson, 2003), cette protéine est considérée comme un très bon marqueur de l'état inflammatoire. Plusieurs études

ont évalué les rôles fonctionnels de la CRP. Ces études ont démontré que la CRP d'origine humaine se lie avec haute affinité et de manière calcium-dépendante aux résidus de la phosphocholine, et lie aussi une multitude d'autres ligands intrinsèques (autologues) et extrinsèques. Parmi les ligands intrinsèques, on peut citer les lipoprotéines plasmatiques natives et modifiées (Pepys, Rowe & Baltz, 1985), les membranes cellulaires endommagées (Volanakis & Wirtz, 1979.), un certain nombre de phospholipides et de composés associés, les petites particules nucléaires ribonucléoprotéiques (Du Clos, 1989) et les cellules apoptotiques (Gershov, Kim, Brot, & Elkon, 2000). Parmi les ligands extrinsèques on peut citer plusieurs glycans, phospholipides et d'autres constituants de microorganismes tels que les composants capsulaires et somatiques des bactéries, des mycoses et des parasites ainsi que des produits végétaux (Mark & Gideon, 2003). Une fois liée aux ligands macromoléculaires, la CRP est reconnue par une des protéines principales du complément, le C1q, ce qui induit l'activation de la voie classique du complément, qui est en l'occurrence l'élément permettant la lyse des cellules pathogènes (Volanakis, 1982 ; Mold, Gewurz, & Du Clos, 1999). Divers effets de la CRP secondaires à sa capacité de liaison aux ligands rappellent certaines propriétés des anticorps, suggérant que sous diverses circonstances, la CRP puisse contribuer à la défense de l'hôte contre les infections, fonctionner comme médiateur pro-inflammatoire et participer au fonctionnement physiologique et physiopathologique des constituants intrinsèques. La phosphocholine est une composante de nombreux procaryotes et est quasi systématiquement présente chez les eucaryotes (Harnett & Harnett, 1999). La capacité de la CRP de lier ces résidus pourrait donc être importante pour la défense de l'hôte et la manipulation de constituants intrinsèques (Pepys & Baltz, 1983) telles que les cellules nécrotiques (Kushner & Kaplan, 1961) et apoptotiques (Gershov, Kim, Brot, & Elkon, 2000 ; Chang, Binder, Torzewski & Witztum, 2002). De plus, l'activation du complément par la CRP en facilitant

l'opsonisation et la phagocytose de ces ligands pourrait induire des effets physiopathologiques pro-inflammatoires (Pepys & Baltz, 1983).

1.3.3.4 Mécanismes de régulation

La CRP est principalement synthétisée par le foie. L'induction de la CRP au niveau hépatique est régulée au niveau transcriptionnel par différentes cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-1 β (Kushner, Jiang, Zhang et al., 1995). Ces cytokines pro-inflammatoires contrôlent, via l'activation des facteurs de transcription STAT3 (protéines de transduction et de régulation de la transcription 3), "CCAAT/box Enhancer Binding Protein" (C/EBP) et NF- κ B, l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines de la phase aiguë. La régulation des gènes de la phase aiguë a lieu suite à des interactions spécifiques entre ces facteurs de transcription et le promoteur de ces gènes (Black, Kushner, & Samols, 2004). Pour la CRP, les membres de la famille des C/EBP (C/EBP β et le C/EBP δ) sont essentiels pour l'induction. Cependant, en plus des sites de liaison pour la C/EBP, le gène de la CRP contient, à proximité de son promoteur, des sites de liaison pour les facteurs nucléaires STAT3 et le NF- κ B. Des interactions entre ces facteurs de transcription mènent à une stabilisation de l'ADN de la famille des C/EBP et permettent une induction maximale du gène (Agrawal, Samols, & Kushner, 2003). En plus d'être synthétisée au niveau hépatique, la CRP est aussi synthétisée au niveau du tissu adipeux, des neurones, de la plaque athérosclérotique, des monocytes et des lymphocytes (Lau et al., 2006 ; Jialal, Devaraj, & Venugopal, 2004; Kuta, & Baum, 1986). Il est plausible que cette synthèse extra-hépatique puisse influencer les niveaux plasmatiques de la CRP.

1.3.3.5 Facteurs de régulation de la CRP hépatique

Comme nous en avons déjà discuté, l'induction de la CRP au niveau hépatique est principalement régulée par l'IL-6, un effet probablement stimulé par l'IL-1 β (Kushner, Jiang, Zhang, et al., 1995). La voie de signalisation impliquée dans cet effet nécessite la liaison de l'IL-6 à son récepteur membranaire, l'IL-6R α . Cette liaison induit la formation d'un complexe entre la gp130, une molécule de transduction du signal, et le récepteur de l'IL-6, complexe qui entraîne l'activation des Janus kinases (JAK) et des facteurs C/EBP et STAT3 (Zhang, Samols & Kushner, 1996 ; Heinrich, Behrmann, Muller-Newen, et al., 1998 ; Ochrietor, Harrison, Zahedi, et al., 2000 ; Agrawal, Cha-Molstad, Samols, et al., 2001). Des études ont démontré que la phosphorylation et l'activation de STAT-3 sont des éléments cruciaux de l'induction de l'expression génique de la CRP par l'IL-6 (Heinrich, Behrmann, Haan, et al., 2003). Arnaud et al. ont démontré que les statines réduisaient l'expression de la CRP induite par l'IL-6 dans les hépatocytes humains et que cet effet était exercé au niveau transcriptionnel. Ces auteurs ont aussi rapporté que les statines réduisaient l'expression génique de la CRP en diminuant l'activation du STAT3 (Arnaud, Burger, Steffens et al., 2005). Bien que la CRP systémique soit essentiellement produite en réponse à l'IL-6, d'autres cytokines telles que l'IL-1 β pourraient aussi produire cet effet. Ainsi, une récente étude a documenté que les statines réduisaient l'expression de la CRP hépatique induite par l'IL-1 β (Kleemann, Verschuren, De Rooij, et al., 2004). Cependant, certains arguments suggèrent que l'effet de l'IL-1 β puisse être médié par l'IL-6 dont la production hépatique est stimulée en présence d'IL-1 β . Supportant cette possibilité, Zhang et al. ont montré que l'IL-1 β ne stimule la transcription de la CRP dans les cellules Hep3B qu'en présence d'IL-6 (Zhang, Jiang, Rzewnicki, Samols, & Kushner, 1995). Une autre cytokine pro-inflammatoire, le TNF- α , essentiellement produite par le tissu adipeux, pourrait aussi réguler les niveaux circulants de CRP en augmentant les niveaux d'IL-1 et d'IL-6

hépatiques (Stephens, Butts, & Pekala, 1992). L'IL-17 est un membre d'un nouveau groupe de cytokines pro-inflammatoires composé de six principaux isoformes, dont l'IL-17A est le membre le plus étudié. L'IL-17A en liant son récepteur IL-17RA exerce des effets pro-inflammatoires, pro-apoptotiques et pro-mitogéniques (Patel, King, Bailey et al., 2007). Si l'IL-17 est considérée comme une cytokine exprimée spécifiquement par les cellules T (Yao, Painter, Fanslow, et al., 1995), plusieurs cellules expriment son récepteur et sont par conséquent des cibles de l'IL-17 (Yao, Fanslow, Seldin, et al., 1995). Patel et al., ont démontré que l'IL-17 stimule l'expression hépatique de la CRP indépendamment de l'IL-1 β et de l'IL-6 et exerce cet effet en activant notamment la voie des MAPK et les facteurs de transcription NF- κ B et C/EBP β (Patel, King, Bailey et al., 2007). Donc, il semble qu'outre les IL-1 β et IL-6, l'IL-17 puisse aussi jouer un rôle important dans la régulation de la CRP systémique.

1.3.3.6 Facteurs de régulation de la CRP vasculaire

Diverses études ont démontré que la CRP est non seulement produite par le foie mais aussi par d'autres cellules et tissus, dont les cellules vasculaires. Au niveau vasculaire, il a été démontré que la CRP était produite dans la lésion athérosclérotique (spécialement par les macrophages et les CML) (Yasojima, Schwab, McGeer E & McGeer P, 2001 ; Kobayashi, Inoue, Ohashi, et al., 2003 ; Reynolds & Vance, 1987) et que les cellules endothéliales la synthétisaient et la sécrétaient (Venugopal, Devaraj & Jialal, 2005). Plusieurs facteurs métaboliques sont impliqués dans la régulation de la CRP vasculaire ; parmi ces facteurs on peut citer les adipokines, les cytokines, le glucose et la lipopolysaccharide (LPS) (Tableau 3).

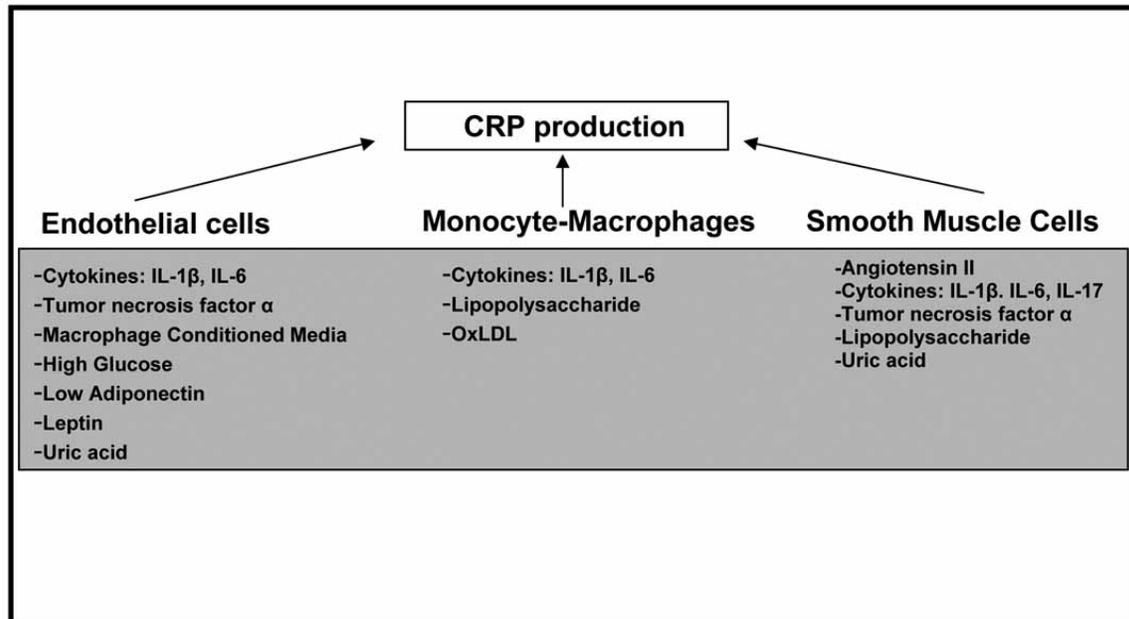


Tableau 3. Principaux stimulants de la CRP vasculaire (Mugabo Y et al., *Current Diabetes Reviews*, 2010 ; 6 : 27-34).

A) Les adipokines.

1) *La leptine*. La leptine est une protéine produite essentiellement par les adipocytes, qui joue un rôle majeur dans la régulation de l'apport alimentaire et la dépense énergétique. De nombreuses études ont pu démontrer une relation indépendante entre la leptine et le risque athérosclérotique (Wallace, McMahon, Packard, et al., 2001 ; Wolk, Berger, Lennon et al., 2004), l'infarctus du myocarde, l'IMT des artères coronaires et les AVC, suggérant que la leptine puisse être associée à un risque cardiovasculaire accru (Beltowski, 2006). Des corrélations positives entre les niveaux plasmatiques de CRP et leptine ont été documentées chez des individus de poids normal et chez les sujets obèses (Shamsuzzaman, Winnicki, Wolk, et al., 2004 ; Ble, Windham, Bandinelli et al., 2005) et il a été récemment démontré par Singh et al. que la leptine, à des concentrations très élevées (>30 ng/ml), induisait l'expression de la CRP par les cellules endothéliales. Cet effet impliquait la production de ROS et la phosphorylation des

kinases extracellulaires régulées 1/2 (ERK1/2) (Singh, Hoffmann, Wolk, et al., 2007).

L'activation de la PKC a aussi été incriminée dans cet effet (DeRosa, 2009).

2) *Le TNF α* . Le TNF α est produit dans le tissu adipeux par les adipocytes. Une étude récente a démontré que le TNF α active la transcription de la CRP via la β -caténine, une protéine multifonctionnelle jouant un rôle crucial dans l'adhésion cellulaire (Choi et al., 2007). Une induction d'expression de la CRP à un niveau similaire à celui obtenu par les IL-1 β et IL-6 est aussi documentée au niveau des CML de l'artère coronaire incubées en présence de TNF α (Calabró, Willerson & Yeh, 2003).

3) *L'Angiotensine II (AngII)*. L'AngII est une hormone octapeptidique produite à partir de l'angiotensine I et qui agit comme une hormone endocrine, paracrine/autocrine et intracrine. Au niveau vasculaire, l'AngII est impliquée dans la vasoconstriction ainsi que dans la sécrétion d'aldostérone menant à une augmentation de la rétention du sodium et favorisant dès lors le développement de l'hypertension. L'AngII est aussi un médiateur pro-inflammatoire libéré par les adipocytes. Des données récentes générées par Peng et al montrent que l'AngII participe à la régulation de la CRP vasculaire et induit l'expression génique de la CRP dans les CML. Cet effet s'exerce via son récepteur de type 1(AT1-R) et la voie des MAPK (Peng, Liu, Gao, et al., 2007).

4) *L'IL-6*. Plus de 25% de l'IL-6 circulant provient du tissu adipeux, les autres sources étant les cellules immunitaires, les fibroblastes, les cellules endothéliales et le muscle squelettique (Fried, Bunkin, Greenberg, 1998). L'IL-6 prédit le développement du diabète de type 2 (Pradhan, Manson, Rifai et al., 2001) et l'infarctus du myocarde (Ridker, Rifai, Stampfer et al., 2000). Il est bien connu que l'IL-6 est le principal régulateur de la synthèse de la CRP par les hépatocytes, mais de nouvelles évidences montrent que l'IL-6 régule aussi l'expression de la CRP au niveau des cellules

vasculaires. La régulation de la CRP vasculaire par l'IL-6 est discutée ci-dessous dans la section « *Cytokines* ».

5) *L'adiponectine*. L'adiponectine, aussi connue sous le nom d'AdipoQ ou AcrP30, est exprimée exclusivement par les adipocytes. Les niveaux plasmatiques d'adiponectine diminuent chez les sujets obèses et sont inversement corrélés à l'état d'IR et aux concentrations circulantes de CRP (Higashiura, Ura, Ohata, et al., 2004). Les sujets présentant des maladies coronariennes ont aussi des niveaux d'adiponectine abaissés (Ouchi, Kihara, Arita, et al., 1999) suggérant un effet cardioprotecteur de cette adipokine. Des études *in vitro* ont pu démontrer que l'adiponectine abolit la synthèse et la sécrétion de la CRP endothéliale induite par divers stimuli tels que les cytokines pro-inflammatoires et que cet effet implique une augmentation de l'activation de l'AMPK et une diminution de l'activité du NF- κ B (Devaraj, Torok, Dasu, Samols et Jialal, 2008). L'adiponectine plasmatique chez l'humain est une molécule multimérique, présentant divers poids moléculaires, à savoir l'adiponectine trimérique de faible poids moléculaire, l'adiponectine hexamérique de poids moléculaire moyen et enfin l'adiponectine multimérique de haut poids moléculaire (Pajvani et al., 2004). Elisha et al. (Elisha et al., 2010), ont examiné, dans une population de femmes ménoposées sédentaires, présentant un surpoids pondéral ou obèses, l'association entre les niveaux d'adiponectine totale et à haut poids moléculaire et les facteurs de risque cardio-métaboliques. Leurs travaux démontrant, dans cette population, des corrélations similaires entre adiponectine totale et de haut poids moléculaire avec ces facteurs de risque suggèrent que le dosage des formes d'adiponectine à haut poids moléculaire ne soit pas particulièrement informatif dans ce contexte.

B) Les cytokines. Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle important dans la synthèse de la CRP systémique et des données récentes montrent qu'elles induisent aussi l'expression de CRP par les cellules vasculaires. La CRP est produite,

nous l'avons vu, dans la lésion athéromateuse par les CML et les macrophages, et les cytokines pro-inflammatoires en sont les principaux inducteurs (Calabro, Willerson, & Yeh, 2003 ; Yasojima, Schwab, McGeer E, & McGeer P, 2001 ; Kobayashi, Inoue, Ohashi, et al., 2003 ; Dong & Wright, 1996). Les travaux de Venugopal et al. ont aussi pu démontrer que les cellules endothéliales aortiques humaines (HAECs) synthétisaient et sécrétaient de la CRP (Venugopal, Devaraj & Jialal, 2005). Le plus puissant stimulant de la production de la CRP par ces cellules est la combinaison d'IL-1 et IL-6. Cette combinaison de cytokines, ainsi que l'IL-17, sont aussi de puissants stimulants de l'expression génique de la CRP dans les CML de l'artère coronaire humaine (Calabro, Willerson, & Yeh, 2003) (Patel, King, Bailey, et al., 2007). Enfin, Haider et al. ont démontré que les cellules sanguines mononucléées périphériques (PBMC) exprimaient la CRP lorsque incubées en présence d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF α , alors que l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, inhibait cette expression. Ces cytokines pro-inflammatoires induisent la CRP via la voie de signalisation intracellulaire impliquant le TLR-4, le NF- κ B et la PKC (Haider, Leuchten, Schaller, et al., 2006).

C) Le glucose. Des études suggèrent qu'un mauvais contrôle glycémique soit associé au développement de complications macrovasculaires. La CRP est un facteur de risque des maladies cardiovasculaires et il a été rapporté par King et al. que des niveaux élevés d'hémoglobine glyquée (HbA1c) étaient associés à une élévation des niveaux plasmatiques de CRP (King, Mainous, Buchanan, & Pearson, 2003). *In vitro*, Devaraj et al. ont aussi documenté que des niveaux élevés de glucose, en plus de stimuler la synthèse de la CRP hépatique, augmentaient la synthèse et la sécrétion de la CRP par les cellules endothéliales, via l'activation du facteur NF- κ B (Devaraj, Torok, Dasu, Samols & Jialal, 2008). De plus, Akbar (Akbar, 2003) a pu démontrer que la metformine, un agent hypoglycémiant, diminuait les niveaux sériques de CRP chez des patients diabétiques avec syndrome métabolique.

D) La lipopolysaccharide (LPS). La LPS est un lipide complexe auquel est attaché un polysaccharide responsable de la spécificité antigénique de l'antigène O. Extrêmement toxique, la LPS représente l'endotoxine des bactéries à Gram négatif. La LPS semble impliquée dans la régulation de la CRP vasculaire. En effet, Haider et al. ont démontré que la LPS induit l'expression de CRP par les PBMCs de sujets sains *in vivo* et *in vitro*, un effet impliquant l'activation de TLR-4, NF- κ B et PKC (Haider, Leuchten, Schaller, et al., 2006). La LPS stimule aussi la production de la CRP par les CML, un effet comparable à celui produit par la combinaison d'IL-1 β et d'IL-6 (Calabro, Willerson, & Yeh, 2003).

I.3.4 CRP et maladies cardiovasculaires

I.3.4.1 CRP : marqueur de risque de maladies cardiovasculaires

De nombreuses évidences démontrent que des niveaux plasmatiques élevés de hsCRP sont des marqueurs de risque de futurs accidents cardiovasculaires et ce aussi bien chez des sujets à risque de maladies cardiovasculaires que chez des sujets sains. L'association indépendante entre la hsCRP et maladies cardiovasculaires a été rapportée pour la première fois par Ridker et al. qui ont démontré que des hommes en bonne santé avec des niveaux élevés de hsCRP avaient 3 fois plus de risque de faire un infarctus du myocarde que ceux avec des niveaux de CRP plus bas (Ridker, Cushman, Stampfer, Tracy, Hennekens, 1997). De nombreuses études prospectives de prévention primaire et secondaire menées sur diverses populations ont confirmé cette association et apporté leur appui au concept selon lequel la mesure de la hsCRP pourrait ajouter des informations sur le risque cardiovasculaire global au-delà de ceux fournis par les facteurs de risque traditionnels de Framingham. De manière intéressante, il a été

proposé que la hsCRP puisse être même un meilleur marqueur d'accidents cardiovasculaires que les niveaux de LDL chez les sujets sains (Ridker, Rifai, Rose, Buring, & Cook, 2002). Les niveaux de hsCRP et de LDL étant faiblement corrélés, il a été suggéré que chaque marqueur puisse identifier différents groupes à risque et que la mesure des deux paramètres puisse offrir une meilleure détection du risque cardiovasculaire que la mesure d'un seul marqueur à la fois. Cette possibilité a été confirmée par l'analyse de survie montrant que des individus sains avec des niveaux de LDL bas mais une concentration de hsCRP élevée étaient plus à risque de développer des maladies cardiovasculaires que ceux avec des niveaux bas de LDL et une concentration de hsCRP faible (Ridker, Rifai, Rose, Buring, & Cook, 2002). Notons que chez des individus en bonne santé et surtout sans antécédents de maladies cardiovasculaires, on observe 2 fois plus de risque de développer des maladies cardiovasculaires chez ceux avec un taux sérique de CRP supérieur à 3mg/L que chez ceux avec un taux sérique de CRP inférieur à 1mg/L (Danesh et al., 2000). Enfin, dans l'étude de Rotterdam, la plus grande étude prospective à ce jour, il a été démontré qu'après ajustement des facteurs de risque traditionnels, les niveaux sériques de CRP étaient indépendamment associés à l'insuffisance cardiaque chez l'homme (Kardys et al., 2006). Prises dans leur ensemble, ces études suggèrent que la CRP est un marqueur de risque cardiovasculaire à ne pas négliger et utile en milieu clinique pour l'évaluation du risque cardiovasculaire, en particulier chez des patients sans antécédents de maladies cardiovasculaires.

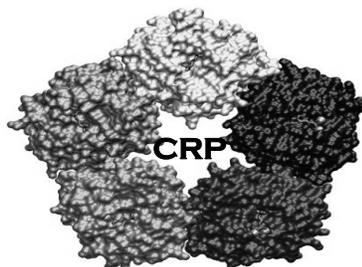
1.3.4.2 CRP : facteur de risque de maladies cardiovasculaires

Certaines évidences semblent indiquer que la CRP puisse être non seulement un marqueur de risque mais aussi un facteur de risque cardiovasculaire. Ainsi, de nombreuses études *in vitro* ont appuyé un rôle contributif direct de la CRP dans l'athérogénèse (Manolov, Koenig, Hombach & Torzewski, 2003 ; Jialal, Devaraj, & Venugopal, 2004). La première hypothèse selon laquelle la CRP pourrait être impliquée dans l'initiation et la progression du processus athérosclérotique a vu le jour en 1982 quand des chercheurs ont démontré que la CRP interagissait avec les particules de LDL (deBeer, Soutar, Baltz, et al., 1982), données qui ont été largement confirmées depuis lors (Bhakdi, Torzewski, Klouche & Hemmes, 1999 ; Chang, Binder, Torzewski & Witztum, 2002 ; Taskinen, Hyvonen, Kovanen, Meri, & Pentikainen, 2005). Ces dernières années, l'explosion de données cliniques montrant l'association entre CRP et morbidité/mortalité cardiovasculaires a généré un intérêt exceptionnel pour l'étude des effets pro-athérogéniques de la CRP. Jusqu'à aujourd'hui, la majorité des études importantes impliquant la CRP dans l'athérogénèse reposent sur des données provenant essentiellement d'études *in vitro*. Plusieurs groupes ont démontré que la CRP induisait de nombreux effets pro-inflammatoires et pro-athérogéniques au niveau des cellules vasculaires et des monocytes/macrophages en culture (Figure 8). À noter cependant que des résultats contradictoires ont aussi été générés *in vitro*, certaines études rapportant des effets anti-inflammatoires de la CRP dans ces mêmes cellules. Ces effets opposés de la CRP pourraient s'expliquer, du moins en partie, par l'utilisation de préparations commerciales de CRP mal caractérisées pouvant contenir diverses protéines ainsi que des contaminants non protéiques ou de l'utilisation de CRP sous différentes conformations, native ou modifiée, susceptibles d'exercer des fonctions opposées. La preuve de l'effet athérogénique de la CRP *in vivo* est nettement moins convaincante. Alors que certaines études ont rapporté des altérations de la fonction

endothéliale (Teoh, Quan, Lovren, et al., 2008) et une augmentation de l'athérosclérose chez des souris transgéniques surexprimant la CRP, la plupart des études n'ont pu reproduire de tels résultats. Pour ajouter à la confusion, il a été rapporté que bien que la CRP ne devienne pas inflammatoire quand elle est injectée à des rats sains, son inhibition abolit l'augmentation de la taille de l'infarctus produite par l'injection de la CRP humaine à ces animaux (Pepys, Hirschfield, Tennent, et al., 2006). Les conformations de la CRP variant selon l'espèce (Baltz et al., 1982), il apparaît difficile d'extrapoler aux humains les résultats obtenus chez les animaux. Il est donc clair que de futures études *in vivo* sont requises pour définir de manière définitive le rôle de la CRP dans l'athérogénèse.

Cellules endothéliales Dysfonction/Activation

- ↓ Expression eNOS, production NO
- ↑ Superoxide
- ↓ Prostacycline
- ↑ ET-1, LOX-1
- ↑ Cytokines proinflammatoires
- Activation du complément
- ↑ Apoptose des EPC



Formation et croissance de la plaque

- ↑ Formation cellules spumeuses
- ↑ Prolifération macrophages
- ↑ Stress oxydatif
- ↑ Cytokines proinflammatoires
- ↑ AT1-R au niveau des CMLs
- ↑ Prolifération & migration des CMLs

Recrutement des Monocytes

- ↑ Chimiotactisme des Monocytes (MCP-1, IL-8)
- ↑ Molécules d'adhésion
- ↑ NF-κB

Rupture de la plaque/Thrombose

- ↑ MMPs, LOX-1
- ↑ PAI-1, Facteur tissulaire
- ↓ Prostacyclin, NO
- ↓ Migration des cellules endothéliales
- ↑ Apoptose des CMLs
- ↑ Angiogénèse

Figure 8. Effets pro-inflammatoires et pro-athérogéniques de la CRP (adapté de Mugabo Y et al., *Current Diabetes Reviews*, 2010 ; 6 : 27-34).

1.3.4.3 Effets pro-athérogéniques de la CRP

La CRP recombinante humaine, à des concentrations associées à un risque cardiovasculaire accru induit une multitude d'effets sur l'endothélium vasculaire favorisant ainsi l'instauration d'un phénotype pro-inflammatoire et pro-athérosclérotique (Figure 8).

Il a été démontré que l'interaction de la CRP avec les cellules endothéliales mène à une diminution de l'expression et de l'activité du eNOS (Singh, Devaraj, Vasquez-Vivar, Jialal, 2007 ; Grad, Golomb, Mor, et al., 2007 ; Schwartz, Osborne-Lawrence, Hahner, et al., 2007), suggérant donc un rôle de la CRP dans la pathogenèse de la ED. Des données récentes montrent que la CRP stimule, d'une manière synchronisée, la libération de l'ET-1 et de l'IL-6 par les cellules endothéliales (Verma, Li, Badiwala, et al., 2002), régule positivement les molécules d'adhésion telles que l'ICAM-1, la VCAM-1 et la E-sélectine (Pasceri, Willerson, Yeh, 2000), et induit la libération de MCP-1, une chémokine facilitant la transmigration des leucocytes (Pasceri, Chang, Willerson, et al., 2001). En inhibant la production du NO, la CRP facilite l'apoptose des cellules endothéliales et bloque l'angiogenèse (Verma, Wang, Li, et al., 2002). La capacité de la CRP à inhiber les cellules progénitrices endothéliales a été proposée comme un important mécanisme inhibant l'angiogenèse compensatoire dans l'ischémie chronique (Szmitko, Fedak, Weisel, et al., 2003). De plus, la CRP augmente l'activation des cellules endothéliales par la CD14, une protéine exprimée par les macrophages (Palusinski, Vaisman, Pasceri, et al., 2002) et régule positivement le NF- κ B (Verma, Badiwala, Weisel, et al., 2003), un des principaux facteurs facilitant la transcription de nombreux gènes pro-athérogéniques. En outre, la CRP induit l'expression du PAI-1 (Devaraj, Xu, & Jialal, 2003), du récepteur des AGEs (RAGE) (Zhong et al., 2006) et du récepteur de type lectine des oxLDL (LOX-1) (Li, Roumeliotis, Sawamura, & Renier, 2004) dans les HAECs, tous des effets potentiellement pro-athérogéniques (Figure 8).

De récentes études ont aussi montré des effets pro-athérogéniques sur d'autres cellules vasculaires (Figure 8). Au niveau des cellules macrophagiques, il a été proposé que la CRP en favorisant l'opsonisation des LDL puisse favoriser leur captation par ces cellules (Zwaka, Hombach, & Torzewski, 2001) et induire dès lors la formation de cellules spumeuses (Fu & Borensztajn, 2002). La CRP a aussi des effets pro-athérogéniques directs au niveau des CML. En effet, de récentes études suggèrent que la CRP régule positivement l'AT-1R au niveau des CML *in vivo* et *in vitro* et stimule la migration et la prolifération des CML ainsi que leur production de ROS et augmente la formation de la néo-intima (Wang, Li, Weisel, et al., 2003). Enfin, certaines études ont pu démontrer que la CRP était souvent localisée à proximité du complexe d'attaque membranaire (MAC) du complément dans des tissus athérosclérotiques précoces (Torzewski J, Torzewski M, Bowyer, et al., 1998), et que les niveaux de mRNA codant pour la CRP ainsi que certains facteurs du complément étaient augmentés dans la plaque athérosclérotique (Yasojima, Schwab, McGeer E, & McGeer P, 2001). De manière collective, ces données suggèrent que la CRP puisse constituer un facteur pro-inflammatoire direct à l'origine de l'initiation, l'évolution et la progression de l'athérosclérose.

I.3.5 CRP et IR

I.3.5.1 CRP : un marqueur de risque du diabète de type 2

Le diabète de type 2 est associé à un état inflammatoire à bas bruit et la CRP est reconnue aujourd'hui comme un facteur de prédiction de cette pathologie. Les sujets diabétiques de type 2 tendent à démontrer des concentrations plus élevées de hsCRP que les sujets non diabétiques et une augmentation de hsCRP chez ces patients est associée à une augmentation du risque de morbidité et de mortalité cardiovasculaires

(Schulze, Rimm, Li, et al., 2004 ; Soinio, Marniemi, Laakso, Lehto, Rönnemaa, 2006). En dépit du fait que la CRP soit indépendamment associée au risque de développer le diabète de type 2 (Freeman, Norrie, Caslake, et al., 2002 ; Festa, D'Agostino, Tracy, Haffner, 2002 ; Pradhan, Manson, Rifai, Buring, Ridker, 2001), il est encore difficile de savoir si la CRP joue un rôle causal dans la pathogénèse du diabète de type 2 (Wolford, Gruber, Ossowski, et al., 2003 ; Zee, Germer, Thomas, et al., 2008 ; Dehghan, Kardys, de Maat, et al., 2007). Facteurs génétiques (Dehghan, Kardys, de Maat, et al., 2007) et métaboliques sont susceptibles d'expliquer la relation entre la hsCRP et le risque de diabète. Ainsi, l'IR, l'obésité et le contrôle glycémique ont été proposés comme des déterminants majeurs des niveaux de CRP chez des patients souffrants de diabète de type 2 (Kahn, Zinman, Haffner, et al., 2006 ; Tan, Chow, Tam, Bucala, Betteridge, 2004 ; King, Mainous, Buchanan, Pearson, 2003) et il a été démontré qu'une modification des habitudes de vie réduisant l'obésité et la sédentarité diminuait de manière significative la hsCRP et le risque cardiovasculaire. Des études à long terme sont nécessaires afin d'évaluer si une diminution de la hsCRP par les statines diminuera le risque cardiovasculaire chez des patients diabétique de type 2 (van de Ree, Huisman, Princen, et al., 2003).

1.3.5.2 CRP : rôle dans l'IR

La CRP pourrait jouer un rôle substantiel dans la survenue de l'IR en altérant les voies de signalisation de l'insuline (Xu, Morita, Ikeda, et al., 2007 ; D'Alessandris, Lauro, Presta, et al., 2007). Des travaux de Xu et al. sur les cellules endothéliales vasculaires ont démontré que la CRP altère la signalisation de l'insuline en régulant la JNK/MAPK, l'IRS-1, le eNOS et la "*spleen tyrosine kinase*" (Syk) (Xu, Morita, Ikeda, et al., 2007) et, ce faisant, atténue plusieurs effets métaboliques de l'insuline. La CRP supprime la production du NO en inhibant la phosphorylation de l'Akt et du eNOS et stimule la

phosphorylation de l'IRS-1 sur le résidu Ser307. L'inhibition du CD32, le récepteur Fc γ II de la CRP, bloquent les phosphorylations de la JNK et IRS-1(Ser307) induites par la CRP et restore, dans une certaine mesure, la phosphorylation de l'Akt stimulée par l'insuline. Il a été récemment proposé que la CRP puisse aussi altérer la cascade de signalisation de l'insuline impliquée dans le transport du glucose par les cellules musculaire L6. (D'Alessandris, Lauro, Presta, et al., 2007). Les auteurs de ces travaux suggèrent que la CRP, en augmentant la phosphorylation de l'IRS-1 sur la Ser307 et la Ser612, puisse altérer la captation du glucose, la translocation des GLUT 4 et la synthèse du glycogène. Notons que la CRP a été récemment associée aux composantes du syndrome métabolique (Mauger, Lévesque, Paradis, et al., 2008) telles que les niveaux de TG élevés, les niveaux de HDL bas et le tour de taille. Elle a, en outre, été associée à une diminution de l'adiponectine dans le tissu adipeux (Ouchi, Kihara, Funahashi, et al., 2003). Prise dans leur ensemble, ces données suggèrent que des quantités excessives de CRP pourraient contribuer à la pathogenèse de l'IR et du diabète chez des patients souffrant d'obésité abdominale.

I.4 Problématique, hypothèse et objectifs du projet de recherche

I.4.1 Problématique

L'obésité est associée à une IR et à une réponse inflammatoire à bas bruit. L'IR au niveau des adipocytes tend à augmenter les niveaux d'AGL dans la circulation, altération qui contribue au développement d'une IR métabolique et vasculaire avec diminution de la production du NO. Les acides gras ont des effets pro-inflammatoires et il a été suggéré que l'activation de la voie du NF- κ B contribuait à l'IR hépatique (Boden, She, Mozzoli, et al., 2005) et vasculaire. Des études épidémiologiques ont établi un lien entre la CRP et l'IR et il a été démontré que la CRP altérait la signalisation de l'insuline. Le rôle de la CRP comme médiateur des effets nuisibles des acides gras sur la fonction endothéliale n'a jamais été évalué.

I.4.2 Hypothèse

Notre hypothèse est que l'acide palmitique, l'acide gras saturé le plus abondant chez l'humain, augmente l'expression de la CRP dans les cellules endothéliales et que l'expression de la CRP agit comme médiateur de l'effet inhibiteur de l'acide palmitique sur la production du NO.

I.4.3 Objectifs

Les objectifs de ce projet sont :

- 1) Évaluer l'effet de l'acide palmitique sur l'expression de la CRP endothéliale.
- 2) Caractériser les voies de signalisation impliquées dans l'expression de la CRP induite par l'acide palmitique.
- 3) Déterminer le rôle de la CRP comme médiateur de l'inhibition du NO par l'acide palmitique.

II. RESULTATS

II.1 ARTICLE

Palmitate induces C-reactive protein (CRP) expression in human aortic endothelial cells.

Relevance to fatty acid-induced endothelial dysfunction.

Yves Mugabo, Yvette Mukaneza and Geneviève Renier

From the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Centre (CRCHUM),
Notre-Dame Hospital, Department of Medicine, Montreal, Quebec, Canada.

Sous presse dans la revue *"Metabolism"*

Acknowledgments. This study was supported by a grant from Diabète Québec. The authors thank Dr Marc Prentki for his helpful assistance.

Conflicts of interest. None

Address correspondence and reprint requests to:

Geneviève Renier, MD, PhD
CRCHUM, Notre-Dame Hospital
Mailloux Pavilion, K5249
1560 Sherbrooke Street East
Montreal, Quebec
Canada H2L 4M1
Tel: (514) 890-8000 ext. 26895
Fax: (514) 412-7661

Abstract

Circulating levels of free fatty acids (FFA) are commonly elevated in patients with the metabolic syndrome and exert, through activating pro-inflammatory pathways, harmful effects of the vascular endothelium. Objectives and Methods: In this study, we examined the effect of palmitate (PA) on endothelial C-reactive protein (CRP) expression and the role of CRP in PA-induced nitric oxide (NO) inhibition. Results: PA increased, in a dose-dependent manner, CRP protein expression and production in human aortic endothelial cells (HAECs). Induction of CRP protein was mimicked by ceramide, while bromopalmitate and other common FFA such as oleate or linoleate were ineffective. PA also elicited reactive oxygen species (ROS) production in HAECs, an effect prevented by protein kinase C (PKC) inhibition and AMP-activated kinase (AMPK) activation. PA-treated HAECs showed increased CRP mRNA expression and nuclear factor-kappaB (NF- κ B) activation. Induction of CRP expression by PA was prevented by antioxidants and normalized by PKC and mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitors. Disrupting NF- κ B and Janus kinase (Jak)/signal transducers and activators of transcription (STAT) pathways or inducing AMPK activation also suppressed the stimulatory effect of PA on CRP mRNA expression. Finally, in HAECs, PA reduced NO release, an effect reversed by anti-CRP antibody. Conclusions: These data demonstrate that PA-induced endothelial CRP expression involves PKC-driven oxidative stress, possibly through AMPK inhibition, and activation of downstream redox-sensitive signalling pathways, including NF- κ B. They further support a role for endothelial-cell derived CRP as mediator of the suppressive effect of PA on NO production.

Introduction

Endothelial dysfunction, the earliest event in atherogenesis, is an important component of the metabolic syndrome. In insulin-resistant (IR) states such as diabetes and obesity, endothelial dysfunction has been linked to the damaging effects of high circulating levels of free fatty acids (FFA) on the vascular endothelium (1), resulting in impaired insulin signalling and reduced endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity (2-4). Recent data have shown that activation of pro-inflammatory signalling pathways plays a critical role in FFA-mediated vascular insulin resistance. Indeed, it has been demonstrated that I κ B-kinase beta (IKK β) mediates the negative effect of palmitic acid (PA) on endothelial nitric oxide (NO) production, thus establishing this inflammatory pathway as a critical mediator of the deleterious effect of this FFA on endothelial function (5-6).

Diabetes, obesity and other IR states are associated with a systemic inflammatory response characterized by increased levels of circulating markers of inflammation. Among these, the prototypic marker of inflammation C-reactive protein (CRP) has been implicated as an important etiological factor in the development of cardiovascular disease, insulin resistance and type 2 diabetes (7), and adding high sensitivity CRP to the definition of the metabolic syndrome has been shown to improve the prediction of cardiovascular disease among apparently healthy women (8). In addition to being a cardiovascular risk marker, CRP might have a causal role in atherogenesis and contribute, through direct effects on vascular cells, to endothelial dysfunction. Supporting this possibility, an inverse relationship between CRP levels and endothelial function has been documented in patients with diabetes and coronary artery disease (9,10) and an inhibitory effect of CRP on endothelial NO expression and vasoreactivity has been documented both in vitro and in vivo (11-15).

Vascular endothelial cells are an important component of the atherosclerotic lesion and do produce CRP in response to inflammatory and metabolic factors associated with diabetes and obesity, including pro-inflammatory cytokines (16), high glucose (17) and adipocyte-derived secretory products (17-18). Thus, high local CRP concentrations may occur in the atherosclerotic lesion of patients with the metabolic syndrome and promote endothelial dysfunction. To further characterize the regulation of endothelial cell-derived CRP in IR states, we examined the effect of PA, the most abundant saturated FFA in plasma (19), on CRP expression by cultured human aortic endothelial cells (HAECs) and investigated the signalling pathways involved in this effect. In view of the striking similarity in vascular changes induced by PA and CRP, the role of CRP as mediator of the inhibitory effect of FFA on endothelial NO production was further evaluated.

Material and Methods

Reagents

Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Wisent (St. Bruno, Quebec, Canada). Penicillin-streptomycin, SDS, glycine, and Trizol reagent were obtained from Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON, Canada). The antioxidant compounds, *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) and apocynin, the 5'-AMP-activated kinase (AMPK) activator, AICAR, the protein kinase C (PKC) inhibitors, calphostin C and GF109203X, the extracellular signal regulated kinases (ERK) inhibitors, U0126 and PD98059, the c-jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor, SP600125, the I κ B α phosphorylation inhibitor, BAY11-7085 and the Janus kinase (Jak)/signal transducers and activators of transcription (STAT) inhibitor, AG490, were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). The specific PKC beta (PKC β) inhibitor, LY379196, was kindly provided by Eli Lilly (Indianapolis, IN). Affinity-purified polyclonal antibody against I κ B α and anti-CRP and PKC β antibodies were bought from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-phosphorylated and unphosphorylated AMPK and STAT-3 antibodies were kindly provided by Dr Marc Prentki, CRCHUM, University of Montreal, Canada. E-TOXATE kit, sodium azide (NaN₃), endotoxin- and FFA-free bovine serum albumin (BSA) fraction V and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). END-X B15 endotoxin removal affinity resin kit was obtained from Seikagaku America (Falmouth, MA). Highly purified (99%) recombinant human native CRP was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). CRP was free of endotoxin, as assessed by the Limulus assay. NaN₃ was removed from the commercial CRP preparation by dialysis against 500 ml 20 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5, 140 mmol/l NaCl, 2 mmol CaCl₂ at 4°C.

Preparation of PA-albumin complexes

PA was added to the culture medium as PA-BSA complex. Briefly, sodium salt palmitic acid was dissolved in 10% FFA-free BSA fraction V at 5mmol/l. This stock solution was filter-sterilized and stored at -20°C. PA was added to the culture medium at final concentrations of 0.05 to 0.3 mmol/l.

Human aortic endothelial cells

Primary HAECs (2×10^6 cells) were plated in 24-well cell culture plates (Costar, Corning, NY) and grown in endothelial growth medium (EGM) under recommended conditions. The EGM was supplemented with 2% FBS containing 0.2µg/ml cupric sulfate, 0.01µg/ml human epidermal growth factor, 0.1% gentamicin sulfate amphotericin-B, 1µg/ml hydrocortisone, and 12µg/ml bovine brain extract protein content. At 80% confluence, cells were incubated in serum and growth factor-free media in presence of PA bound to BSA. Control cells were incubated with serum-free EGM media containing equal concentrations of BSA as present in PA-treated cells. HAECs were used in the experiments at passages 3 to 5.

Determination of CRP protein expression

HAECs cells were treated for 24h with increasing concentrations of PA (0.05 to 0.3mmol/l) or were stimulated for 24h with PA (0.2mmol/l), bromopalmitate (BrPA) (0.2mmol/l), oleate (OA) (0.2mmol/l), linoleate (LA) (0.2mmol/l), or C₂-ceramide (CER) (15µmol/l). In some experiments, HAECs were pretreated for 1h with calphostin C (CAL C) (0.1µg/ml), *N*-acetyl cysteine (NAC) (10mmol/l) or apocynin (10µmol/l) and then exposed to PA (0.2mmol/l) for 24h.

At the end of the incubation period, cells were lysed and CRP protein expression was determined by Western Blot analysis. Briefly, cell protein extracts (15 µg) were applied to

10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane using a Bio-Rad transfer blotting system at 100 V for 1 hour. Nonspecific binding was blocked with 5% milk for 1 hour at room temperature. After washing with PBS-Tween 0.1%, blots were incubated overnight at 4°C with anti-CRP (1/1000) or anti- β -actin antibodies (1/5000). After further washing, membranes were incubated for 1 hour at room temperature with a horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-mouse IgG (1/5,000). Antigen detection was performed with an enhanced chemiluminescence detection system (Amersham).

Determination of CRP secretion

The amounts of CRP secreted by the cells exposed to increasing PA concentrations (0.05-0.3mmol/l) for 24h was measured in 20-fold concentrated supernatants using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit specific for human CRP (Bender MedSystems, Austria) according to the manufacturer's instructions. The minimum detectable concentration with this assay is 78pg/ml. Levels of CRP in the cell supernatants were normalized to the levels of total cell proteins.

Measurement of intracellular reactive oxygen species (ROS) generation

Intracellular ROS generation was determined according to the method of Royall (20). HAECs (1×10^6 cells) were plated in 24-well cell culture cluster plates (Costar, Corning, NY) in EGM under recommended conditions. At confluence, cells were incubated in serum- and growth factor-free media and pre-treated or not for 1h with appropriate agents prior to exposure to PA for a further 3h period at 37°C, with addition of the cell-permeable fluorogenic probe, DCF-DA (20 μ g/ml), during the last 20 min of incubation. After washing, cells were trypsinized and intracellular ROS production was monitored by measuring fluorescence in an LS50B luminescence spectrophotometer (Perkin Elmer) using excitation and emission wavelengths of 498 nm and 522 nm, respectively.

Measurement of CRP gene expression

CRP gene expression was measured by semi-quantitative polymerase chain reaction (PCR) in HAECs incubated with the combination of interleukin (IL)-1 β (25ng/ml) and IL-6 (10ng/ml), lipopolysaccharide (LPS) (1 μ g/ml), CRP (10 μ g/ml) or PA (0.2mmol/l) for 6 or 24h. In some experiments, CRP mRNA levels were determined in HAECs pre-treated for 1h with calphostin C (CAL C) (0.1 μ g/ml), LY379196 (20nmol/l), GF109203X (20nmol/l), PD98059 (10 μ mol/l), U0126 (20 μ mol/l), SP600125 (50 μ mol/l), NAC (10mmol/l), apocynin (10 μ mol/l), AICAR (0.5 μ mol/l), BAY11-7085 (10 μ mol/l), or AG490 (20 μ mol/l) prior incubation with PA (0.2mmol/l) for 24h. Expression of the CRP gene in HAECs was measured by Total RNA for use in the PCR reaction was extracted from cells by an improvement of the acid-phenol technique of Chomczynski. 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 (2 μ g/reaction) with 0.1 μ g oligodT (Pharmacia) for 5 minutes at 98°C, then by incubating the mixture with reverse transcription buffer for 1 hour at 37°C. The cDNA obtained was amplified by using 0.8 μ mol/l of two synthetic primers specific for human CRP (5'-TCGTATGCCACCAAGAGACAAGACA-3') (5'-AACACTTCGCCTTGCACTTCATACT-3') and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (5'-CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG-3') (5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG-3'), used as internal standard in the PCR reaction mixture. A 440-base pair human CRP cDNA fragment and a 456-base pair human GAPDH cDNA fragment were amplified enzymatically by 35 and 20 repeated cycles, respectively. An aliquot of each reaction mixture was then subjected to electrophoresis on 1% agarose gel containing ethidium bromide. The intensity of the bands was measured by an image analysis scanning system (Alpha Imager 2000; Packard Instrument Company). Titrating the cDNA samples

ensured that the signal lies on the exponential part of the standard curve. Results obtained by semi-quantitative PCR were confirmed by quantitative real-time PCR as previously described (21) using specific primers for human CRP (5'-GTGTTTCCCAAAGAGTCGGATACT-3') and (5'-CCACGGGTTCGAGGACAGTT-3').

Western Blots for PKC, AMPK, STAT-3 and I κ B α protein expression

Western blotting for PKC β phosphorylated AMPK, phosphorylated STAT-3 and I κ B α was performed using isozyme-specific monoclonal antibody against PKC β (1/1000), anti-phosphorylated AMPK (1/1000) and STAT-3 (1/1000) antibodies, and affinity-purified polyclonal antibody against I κ B α (1/1000). β -actin or unphosphorylated total antibodies were used as internal controls.

Determination of NO production

NO production by HAECs was determined in the supernatants of cells pretreated for 1h with anti-CRP antibody (10 μ g/ml), anti-IgG antibody (10 μ g/ml), AICAR (0.5 μ mol/l) or BAY11-7085 (10 μ mol/l) prior exposure to PA (0.2mmol/l) for 24h. NO production by HAECs treated with CRP (10 μ g/ml) for 24h was also evaluated. The measure of NO released by HAECs was performed according to the method of Green et al (22). Results were expressed as nitrite production per total cell protein content.

Determination of endotoxin levels

The endotoxin content of the PA preparations (0.2mmol/l) was determined by the Limulus Amebocyte Lysate assay and was consistently found to be lower than 3 pg/ml.

Determination of protein concentrations

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

Determination of cell viability

To exclude the possibility that PA, at maximal concentrations used in this study, may exert cytotoxic effect, cell viability after treatment with PA was determined by trypan blue exclusion. It was consistently found to be equal to or higher than 80% (data not shown).

Statistical analysis

Statistical analysis of the results was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls test. Differences were considered to be of statistical significance at $P < 0.05$. Results are expressed as the mean + SEM.

Results

PA induces CRP protein expression and production by HAECs.

Incubation of HAECs with PA enhanced, in a dose-dependent manner, CRP protein expression (Fig.1A). Maximal effect of PA on CRP protein expression was observed at 0.2mmol/l with no further increase at higher concentrations (data not shown). In contrast to PA, the non metabolizable palmitate analog, 2-bromopalmitate, and the unsaturated FFA, oleate and linoleate, showed no inductive effect (Fig.1B). Exposure of HAECs to C₂-ceramide, a cell permeable ceramide analog, mimicked the effect of PA (Fig.1B). Recovery of enhanced amounts of CRP from the culture media reflected the dose-dependent increase in intracellular CRP protein expression in response to PA (CRP (pg/mg cell protein/ml): Medium: 65.83 ±5.9; BSA: 88.63 ± 7.7; PA (0.05mmol/l): 81.12 ±9.5, p >0.05 vs BSA; PA (0.1mmol/l): 194.8 ±16.8, p <0.05 vs BSA; PA (0.2mmol/l): 683.1 ±32.6, p < 0.001 vs BSA; PA (0.3mmol/l): 751.4 ±26.1, p <0.001 vs BSA).

Oxidative stress mediates PA-induced endothelial CRP expression. Role of PKC and AMPK.

In HAECs, PA induced a significant increase in ROS production and C₂-ceramide recapitulated this effect (Fig. 2A). The increase in ROS production elicited by PA was prevented by the pan-specific and selective classical PKC inhibitors, calphostin C and GF109203X, respectively, and by the selective PKC beta inhibitor, LY379196 (Fig. 2A) whereas MAPK inhibitors were ineffective (data not shown). Similar inhibitory effect was observed after treatment of the cells with the cell permeable AMPK activator, AICAR (Fig. 2A). Treatment of HAECs with the antioxidants, NAC and apocynin, or with the PKC inhibitor, calphostin C, inhibited the stimulatory effect of PA on CRP protein expression (Fig.2B).

PA up-regulates CRP mRNA expression in HAECs.

Barely detectable under basal conditions, levels of CRP mRNA significantly increased in PA-treated HAECs, as assessed by semiquantitative RT-PCR. Induction of CRP gene by PA was time-dependent with maximal effect being observed after 6h of incubation (Fig.3A). Extent of CRP mRNA induction by PA was greater than that observed with the combination of IL-1 and IL-6 or with LPS at 6h, while it was comparable to that elicited by these CRP stimulatory agents at 24h (Fig.3A). Quantitative determination of the induction of CRP mRNA levels by PA using real-time PCR is presented in Fig.3B. Pre-incubation of HAECs with PKC inhibitors (calphostin C, GF109203X, LY379196), ERK and JNK MAPK inhibitors (PD98059, U0126, SP600125) or antioxidants (NAC, apocynin) decreased PA-induced CRP gene expression, as assessed by both quantitative (Fig.3B) and semi-quantitative (Fig.3C) RT-PCR. A similar effect was observed when the cells were incubated with the AMPK activator, AICAR (Fig.3B and C). In light of the inhibitory effect of LY379196, levels of PKC β expression was further determined in PA-treated HAECs, using western blot analysis. As expected, a significant increase in PKC β protein expression was observed in PA-treated HAECs (data not shown).

Role of the NF- κ B and Janus Kinases (Jak)/Signal transducers and Activators of Transcription (STAT) pathways in PA-induced endothelial CRP mRNA expression.

Transcription factors involved in the regulation of the CRP gene include the NF- κ B subunits p50 and p65 and STAT-3. Incubation of HAECs with BAY11-7085, an inhibitor of I κ B α phosphorylation or with AG490, an inhibitor of the Jak/STAT pathway, prevented the stimulatory effect of PA on CRP mRNA expression (Fig.4A). Reflecting the I κ B α -dependent NF- κ B activation induced by PA, decrease in I κ B α protein expression was documented in PA-treated HAECs (Fig.4B). PA-induced NF- κ B activation was prevented

by the antioxidant NAC, the PKC beta inhibitor, LY379196, the AMPK activator, AICAR, and the MAPK inhibitors, SP600125 and U0126 (Fig.4B). To further evaluate the role of JAK/STAT in PA-induced CRP gene expression, the effect of PA on STAT-3 phosphorylation was further examined. As expected, PA significantly increased STAT-3 activity in HAECs, as reflected by increased levels of STAT-3 phosphorylation in these cells (data not shown).

CRP mediates PA-induced decrease in endothelial NO production.

Exposure of HAECs to PA for 24h dramatically decreased the production of NO by these cells. This effect was abolished by an anti-CRP antibody, whereas an irrelevant IgG antibody was without effect (Fig.5A). The inhibitory effect of PA on NO release was mimicked by CRP (Fig.5A). Anti-CRP treatment significantly decreased the amount of CRP in the conditioned media, thus demonstrating the efficacy of immunoneutralization of PA-induced CRP release with anti-CRP antibody (CRP (pg/mg cell protein/ml): BSA: 91.5 ± 40.3 ; PA: 1121.0 ± 54.9 , $p < 0.001$ vs BSA; PA + anti-CRP: 109.7 ± 20.9).

Role of AMPK and NF- κ B in PA-induced inhibition of NO.

To evaluate the role of AMPK and NF- κ B in the suppressive effect of PA on NO production, HAECs were pre-incubated with AICAR and BAY11-7085 prior to exposure to PA. As shown in Fig.5B, treatment of HAECs with these agents reversed the inhibitory effect of PA on NO production. While neither AICAR nor BAY11-7085 had an effect on basal NO production on their own, both compounds increased NO production over basal values in PA-treated cells (Fig. 5B).

Discussion

There is now clear evidence that human endothelial cells express and produce CRP in response to various inflammatory and metabolic factors relevant to diabetes and obesity, including cytokines, high glucose, leptin and adiponectin. The present study demonstrates for the first time that PA, at concentrations that could be reached in patients with the metabolic syndrome (23), induces CRP synthesis and secretion in cultured HAECs. It further points to a pathogenic role for CRP as mediator of the suppressive effect of PA on NO production. These observations identify endothelial cell-derived CRP as a possible determinant of the vascular damaging effects of FFA.

Data generated herein identify several important steps in PA-induced endothelial CRP expression. First, there is evidence that PA should be metabolised to induce CRP since the non-metabolisable analog of palmitate, 2-bromopalmitate, had no effect. It is well known that saturated fatty acids are preferentially converted to ceramide and recent studies have revealed that de novo ceramide synthesis mediates several adverse effects of PA in endothelial cells, including the induction of interleukin-6 (23) and the inhibition of the Akt/eNOS signalling pathway (24-25). Our data which demonstrate that C₂-ceramide mimicked the effect of PA on CRP expression, while oleate or linoleate, which do not cause ceramide accumulation, had no effect (24-26) strongly suggest that ceramide is the intermediate molecule mediating PA-induced CRP expression.

Second, our results with antioxidants and PKC inhibitors provide clear recognition that PKC-driven oxidative stress mediates the PA-induced increase in endothelial CRP expression. Enhanced production of ROS in endothelial cells is a central mechanism underlying vascular lipotoxicity (27) and previous work has shown that PA stimulates ROS production through PKC-dependent activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) NAD(P)H in endothelial cells (28). Of the PKC isoforms studied so far, activation of PKC beta appears to occur preferentially in IR

states and shows close relationship with vascular oxidant stress. In agreement with a key role of PKC beta in PA-induced ROS production, our results demonstrate that the specific PKC beta inhibitor, LY379196, abrogates ROS production elicited by PA in HAECs. Given the deleterious effect of excessive oxidative stress on endothelial cell function, these data support the notion that PKC β isoform selective inhibitors may attenuate FFA-induced vascular oxidative stress and protect vascular function in insulin-resistant subjects. In contrast to PKC, AMPK seems to play an important role in protecting endothelial cells against glucose and FFA-induced oxidative stress (29, 30). In agreement with a role of AMPK in the regulation of ROS production by PA, our results demonstrate that AICAR, a specific AMPK activator, prevents the oxidative effect of PA in HAECs and abrogates the inhibitory effect of PA on AMPK phosphorylation in these cells (see supplementary data). One mechanism by which AICAR may suppress PA-induced ROS production is through the inhibition of the DAG-PKC pathway. Supporting this possibility, it has been recently reported that AMPK mediates the inhibitory effect of thiazolidinediones on PKC activation (30) and suppresses NAD(P)H in neutrophils (31). If this hypothesis is true, most of the oxidative effect of PA could be determined by its ability to inhibit AMPK activation. Experiments aimed at evaluating the oxidative effects of PA when AMPK is inhibited are under way to evaluate this possibility.

Endothelial CRP induction in response to PA appears to be exerted at the transcriptional level, as reflected by the parallel increase in CRP gene and protein expression in PA-treated HAECs. Results with pharmacological inhibitors and antioxidants demonstrate that PA-induced CRP gene expression is mediated through oxidative stress and involves PKC/AMPK and MAPK-dependent pathways. Transcriptional activation of the CRP gene by PA may theoretically involve NF- κ B. Supporting this possibility, activation of IKK β by PA has been documented in endothelial cells (8, 32-33) and a binding site for NF- κ B has been located in the regulatory sequence

of the CRP gene (34). Consistent with a critical role of the IKK β /NF- κ B pathway in the induction of CRP gene expression by PA, we found that PA reduces the level of I κ B α in HAECs and that BAY11-7085, an I κ B α phosphorylation inhibitor, totally prevented PA-induced CRP mRNA levels. Activation of PKC, in particular PKC β , can lead to the activation of NF- κ B through direct phosphorylation of I κ B α (35) or by causing the generation of oxidative stress that can secondary activate IKK. Our results showing that antioxidants and the PKC β inhibitor, LY379196, prevent the degradation of I κ B α caused by PA support the notion that NF- κ B activation in PA-treated HAECs involves PKC beta-dependent ROS production. These results are in line with those of Maloney et al who recently reported that NAD(P)H oxidase-dependent superoxide links PA to NF- κ B signalling in human endothelial cells (33). It has been previously reported that AMPK may function as an anti-inflammatory agent and inhibit FFA-induced NF- κ B activation as well as increase in NF- κ B-mediated gene expression (36). Furthermore, recent data have shown that activation of this kinase by adiponectin reduced CRP synthesis in endothelial cells (16). In agreement with these observations, the present study demonstrates that AICAR prevents the decrease in I κ B α levels induced by PA in endothelial cells and abrogates PA-induced CRP gene expression. PA is a potent inducer of IL-6 expression (6) and this cytokine participates in the transcriptional activation of the CRP gene through activating STAT3 (37). In endothelial cells, PA may activate the JAK/STAT pathway through generating NAD(P)H oxidase-derived ROS (38). Our data which demonstrate that AG490, a specific JAK2 inhibitor, decreases the induction of CRP gene expression by PA support a role for the JAK/STAT pathway in the transcriptional regulation of endothelial CRP by this FFA. In the whole, our results suggest that not one transcription factor alone but multiple redox-sensitive transcription factors together modulate the transcription rate of CRP in response to FFA. The

potential synergistic impact of these factors on endothelial CRP transcription needs to be specifically addressed in future studies.

ERK1/2 and JNK MAPK are well known downstream targets of oxidative stress and are activated by PA. Previous studies have shown that these kinases mediate PA-induced NF- κ B activation (39), promote STAT3 phosphorylation (40) and contribute to the inhibitory effect of PA on eNOS (5). While previous studies have demonstrated the involvement of the ERK1/2-MAPK cascade in the induction of vascular CRP by endothelin and leptin (18, 41), the role of the JNK pathway in endothelial CRP regulation remains unknown. Our findings that ERK1/2 and JNK inhibitors prevent both PA-induced NF- κ B activation and CRP expression, suggest that MAPK-dependent NF- κ B activation is required for the stimulatory effect of PA on endothelial CRP expression. They further stress a potential key role for these kinases as transducers of the vascular inflammatory effects of FFAs.

Clinical studies have shown that high FFA levels are associated with impaired endothelium-dependent vasodilation as reflected by decreased basal and insulin-mediated NO production (42, 43). The cellular mechanism responsible for FFA impairment of NO production is not well understood, but activation of the IKK β pathway seems to be involved (9). It has been previously reported that CRP inhibits endothelial NO generation (12-14) and acts as mediator of the suppressive effect of uric acid on NO production (44) by vascular cells. Our results which demonstrate that anti-CRP antibody and endothelial CRP inhibitory agents prevent the suppressive effect of PA on NO production expand these works and support a role for CRP as paracrine regulator of NO production. This finding suggests that oxidative or inflammatory signalling pathways induced by PA are not by themselves responsible for NO inhibition and that CRP is the fundamental mechanism linking these pathways to endothelial dysfunction.

In addition to PA, several cardiometabolic factors linked to insulin resistance and endothelial dysfunction enhance CRP production by endothelial cells (17, 18, 45). These results call for careful consideration of the role of endothelial cells as significant sources of vascular CRP in the setting of metabolic disorders such as obesity and type 2 diabetes and highlight endothelial CRP induction as an attractive mechanism for the pro-atherogenic effects of inflammatory or metabolic factors associated with the metabolic syndrome. Clearly, further studies are needed to determine whether CRP concentration in diabetic atherosclerotic plaques is higher than in nondiabetic ones and whether CRP, as a cell based molecule, is an effector of the atherosclerotic disease and should be considered as a potential therapeutic target in diabetic vasculopathy.

References

1. Moller DE, Kaufman KD. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med***56**:45-62, 2005.
2. Davda RK, Stepniakowski KT, Lu G, Ullian ME, Goodfriend TL, Egan BM. Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C-independent mechanism. *Hypertension***26**:764-770, 1995.
3. Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, Crowder K, Cronin J, Baron AD. Free fatty elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes***49**:1231-1238, 2000.
4. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol***79**:350-354, 1997.
5. Wang XL, Zhang L, Youker K, Zhang M-X, Wang J, LeMaire SA, Coselli JS, Shen YH. Free fatty acids inhibit insulin signalling-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation through upregulating PTEN or inhibiting Akt kinase. *Diabetes***55**:2301-2310, 2006.
6. Kim F, Tysseling KA, Rice J, Pham M, Haji L, Gallis BM, Baas AS, Paramsothy P, Giachelli CM, Corson MA, Raines EW. Free fatty acid impairment of nitric oxide production in endothelial cells is mediated by IKK β . *Arterioscler Thromb Vasc Bio***25**:989-994, 2005.
7. Plutzky J. Inflammation in atherosclerosis and diabetes. *Rev Endocr Metab Dis***5**:255-259, 2004.
8. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation***107**:391-397, 2003.

9. Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation***102**:1000-1006, 2000.
10. Nyström T, Nygren A, Sjöholm A. Persistent endothelial dysfunction is related to elevated C-reactive protein (CRP) levels in type II diabetic patients after acute myocardial infarction. *Clin Sci***108**:121-128, 2005.
11. Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation***106**:1439-1441, 2002.
12. Singh U, Devaraj S, Vasquez-Vivar J, Jialal I. C-reactive protein decreases endothelial nitric oxide synthase activity via uncoupling. *J Mol Cell Cardiol***43**:780-791, 2007.
13. Schwartz R, Osborne-Lawrence S, Hahner L, Gibson LL, Gormley AK, Vongpatanasin W, Zhu W, Word RA, Seetharam D, Black S, Samols D, Mineo C, Shaul PW. C-reactive protein downregulates endothelial NO synthase and attenuates reendothelialization in vivo in mice. *Circ Res***100**:1452-1459, 2007.
14. Teoh H, Quan A, Lovren F, Wang G, Tirgari S, Szmitko PE, Szalai AJ, Ward ME, Verma S. Impaired endothelial function in C-reactive protein overexpressing mice. *Atherosclerosis***201**:318-325, 2008.
15. Bisioendial RJ, Kastelein JJ, Peters SL, Levels JH, Birjmohun R, Rotmans JI, Hartman D, Meijers JC, Levi M, Stroes ES. Effects of CRP infusion on endothelial function and coagulation in normocholesterolemic and hypercholesterolemic subjects. *J Lipid Res***48**:952-960, 2007.
16. Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. Macrophage conditioned medium induces the expression of C-reactive protein in human aortic endothelial cells. *Am J Pathol***166**:1265-1271, 2005.

17. Devaraj S, Torok N, Dasu MR, Samols D, Jialal I. Adiponectin decreases C-reactive protein synthesis and secretion from endothelial cells. Evidence for an adipose tissue-vascular loop. *Arterioscler Thromb Vasc Biol***28**:1368-1374, 2008.
18. Singh P, Hoffmann M, Wolk R, Shamsuzzaman ASM, Somers VK. Leptin induces C-reactive protein expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol***27**:e302-e317, 2007.
19. Mittendorfer B, Liem O, Patterson BW, Miles JM, Klein S. What does the measurement of whole body fatty acid rate of appearance in plasma by using a fatty acid tracer really mean? *Diabetes* **52**:1641-1648, 2003.
20. Royall JA, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent-probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys***302**:348-355, 1993.
21. Pasceri V, Chang J, Willerson JT, Yeh ETH. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerotic drugs. *Circulation***103**:2531-2534, 2001.
22. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Whisnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and 15n-nitrate in biological fluids. *Anal Biochem***126**:131-138, 1982.
23. Staiger H, Staiger K, Stefan N, Wahl HG, Machicao F, Kellerer M, Haring HU. Palmitate-induced interleukin-6 expression in human coronary endothelial cells. *Diabetes* **53**:3209-3216, 2004.
24. Wu Y, Song P, Zhang M, Zou M-H. Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem***282**:13, 9777-9788, 2007.
25. Xiao-Yun Z, Zhuo-Xiong C, Min-Xiang L, Xingxuan H, Schuchman EH, Feng L, Han-Song X, An-Hua L. Ceramide mediates inhibition of the AKT/eNOS signalling pathway by palmitate in human vascular endothelial cells. *Med Sci Monit***15**:BR254-261, 2009.

26. Lee JS, Pinnamaneni S, Eo S, Cho I, Pyo J, Kin C, Sinclair A, Febbraio M, Watt M. Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites. *J Appl Physiol***100**:54,1467-1474, 2006.
27. Chinen I, Shimabukuro M, Yamakawa K, Higa N, Matsuzaki T, Noguchi K, Ueda S, Sakanashi M, Takasu N. Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats. *Endocrinology***148**:160-165, 2007.
28. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes***49**:1939-1945, 2000.
29. Li XN, Song J, Zhang L, LeMaire SA, Hou X, Zhang C, Coselli JS, Chen L, Wang XL, Zhang Y, Shen YH. Activation of the AMPK-FOXO3 pathway reduces fatty acid-induced increase in intracellular reactive oxygen species by upregulating thioredoxin. *Diabetes***58**:2246-2257, 2009.
30. Ceolotto G, Gallo A, Papparella I, Franco L, Murphy E, Iori E, Pagnin E, Fadini GP, Albiero M, Semplicini A, Avogaro A. Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol***27**:2627-2633, 2007.
31. Alba G, Bekay R, Alvarez-Maqueda M, Chacon P, Vega A, Monteseirin J, Santa-Maria C, Pintado E, Bedoya FJ, Bartrons R, Sobrino F. Stimulators of AMP-activated protein kinase inhibit the respiratory burst in neutrophils. *FEBS Lett***27**:219-225, 2004.
32. Chai W, Liu Z. p38 mitogen-activated protein kinase mediates palmitate-induced apoptosis but not inhibitor of nuclear factor- κ B degradation in human coronary artery endothelial cells. *Endocrinology***148**:1622-1628, 2007.

33. Maloney E, Sweet IR, Hockenbery DM, Pham M, Rizzo NO, Tateya S, Handa P, Schwartz MW, Kim F. Activation of NF-kappaB by palmitate in endothelial cells: a key role for NADPH oxidase-derived superoxide in response to TLR4 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**:1370-1375, 2009.
34. Kramer F, Torzewski J, Kamenz J, Veit K, Hombach V, Dedio J, Ivashchenko Y. Interleukin-1beta stimulates acute phase response and C-reactive protein synthesis by inducing an NFkappaB- and C/EBPbeta-dependent autocrine interleukin-6 loop. *Mol Immunol* **45**: 2678-2689, 2008.
35. Ghosh S, Baltimore D. Activation in vitro of NF-kB by phosphorylation of its inhibitor Ikb. *Nature* **344**:678-682, 1990.
36. Cacicedo JM, yagihashi N, Keaney JF, Ruderman NB, Ido Y. AMPK inhibits fatty acid-induced increases in NF-kB transactivation in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Biochim Biophys Res Comm* **324**:1204-1209, 2004.
37. Zhang D, Sun M, Samols D, Kushner I. STAT-3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. *J Biol Chem* **271**:9503-9509, 1996.
38. Schieffer B, Luchtefeld M, Braun S, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H. Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signalling and cytokine induction. *Circ Res* **87**:1195-1201, 2000.
39. Coll T, JOvé M, Rodriguez-Calvo R, Eyre E, Palomer X, Sanchez RM, Merlos M, Laguna JC, Vasquez-Carrera M. Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes* **55**:2779-2789, 2006.
40. Souza V, Escobar Mdel C, Bucio L, Hernández E, Gómez-Quiroz LE, Gutiérrez Ruiz MC. NADPH oxidase and ERK1/2 are involved in cadmium induced-STAT3 activation in HEPG2 cells. *Toxicol Lett* **187**:180-186, 2009.

41. Wang C, Liu J, Guo F, Ji Y, Liu N. Endothelin-1 induces the expression of C-reactive protein in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun***389**:537-542, 2009.
42. Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, Hook G, Cronin J, Johnson A, Bayazeed B, Baron AD. Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Invest***100**:1230-1239, 1997.
43. Watanabe S, Tagawa T, Yamakawa K, Shimabukuro M, Ueda S. Inhibition of the renin-angiotensin system prevents free fatty acid-induced acute endothelial dysfunction in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**:2376-2380, 2005.
44. Kang DH, Park SK, Lee IK, Johnson RJ. Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. *J Am Soc Nephrol***16**:3553-3562, 2005.
45. De Rosa S, Cirillo P, Pacileo M, Di Palma V, Paglia A. Leptin stimulated C-reactive protein production by human coronary artery endothelial cells. *J Vasc Res***46**:609-617, 2009.

Figure legends

Figure 1. Effect of PA on endothelial CRP protein expression. Role of ceramide.

HAECs cells were treated for 24h with **A.** increasing concentrations of palmitate (PA) (0.05 to 0.2mmol/l) or with **B.** PA (0.2mmol/l), bromopalmitate (BrPA) (0.2mmol/l), oleate (OA) (0.2mmol/l), linoleate (LA) (0.2mmol/l), or C₂-ceramide (CER) (15μmol/l). At the end of the incubation period, cells were lysed and CRP protein expression was determined by Western Blot analysis. CRP protein level was normalized to the level of α -actin protein. Data represent the means \pm SEM of five independent experiments. *,P<0.05; **,P<0.01; ***,P<0.001 vs. bovine serum albumin (BSA)

Figure 2. Role of oxidative stress and PKC in PA-induced endothelial CRP protein expression.

A. HAECs cells were treated with palmitate (PA) (0.2mmol/l) or C₂-ceramide (CER) (15μmol/l) alone for 3h or were pre-incubated for 1h with calphostin C (CAL C) (0.1μg/ml), GF109203X (GF) (20nmol/l), LY379196 (LY) (20nmol/l) or AICAR (0.5μmol/l) prior to be treated with PA. During the final 20-min incubation period, 20μg/ml DCF-DA was added to the culture medium. Intracellular ROS generation was quickly monitored by measuring fluorescence. **B.** HAECs cells were pretreated for 1h with calphostin C (CAL C) (0.1μg/ml), N-acetyl cysteine (NAC) (10mmol/l) or apocynin (10μmol/l) and then exposed to PA (0.2mmol/l) for 24h. At the end of the incubation period, cells were lysed and CRP protein expression was determined by Western Blot analysis. CRP protein level was normalized to the level of β -actin protein. Data represent the means \pm SEM of 3 independent experiments (A) and 4 independent experiments (B). ***, P<0.001 vs bovine serum albumin (BSA).

Figure 3. Effect of PA on endothelial CRP mRNA expression. A. Semi-quantitative RT-PCR. HAECs were incubated with the combination of interleukin (IL)-1 β (25ng/ml) and IL-6 (10ng/ml), LPS (1 μ g/ml) or palmitate (PA) (0.2mmol/l) for 6 or 24h. **B and C.** HAECs were pre-treated or not for 1h with calphostin C (CAL C) (0.1 μ g/ml), LY379196 (20nmol/l), GF109203X (20nmol/l), PD98059 (10 μ mol/l), U0126 (20 μ mol/l), SP600125 (50 μ mol/l), NAC (10mmol/l), apocynin (10 μ mol/l) or AICAR (0.5 μ mol/l) before incubation with PA (0.2mmol/l). At the end of the incubation period, cells were lysed and CRP mRNA expression was determined by quantitative (B) and semi-quantitative (C) RT-PCR analysis. Data represent the means \pm SEM of 3 independent experiments. **,P<0.01; ***, P<0.001 vs bovine serum albumin (BSA). #, P<0.05; ##, P<0.01; ###, P<0.001 vs PA.

Figure 4. Role of the NF- κ B and Jak/STAT pathways in PA-induced endothelial CRP mRNA expression. A. HAECs were pre-incubated for 1h with BAY11-7085 (10 μ mol/l), or AG490 (20 μ mol/l) prior to be treated with palmitate (PA) (0.2mmol/l) for 24h. **B.** HAECs were pre-incubated for 1h with NAC (10mmol/l), LY379196 (20nmol/l), AICAR (0.5 μ mol/l), SP600125 (50 μ mol/l) or U0126 (20 μ mol/l) before exposure to PA (0.2mmol/l) for 3h. At the end of the incubation period, cells were lysed and CRP gene **(A)** and I κ B α protein **(B)** expressions were determined by RT-PCR and Western Blot analysis, respectively. CRP mRNA and I κ B α protein levels were normalized to the levels of GAPDH mRNA and β -actin protein. Data represent the means \pm SEM of 5 independent experiments. *,P<0.05; ***, P<0.001 vs bovine serum albumin (BSA).

Figure 5. Role of CRP in PA-induced decrease in endothelial NO production. Involvement of AMPK and NF- κ B pathways. HAECs cells were pretreated for 1h with **A.** anti-CRP antibody (10 μ g/ml), anti-IgG antibody (10 μ g/ml) or CRP (10 μ g/ml) or **B.** AICAR (0.5 μ mol/l) or BAY11-7085 (10 μ mol/l) and then exposed to palmitate (PA) (0.2mmol/l) for 24h. At the end of this incubation period, the amounts of NO in the cell supernatants were determined. Data represent the means \pm SEM of 4 to 5 independent experiments. *, P<0.05; **, P<0.01 vs bovine serum albumin (BSA).

Figure 6. Relationship among the signaling pathways potentially involved in PA-induced decrease in NO production.

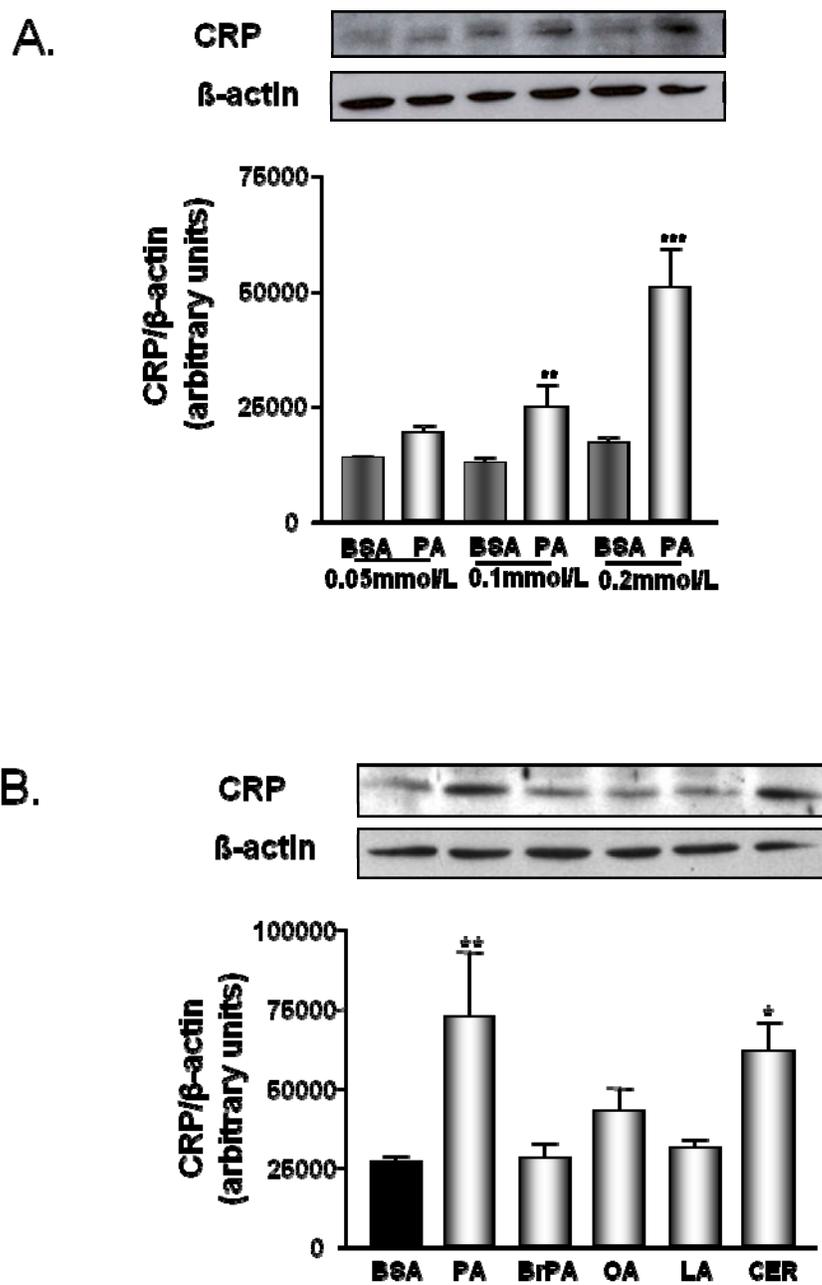
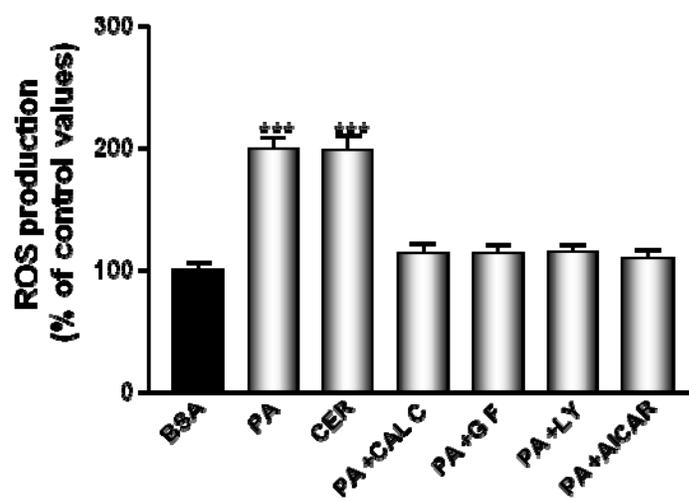


Figure 1.

A.



B.

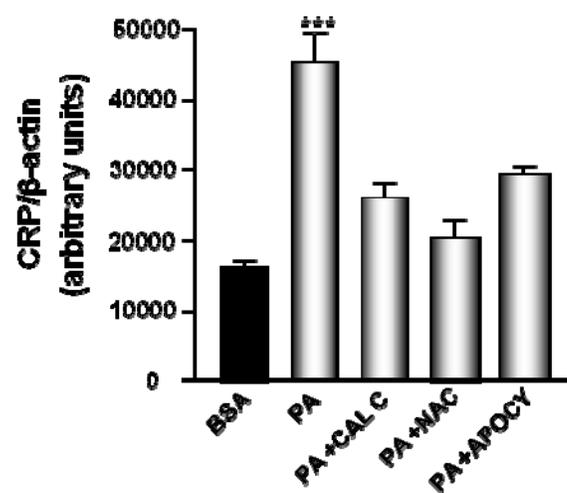
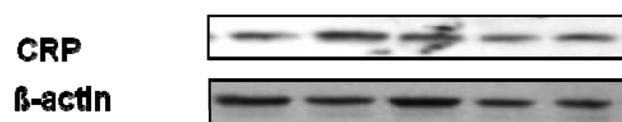


Figure 2.

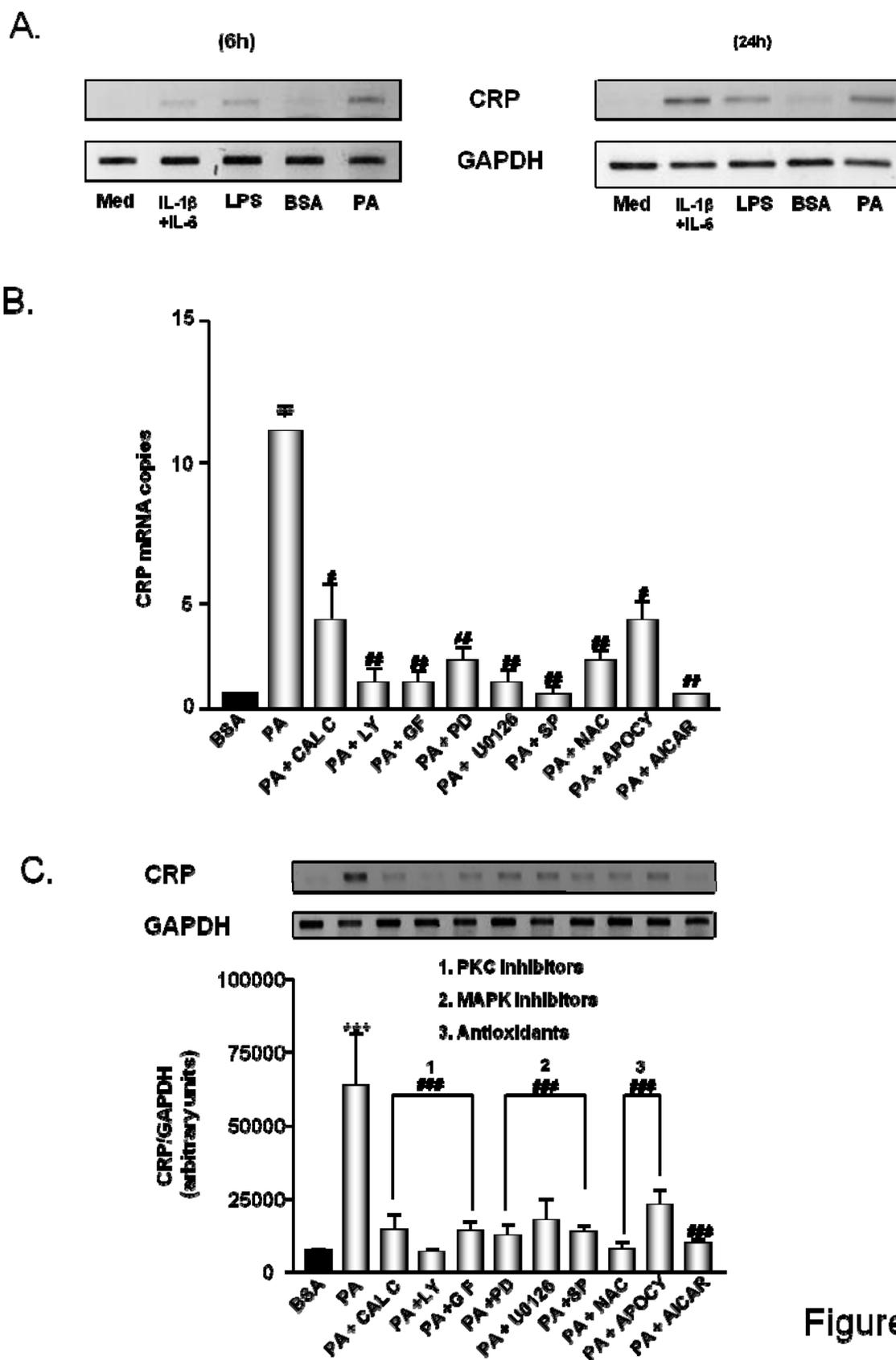
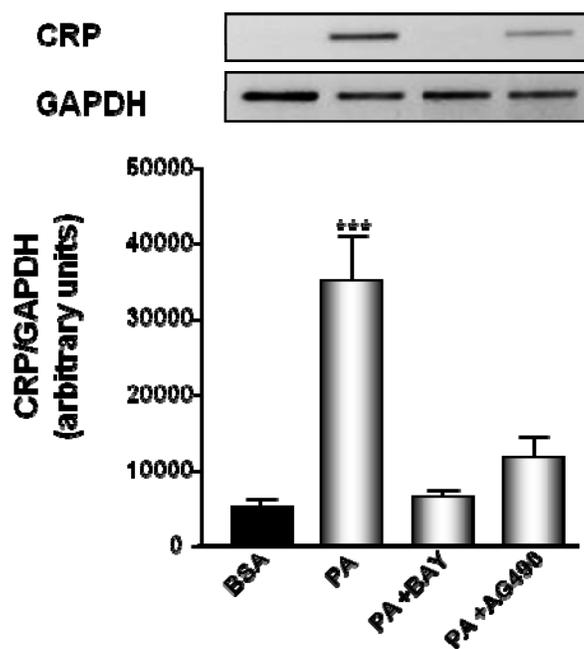


Figure 3.

A.



B.

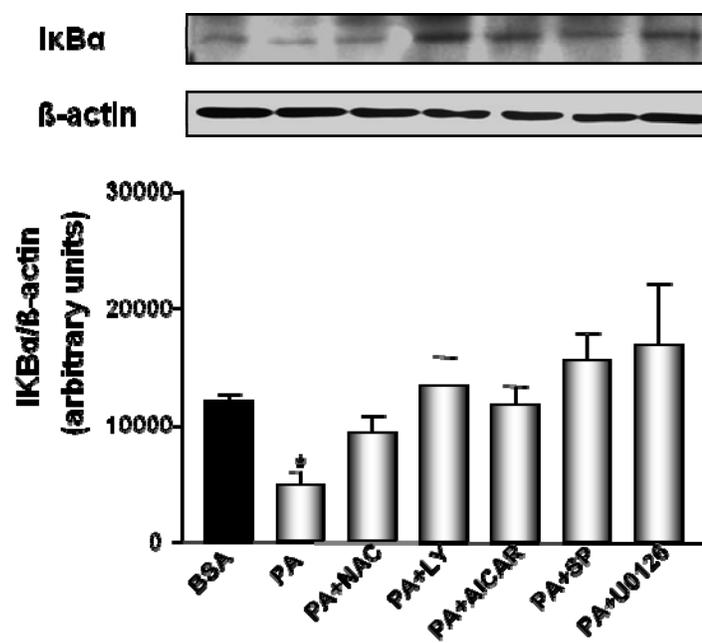
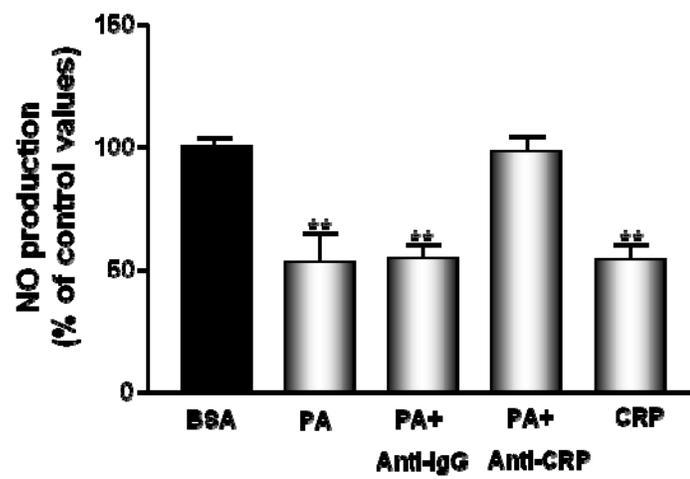


Figure 4.

A.



B.

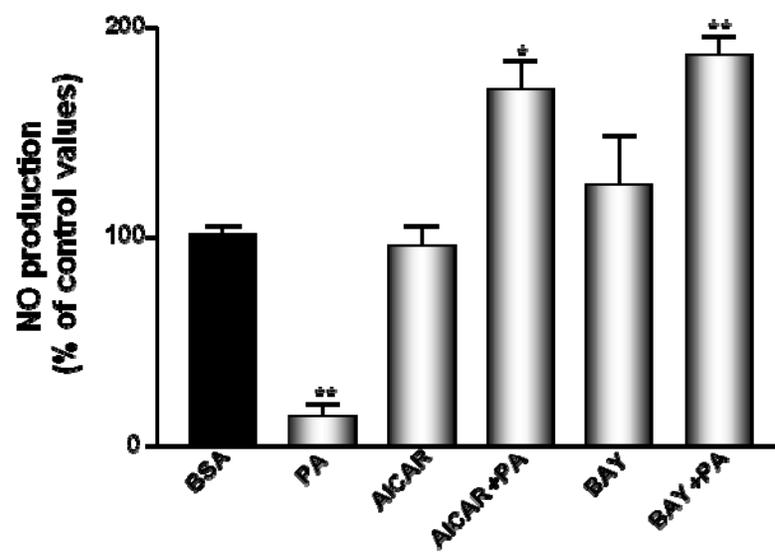


Figure 5.

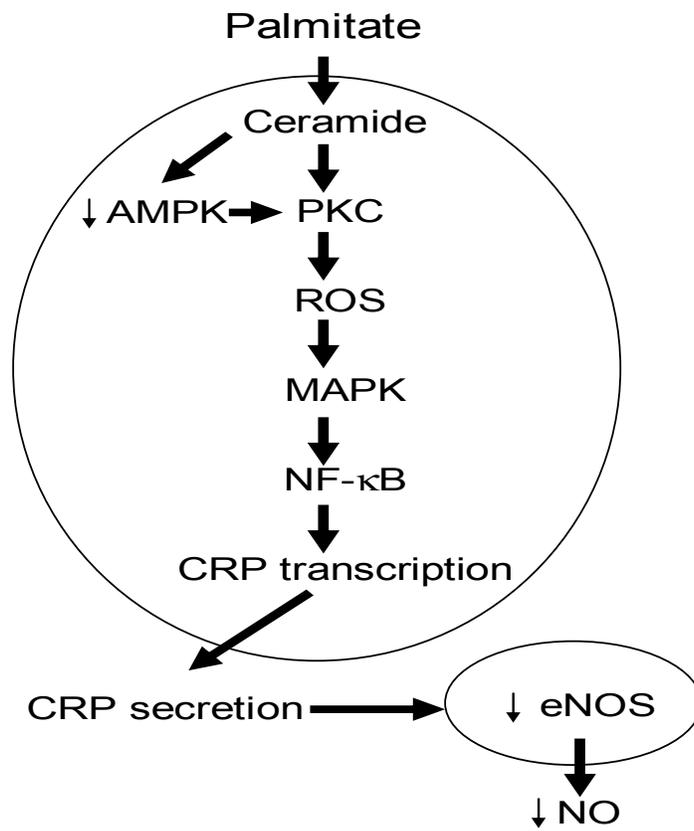
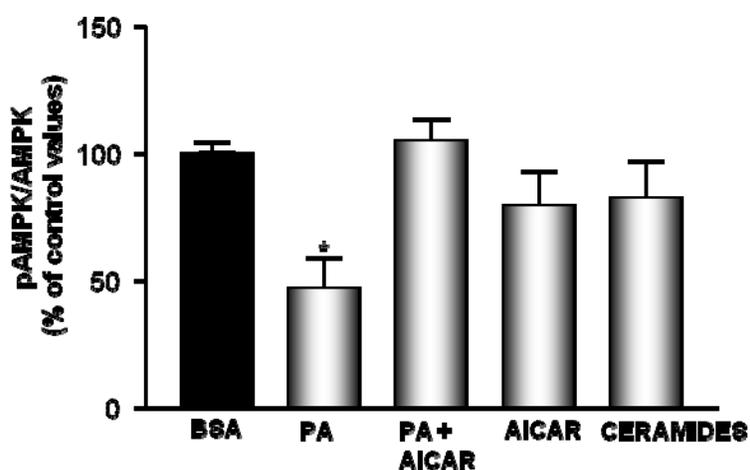


Figure 6

Supplementary data



Effect of PA on AMPK expression. HAECs cells were pretreated for 1h with AICAR (0.5 μ mol/l) and then exposed for 3h to palmitate (PA) (0.2mmol/l). At the end of the incubation period, cells were lysed and phosphorylated AMPK protein expression was determined by Western Blot analysis. Phosphorylated AMPK protein level was normalized to the level of total AMPK protein. Data represent the means \pm SEM of 3 independent experiments. *, $P < 0.05$ vs bovine serum albumin (BSA).

III. DISCUSSION

III. DISCUSSION

Le syndrome métabolique, une entité décrite il y a une dizaine d'années, est actuellement reconnu comme un problème de santé majeur qui atteint d'ores et déjà des proportions pandémiques dans les pays industrialisés et affectera bientôt les pays en voie de développement. Cette affection a été qualifiée de « bombe à retardement de la santé publique », du fait qu'elle ne provoque pas de symptômes particuliers. Au Canada, des milliers de sujets sont touchés par ce fléau et la prévalence du syndrome métabolique croît proportionnellement à celle de l'obésité, qui, rappelons le, atteint aujourd'hui 16% des sujets et constitue, tout particulièrement lorsqu'elle est localisée au niveau abdominal, un facteur pathogénique majeur du développement de l'IR et du diabète de type 2.

De nombreuses études ont démontré que les sujets atteints de syndrome métabolique présentent un risque accru de maladies cardiovasculaires (Wilson et al., 2005 ; Wang et al., 2007 ; Dekker et al., 2005 ; Lawlor et al., 2006 ; Saely et al., 2006). Le syndrome métabolique est aussi associé à une augmentation de la mortalité cardiovasculaire. Ainsi, dans la "Kuopio Ischemic Heart Disease study", il est démontré que les hommes atteints de syndrome métabolique, même en l'absence d'antécédents de maladies coronariennes ou de diabète, présentent une augmentation significative de mortalité due aux maladies cardiovasculaires (Lakka, Laaksonen, Lakka, et al., 2002). Une conclusion identique a été faite par Wang et al. (Wang et al., 2007) qui ont démontré sur un large échantillon une association étroite entre syndrome métabolique et mortalité cardiovasculaire.

Diverses composantes du syndrome métabolique, telles la dyslipidémie, l'intolérance au glucose, l'hypertension et l'IR sont des facteurs de risque majeurs et indépendants du développement des maladies coronariennes (Lakka, Laaksonen, Lakka, et al., 2002).

De nombreuses études cliniques se sont penchées sur l'association entre IR et risque cardiovasculaire. À l'encontre de certaines études ne démontrant que peu ou pas d'association entre IR et maladies cardiovasculaires (Howard B et al., 1999) ou excluant son rôle comme facteur de risque cardiovasculaire indépendant (Resnick et al., 2003), d'autres études telles que la "Nurses' Health Study" (Hu et al., 2002), l'IRAS (Howard G et al., 1996), la "Framingham Offspring Study" (Rutter et al., 2005), l'étude de Bruneck (Bonara et al., 2007) et bien d'autres (Hanley et al., 2002 ; Wang J et al., 2007; Wilson et al., 2008) ont documenté une association entre IR et le développement des maladies cardiovasculaires tant au niveau infra-clinique que clinique et sa capacité de prédire de manière indépendante le risque cardiovasculaire tant dans la population générale (Bonara et al., 2007) que diabétique (Hanley et al., 2002). Nous disposons aussi de données indiquant que la progression de la maladie athéromateuse peut être ralentie par l'administration de drogues augmentant la sensibilité à l'insuline. Ainsi l'étude de Chicago a démontré un ralentissement de la progression de l'IMT au niveau de l'artère carotidienne de patients diabétiques traités par les TZD (Mazzone et al., 2006) et d'autres études ont démontré que la combinaison TZD et metformine réduisait dans cette population le risque d'infarctus du myocarde.

L'inflammation est une composante du syndrome métabolique et est étroitement associée à chacune de ses composantes et tout particulièrement à l'IR et l'adiposité. Rappelons en effet que l'obésité est associée à une réponse inflammatoire chronique caractérisée par une production anormale d'adipokines et l'activation de certaines voies de signalisation pro-inflammatoires menant à l'induction de nombreux marqueurs biologiques de l'inflammation (Hotamisligil, Shargill, & Spiegelman, 1993 ; Fried, Bunkin, & Greenberg, 1998 ; Bastard et al., 2002 ; Samad, et al., 1997 ; Sartipy et al., 2003) et qu'une réduction pondérale induit une diminution voire même une normalisation de ces paramètres biologiques (van Dielen, Buurman, Hadfoune et al., 2004 ; Cottam, et al.,

2004 ; Esposito, Pontillo, Di Palo, et al., 2003, Ryan & Nicklas, 2004). L'association entre obésité et réponse inflammatoire est aussi illustrée par la corrélation existant entre l'indice de masse corporelle (IMC) et les niveaux de CRP chez l'individu sain (Ford, 2003). La diète pourrait être un facteur pathogénique de l'inflammation dans le syndrome métabolique. En effet, il a été démontré chez des sujets sains qu'un repas riche en gras était associé à une augmentation des niveaux sériques de certains médiateurs inflammatoires et en particulier à une augmentation d'expression des molécules d'adhésion (Ceriello, Quagliaro, Piconi, et al., 2004). Chez la souris cette anomalie était normalisée par une augmentation d'apport en fibres alimentaires (Cani, Knauf, Iglesias, et al., 2006). Ces données appuient l'hypothèse qu'une diète riche en gras et en énergie (par exemple une diète de type western) puisse induire un état pro-inflammatoire menant au développement du syndrome métabolique.

La réponse inflammatoire à bas bruit, telle que définie par les niveaux sériques de CRP, semble proportionnelle au nombre de composantes du syndrome métabolique (Festa, D'Agostino, Howard, et al., 2000). De manière très intéressante, il a été démontré que cette réponse inflammatoire accroît le risque cardiovasculaire au-delà de celui inhérent au syndrome métabolique (Paoletti et al., 2006 ; Nissen et al., 2005 ; Ridker, Cannon, Morrow, et al., 2005 ; Haffner et al., 2006).

De nombreuses évidences impliquent l'inflammation dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose (Ross, 1999). Plusieurs marqueurs de risque inflammatoires des maladies cardiovasculaires ont été identifiés. Parmi ces marqueurs on peut citer les molécules d'adhésion telles que l'ICAM-1 et la E-sélectine, les cytokines telles que l'IL-6 et le TNF- α , les chimiokines telle que l'IL-8 et enfin la CRP. Parmi les protéines de la phase aiguë étudiées jusqu'à présent, la CRP a été proposée comme étant un des marqueurs les plus intéressants et potentiellement utiles en clinique pour l'évaluation du risque cardiovasculaire. En effet, de nombreuses données

ont suggéré qu'une augmentation modérée des niveaux circulants de CRP puisse traduire un état inflammatoire à bas bruit (Rifai, Ridker, 2002) et plusieurs études, au cours des dernières années ont associé cette augmentation à un risque accru de maladies coronariennes (Ridker, Cushman, Stampfer, et al., 1997 ; Koenig, Sund, Frohlich, et al., 1999). En outre, une association entre CRP et ED, l'étape la plus précoce dans le développement de l'athérosclérose a été documentée (Perticone et al., 2008 ; Chung et al., 2007 ; Annambhotla et al., 2008).

Des concentrations élevées de CRP sont aussi associées à l'IR (Yudkin, Stehouwer, Emeis, et al., 1999 ; Festa, D'Agostino, Howard, et al., 2000), suggérant que l'athérosclérose et l'IR puissent présenter une étiologie commune, à savoir l'inflammation (Pradhan & Ridker, 2002). Tel que discuté précédemment, une augmentation des taux sériques de CRP est en outre associée à l'obésité (Yudkin, Stehouwer, Emeis, et al., 1999) et au syndrome métabolique (Ridker, Wilson, Grundy, 2004) alors qu'une diminution de ses concentrations est associée à la perte pondérale (Tchernof, Nolan, Sites, et al., 2002 ; Heilbronn & Clifton, 2002 ; Laimer, Ebenbichler, Kaser, et al., 2002 ; Esposito, Pontillo, Di Palo, et al., 2003 ; Kopp, Kopp, Festa, et al., 2003 ; Pannacciulli, Cantatore, Mienna, et al., 2001). Il semble de plus en plus probable que l'inflammation chronique associée au syndrome métabolique soit due à l'obésité souvent présente dans cette maladie. L'association étroite entre inflammation et obésité pourrait expliquer l'observation selon laquelle l'obésité semble directement affecter la progression de l'athérosclérose (McGill, McMahan, Herderck, et al., 2002). Par ses effets directs ou encore indirects sur le développement et la progression de l'IR, l'état inflammatoire caractérisant l'obésité pourrait promouvoir le développement et la progression de l'athérosclérose et induire un état de ED, un médiateur bien identifié des effets vasculaires nuisibles de l'IR.

Si on s'entend pour reconnaître l'importance de l'inflammation dans la pathogenèse de l'IR et de l'athérosclérose, il serait logique de développer des stratégies pour la contrer. Nous discuterons dans les prochains paragraphes de l'impact de notre alimentation moderne sur la réponse inflammatoire et des diverses stratégies nutritionnelles susceptibles de réduire la réponse inflammatoire associée au syndrome métabolique. Ensuite nous aborderons les déterminants métaboliques de l'inflammation, en mettant une emphase toute spéciale sur le rôle des AGL comme facteur déclenchant de l'inflammation dans les états d'IR.

L'apport calorique et la qualité de la diète sont souvent inadaptés chez les sujets obèses. En effet, chez ces patients l'apport calorique est souvent excessif et la diète est fréquemment de type « *western* », c'est à dire caractérisée par un apport élevé en AG saturés, une consommation élevée de viande rouge et de produits transformés, un apport élevé en sucre raffiné et une faible consommation de fibres alimentaires.

L'ingestion excessive d'aliments riches en énergie, transformés, facilement assimilables et digestibles induit une hyperglycémie et hyperlipidémie post-prandiale. Ce bolus énergétique qui dépasse les capacités métaboliques des mitochondries est responsable de la genèse d'un stress oxydatif excessif dont résulte une augmentation de marqueurs inflammatoires et un état de ED (Gerich, 2006; Ceriello, 2005). Ce phénomène de "stress postprandial" peut être reproduit par l'ingestion de 75gr de glucose et d'aliments dense en énergie et est caractérisé par une augmentation des niveaux sériques de CRP et des marqueurs de stress oxydatif ainsi que par un état de ED (Esposito et al.,2002). La restriction calorique constitue une manière très efficace de réduire les altérations métaboliques dans la phase postprandiale et la perte pondérale, particulièrement quand elle s'accompagne d'une réduction de l'obésité abdominale et est associée à une amélioration du profil glycémique et lipidique en période post-

prandiale avec réduction des réponses oxydatives et inflammatoires. De multiples études d'intervention ont montré une corrélation entre perte pondérale et le pourcentage de réduction de CRP. La baisse de CRP semble conséquent à la diminution de la masse adipeuse, avec diminution de l'IL-6 et diminution de synthèse hépatique de la CRP.

Tel que mentionné précédemment, plusieurs évidences suggèrent un lien entre la consommation d'une diète de type « *western* » et l'état pro-inflammatoire. Ainsi, la "*Nurse's Health Study I*", une étude de cohorte menée chez plus de 732 infirmières a montré une corrélation positive entre la consommation de ce type de diète et les concentrations sériques de CRP, de VCAM-1, d'ICAM-1 et de E-sélectine (Lopez-Garcia et al., 2004). En outre, la consommation d'une diète de type « *western* » a été associée à une augmentation des niveaux de CRP sériques chez des sujets sains (Fung et al., 2001). De manière intéressante, la "*Women Health study*" a pu établir une relation entre charge glycémique alimentaire et les concentrations de CRP plasmatiques chez 244 femmes saines avec BMI inférieur ou supérieur à 25 (Liu S et al. AM J Clin Nutr 2002 : 75 :492). Une relation entre apport en AG saturés et trans et divers marqueurs inflammatoires a aussi été établie par la "*Nurse's Health Study-National Health and Nutrition Examination Survey*" (Mozaffarian et al., 2004) et des études d'interventions ont démontré qu'une réduction en gras saturés diminuait les niveaux sériques de CRP alors qu'une augmentation d'apport en AG trans l'augmentait (Giugliano et al., 2006).

Il existe de plus en plus d'évidence que la consommation d'une diète de type méditerranéenne est associée à une réduction des maladies métaboliques chroniques telles l'obésité, le diabète et le syndrome métabolique. Cette diète, dite « équilibrée » et riche en fruits et légumes, en fibres, en produits céréaliers à grains entiers, en viandes maigres, est associée à un profil anti-inflammatoire avec de faibles concentrations de

CRP, de VCAM, d'ICAM et d'E-sélectine (Lopez-Garcia et al., 2004). Ainsi, il a été rapporté que la consommation régulière d'une diète de type méditerranéenne était associée à une diminution de l'ordre de 20% des concentrations sériques de CRP et d'IL-6 (Chrysohoou, Panagiotakos, Pitsavos, Das, & Stefanadis, 2004). Ces données ont été confirmées par la "*Nurse's Health Study*" qui a démontré une diminution des concentrations sériques de divers marqueurs pro-inflammatoires chez des individus consommant une diète de type méditerranéenne (Fung et al., 2005). Finalement, Jenkins et al. (Jenkins et al., 2003) ont démontré que l'adhésion à une diète équilibrée était associée à une réduction significative des concentrations sériques de CRP et que cette réduction était comparable à celle obtenue après un traitement aux statines.

Diverses études ont tenté d'identifier les facteurs responsables de la corrélation inverse existant entre la consommation d'une diète de type méditerranéenne et la réponse inflammatoire. Une des hypothèses avancées était que le contenu élevé en antioxydants des fruits et légumes présent dans cette diète puisse exercer des propriétés anti-inflammatoires. Supportant cette possibilité, la "*Massachusetts Hispanic Elders Study*" (Gao, Bermudez, & Tucker, 2004) a montré une association inverse entre l'apport en fruits et légumes et les concentrations sériques de CRP et d'homocystéine. En outre, il a été rapporté qu'une consommation de jus d'orange, à raison de 500mL par jour pendant 14 jours, réduisait les niveaux plasmatiques de CRP de 40% et 56% chez l'homme et la femme respectivement (Sanchez-Moreno et al., 2003). La possibilité que la diète méditerranéenne puisse exercer des effets anti-inflammatoires grâce à ses propriétés antioxydantes semble aussi soutenue par les résultats de l'étude de Nappo et al qui ont montré qu'une supplémentation en antioxydants pouvait prévenir l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion induite par un régime riche en gras saturés (Nappo et al., 2002). Pour leur part, King et al. (King et al., 2003) ont rapporté une corrélation inverse entre l'apport en fibres et les

concentrations sériques de CRP. Un rôle anti-inflammatoire des AG polyinsaturés à longue chaîne n-3, appelés aussi omega (ω)3, des composants clés de la diète méditerranéenne est aussi proposé. À ce titre, il a été démontré par Pischon et al. (Pischon et al., 2003) que l'apport en acide eicosapentaénoïque (EPA) et en acide docosahexaénoïque (DHA) était inversement proportionnel aux niveaux sériques des formes solubles du récepteur du TNF α et une relation inverse entre un apport élevé d'AG ω 3 et les concentrations sériques de CRP, d'E-sélectine, d'IL-6, de VCAM-1, et d'ICAM-1 a été documentée chez l'homme (Trichopoulou, Bamia, & Trichopoulos, 2005 ; Trichopoulou, Orfanos, Norat, et al., 2005 ; Knoops, Groot, Kromhout, 2004). La *"Nurse's Health Study"* a également rapporté une diminution des concentrations de marqueurs inflammatoires tels que la CRP, l'IL-6 et la E-sélectine, chez des femmes se trouvant dans le plus haut quintile de consommation en AG ω 3 comparativement à celles se situant dans le plus bas quintile (Lopez-Garcia et al., 2004). Des données récentes démontrent en outre qu'une supplémentation d'une diète par l'acide α -linoléique, le précurseur des AG ω 3, induit une diminution des concentrations sériques de CRP, d'IL-6 et de l'amyloïde sérique (SAA), un effet indépendant des changements observés au niveau du profil lipidique (Rallidis et al., 2003). Des études *in vitro* ont pour leur part démontré que les AG ω 3 inhibaient la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles l'IL-1 et -2 et le TNF- α et qu'ils diminuaient l'expression de certaines molécules d'adhésion (Christon, 2003). Finalement, une étude récente a pu démontrer qu'une intervention nutritionnelle visant à baisser le ratio ω 6/ ω 3 induisait de multiples effets, potentiellement favorables sur les profils métaboliques et inflammatoires (Guebre-Egziabher et al., 2008). Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent que les AG ω 3 sont anti-inflammatoires.

De multiples études ont montré une association entre bilan calorique et réponse inflammatoire et dès lors un rôle préventif de la restriction calorique dans l'activation de

processus inflammatoire a été proposé. Supportant cette possibilité, Bosutti et al. (Bosutti et al., 2008) ont démontré qu'un alitement de 2 semaines, à bilan énergétique neutre, activait une cascade pro-inflammatoire telle que reflétée par une augmentation des niveaux plasmatiques de CRP et d'IL-6 et une diminution des niveaux de mRNA de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Cet effet pro-inflammatoire était aboli par une restriction calorique modérée menant à une perte de plus ou moins 5% de la masse adipeuse corporelle. En accord avec ces données, Holloszy et al, ont documenté des effets anti-inflammatoires d'un bilan calorique négatif (Holloszy & Fontana, 2007) et ont pu démontrer qu'une restriction calorique prévenait le vieillissement secondaire chez l'homme et réduisait le risque de développer du diabète et de l'athérosclérose. De manière intéressante, cette diminution de risque était associée à des niveaux très faibles de marqueurs inflammatoires circulants, tels la CRP. Il a été proposé que l'effet modulateur de l'activité physique et de la balance énergétique sur le processus inflammatoire puissent s'exercer, soit directement via la production de cytokines dans le muscle squelettique et le tissu adipeux (Petersen et al., 2005 ; Blanc et al., 2000 ; Kershaw et al., 2004 ; Pedersen et al., 2007), soit indirectement via des modifications de la fonction endothéliale et de la production de radicaux libres (Taddei et al., 2000).

Les diètes faibles en glucides ont démontré ces dernières années des bénéfices en terme de perte pondérale et d'amélioration du profil métabolique (Volek et al., 2005). Ces diètes, dont l'apport en glucides est habituellement de moins de 20% de l'apport total en énergie, sont associées à une consommation importante de gras. Ce type de diète a été présenté comme une alternative efficace dans le traitement du syndrome métabolique (Volek & Feinman, 2005), de l'obésité (Samaha et al., 2003) et dans la prévention de l'athérosclérose (Halton et al., 2006) et sa consommation est associée à une diminution des niveaux de CRP (Shai et al., 2008).

À noter que des données récentes ont aussi documenté des actions anti-inflammatoires de l'alcool. En effet, selon quelques études, une consommation modérée d'alcool serait associée à de faibles concentrations de plusieurs marqueurs inflammatoires dont la CRP (Imhof et al., 2001 ; Albert, Glynn, & Ridker, 2003 ; Stewart, Mainous, III, & Gilbert, 2002). De plus, une étude a démontré qu'une consommation de 30g/j d'alcool, sous forme de vin rouge, diminuait les concentrations sériques de CRP de 21% (Estruch et al., 2004).

Le rôle primordial de la nutrition dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires est bien établi et diverses études épidémiologiques et d'interventions ont supporté l'effet cardioprotecteur de la diète méditerranéenne. Ainsi, l'étude ATTICA (Panagiotakos D et al., 2009) a démontré que les individus qui consommaient principalement des aliments à base de céréales, de petits poissons et d'huile d'olive avaient 28% de risque en moins de développer une maladie cardiovasculaire et que ceux dont l'alimentation reposait principalement sur une forte consommation de fruits, de légumes et d'huile d'olive voyaient ce risque chuter de 20%. Les travaux de cette étude ont aussi pu montrer que les personnes consommant 300g de poisson par semaine avaient une réduction de 33% des taux sériques de CRP comparativement à ceux qui n'en consommaient pas (Zampelas et al., 2005).

La "*Nurse Health Study*" (Lopez-Garcia et al., 2004) a quant à elle démontré qu'un apport élevé en AG trans, éléments banis dans une diète méditerranéenne, était associé à une altération de la fonction endothéliale, ce qui pourrait expliquer la relation positive entre les AG trans et les maladies cardiovasculaires. Les auteurs de cette étude ont aussi pu démontrer que les taux sériques de CRP étaient de 73% plus élevés chez les individus se trouvant dans le quintile le plus élevé d'apport en AG trans,

comparativement à ceux se situant dans le quintile le plus bas, suggérant donc un effet pro-inflammatoire de ce type d'AG.

L'étude de Lyon (de Lorgeril, Salen, Martin, et al., 1999) est une étude majeure ayant évalué le rôle de la diète méditerranéenne dans la prévention secondaire des maladies cardiovasculaires. Ses résultats ont permis de démontrer une diminution de prévalence d'infarctus aigus du myocarde et d'épisodes d'angine instable ainsi qu'une baisse importante de la mortalité globale et cardiovasculaire chez des individus adhérant à une diète méditerranéenne (de Lorgeril, Salen, Martin, et al., 1999). Cette dernière observation a été confirmée en 2003 par l' *"European Prospective Investigation into Cancer and nutrition (EPIC)* (Trichopoulou, Costacou, Bamia & Trichopoulos, 2003). Esposito et al. (Esposito, Marfella, Ciotola, et al., 2004) ont pour leur part démontré, dans une étude d'intervention, que des patients souffrant de syndrome métabolique présentaient, lorsqu'ils étaient soumis à une diète de type méditerranéenne, une diminution pondérale, une amélioration de leur fonction endothéliale et une diminution de divers paramètres inflammatoires tels que l'IL-6, IL-7, IL-18 et la CRP. Il a été récemment proposé que l'effet anti-inflammatoire de la diète méditerranéenne puisse être responsable de ses effets cardioprotecteurs (Giugliano, Ceriello, & Esposito, 2006).

Comme nous venons de le constater, divers nutriments de la diète jouent un rôle modulateur important dans l'inflammation. Outre la capacité des aliments à moduler la réponse inflammatoire, il est maintenant bien connu qu'un apport énergétique excessif, en favorisant l'accumulation de lipides dans les adipocytes et l'augmentation de la taille de ces derniers, génère un état inflammatoire. En outre, il est maintenant admis par plusieurs que le développement excessif de tissu adipeux, surtout au niveau abdominal, joue un rôle clé dans la survenue de l'IR (Hotamisligil, 2000) (Despres, 2006a). Dans les

prochains paragraphes, nous allons discuter du rôle de l'obésité et des AG dérivés du tissu adipeux dans la pathogenèse de l'IR et de l'inflammation.

L'hypothèse selon laquelle les AGL jouent un rôle important dans la pathogenèse de l'IR ne date pas d'hier. Il y a une trentaine d'années, Randle et al. (Randle, Garland, Hales, & Newsholme, 1963; Randle, Garland, Newsholme, & Hales, 1965) ont démontré que les AGL rivalisaient efficacement avec le glucose en tant que substrat énergétique au niveau musculaire et induisaient une diminution de l'utilisation du glucose. Ces auteurs ont spéculé qu'une augmentation de l'oxydation des lipides pourrait être à l'origine d'une IR associée au diabète et à l'obésité. Chalkley et al. (Chalkley, Hettiarachchi, Chisholm, et al., 1998) ont pu démontrer qu'une perfusion de lipides augmentait les niveaux musculaires de TG et de LCFA-CoA susceptibles de causer une augmentation du DG, un activateur potentiel bien connu de la PKC θ (Schimtz-Peiffer, Browne, Oakes, et al., 1997). Des travaux de Benoit et al. (Benoit et al., 2009) sur l'hypothalamus des rongeurs obèses ont démontré que l'acide palmitique (PA), un des principaux AGL chez l'humain, augmentait la PKC θ membranaire et ce faisant, altérait la signalisation de l'insuline. Les travaux de Santomauro et al. (Santomauro et al., 1999) ont pour leur part renforcé ces données en démontrant que l'administration d'Acipimox, un médicament inhibant la lipolyse, à différents groupes de sujets obèses (non-diabétiques, diabétiques de type 2 et intolérants au glucose) ou non obèses, diminuait les niveaux d'AGL plasmatique à jeun et les concentrations d'insuline plasmatique de 60 à 70% et de 50% respectivement. De ces résultats, il semble évident que les AGL sont des acteurs clés dans le développement de l'IR surtout en cas d'obésité.

Le tissu adipeux est le principal réservoir d'AG et une libération importante d'AGL se produit à partir du tissu adipeux viscéral, qui présente une capacité lipolytique importante et une grande résistance au processus de réesterification des AG.

L'augmentation des AGL circulants secondaire à l'hypertrophie adipocytaire contribue au développement de l'IR dans les autres tissus périphériques. Rappelons que l'IR se définit comme un état de perte de sensibilité des tissus périphériques à l'insuline, état où l'on observe une perturbation des effets métaboliques de l'insuline sur ses tissus cibles, en particulier le muscle. Cette perturbation est liée à des défauts multiples dans les mécanismes de signalisation par le récepteur de l'insuline. Ces défauts sont amplifiés par la présence d'une concentration élevée en AGL. En effet, une augmentation des niveaux plasmatiques d'AGL contribue à réduire la captation du glucose par le muscle en atténuant la transmission du signal insulinique et en stimulant la néoglucogenèse par l'apport de co-facteurs tels que l'acétyl-CoA, l'ATP et le nicotinamide adénosine dinucléotide (forme réduite) (NADH).

Il semble de plus en plus probable que l'obésité associée au syndrome métabolique et au diabète de type 2 soit responsable de l'état inflammatoire chronique qui accompagne souvent ces pathologies. L'obésité est associée à des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines dans la circulation et dans les tissus (Tataranni & Ortega, 2005) et il existe de multiples évidences d'une augmentation des concentrations plasmatiques de divers marqueurs pro-inflammatoires tels que la CRP, le TNF- α et l'IL-6 chez les individus obèses (Dandona et al., 1998; Dandona, Aljada, & Bandyopadhyay, 2004; Kern, Ranganathan, Li, Wood, & Ranganathan, 2001; Pradhan et al., 2001). Des études récentes incriminent les AGL comme facteurs déclencheurs de l'inflammation associée aux états d'IR. À cet effet, des données montrent que l'infusion intraveineuse de lipides chez des individus sains, dans le but de générer des concentrations en AGL similaires à celles observées chez des sujets obèses, induit une importante réponse inflammatoire (Tripathy et al., 2003) alors qu'une restriction calorique diminue les concentrations des marqueurs inflammatoires (Dandona et al.,

2001). D'autres études démontrent aussi qu'une augmentation d'AGL plasmatiques, en plus de générer une IR périphérique et hépatique, active la voie pro-inflammatoire du NF- κ B (Itani, Ruderman, Schmieder, et al., 2002) menant à une augmentation de l'expression hépatique de divers cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'à une augmentation des niveaux circulants de MCP-1 (Boden, She, Mozzoli, et al., 2005), une chimiokine impliquée dans le recrutement macrophagique aux sites inflammatoires (Rollins, Walz, & Baggiolini, 1991) incluant l'espace sous-endothélial (Rollins, Walz, & Baggiolini, 1991).

Par sa capacité à réduire l'activité de la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate 5' (AMPK), un important régulateur de l'oxydation des AG, le TNF- α , une cytokine pro-inflammatoire, induit une accumulation de lipides au niveau musculaire, générant ainsi une IR au niveau du muscle squelettique (Steinberg, 2007). Cette cytokine active en outre deux voies de signalisation pro-inflammatoires, la voie JNK et la voie IKK β /NF- κ B, dont l'activation mène à l'inhibition de la signalisation de l'insuline (Shoelson et al., 2006). En activant ces deux mêmes voies, les AGL contribuent non seulement à la pathogenèse de l'IR mais aussi au maintien de la réponse inflammatoire (Furukawa et al., 2004; Ozcan et al., 2004; Summers, 2006). Ces données appuient la notion selon laquelle les AGL constituent le lien principal entre l'obésité ou un apport élevé en gras et le développement d'un état pro-inflammatoire (Figure 2).

La ED est documentée chez les individus obèses, insulino-résistants et diabétiques de type 2 (Brunner et al., 2005). Rappelons que l'IR peut contribuer à la ED en inhibant la production insulino-dépendante du NO par l'endothélium (Zeng et al., 2000; Montagnani et al., 2002) et que, vice versa, un défaut de vasodilatation NO-dépendante au niveau endothélial peut induire une IR vasculaire.

Il existe des évidences démontrant que l'inflammation joue un rôle dans l'activation et la ED. Ainsi, Ross (Ross, 1999) a démontré que des cytokines pro-inflammatoires telles

que le TNF- α et l'IL-6, induisaient un état de ED et les travaux de Fichtlscherer et al. (Fichtlscherer et al., 2000) furent parmi les premiers à proposer l'implication de la CRP dans la ED. En 2003, Vitale et al. (Vitale, et al., 2003), ont démontré, chez des patients souffrant de maladies coronariennes, une association entre les niveaux de CRP plasmatique et une altération de la fonction endothéliale. Ces mêmes auteurs ont également rapporté que la réduction des niveaux de CRP chez ces sujets était associée à une amélioration de la fonction endothéliale. Notons aussi que Bisioendial et al. (Bisioendial et al., 2005) ont récemment documenté, chez l'humain, un effet *in vivo* de la CRP sur l'activation endothéliale. En revanche, d'autres études ont démontré que la CRP peut avoir des effets anti-inflammatoires au niveau des cellules vasculaires et inflammatoires. Tel que discuté antérieurement, cet effet paradoxal de la CRP pourrait être dû, du moins en partie, par l'utilisation de préparations commerciales de CRP mal caractérisées ainsi que par l'existence de différentes conformations de CRP susceptibles d'exercer des effets opposés. Les études menées chez l'animal font elles aussi état de résultats controversés. Alors que quelques études montrent une altération de la fonction endothéliale (Teoh, Quan, Lovren, et al., 2008), et une amélioration de l'athérosclérose chez les souris transgéniques pour la CRP, la grande majorité d'entre elles ne montrent pas de tels effets. Les travaux *in vitro* menés sur des cellules isolées semblent quant à eux appuyer le rôle de la CRP dans la ED. En effet, les résultats de ces études démontrent que la CRP augmente *in vitro* l'expression d'ET-1, de LOX-1, de RAGE, de MCP-1, de VCAM-1 et ICAM-1 par les cellules endothéliales. La CRP diminue aussi la production de prostacycline, augmente la production des ROS et favorise l'apoptose des cellules endothéliales (Paffen & DeMaat, 2006). De plus, il a été démontré que l'interaction de la CRP avec les cellules endothéliales mène à une diminution de l'expression et l'activité de eNOS (Singh, Devaraj, Vasquez-Vivar, Jialal, 2007; Grad et al., 2007; Schwartz, Osborne-Lawrence, Hahner, et al., 2007) avec

diminution de la production de NO, donc supportant un rôle de la CRP dans l'altération de la fonction endothéliale.

Des travaux récents ont permis de démontrer que la CRP était non seulement produite par le foie mais aussi par d'autres tissus, dont les cellules vasculaires. En 2005, Venugopal et al. (Venugopal et al., 2005) ont pour la première fois démontré une expression de CRP par les cellules endothéliales humaines, expression induite en présence de milieu conditionné macrophagique et d'une combinaison d'IL-1 β et d'IL-6.

Les stimulants de l'expression de la CRP au niveau endothéliale incluent des facteurs inflammatoires et métaboliques. Ainsi, Singh et al. (Singh et al., 2007) ont rapporté que la leptine induisait l'expression de CRP par les cellules endothéliales vasculaires et il a été démontré que d'autres facteurs métaboliques et inflammatoires, tels que le TNF- α , l'hyperglycémie, l'acide urique et une diminution de l'adiponectine, augmentaient l'expression endothéliale de la CRP (Devaraj, Torok, Dasu, Samols, & Jialal, 2008 ; Calabro, Willerson, & Yeh, 2003 ; Haider, Leuchten, Schaller, et al., 2006 ; Kang, Park, Lee, & Johnson, 2005). Dans notre étude, nous avons démontré que le PA, le plus abondant AG saturé en circulation, augmentait l'expression endothéliale de la CRP, suggérant un nouveau mécanisme par lequel les AGL pourraient induire l'activation et la ED.

Les concentrations d'AGL auxquelles sont exposées les cellules endothéliales *in vivo* sont déterminées par leur concentration dans le plasma. Dans la circulation, les AGL sont liés à l'albumine et le ratio AGL/albumine représente le principal déterminant de la captation des AGL par la cellule. Dans des conditions physiologiques, le ratio AGL/albumine varie entre 0.15 à 4 et la moyenne est de 1 (Spector, 1975). *In vivo*, les concentrations plasmatiques d'AGL varient de 90 à 1200 μ M. Des données ont même démontré que la concentration plasmatique totale d'AGL pouvait atteindre à l'état de jeune 1.6mmol/L, tel que détecté chez certains participants de l'étude de famille de

Tubingen. Puisque le palmitate constitue 28% des AGL totaux circulants (Staiger et al., 2004) et peut augmenter dans des états pathologiques inflammatoires comme l'IR et le syndrome métabolique, la concentration de PA utilisée dans notre étude, soit 200 μ M, semble pouvoir être atteinte dans des situations pathologiques telles le syndrome métabolique. Le PA est un acide gras saturé que l'on trouve principalement dans les aliments d'origine animale comme les viandes de bœuf et de porc, dans le fromage, le beurre mais aussi dans une source végétale importante: l'huile ou graisse de palme. Il est donc fréquemment présent dans notre alimentation. De nombreuses études ont montré plusieurs effets nociceptifs du PA chez le diabétique in vivo (Vessby, 2003 ; Vessby, 2000). En effet, le PA est un important inducteur de l'expression d'IL-6 (Weigert et al., 2004) et cette cytokine participe à l'activation transcriptionnelle de la CRP en activant 2 facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de cette protéine. De manière spécifique, une relation positive entre le PA et les niveaux sériques d'IL-6, indépendamment de l'adiposité, a été trouvée chez 55 sujets de l'étude de famille de Tubingen pour l'obésité et le diabète de type 2 (Weigert et al., 2004). Certains désordres métaboliques, tels l'état d'insulino-résistance, sont souvent associés à une augmentation des niveaux de PA et d'une diminution de ceux du linoléate (Vessby, 2003). Ces résultats suggèrent qu'une surexpression d'IL-6 et donc de la CRP par les acides gras saturés puisse aussi être présent chez l'humain.

Plusieurs études ont démontré que les AG saturés tels que le PA doivent être métabolisés afin de produire leur effet biologique. Notre étude démontrant l'incapacité du bromopalmitate, un analogue du PA non métabolisable, à induire l'expression endothéliale de CRP est en accord avec ces travaux et indique que le métabolisme cellulaire du PA est requis pour l'induction de la CRP endothéliale par cet AGL.

Les AG saturés sont métabolisés de manière préférentielle en céramides et des données récentes ont rapporté que la synthèse *de novo* de céramides médie plusieurs effets de PA au niveau des cellules endothéliales (Staiger et al., 2004; Wu, Song, Zhang, & Zou, 2007; Xiao-Yun et al., 2009). En accord avec ces données, nous avons démontré que les céramides reproduisent fidèlement l'effet du PA sur l'expression de la CRP endothéliale alors que l'oléate et le linoléate, deux AG insaturés ne causant pas l'accumulation de céramides (Wu, Song, Zhang, & Zou, 2007; Lee, Pinnamaneni, Eo, et al., 2006), n'ont aucun effet. Ces résultats indiquent que les céramides sont les médiateurs responsables de l'induction de l'expression de la CRP endothéliale en réponse au PA.

Il est maintenant bien établi que les niveaux de stress oxydatif sont augmentés dans le syndrome métabolique et le rôle clé du stress oxydatif dans la pathogenèse de la ED est bien documenté (Roberts & Sindhu, 2009; Sano, Umeda, Hashimoto, Nawata, & Utsumi, 1998; Wolf, Jiang, & Hunt, 1991). Il est en outre bien connu qu'une augmentation de la production des ROS par les cellules endothéliales constitue un des mécanismes pro-oxydatif stimulé par une lipotoxicité vasculaire (Chinen, Shimabukuro, Yamakawa, et al., 2007). Ainsi, les travaux d'Inoguchi et al. (Inoguchi, Li, Umeda, et al., 2000) ont démontré que le PA stimule la production de ROS par les cellules endothéliales via l'activation PKC-dépendante de la nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase. En accord avec ces données, nous avons démontré que des antioxydants tels que le NAC et l'apocynine diminuaient significativement l'expression de la CRP induite par le PA dans les cellules endothéliales.

Certaines voies de signalisation activant les PKC sont impliquées dans les complications vasculaires du diabète (Koya & King, 1998). Des études *in vitro* ont démontré que la PKC est activée dans les cellules vasculaires exposées à des concentrations élevées en AGL et en glucose (Inoguchi et al., 1992). Parmi les

isoformes de PKC étudiées jusqu'à présent, l'activation de la PKC β semble être centrale au processus de développement de l'IR et est étroitement liée au stress oxydatif vasculaire. Nos résultats démontrant que les inhibiteurs de la PKC β abolissent la production des ROS produite par le PA dans les cellules endothéliales, appuient le rôle crucial de la PKC β dans le stress oxydatif induit par le PA.

L'effet permissif du glucose sur les effets nociceptifs du PA a été démontré *in vitro* (Su et al., 2002 ; Briaud et al., 2001). Le mécanisme responsable de cet effet semble résider dans l'induction du DAG par le glucose intracellulaire, un médiateur clé des effets du PA sur l'activation de la PKC, une kinase qui diminue la biodisponibilité du NO en réduisant l'activité du eNOS et en augmentant la synthèse de l'ET-1 (Chen et al., 2000). Si ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle l'effet nocif du palmitate augmente en fonction de la concentration du glucose dans le milieu, nous ne disposons pas de données permettant de la confirmer. En effet, dans notre étude, le milieu utilisé pour la culture cellulaire contenait 11mM de glucose et nous n'avons pas testé l'effet du PA en fonction de différentes concentrations de glucose.

À l'inverse de la PKC, il a été démontré que l'AMPK prévenait l'effet pro-oxydatif du glucose et des AGL au niveau endothélial. En accord avec les données documentant le rôle inhibiteur de l'AMPK sur la production endothéliale de ROS stimulée par le PA (Li, Song, Zhang, et al., 2009; Ceolotto, Gallo, Papparella, et al., 2007), nos résultats démontrent que l'AICAR, un activateur de l'AMPK, prévient la genèse de stress oxydatif dans les cellules endothéliales exposées au PA. Puisqu'il a été documenté que l'AMPK médiait l'effet inhibiteur des TZD sur l'activation de la PKC (Yasunari et al., 1997 ; Ceolotto et al., 2007), nous postulons que l'effet antioxydatif de l'AMPK est relié à sa capacité d'inhiber la voie de signalisation de la PKC. Si cette hypothèse s'avérait juste,

l'essentiel de l'effet oxydant du PA pourrait être imputable à sa capacité d'inhiber l'AMPK.

L'activation du facteur de transcription NF- κ B joue un rôle clé dans la régulation de l'expression génique des molécules pro-inflammatoires impliquées dans la ED. En accord avec le rôle critique de la voie IKK β /NF- κ B dans le contrôle de l'expression génique de la CRP, nos résultats démontrent que le PA réduit le niveau d'I κ B α dans les cellules endothéliales et qu'un inhibiteur pharmacologique de l'IKK β prévient totalement l'expression du gène de la CRP induite par le PA. Il a été démontré que l'activation de la PKC, en particulier l'activation de la PKC β , phosphoryle directement l'I κ B α (Ghosh & Baltimore, 1990) et en augmentant les niveaux de stress oxydatif, active l'I κ B kinase. En accord avec ces données, nos résultats démontrent que les antioxydants et l'inhibiteur de PKC β préviennent la dégradation de l'I κ B α induite par le PA, suggérant dès lors que l'activation du NF- κ B par le PA implique la production de ROS médiée par la PKC β . Le STAT3 est un autre facteur de transcription impliqué dans l'expression de gènes liés à l'inflammation et au stress oxydatif. Des données récentes ont démontré que le PA est un inducteur puissant de l'expression d'IL-6 (Kim, Tysseling, Rice, et al., 2005) et que cette cytokine induit l'activation transcriptionnelle du gène de la CRP en activant le STAT3 (Zhang, Sun, Samols, & Kushner, 1996). Le PA peut activer la voie JAK/STAT via la production des ROS induite par la NADPH oxidase (Schieffer, Luchtefeld, Braun, et al., 2000). Nos résultats démontrant qu'un inhibiteur spécifique de JAK2 diminue l'induction de l'expression du gène de la CRP par le PA appuient le rôle de la voie JAK/STAT dans cet effet.

Les MAPK, incluant les ERK1/2, JNK et p38 MAPK, sont des molécules de signalisation impliquées de manière cruciale dans la ED associée à l'IR et au diabète (Li et al., 2003d; Liu, Schoenkerman, & Lowe, 2000; Nakagami et al., 2001). Ces kinases

médient l'activation du NF- κ B induite par le PA (Coll, Jové, Rodriguez-Calvo, et al., 2006), favorisent la phosphorylation du STAT3 (Souza, Escobar, Bucio, et al., 2009) et médient l'effet inhibiteur du PA sur eNOS (Wang, Zhang, Youker, 2006). Par ailleurs, les MAPK sont impliquées dans l'induction de la CRP vasculaire par l'ET-1 et la leptine (Mittendorfer, Liem, Patterson, et al., 2003; Wang, Liu, Guo, et al., 2009). En accord avec ces données, notre étude a démontré que des inhibiteurs d'ERK1/2 et de JNK préviennent à la fois l'activation du NF- κ B et l'expression de la CRP induites par le PA. Les MAPK étant situées en aval de la PKC et en amont du NF- κ B pourraient jouer le rôle de transmetteur du signal d'activation de la PKC à la CRP et agir comme médiateur des effets inflammatoires vasculaires des AGL.

Les AGL peuvent altérer la production du NO induite par l'insuline (Steinberg, Tarshoby, Monestel, et al., 1997; Watanabe, Tagawa, Yamakawa, et al., 2005). De récentes études démontrent que la CRP inhibe la production endothéliale de NO (Singh, Devaraj, Vasquez-Vivar, & Jialal, 2007; Schwartz, Osborne-Lawrence, Hahner, et al., 2007; Teoh, Quan, Lovren, et al., 2008) et agit comme médiateur de l'effet inhibiteur de l'acide urique sur la production du NO (Kang et al., 2005). Notre étude démontrant qu'un anticorps anti-CRP et d'autres agents inhibant l'expression de la CRP préviennent l'effet inhibiteur du PA sur la production du NO, suggère un rôle important de la CRP dans la régulation de la production basale du NO par les cellules endothéliales. Il est important de noter qu'au niveau vasculaire, la CRP est à la fois synthétisée par les monocytes-macrophages, les cellules musculaires lisses, ainsi que par les cellules endothéliales. Il a été proposé que la CRP produite localement par ses effets paracrine/autocrine sur les cellules vasculaires puisse être responsable de divers effets pro-inflammatoires et pro-thrombotiques. À ce titre, nos expériences *in vitro* suggèrent que la CRP puisse être impliquée dans la pathogenèse de la ED, notamment en diminuant, par son effet autocrine, la production du NO. Un schéma illustrant les voies

de signalisation potentiellement impliquées dans la régulation de la CRP endothéliale par le PA et le rôle de la CRP comme médiateur de l'effet inhibiteur du PA sur la production de NO est présenté à la Figure 9.

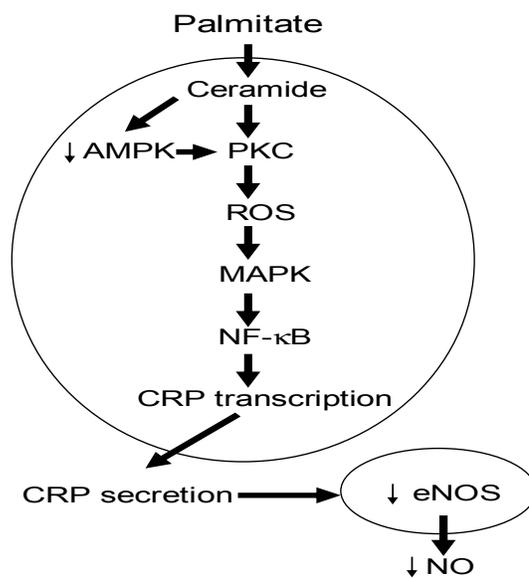


Figure 9. Voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de la CRP endothéliale par le PA.

Les niveaux d'AGL sont augmentés chez la plus part des sujets obèses (Reaven, Hollenbeck, Jeng, et al., 1988). Une augmentation des niveaux d'AGL aggrave l'IR (Boden, Chen, Ruiz, et al., 1994) alors qu'une diminution de ces niveaux l'améliore (Santomauro, Boden, Silva, et al., 1999). Une normalisation des niveaux d'AGL plasmatiques pendant 12 heures restaure la captation du glucose stimulée par l'insuline

chez des individus obèses et non diabétiques et améliore de 25 à 50% la sensibilité à l'insuline chez des patients obèses et diabétiques de type 2 (Santomauro, Boden, Silva, et al., 1999). En plus d'améliorer la sensibilité à l'insuline, une diminution des niveaux d'AGL plasmatiques est susceptible de freiner le développement ou la progression de la maladie athéromateuse. Rappelons en effet que des études menées récemment ont démontré qu'une élévation d'AGL plasmatiques active la voie du NF- κ B (Itani, Ruderman, Schmieder, et al., 2002) menant à une augmentation de l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1- β , le MCP-1 et la CRP (Boden, She, Mozzoli, et al., 2005), tous des médiateurs impliqués dans le développement de la maladie athéromateuse. Vu certaines études récentes, il est possible que certaines de ces cytokines pro-inflammatoires puissent exercer leur effet pro-athérogénique via la stimulation de l'expression de la CRP vasculaire (voir les sections I.3.3.6 et I.3.4.3). À la lumière de ces données, il est logique de postuler qu'une diminution des concentrations plasmatiques des AGL, en prévenant l'activation de la voie pro-inflammatoire et pro-athérogénique du NF- κ B, puisse mener à une réduction de l'incidence d'événements athérosclérotiques.

En 2004, environ 6,8 millions d'adultes canadiens âgés de 20 à 64 ans présentaient un excès pondéral, tandis que 4,5 millions étaient obèses (Statistique Canada, enquête sur la santé dans les collectivités canadiennes, 2004). La majorité des problèmes de santé rencontrés par les patients obèses sont liés à l'IR. Dès lors, prévenir l'IR devrait être la stratégie primaire pour contrer les complications liées à l'obésité. Parmi les méthodes préconisées pour réduire l'IR, la diminution de l'apport calorique (régime hypocalorique) et une augmentation de la dépense calorique (exercice) sont les méthodes les plus recommandées. Puisque les AGL jouent un rôle clé dans l'IR chez les patients obèses, une normalisation des niveaux plasmatiques d'AGL devrait être préconisée en plus de l'exercice et de la diète. Santomauro et al., (Santomauro, Boden,

Silva et al., 1999) ont démontré qu'une normalisation des niveaux d'AGL avec de l'Acipimox, un analogue de l'acide nicotinique, normalisait l'IR chez des sujets obèses et non-diabétiques et améliorait l'IR chez des patients obèses et diabétiques de type 2. Malheureusement, une utilisation à long terme de ce médicament est associée à un effet rebond, menant à une augmentation majeure des niveaux plasmatiques des AGL (Chen, Iqbal, & Boden, 1999). Les TZD, des médicaments améliorant la sensibilité à l'insuline, diminuent aussi les niveaux plasmatiques d'AGL à long terme et ne produisent pas d'effet rebond (Boden, Homko, Mozzoli, et al., 2005). Toutefois, ces médicaments ont des effets secondaires, tels la rétention hydrique, qui en limitent l'utilisation (Boden & Zhang, 2006). Les fibrates diminuent aussi les niveaux d'AGL dans la circulation et ne produisent pas non plus d'effet rebond (Staels & Fruchart, 2005). Notons que ces deux médicaments agissent différemment et dans différents organes; les TZD agissent en activant le PPAR γ dans le tissu adipeux alors que les fibrates activent le PPAR α dans le foie. Bien que ces deux médicaments diminuent les niveaux d'AGL de manière modeste, Boden et al. (Boden, Homko, Mozzoli, et al., 2007) ont démontré qu'une combinaison de ces drogues diminuait de manière substantielle les niveaux d'AGL plasmatiques et améliorait la sensibilité à l'insuline comparativement à l'utilisation d'un seul médicament.

Outre la dyslipidémie, l'hyperglycémie est un facteur déterminant des complications vasculaires dans le syndrome métabolique (Massi-Benedetti & Federici, 1999 ; Orchard, 1999). Si le rôle de l'hyperglycémie dans les complications micro-vasculaires est clairement établi, son rôle dans le développement des complications macro-vasculaires reste controversé. En effet, la "United Kingdom Prospective Diabetes Study" (UKPDS), une étude de cohorte effectuée chez 5000 patients diabétiques, a démontré qu'un contrôle glycémique agressif n'induisait pas une diminution significative des complications macro-vasculaires chez des patients diabétiques (UKPDS, 1998b). Esposito et al. (Esposito et al., 2002) ont proposé que des excursions hyperglycémiques

majeures durant la période post-prandriale, puissent exercer des effets délétères sur la paroi vasculaire via divers mécanismes tels que la ED, l'activation de la cascade de coagulation, l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires et l'induction du stress oxydatif. Des études ont aussi démontré que l'hyperglycémie aiguë chez des sujets normaux et diabétiques est un stimulus suffisant pour augmenter les taux circulants d'ICAM-1, activant ainsi l'une des premières étapes du processus athérosclérotique (Ceriello, Falletti, Motz, et al., 1998 ; Marfella, Esposito, Giunta, et al., 2000). Le concept selon lequel l'athérosclérose est une maladie inflammatoire, même dans le diabète, est actuellement bien établi (Plutzky, 2004) et il est documenté qu'une hyperglycémie aiguë, soit durant un clamp hyperglycémique (Esposito, Nappo, Marfella, et al., 2002) soit en période post-prandiale (Nappo, Esposito, Cioffi, et al., 2002), augmente la production plasmatique de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF- α et l'IL-18. Ces données suggèrent qu'un contrôle glycémique serré, en réduisant divers processus pro-athérosclérotiques, puisse représenter une stratégie efficace pour prévenir les complications vasculaires liées au syndrome métabolique.

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

IV.1 Conclusion

Les résultats de notre étude démontrent que :

- 1) Le PA augmente *in vitro* l'expression endothéliale de CRP
- 2) L'inhibition de la production basale du NO par le PA est médiée par la CRP.

Nos données supportent le concept d'une régulation de la CRP endothéliale par le PA via l'activation de facteurs de transcription et kinases sensibles au stress oxydatif. Elles suggèrent en outre un rôle de la CRP dans la ED induite par les AGL.

IV.2 Perspectives

En démontrant la capacité du PA à induire l'expression endothéliale de CRP, notre étude identifie l'endothélium comme source probable de CRP dans les pathologies métaboliques associées à une augmentation des niveaux d'AGL, telles que l'obésité et le diabète de type 2. L'induction de la CRP endothéliale en réponse aux AGL ou au glucose, par ses effets paracrines sur les cellules vasculaires, pourrait contribuer de manière significative aux effets pro-inflammatoires et pro-athérogéniques de divers facteurs métaboliques altérés dans le syndrome métabolique. Ces résultats laissent entrevoir la possibilité d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à diminuer l'expression vasculaire de la CRP et dès lors à contrer ses effets pro-athérogéniques.

Des stratégies nutritionnelles visant à inhiber de manière sélective l'état inflammatoire et à réduire les niveaux d'AGL plasmatiques chez les patients obèses et insulino-résistants sont susceptibles de ralentir le développement de l'athérosclérose. Au cours des dernières années, une meilleure connaissance des effets néfastes des AG

saturés ont incité les consommateurs à augmenter leur apport en AG polyinsaturés. Au vu de leurs effets bénéfiques sur l'endothélium et l'inflammation, les AG ω 3 semblent être un choix bénéfique pour la santé cardiovasculaire. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier les effets potentiels des AG ω 3 sur la CRP et élucider leurs mécanismes d'action à ce niveau. De telles études pourraient permettre de faire de meilleures recommandations nutritionnelles en termes de prévention des maladies cardiovasculaires.

Les résultats de notre étude suggèrent une implication des voies sensibles au stress oxydatif dans l'expression de la CRP induite par le PA et dès lors l'utilité potentielle des antioxydants, tels que les vitamines C et E, pour réduire l'expression vasculaire de CRP et ses conséquences néfastes sur l'endothélium. Cependant, les effets bénéfiques d'une supplémentation en vitamines et en antioxydants dans la prévention des maladies cardiovasculaires sont encore controversés.

Sans doute, les études futures viendront à la conclusion que la consommation d'une diète équilibrée, riche en fruits et légumes, pauvre en gras et riche en fibres reste la meilleure stratégie, en plus de saines habitudes de vie, pour réduire l'inflammation systémique et vasculaire et prévenir les complications cardiovasculaires associées au syndrome métabolique et au diabète.

V. REFERENCES

Abramson, J. L., Vaccarino, V. (2002). Relationship between physical activity and inflammation among apparently healthy middle-aged and older US adults. *Arch. Intern. Med.*, 162, 1286–1292.

Adams, J. M. II, Pratipanawatr, T., Berria, R., Wang, E., DeFronzo, R. A., Sullards, M. C., Mandarino, L. J. (2004). Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes*, 53, 25-31.

Agrawal, A., Cha-Molstad, H., Samols, D., Kushner, I. (2001). Transactivation of C-reactive protein by IL-6 requires synergistic interaction of CCAAT/ enhancer binding protein beta (C/EBP beta) and Rel p50. *J. Immunol.*, 166, 2378 -2384.

Agrawal, A., Samols, D., Kushner, I. (2003). Transcription factor c-Rel enhances C-reactive protein expression by facilitating the binding of C/EBPbeta to the promoter. *Mol. Immunol.*, 40, 373-380.

Aguilar-Salinas, C. A., García, E. G., Robles, L., Riaño, D., Ruiz-Gomez, D. G., García-Ulloa, A. C., Melgarejo, M. A., Zamora, M., Guillen-Pineda, L. E., Mehta, R., Canizales-Quinteros, S., Tusie Luna, M. T., Gómez-Pérez, F. J. (2008). High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93, 4075-4079.

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

Albert, M. A., Glynn, R. J., Ridker, P. M. (2003). Alcohol consumption and plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation*, *107*, 443-447.

Alberti, K. G., Zimmet, P. Z. (1998). 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.

Amar, J., Fauvel, J., Drouet, L., Ruidavets, J. B., Perret, B., Chamontin, B., Boccalon, H., Ferrieres, J. (2006). Interleukin 6 is associated with subclinical atherosclerosis: a link with soluble intercellular adhesion molecule 1. *J.Hypertens.*, *24*, 1083-1088.

Annambhotla, S., Wang, X., Dhahwal, A., Lin, P., Yao, Q., Chen, C. J. (2008). C-reactive protein induces endothelial dysfunction through downregulation of eNOS expression and increase of oxidative stress in porcine pulmonary arteries. *J. Surg. Res.* *144*, 328.

Anderson, H. D., Rahmutula, D., Gardner, D. G. (2004). Tumor necrosis factor-alpha inhibits endothelial nitric oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *J.Biol.Chem.*, *279*, 963-969.

Andreozzi, F., Laratta, E., Procopio, C., Hribal, M. L., Sciacqua, A., Perticone, M., Miele, C., Perticone, F., Sesti, G. (2007). Interleukin-6 impairs the insulin signaling pathway, promoting production of nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells. *Mol.Cell.Biol.*, 27, 2372-2383.

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

Arkan, M.C., Hevener, A. L., Greten, F. R., Maeda, S., Li, Z. W., Long, J. M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., Karin, M. (2005). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med.*, 11, 191-198.

Armoni, M., Harel, C., Bar-Yoseph, F., Milo, S., Karnieli, E. (2005). Free fatty acids repress the Glut4 gene expression in cardiac muscle via novel response elements. *J.Biol.Chem.*, 280, 34786-34795.

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

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

Bae, J. H., Bassenge, E., Kim, K. B., Kim, Y. N., Kim, K. S., Lee, H. J., Moon, K. C., Lee, M. S., Park, K. Y., Schwemmer, M. (2001). Postprandial hypertriglyceridemia impairs endothelial function by enhanced oxidant stress. *Atherosclerosis*, *155*, 517-523.

Baillyes, E. M., Navé, B.T., Soos, M. A., Orr, S. R., Hayward, A. C., Siddle, K. (1997). Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochem.J.*, *327 (Pt 1)*, 209-215.

Balkau, B., Charles, M. A. (1999). Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) *Diabet. Med.*, *16*, 442-443.

Ball, L. E., Berkaw, M. N., Buse, M. G. (2006). Identification of the major site of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the C terminus of insulin receptor substrate-1. *Mol.Cell.Proteomics*, *5*, 313-323.

Balletshofer, B. M., Rittig, K., Enderle, M. D., Volk, A., Maerker, E., Jacob, S., Matthaei, S., Rett, K., Häring, H. U. (2000). Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation*, *101*, 1780-1784.

Baltz, M. L., de Beer, F. C., Feinstein, A., Munn, E. A., Milstein, C. P., Fletcher, T. C., March, J. F., Taylor, J., Bruton, C., Clamp, J. R., Davies, A. J., Pepys, M. B. (1982). Phylogenetic aspects of C-reactive protein and related proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 389, 49-75.

Bamba V, Rader DJ. (2007). Obesity and atherogenic dyslipidemia. *Gastroenterology*, 132, 2181-2190.

Banskota, N. K., Taub, R., Zellner, K., King, G. L. (1989). Insulin, insulin-like growth factor I and platelet-derived growth factor interact additively in the induction of the protooncogene c-myc and cellular proliferation in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Mol.Endocrinol.*, 3, 1183-1190.

Barac, A., Campia, U., Panza, J. A. (2007). Methods for evaluating endothelial function in humans. *Hypertension*, 49, 748-760.

Bar, R. S., Kahn, C. R., Koren, H. S. (1977). Insulin inhibition of antibody-dependent cytotoxicity and insulin receptors in macrophages. *Nature*, 265, 632-635.

Baron, A. D., Brechtel-Hook, G., Johnson, A., Cronin, J., Leaming, R., Steinberg, H. O. (1996). Effect of perfusion rate on the time course of insulin-mediated skeletal muscle glucose uptake. *Am. J. Physiol*, 271, E1067-E1072.

Baron, A. D., Laakso, M., Brechtel, G., Hoit, B., Watt, C., Edelman, S. V. (1990). Reduced postprandial skeletal muscle blood flow contributes to glucose intolerance in human obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 70, 1525-1533.

Baron, A. D., Zhu, J. S., Zhu, J. H., Weldon, H., Maianu, L., Garvey, W. T. (1995). Glucosamine induces insulin resistance in vivo by affecting GLUT 4 translocation in skeletal muscle. Implications for glucose toxicity. *J.Clin.Invest.*, 96, 2792-2801.

Barzilay, J.I., Abraham, L., Heckbert, S. R., Cushman, M., Kuller, L. H., Resnick, H. E., Tracy, R. P. (2001). The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes*, 50, 2384-2389.

Basta, G., Schmidt, A. M., De Caterina, R. (2004). Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc.Res.*, 63, 582-592.

Bastard, J. P., Maachi, M., Tran Van Nhieu, J., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., Robert, J. J., Capeau, J., Hainque, B. (2002). Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87, 2084-2089.

Beckman, J. A., Goldfine, A. B., Gordon, M. B., Creager, M. A. (2001). Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation*, 103, 1618-1623.

Beltowski, J. (2006). Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 189, 47-60.

Berenson, G. S., Srinivasan, R. S., Bao, W., Newman, W. P. 3rd, Tracy, R. E., Wattigney, W. A. (1998). Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. *N. Engl. J. Med.*, 338, 1650-1656.

Bhakdi, S., Torzewski, M., Klouche, M., Hemmes, M. (1999). Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 2348-2354.

Bickerstaff, M. C. M., Botto, M., Hutchinson, W. L., Herbert, J., Tennent, G. A., Bybee, A., Mitchell, D. A., Cook, H. T., Butler, P. J., Walport, M. J., Pepys, M. B. (1999). Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity. *Nat. Med.*, 5, 694-697.

Bisoendial, R. J., Kastelein, J. J., Levels, J. H., Zwaginga, J. J., van den Bogaard, B., Reitsma, P. H., Meijers, J. C., Hartman, D., Levi, M., Stroes, E. S. (2005). Activation of inflammation and coagulation after infusion of C-reactive protein in humans. *Circ Res.*, 96, 714-716.

Bjornberg, J., Albert, U., Mellander, S. (1990). Resistance responses in proximal arterial vessels, arterioles and veins during reactive hyperemia in skeletal muscle and their underlying mechanisms. *Acta. Physiol. Scand.*, 139, 535-550.

Björntorp, P. (1988). The associations between obesity, adipose tissue distribution and disease. *Acta Med.Scand.Suppl.*, 723, 121-134.

Björntorp, P., Depergola, G., Sjöberg, C., Pettersson, P., Hallgren, P., Boström, K., Helander, K. G., Seidell, J. (1990). Alcohol consumption and synthesis of ethyl esters of fatty acids in adipose tissue. *J. Intern. Med.*, 228, 557-562.

Blanc, S., Normand, S., Pachiaudi, C., Duvareille, M., Gharib, C. (2000). Leptin responses to physical inactivity induced by simulated weightlessness. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 279, R891–R898.

Blankenberg, S., Barbaux, S., Tiret, L. (2003). Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 170, 191-203.

Ble, A., Windham, B. G., Bandinelli, S., Taub, D. D., Volpato, S., Bartali, B., Tracy, R. P., Guralnik, J. M., Ferrucci, L. (2005). Relation of plasma leptin to C-reactive protein in older adults (from the Invecchiare nel Chianti study). *Am. J. Cardiol.*, 96, 991-995.

Boden G. (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, 46, 3-10.

Boden, G. (2008). Obesity and free fatty acids. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, 37, 635-646.

Boden, G, Chen X. (1995). Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulindependent diabetes. *J. Clin. Invest.*, 96, 1261-1268.

Boden, G., Chen, X., Ruiz, J., White JV, Rossetti L. (1994). Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J. Clin. Invest.*, 93, 2438-2446.

Boden, G., Homko, C., Mozzoli, M., Showe, L. C., Nichols, C., Cheung, P. (2005). Thiazolidinediones upregulate fatty acid uptake and oxidation in adipose tissue of diabetic patients. *Diabetes*, *54*, 880-885.

Boden, G., Homko, C., Mozzoli, M., Zhang, M., Kresge, K., Cheung, P. (2007). Combined use of rosiglitazone and fenofibrate in patients with type 2 diabetes. Prevention of fluid retention. *Diabetes*, *56*, 248-255.

Boden, G., Lebed, B., Schatz, M., Homko, C., Lemieux, S. (2001). Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. *Diabetes*, *50*, 1612-1617.

Boden, G., She, P., Mozzoli, M., Cheung, P., Gumireddy, K., Reddy, P., Xiang, X., Luo, Z., Ruderman, N. (2005). Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor- κ B pathway in rat liver. *Diabetes*, *54*, 3458-3465.

Boden, G., Zhang, M. (2006). Recent findings concerning thiazolidinediones in the treatment of diabetes. *Expert Opin. Investig. Drugs*, *15*, 243-250.

Bonetti, P. O., Lerman, L. O., Lerman, A. (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, *23*, 168-175.

Bonora, E., Kiechl, S., Willeit, J., Oberhollenzer, F., Egger, G., Meigs, J. B., Bonadonna, R. C., Muggeo, M. (2007). Insulin resistance as estimated by homeostasis model assessment predicts incident symptomatic cardiovascular disease in caucasian subjects from the general population: the Bruneck study. *Diabetes Care*, *30*, 318-324.

Bongard, V., Elias, A., Bal dit Sollier, C., Ruidavets, J., Boccalon, H., Drouet, L., Ferrières, J. (2002). Soluble intercellular adhesion molecule-1 is associated with carotid and femoral atherosclerosis but not with intima-media thickness in a population-based sample. *Atherosclerosis*, 164, 297-304.

Bornfeldt, K. E., Gidlöf, R. A., Wasteson, A., Lake, M., Skottner, A., Arnqvist, H. J. (1991). Binding and biological effects of insulin, insulin analogues and insulin-like growth factors in rat aortic smooth muscle cells. Comparison of maximal growth promoting activities. *Diabetologia*, 34, 307-313.

Bornfeldt, K. E., Skottner, A., Arnqvist, H. J. (1992). In-vivo regulation of messenger RNA encoding insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor by diabetes, insulin and IGF-I in rat muscle. *J.Endocrinol.*, 135, 203-211.

Bosutti, A., Malaponte, G., Zanetti, M., Castellino, P., Heer, M., Guarnieri, G., Biolo, G. (2008). Calorie restriction modulates inactivity-induced changes in the inflammatory markers C-reactive protein and pentraxin-3. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93, 3226-3229.

Bouchard, C., Després, J. P., Mauriège, P. (1993). Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution. *Endocr. Rev.*, 14, 72-93.

Bray GA. (2004). Medical consequences of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89, 2583-2589.

Bressler, P., Bailey, S. R., Matsuda, M., DeFronzo, R. A. (1996). Insulin resistance and coronary artery disease. *Diabetologia*, 39, 1345-1350.

Briaud, I., Harmon, J. S., Kelpé, C. L., Segu, V. B., Poitout, V. (2001). Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. *Diabetes*, *50*, 315-321.

Brochu, M., Tchernof, A., Dionne, I. J., Sites, C. K., Eltabbakh, G. H., Sims, E. A., Poehlman, E. T. (2001). What are the physical characteristics associated with a normal metabolic profile despite a high level of obesity in postmenopausal women? *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *86*, 1020-1025.

Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, *54*, 1615-1625.

Brull, D. J., Serrano, N., Zito, F., Jones, L., Montgomery, H. E., Rumley, A., Sharma, P., Lowe, G. D., World, M. J., Humphries, S. E., Hingorani, A. D. (2003). Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, *23*, 2063-2069.

Bruunsgaard, H., Ladelund, S., Pedersen, A. N., Schroll, M., Jorgensen, T., Pedersen, B. K. (2003). Predicting death from tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in 80-year-old people. *Clin. Exp. Immunol.* *132*, 24-31.

Bucala, R., Tracey, K. J., Cerami, A. (1991). Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J. Clin. Invest.*, *87*, 432-438.

Burant, C. F., Sreenan, S., Hirano, K., Tai, T. A., Lohmiller, J., Lukens, J., Davidson, N. O., Ross, S., Graves, R. A. (1997). Troglitazone action is independent of adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, *100*, 2900-2908.

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

Buse, M.G. (2006). Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.*, *290*, E1-E8.

Cai, D., Yuan, M., Frantz, D. F., Melendez, P. A., Hansen, L., Lee, J., Shoelson, S. E. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat.Med.*, *11*, 183-190.

Calabro, P., Willerson, J. T., Yeh, E. T. (2003). Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation*, *108*, 1930-1932.

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

Calles-Escandon, J., Mirza, S.A., Sobel, B.E., Schneider, D.J. (1998). Induction of hyperinsulinemia combined with hyperglycemia and hypertriglyceridemia increases plasminogen activator inhibitor 1 in blood in normal human subjects. *Diabetes*. *47*, 290-293.

Cani, P. D., Knauf, C., Iglesias, M. A., Drucker, D. J., Delzenne, N. M., Burcelin, R. (2006). Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes*, *55*, 1484-1490.

Capeau J. (2008). Insulin resistance and steatosis in humans. *Diabetes Metab.*, *34*, 649-657.

Caprio, S. (2002). Insulin resistance in childhood obesity. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, *15*, 487-492.

Caprio, S., Bronson, M., Sherwin, R. S., Rife, F. Tamborlane, W. V. (1996). Co-existence of severe insulin resistance and hyperinsulinaemia in pre-adolescent obese children. *Diabetologia*, *39*, 1489-1497.

Cardillo, C., Nambi, S. S., Kilcoyne, C. M., Choucair, W. K., Katz, A., Quon, M. J., Panza, J. A. (1999). Insulin stimulates both endothelin and nitric oxide activity in the human forearm. *Circulation*, *100*, 820-825.

Carlsson, S., Hammar, N., Grill, V. (2005). Alcohol consumption and type 2 diabetes Meta-analysis of epidemiological studies indicates a U-shaped relationship. *Diabetologia*, *48*, 1051-1054.

Ceolotto, G., Gallo, A., Papparella, I., Franco, L.; Murphy, E., Iori, E., Pagnin, E., Fadini, G. P., Albiero, M., Semplicini, A., Avogaro, A. (2007). Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 12, 2627-2633.

Ceriello, A. (2005). Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes*, 54, 1-7.

Ceriello, A., Quagliaro, L., Piconi, L., Assaloni, R., Da Ros, R., Maier, A., Esposito, K., Giugliano, D. (2004). Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. *Diabetes*, 53, 701-710.

Cersosimo, E., DeFronzo, R. A. (2006). Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, 22, 423-436.

Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW, McAuley E, Archer DB (1998). Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. *Diabetes*, 47, 945-952.

Chang, M. K., Binder, C. J., Torzewski, M., Witztum, J. L. (2002). C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 13043-13048.

Chavez, J. A., Holland, W. L., Bär, J., Sandhoff, K., Summers, S. A. (2005). Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling. *J.Biol.Chem.*, 280, 20148-20153.

Chavez, J. A., Knotts, T. A., Wang, L. P., Li, G., Dobrowsky, R. T., Florant, G. L., Summers, S. A. (2003). A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J.Biol.Chem.*, 278, 10297-10303.

Chen, S., Apostolova, M. D., Cherian, M. G., Chakrabarti, S. (2000). Interaction of endothelin-1 with vasoactive factors in mediating glucose-induced increased permeability in endothelial cells. *Lab. Invest.*, 80, 1311-1321.

Chen, X., Iqbal, N., Boden, G. (1999). The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects. *J. Clin. Invest.*, 103, 365-372.

Cheng, K. K. Y., Lam, K. S. L., Wang, Y., Huang, Y., Carling, D., Wu, D., Wong, C., Xu, A. (2007). Adipoectin induced eNOS activation and NO production are mediated by APPL1 in endothelial cells. *Diabetes*, 56, 1387-1394.

Chinen, I., Shimabukuro, M., Yamakawa, K., Higa, N., Matsuzaki, T., Noguchi, K., Ueda, S., Sakanashi, M., Takasu, N. (2007). Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats. *Endocrinology*, 148, 160-165.

Chisalita, S. I., Arnqvist, H. J. (2004). Insulin-like growth factor I receptors are more abundant than insulin receptors in human micro- and macrovascular endothelial cells. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.*, 286, E896-E901.

Christon, R. A. (2003). Mechanisms of action of dietary fatty acids in regulating the activation of vascular endothelial cells during atherogenesis. *Nutr. Rev.*, 61, 272-279.

Chrysohoou, C., Panagiotakos, D. B., Pitsavos, C., Das, U. N., Stefanadis, C. (2004). Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults: The ATTICA Study. *J. Am. Coll Cardiol.*, 44, 152-158.

Chung, S., Yoon, I. Y., Shin, Y. K., Lee, C. H., Kim, J. W., Lee, T., Choi, D. J., Ahn, H. J. (2007). Endothelial dysfunction and C-reactive protein in relation with the severity of obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep*, 30, 997-1001.

Clerk, L. H., Vincent, M. A., Jahn, L. A., Liu, Z., Lindner, J. R., & Barrett, E. J. (2006). Obesity blunts insulin-mediated microvascular recruitment in human forearm muscle. *Diabetes*, 55, 1436-1442.

Coll, T., Jové, M., Rodríguez-Calvo, R., Eyre, E., Palomer, X., Sánchez, R. M., Merlos, M., Laguna, J. C., Vázquez-Carrera, M. (2006). Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes*, 55, 2779-2787.

Collins, R., Armitage, J., Parish, S., Sleight, P., Peto, R. (2003). MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5,963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, *361*, 2005-2016.

Cook, S., Hugli, O., Egli, M., Ménard, B., Thalmann, S., Sartori, C., Perrin, C., Nicod, P., Thorens, B., Vollenweider, P., Scherrer, U., Burcelin, R. (2004). Partial gene deletion of endothelial nitric oxide synthase predisposes to exaggerated high-fat diet-induced insulin resistance and arterial hypertension. *Diabetes*, *53*, 2067-2072.

Coon, P. J., Rogus, E. M., Drinkwater, D., Muller, D. C., Goldberg, A. P. (1992). Role of body fat distribution in the decline in insulin sensitivity and glucose tolerance with age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *75*, 1125-1132.

Cottam, D. R., Mattar, S. G., Barinas-Mitchell, E., Eid, G., Kuller, L., Kelley, D. E., Schauer, P. R. (2004). The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes. Surg.*, *14*, 589-600.

Coutinho, M., Gerstein, H. C., Wang, Y., Yusuf, S. (1999). The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care*, *22*, 233-240.

Cuff, C. A., Kothapalli, D., Azonobi, I., Chun, S., Zhang, Y., Belkin, R., Yeh, C., Secretto, A., Assoian, R. K., Rader, D. J., Pure, E. (2001). The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation. *J.Clin.Invest.*, *108*, 1031-1040.

D'Alessandris, C., Lauro, R., Presta, I., Sesti, G. (2007). C-reactive protein induces phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser307 and Ser 612 in L6 myocytes, thereby impairing the insulin signalling pathway that promotes glucose transport. *Diabetologia*, 50, 840-849.

Dandona, P., Aljada, A., Bandyopadhyay, A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.*, 25, 4-7.

Dandona, P., Aljada, A., Chaudhuri, A., Mohanty, P., Garg, R. (2005). Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation*, 111, 1448-1454.

Dandona, P., Mohanty, P., Ghanim, H., Aljada, A., Browne, R., Hamouda, W., Prabhala, A., Afzal, A., Garg, R. (2001). The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 355-362.

Dandona, P., Weinstock, R., Thusu, K., Abdel-Rahman, E., Aljada, A., Wadden, T. (1998). Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 2907-2910.

Danesh, J., Wheeler, J. G., Hirschfield, G. M., Eda, S., Eiriksdottir, G., Rumley, A., Lowe, G. D., Pepys, M. B., Gudnason, V. (2004). C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N.Engl.J.Med.*, 350, 1387-1397.

Day, C. (1999). Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet. Med.*, *16*, 179-192.

de Alvaro, C., Teruel, T., Hernandez, R., Lorenzo, M. (2004). Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J.Biol.Chem.*, *279*, 17070-17078.

de Beer, F. C., Baltz, M. L., Munn, E. A., Feinstein, A., Taylor, J., Bruton, C., Clamp, J. R., Pepys, M. B. (1982). Isolation and characterization of C-reactive protein and serum amyloid P component in the rat. *Immunology*, *45*, 55-70.

de Beer, F. C., Soutar, A. K., Baltz, M. L., Trayner, I. M., Feinstein, A., Pepys, M. B. (1982). Low density lipoprotein and very low density lipoprotein are selectively bound by aggregated C-reactive protein. *J. Exp. Med.*, *156*, 230-242.

DeFronzo, R. A. (2006). Is insulin resistance atherogenic? Possible mechanisms. *Atheroscler.Suppl.*, *7*, 11-15.

DeFronzo, R. A. (1998). The triumvirate: beta cell, muscle and liver, a collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*, *37*, 667-687.

DeFronzo, R. A., Bonadonna, R. C., Ferrannini, E. (1992). Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care*, *15*, 318-368.

Dehghan, A., Kardys, I., de Maat, M. P., Uitterlinden, A. G., Sijbrands, E. J., Bootsma, A. H., Stijnen, T., Hofman, A., Schram, M. T., Witteman, J. C. (2007). Genetic variation, C-reactive protein levels, and incidence of diabetes. *Diabetes*, *56*, 872-878.

Dekker, J. M., Girman, C., Rhodes, T., Nijpels, G., Stehouwer, C. D., Bouter, L. M., Heine, R. J. (2005). Metabolic syndrome and 10-year cardiovascular disease risk in the Hoorn Study. *Circulation*, *112*, 666-673.

de Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J. L., Monjaud, I., Delaye, J., Mamelle, N. (1999). Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*, *99*, 779-785.

Desideri, G., Ferri, C., Bellini, C., De Mattia, G., Santucci A. (1997). Effects of ACE inhibition on spontaneous and insulin-stimulated endothelin-1 secretion: In vitro and in vivo studies. *Diabetes*, *46*, 81-86.

Després J. P. (1991). Obesity and lipid metabolism: relevance of body fat distribution. *Curr. Opin. Lipidol.*, *2*, 5-15.

Després, J. P. (1992). Abdominal obesity and the risk of coronary artery disease. *Can.J.Cardiol.*, *8*, 561-562.

Després, J. P. (2006). Intra-abdominal obesity: an untreated risk factor for type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J. Endocrinol. Invest.*, *29*, 77-82.

Devaraj, S., Singh, U., Jialal, I. (2009). Human C-reactive protein and the metabolic syndrome. *Curr. Opin. Lipidol.*, 20, 182-189.

Devaraj S, Torok N, Dasu MR, Samols D, Jialal I. (2008). Adiponectin decreases C-reactive protein synthesis and secretion from endothelial cells: evidence for an adipose tissue-vascular loop. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 28, 1368-74.

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

Diamond, J. (2003). The double puzzle of diabetes. *Nature*, 423, 599-602.

Dib, K., Whitehead, J. P., Humphreys, P. J., Soos, M. A., Baynes, K. C., Kumar, S., Harvey, T., O'Rahilly, S. (1998). Impaired activation of phosphoinositide 3-kinase by insulin in fibroblasts from patients with severe insulin resistance and pseudoacromegaly. A disorder characterized by selective postreceptor insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 101, 1111-1120.

Dichtl, W., Stiko, A., Eriksson, P., Goncalves, I., Calara, F., Banfi, C., Ares, M. P., Hamsten, A., Nilsson, J. (1999). Oxidized LDL and lysophosphatidylcholine stimulate plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 3025-3032.

Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, *399*, 601-605.

Donahue, R. P., Rejman, K., Rafalson, L. B., Dmochowski, J., Stranges, S., Trevisan, M. (2007). Sex differences in endothelial function markers before conversion to pre-diabetes: Does the clock start ticking earlier among women? The western New York study. *Diabetes Care*, *30*, 354-359.

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

Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M. E., Dufour, S., Cline, G. W., Slezak, L. A., Andersen, D. K., Hundal, R. S., Rothman, D. L., Petersen, K. F., Shulman, G. I. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1 associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Clin. Invest.*, *103*, 253-259.

Du, X. L., Edelstein, D., Dimmeler, S., Ju, Q., Sui, C., Brownlee, M. (2001). Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J.Clin.Invest.*, *108*, 1341-1348.

Du, X., Edelstein, D., Obici, S., Higham, N., Zou, M. H., Brownlee, M. (2006). Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and enos activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J.Clin.Invest.*, *116*, 1071-1080.

Du Clos, T.W. (1989). C-reactive protein reacts with the U1 small nuclear ribonucleoprotein. *J. Immunol.*, 143, 2553-2559.

Ducimetiere, P., Eschwege, E., Papoz, L., Richard, J. L., Claude, J. R., Rosselin, G. (1980). Relationship of plasma insulin levels to the incidence of myocardial infarction and coronary heart disease mortality in a middle-aged population. *Diabetologia*, 19, 205-210.

Duncan, B. B., Schmidt, M. I., Pankow, J. S., Ballantyne, C. M., Couper, D., Vigo, A., Hoogeveen, R., Folsom, A. R., Heiss, G. (2003). Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Diabetes*, 52, 1799-1805.

Duplain, H., Burcelin, R., Sartori, C., Cook, S., Egli, M., Lepori, M., Vollenweider, P., Pedrazzini, T., Nicod, P., Thorens, B., Scherrer, U. (2001). Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 104, 342-345.

Dvorak, R. V., DeNino, W. F., Ades, P. A., Poehlman, E. T. (1999). Phenotypic characteristics associated with insulin resistance in metabolically obese but normal-weight young women. *Diabetes*, 48, 2210-2214.

Ebstein, W. (1876). Zur therapie des Diabetes mellitus, insbesondere über die Anwendung des salicylsauren Natron bei demselben. *Berliner Klinische Wochenschrift*, 13, 337-340.

Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet*, 365, 1415-1428.

Elisha, B., Ziai, S., Karelis, A. D., Rakel, A., Coderre, L., Imbeault, P., Rabasa-Lhoret, R. (2010). Similar associations of total adiponectin and high molecular weight adiponectin with cardio-metabolic risk factors in a population of overweight and obese postmenopausal women: a MONET study. *Horm. Metab. Res.*, 42, 590-594.

Engelke, K. A., Halliwill, J. R., Protcor, D. N., Dietz, N. M., Joyner, M. J. (1996). Contribution of nitric oxide and prostaglandins to reactive hyperemia in the human forearm. *J. Appl. Physiol.*, 81, 1807-1814.

Emeson, E. E., Robertson, Jr. A. L. (1988). T lymphocytes in aortic and coronary intimas. Their potential role in atherogenesis. *Am.J.Pathol.*, 130, 369-376.

Eringa, E. C., Stehouwer, C. D., van Nieuw Amerongen, G. P., Ouwehand, L., Westerhof, N., Sipkema, P. (2004). Vasoconstrictor effects of insulin in skeletal muscle arterioles are mediated by ERK1/2 activation in endothelium. *Am.J.Physiol.Heart.Circ.Physiol.*, 287, H2043-H2048.

Eringa, E. C., Stehouwer, C. D., Walburg, K., Clark, A. D., van Nieuw Amerongen, G. P., Westerhof, N., Sipkema, P. (2005). Physiological concentrations of insulin induce endothelin-dependent vasoconstriction of skeletal muscle resistance arteries in the presence of tumor necrosis factor- α dependence on c-Jun N-terminal kinase. *Arterioscler.Thromb.Vasc. Biol.*, 26, 274-280.

Erwin, P. A., Lin, A. J., Golan, D. E., Michel, T. (2005). Receptor-regulated dynamic S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J.Biol.Chem.*, 280, 19888-19894.

Erwin, P. A., Mitchell, D. A., Sartoretto, J., Marletta, M. A., Michel, T. (2006). Subcellular targeting and differential S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase. *J.Biol.Chem.*, 281, 151-157.

Esposito, K., Marfella, R., Ciotola, M., Di Palo, C., Giugliano, F., Giugliano, G., D'Armiento, M., D'Andrea, F., Giugliano, D. (2004). Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA*, 292, 1440-1446.

Esposito, K., Nappo, F., Marfella, R., Giugliano, G., Giugliano, F., Ciotola, M., Quagliaro, L., Ceriello, A., Giugliano, D. (2002). Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation*, 106, 2067-2072.

Esposito, K., Pontillo, A., Di Palo, C., Giugliano, G., Masella, M., Marfella, R., Giugliano, D. (2003). Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA*, 289, 1799-1804.

Estruch, R., Sacanella, E., Badia, E., Antúnez, E., Nicolás, J. M., Fernández-Solá, J., Rotilio, D., de Gaetano, G., Rubin, E., Urbano-Márquez, A. (2004). Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial. Effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis*, 175, 117-123.

Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). (2001). *JAMA*, 285, 2486-2497.

Fallon, K. E., Fallon, S. K., Boston, T. (2001). The acute phase response and exercise: court and field sports. *Br. J. Sports Med.*, 35, 170–173.

Farese, R. (2000). Diabetes Mellitus: a fundamental and clinical text. LeRoith, D.; Taylor, S.I.; Olefsky, J.M., editors. *Philadelphia: Lippincott*, 239-251.

Febbraio, M., Podrez, E. A., Smith, J. D., Hajjar, D. P., Hazen, S. L., Hoff, H. F., Sharma, K., Silverstein, R. L. (2000). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J.Clin.Invest.*, 105, 1049-1056.

Feinstein, R., Kanety, H., Papa, M.Z., Lunenfeld, B., Karasik, A. (1993). Tumor necrosis factor- α suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J. Biol. Chem.*, 268, 26055-26058.

Fernández-Real, J. M., Ricart, W. (2003). Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr.Rev.*, 24, 278-301.

Ferrannini, E., De Fronzo, R. A. (2004). Insulin Action In Vivo: Glucose Metabolism, in International Textbook of Diabetes Mellitus, Edited by DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Keen H., *Zimmet. P. John Wiley & Sons, Ltd. England.*, 277-301.

Ferrucci, L., Cavazzini, C., Corsi, A., Bartali, B., Russo, C. R., Lauretani, F., Ferrucci, L., Cavazzini, C., Corsi, A. M., Bartali, B., Russo, C. R., Lauretani, F., Bandinelli, S., Bandinelli, S., Guralnik, J. M. (2002). Biomarkers of frailty in older persons. *J. Endocrinol. Invest.*, 25, 10-15.

Festa, A., D'Agostino, R. Jr., Tracy, R. P., Haffner, S. M. (2002). Insulin resistance atherosclerosis study: elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*, 51, 1131-1137.

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

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

Fonseca, V., Desouza, C., Asnani, S., Jialal, I. (2004). Nontraditional risk factors for cardiovascular disease in diabetes. *Endocr. Rev.*, 25, 153-175.

Fontana, L., Eagon, J. C., Trujillo, M. E., Scherer, P. E., Klein, S. (2007). Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*, 56, 1010-1013.

Ford, E.S. (2002). Leukocyte count, erythrocyte sedimentation rate, and diabetes incidence in a national sample of US adults. *Am. J. Epidemiol.* 155, 57–64.

Ford, E. S. (2003). The metabolic syndrome and C-reactive protein, fibrinogen, and leukocyte count: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis*, 168, 351-358.

Freeman, D. J., Norrie, J., Caslake, M. J., Gaw, A., Ford, I., Lowe, G. D., O'Reilly, D. S., Packard, C. J., Sattar, N. (2002). The West of Scotland Coronary Prevention Study Group. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes*, 51, 1596-1600.

Fried, S. K., Bunkin, D. A., Greenberg AS. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 847-850.

Frittitta, L., Grasso, G., Munguira, M. E., Vigneri, R., Trischitta, V. (1993). Insulin receptor tyrosine kinase activity is reduced in monocytes from non-obese normoglycaemic insulin-resistant subjects. *Diabetologia*, 36, 1163-1167.

Fu, T., Borensztajn, J. (2002). Macrophage uptake of low-density lipoprotein bound to aggregated C-reactive protein: possible mechanism of foam-cell formation in atherosclerotic lesions. *Biochem. J.*, 366, 195-201.

Fung, T. T., Rimm, E. B., Spiegelman, D., Rifai, N., Tofler, G. H., Willett, W. C., Hu, F. B. (2001). Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 61-67.

Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J.Clin.Invest.*, 114, 1752-1761.

Gao, X., Bermudez, O. I., Tucker, K. L. (2004). Plasma C-reactive protein and homocysteine concentrations are related to frequent fruit and vegetable intake in Hispanic and non-Hispanic white elders. *J. Nutr.*, 134, 913-918.

Gao, Z., Hwang, D., Bataille, F., Lefevre, M., York, D., Quon, M. J., Ye, J. (2002). Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J.Biol.Chem.*, 277, 48115-48121.

Gao, Z., Zhang, X., Zuberi, A, Hwang, D., Quon, M. J., Lefevre, M., Ye, J. (2004). Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology*, 18, 2024-2034.

Gao, Z., Zuberi, A., Quon, M. J., Dong, Z., Ye, J. (2003). Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J.Biol. Chem.*, 278, 24944-24950.

Gardner, G., Banka, C. L., Roberts, K. A., Mullick, A. E., Rutledge, J. C. (1999). Modified LDL-mediated increases in endothelial layer permeability are attenuated with 17 beta-estradiol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 854-861.

Garg, A., Peshock, R. M., Fleckenstein, J. L. (1999). Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 170-174.

Gastaldelli, A., Miyazaki, Y., Pettiti, M., Matsuda, M., Mahankali, S., Santini, E., DeFronzo, R. A., Ferrannini, E. (2002). Metabolic effects of visceral fat accumulation in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87, 5098-5103.

Geffken, D. F., Cushman, M., Burke, G. L., Polak, J. F., Sakkinen, P. A., Tracy, R. P. (2001). Association between physical activity and markers of inflammation in a healthy elderly population. *Am. J. Epidemiol.*, 153, 242–250.

Gerich, J. E. (2006). Postprandial hyperglycemia and cardiovascular disease. *Endocr. Pract.*, 12 Suppl 1, 47-51.

Gershov, D., Kim, S., Brot, N., Elkon, K.B. (2000). C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.*, 192, 1353-1363.

Ghanim, H., Aljada, A., Hofmeyer, D., Syed, T., Mohanty, P., Dandona, P. (2004). Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation*, *110*, 1564-1571.

Ghosh, S., Baltimore, D. (1990). Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature*, *344*, 678-682.

Ginsberg, H. N. (2000). Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.*, *106*, 453-458.

Giugliano, D., Ceriello, A., Esposito, K. (2006). The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.*, *48*, 677-685.

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

Goldberg, I. J., Dansky, H. M. (2006). Diabetic vascular disease: an experimental objective. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, *26*, 1693-1701.

Goldfine, A. B., Beckman, J. A., Betensky, R. A., Devlin, H., Hurley, S., Varo, N., Schonbeck, U., Patti, M. E., Creager, M. A. (2006). Family history of diabetes is a major determinant of endothelial function. *J. Am. Coll. Cardiol.*, *47*, 2456-2461.

Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA (2006). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*, 114, 597-605.

Goldschmid, M. G., Barrett-Connor, E., Edelstein, S. L., Wingard, D. L., Cohn, B. A., Herman, W. H. (1994). Dyslipidemia and ischemic heart disease mortality among men and women with diabetes. *Circulation*, 89, 991-997.

Goossens, G.H. (2008). The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol.Behav.*, 94, 206-218.

Grad, E., Golomb, M., Mor, Y. I., Koroukhov, N., Lotan, C., Edelm, E .R., Danenberg, H. D. (2007). Transgenic expression of human C-reactive protein suppresses endothelial nitric oxide synthase expression and bioactivity following vascular injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 293, H489-H495.

Grekin, R. J., Vollmer, A. P., Sider, R. S. (1995). Pressor effects of portal venous oleate infusion. A proposed mechanism for obesity hypertension. *Hypertension*, 26, 193-198.

Guebre-Egziabher, F., Rabasa-Lhoret, R., Bonnet, F., Bastard, J. P., Desage, M., Skilton, M. R., Vidal, H., Laville, M. (2008). Nutritional intervention to reduce the n-6/n-3 fatty acid ratio increases adiponectin concentration and fatty acid oxidation in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 62, 1287-1293.

Gustafson, B., Hammarstedt, A., Andersson, C. X., Smith, U. (2007). Inflamed adipose tissue: A culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 27, 2276-2283.

Haber, C. A., Lam, T. K., Yu, Z., Gupta, N., Goh, T., Bogdanovic, E., Giacca, A., Fantus, I. G. (2003). N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.*, 285, E744-E753.

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

Haffner, S. M. (1998). The importance of hyperglycemia in the nonfasting state to the development of cardiovascular disease. *Endocr.Rev.*, 19, 583-592.

Haffner, S. M. (2006). The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.*, 97, 3A-11A.

Haffner, S. M., D'Agostino, R. Jr., Mykkänen, L., Tracy, R., Howard, B., Rewers, M., Selby, J., Savage, P. J., Saad, M. F. (1999). Insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. Relationship to cardiovascular risk factors: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care*, 22, 562-568.

Hales, C. N., Barker, D. J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35, 595-601.

Haider, D. G., Leuchten, N., Schaller, G., Gouya, G., Kolodjaschna, J., Schmetterer, L., Kapiotis, S., Wolzt, M. (2006). C-reactive protein is expressed and secreted by peripheral blood mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 146, 533-539.

Halton, T. L., Willett, W. C., Liu, S., Manson, J. E., Albert, C. M., Rexrode, K., Hu, F. B. (2006). Low-carbohydrate-diet score and the risk of coronary heart disease in women. *N. Engl. J. Med.*, 355, 1991-2002.

Han, J., Hajjar, D. P., Febbraio, M., Nicholson, A. C. (1997). Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J. Biol. Chem.*, 272, 21654-21659.

Hanley, A. J., Karter, A. J., Festa, A., D'Agostino, R. Jr., Wagenknecht, L. E., Savage, P., Tracy, R. P., Saad, M. F., Haffner, S. (2002). Factor analysis of metabolic syndrome using directly measured insulin sensitivity: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes*, 51, 2642-2647.

Hanley, A. J., Williams, K., Stern, M. P., Haffner, S. M. (2002). Homeostasis model assessment of insulin resistance in relation to the incidence of cardiovascular disease: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*, 25, 1177-1184.

Hansson, G. K., Jonasson, L., Lojsthed, B., Stemme, S., Kocher, O., Gabbiani, G. (1988). Localization of T lymphocytes and macrophages in fibrous and complicated human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 72, 135-141.

Hansson, L., Lindholm, L. H., Niskanen, L., Lanke, J., Hedner, T., Niklason, A., Luomanmäki, K., Dahlöf, B., de Faire, U., Mörlin, C., Karlberg, B. E., Wester, P. O., Björck, J. E. (1999). Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet*, 353, 611-616.

Harding, A. H., Day, N. E., Khaw, K. T., Bingham, S., Luben, R., Welsh, A., Wareham, N. J. (2004). Dietary fat and the risk of clinical type 2 diabetes: the European prospective investigation of Cancer-Norfolk study. *Am. J. Epidemiol.*, 159, 73-82.

Harnett, W., Harnett, M. M. (1999). Phosphorylcholine: friend or foe of the immune system? *Immunol. Today*, 20, 125-129.

Havel, P. J. (2002). Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr. Opin. Lipidol.*, 13, 51-59.

Hayashi, K., Shibata, K., Morita, T., Iwasaki, K., Watanabe, M., Sobue, K. (2004). Insulin receptor substrate-1/SHP-2 interaction, a phenotype-dependent switching machinery of insulin-like growth factor-I signaling in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.*, 279, 40807-40818.

Heart Protection Study Collaborative Group. (2002). MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet*, 360, 7-22.

Heidemann, C., Hoffmann, K., Spranger, J., Klipstein-Grobusch, K., Möhlig, M., Pfeiffer, A. F., Boeing, H. (2005). European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)--Potsdam Study Cohort. A dietary pattern protective against type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)--Potsdam Study cohort. *Diabetologia*, *48*, 1126-1134.

Heilbronn, L. K., Clifton, P. M. (2002). C-reactive protein and coronary artery disease: influence of obesity, caloric restriction and weight loss. *J. Nutr. Biochem.*, *13*, 316-321.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.*, *374*, 1-20.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. L., Graeve. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* *334*, 297-314.

Hennekens, C. H. (1997). Antioxidant vitamins and cardiovascular disease: current perspectives and future directions. *Eur. Heart. J.*, *18*, 177-179.

Hermann, T. S., Li, W., Dominguez, H., Ihlemann, N., Rask-Madsen, C., Major-Pedersen, A., Nielsen, D. B., Hansen, K. W., Hawkins, M., Kober, L., Torp-Pedersen, C. (2006). Quinapril treatment increases insulin-stimulated endothelial function and adiponectin gene expression in patients with type 2 diabetes. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, *91*, 1001-1008.

Hernandez Mijares, A., Jensen, M. D. (1995). Contribution of blood flow to leg glucose uptake during a mixed meal. *Diabetes*, *44*, 1165–1169.

Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Karin, M., & Hotamisligil, G. S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, *420*, 333-336.

Hodge, A. M., English, D. R., O'Dea, K., Sinclair, A. J., Makrides, M., Gibson, R. A., Giles, G. G. (2007). Plasma phospholipid and dietary fatty acids as predictors of type 2 diabetes: interpreting the role of linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.*, *86*, 189-197.

Hofmann, M. A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P., Neurath, M. F., Slattery, T., Beach, D., McClary, J., Nagashima, M., Morser, J., Stern, D., Schmidt, A. M. (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, *97*, 889-901.

Hollenberg, S., Klein, L., Parrillo, J., Scherer, M., Burns, D., Tamburro, P., Oberoi, M., Johnson, M. R., Costanzo, M. R. (2001). Coronary endothelial dysfunction after heart transplantation predicts allograft vasculopathy and cardiac death. *Circulation*, *104*, 3091-3096.

Holloszy, J. O., Fontana, L. (2007). Caloric restriction in humans. *Exp. Gerontol.*, *42*, 709-712.

Hoost, U., Kelbaek, H., Rasmussen, H., Court-Payen, M., Christensen, N. J., Pedersen-Bjergaard, U., Lorenzen, T. (1996). Haemodynamic effects of eating: the role of meal composition. *Clin. Sci. (Lond)*, *90*, 269-276.

Hotamisligil, G. S. (2000). Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, *24 Suppl 4*, S23-S27.

Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, *444*, 860-867.

Hotamisligil, G. S. (2005). Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes*, *54*, S73-S78.

Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, *259*, 87-91.

Howard, G., O'Leary, D. H., Zaccaro, D., Haffner, S., Rewers, M., Hamman, R., Selby, J. V., Saad, M. F., Savage, P., Bergman, R. (1996). Insulin sensitivity and atherosclerosis. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators. *Circulation*, *93*, 1809-1817.

Hsueh, W. A., Law, R. (2003). The central role of fat and effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on progression of insulin resistance and cardiovascular disease. *Am.J.Cardiol.*, *92*, 3J-9J.

Hsueh, W. A., Lyon, C. J., Quiñones, M. J. (2004). Insulin resistance and the endothelium. *Am.J.Med.*, 117, 109-117.

Hu, F. B., Stampfer, M. J., Haffner, S. M., Solomon, C. G., Willett, W. C., Manson, J. E. (2002). Elevated risk of cardiovascular disease prior to clinical diagnosis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 25, 1129-1134.

Hu, F. B., van Dam, R. M., Liu, S. (2001). Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia*, 44, 805-817.

Hu, R. M., Levin, E. R., Pedram, A., Frank, H. J. (1993). Insulin stimulates production and secretion of endothelin from bovine endothelial cells. *Diabetes*, 42, 351-358.

Hundal, R. S., Petersen, K. F., Mayerson, A. B., Randhawa, P. S., Inzucchi, S., Shoelson, S. E., Shulman, G. I. (2002). Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.*, 109, 1321-1326.

Iida, K. T., Suzuki, H., Sone, H., Shimano, H., Toyoshima, H., Yatch, S., Asano, T., Okuda, Y., Yamada, N. (2002). Insulin inhibits apoptosis of macrophage cell line, THP-1 cells, via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22, 380-386.

Imhof, A., Froehlich, M., Brenner, H., Boeing, H., Pepys, M. B., Koenig, W. (2001). Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet*, 357, 763-767.

Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H. Y., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., Hashimoto, T., Naruse, M., Sano, H., Utsumi, H., Nawata, H. (2000). High glucose level

and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, *49*, 1939-1945.

Itani, S. I., Ruderman, N. B., Schmedier, F., Boden, G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes*, *51*, 2005-2011.

Jialal, I., Crettaz, M., Hachiya, H. L., Kahn, C. R., Moses, A. C., Buzney, S. M., King, G. L. (1985). Characterization of the receptors for insulin and the insulin-like growth factors on micro- and macrovascular tissues. *Endocrinology*, *117*, 1222-1229.

Jialal, I., Devaraj, S., Venugopal, S. K. (2004). C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis? *Hypertension*, *44*, 6-11.

Joannides, R., Haefeli, W. E., Linder, L., Richard, V., Bakkali, E. H., Thuillez, C., Lüscher, T. F. (1995). Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*, *91*, 1314-1319.

Johnson, P. R., Hirsch, J. (1972). Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice. *J. Lipid Res.*, *13*, 2-11.

Kahn, S. E., Zinman, B., Haffner, S. M., O'Neill, M. C., Kravitz, B. G., Yu, D., Freed, M. I., Herman, W. H., Holman, R. R., Jones, N. P., Lachin, J. M., Viberti, G. C.; ADOPT Study Group. (2006). The ADOPT Study Group. Obesity is a major determinant of the association of C-reactive protein levels and the metabolic syndrome in type 2 diabetes. *Diabetes*, *55*, 2357-2364.

Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., Karin, M. (2005). Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*, 120, 649-661.

Kang, D. H., Park, S. K., Lee, I. K., Johnson, R. J. (2005). Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16, 3553-3562.

Kang, J. X., Leaf, A. (2000). Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 202S-207S.

Kardys, I., Knetsch, A. M., Bleumink, G. S., Deckers, J. W., Hofman, A., Stricker, B. H., Witteman, J. C. (2006). C-reactive protein and risk of heart failure. The Rotterdam Study. *Am. Heart J.*, 152, 514-520.

Karelis, A. D., Faraj, M., Bastard, J. P., St-Pierre, D. H., Brochu, M., Prud'homme, D., Rabasa-Lhoret, R. (2005). The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90, 4145-4150.

Karelis, A. D., St-Pierre, D. H., Conus, F., Rabasa-Lhoret, R., Poehlman, E. T. (2004). Metabolic and body composition factors in subgroups of obesity: what do we know? *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89, 2569-2575.

Keaney, J.F., Jr., Larson, M. G., Vasan, R. S., Wilson, P. W., Lipinska, I., Corey, D., Massaro, J. M., Sutherland, P., Vita, J. A., Benjamin, E. J.; Framingham Study. (2003). Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, *23*, 434-439.

Keech, A., Colquhoun, D., Best, J., Kirby, A., Simes, R. J., Hunt, D., Hague, W., Beller, E., Arulchelvam, M., Baker, J., Tonkin, A., LIPID Study Group. (2003). Secondary prevention of cardiovascular events with long-term pravastatin in patients with diabetes or impaired fasting glucose: results from the LIPID trial. *Diabetes Care*, *26*, 2713-2721.

Keller, C., Keller, P., Giralt, M., Hidalgo, J., Pedersen, B. K. (2004). Exercise normalises overexpression of TNF-alpha in knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *321*, 179–182.

Kelley, D., Mitrakou, A., Marsh, H., Schwenk, F., Benn, J., Sonnenberg, G., Arcangeli, M., Aoki, T., Sorensen, J., Berger, M., Sonksen, P., Gerich, J. (1988). Skeletal muscle glycolysis, oxidation, and storage of an oral glucose load. *J. Clin. Invest.*, *81*, 1563-1571.

Kelley, D. E., Mokan, M., Mandarino, L. J. (1992). Intracellular defects in glucose metabolism in obese patients with NIDDM. *Diabetes*, *41*, 698-706.

Kendall, D. M., Sobel, B. E., Coulston, A. M., Peters Harmel, A. L., McLean, B. K., Peragallo-Dittko, V., Buse, J. B., Fonseca, V. A., Hill, J. O., Nesto, R. W., Sunyer, F. X. (2003). The insulin resistance syndrome and coronary artery disease. *Coron. Artery Dis.*, *14*, 335-348.

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

Kershaw, E. E., Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89, 2548-2556.

Khoo, J. C., Miller, E., McLoughlin, P., Steinberg, D. (1988). Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis*, 8, 348-358.

Khreiss, T., Jozsef, L., Potempa, L. A., Filep J. G. (2004). Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells. *Circulation*, 109, 2016-2022.

Kim, F., Tysseling, K. A., Rice, J., Pham, M., Haji, L., Gallis, B. M., Baas, A. S., Paramsothy, P., Giachelli, C. M., Corson, M. A., Raines, E. W. (2005). Free fatty acid impairment of nitric oxide production in endothelial cells is mediated by IKKbeta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25, 989-994.

Kim, J. A., Montagnani, M., Koh, K. K., Quon, M. J. (2006). Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: Molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*, 113, 1888-1904.

Kim, J. A., Yeh, D. C., Ver, M., Li, Y., Carranza, A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Harrington, M. A., Quon, M. J. (2005). Phosphorylation of Ser24 in the pleckstrin homology domain of insulin receptor substrate-1 by Mouse Pelle-like kinase/interleukin-1

receptor-associated kinase: cross-talk between inflammatory signaling and insulin signaling that may contribute to insulin resistance. *J.Biol.Chem.*, 280, 23173-23183.

King, D. E., Carek, P., Mainous, A. G. III., Pearson, W. S. (2003). Inflammatory markers and exercise: differences related to exercise type. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35, 575–581.

King, D. E., Mainous, A. G., Buchanan, T. A., Pearson, W. S. (2003). C-reactive protein and glycemic control in adults with diabetes. *Diabetes Care*, 26, 1535-1539.

King, G. L., Buzney, S. M., Kahn, C. R., Hetu, N., Buchwald, S., Macdonald, S. G., Rand, L. I. (1983). Differential responsiveness to insulin of endothelial and support cells from micro- and macrovessels. *J.Clin.Invest.*, 71, 974-979.

King, G. L., Hachiya, H. I., Kwok, C. F. (1990). Characterization of the effects of insulin, IGF, and hyperglycemia on the metabolism and function of vascular endothelial cells. In *Endothelial Cell Function in Diabetic Microangiopathy*, Molinatti GM, Bar RS, Belfiore F, Porta M (eds). Karger: Basel, 86-89.

Kirstein, M., Brett, J., Radoff, S., Ogawa, S., Stern, D., Vlassara H. (1990). 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.

Klover, P. J., Zimmers, T. A., Koniaris, L. G., Mooney, R. A. (2003). Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes*, 52, 2784-2789.

Kluft, C., de Maat, M. P. M. (2003). Genetics of C-reactive protein: new possibilities and complications. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23, 1956-1959.

Knoops, K. T., de Groot, L. C., Kromhout, D., Perrin, A. E., Moreiras-Varela, O., Menotti, A., van Staveren, W. A. (2004). Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA*, 292, 1433-1439.

Knowler, W. C., Pettitt, D. J., Saad, M. F., Bennett, P. H. (1990). Diabetes mellitus in the Pima Indians: incidence, risk factors and pathogenesis. *Diabetes. Metab. Rev.*, 6, 1-27.

Kobayashi, S., Inoue, N., Ohashi, Y., Terashima, M., Matsui, K., Mori, T., Fujita, H., Awano, K., Kobayashi, K., Azumi, H., Ejiri, J., Hirata, K., Kawashima, S., Hayashi, Y., Yokozaki, H., Itoh, H., Yokoyama, M. (2003). Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23, 1398-1404.

Kobayashi T., Kamata, K. (2002). Short-term insulin treatment and aortic expressions of IGF-1 receptor and VEGF mRNA in diabetic rats. *Am.J.Physiol.Heart.Circ.Physiol.*, 283, H1761-H1768.

Koenig, W., Sund, M., Fröhlich, M., Fischer, H. G., Löwel, H., Döring, A., Hutchinson, W. L., Pepys, M. B. (1999). C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation*, 99, 237-242.

Koh, K. K., Han, S. H., Quon, M. J. (2005). Inflammatory markers and the metabolic syndrome: Insights from therapeutic interventions. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 46, 1978-1985.

Kopp, H. P., Kopp, C. W., Festa, A., Krzyzanowska, K., Kriwanek, S., Minar, E., Roka, R., Schernthaner, G. (2003). Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23, 1042-1047.

Koppes, L. L., Dekker, J. M., Hendriks, H. F., Bouter, L. M., Heine, R. J. (2005). Moderate alcohol consumption lowers the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective observational studies. *Diabetes Care*, 28, 719-725.

Koya, D., King, G. L. (1998). Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 47, 859-866.

Kraegen, E. W., Cooney, G. J. (2008). Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Curr. Opin. Lipidol.*, 19, 235-41.

Krook, A., Brueton, L., O'Rahilly, S. (1993). Homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene in infant with leprechaunism. *Lancet*, 342, 277-278.

Krotkiewski, M., Bjorntorp, P., Sjostrom, L., and Smith, U. (1983). Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J. Clin. Invest.*, 72, 1150-1162.

Kubis, N., Richer, C., Domergue, V., Giudicelli, J. F., Levy, B. I. (2002). Role of microvascular rarefaction in the increased arterial pressure in mice lacking for the endothelial nitric oxide synthase gene (*enos3pt^{-/-}*). *J. Hypertens.*, 20, 1581-1587.

Kuboki, K., Jiang, Z. Y., Takahara, N., Ha, S. W., Igarashi, M., Yamauchi, T., Feener, E. P., Herbert, T. P., Rhodes, C. J., King, G. L. (2000). Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation*, 101, 676-681.

Kuroda, S., Uzu, T., Fujii, T., Nishimura, M., Nakamura, S., Inenaga, T., Kimura, G. (1999). Role of insulin resistance in the genesis of sodium sensitivity in essential hypertension. *J.Hum.Hypertens.*, 13, 257-262.

Kushner, I., Jiang, S. L., Zhang, D., Lozanski, G., Samols, D. (1995). Do post-transcriptional mechanisms participate in induction of C-reactive protein and serum amyloid A by IL-6 and IL-1? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 762, 102-107.

Kushner, I., Kaplan, M.H. (1961). Studies of acute phase protein. I. An immunohistochemical method for the localization of C-reactive protein in rabbits. Association with necrosis in local inflammatory lesions. *J. Exp. Med.*, 114, 961-973.

Kuta, A. E., Baum, L. L. (1986). C-reactive protein is produced by a small number of normal human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 164, 321-326.

Laimer, M., Ebenbichler, C. F., Kaser, S., Sandhofer, A., Weiss, H., Nehoda, H., Aigner, F., Patsch, J. R. (2002). Markers of chronic inflammation and obesity: a prospective

study on the reversibility of this association in middle-aged women undergoing weight loss by surgical intervention. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 26, 659-662.

Lakka, H. M., Laaksonen, D. E., Lakka, T. A., Niskanen, L. K., Kumpusalo, E., Tuomilehto, J., Salonen, J. T. (2002). The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*, 288, 2709-2716.

Lau, D. C., Yan, H., Dhillon, B. (2006). Metabolic syndrome: a marker of patients at high cardiovascular risk. *Can. J. Cardiol.*, 22, 85B-90B.

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

Lawlor, D. A., Smith, G. D., Ebrahim, S. (2006). Does the new International Diabetes Federation definition of the metabolic syndrome predict CHD any more strongly than older definitions? Findings from the British Women's Heart and Health Study. *Diabetologia*, 49, 41-48.

Le Gouill, E., Jimenez, M., Binnert, C., Jayet, P. Y., Thalmann, S., Nicod, P., Scherrer, U., Vollenweider, P. (2007). Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) knockout mice have defective mitochondrial beta-oxidation. *Diabetes*, 56, 2690-2696.

Lee, J. M., Okumura, M. J., Davis, M. M., Herman, W. H. Gurney, J. G. (2006). Prevalence and determinants of insulin resistance among US adolescents: a population-based study. *Diabetes Care*, 29, 2427-2432.

Lee, J. S., Pinnamaneni, S. K., Eo, S. J., Cho, I. H., Pyo, J. H., Kim, C. K., Sinclair, A. J., Febbraio, M. A, Watt, M. J. (2006). Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites. *J. Appl. Physiol.*, 100, 1467-1474.

Lehr, H. A. (2000). Microcirculatory dysfunction induced by cigarette smoking. *Microcirculation.*, 7, 367-84.

Levitan, E. B., Song, Y., Ford, E. S., Liu, S. (2004). Is nondiabetic hyperglycemia a risk factor for cardiovascular disease? A meta-analysis of prospective studies. *Arch. Intern. Med.*, 164, 2147-2155.

Lewis, G. F., Uffelman, K. D., Szeto, L. W., Weller, B., Steiner, G. (1995). 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.

Li, L., Roumeliotis, N., Sawamura, T., Renier, G. (2004). C-reactive protein enhances LOX-1 expression in human aortic endothelial cells: relevance of LOX-1 to C-reactive protein-induced endothelial dysfunction. *Circ. Res.* 95, 877-883.

Li, X.N., Grenett, H. E., Benza, R. L., Demissie, S., Brown, S. L., Tabengwa, E. M., Gianturco, S. H., Bradley, W. A., Fless, G. M., Booyse, F. M. (1997). Genotype-specific transcriptional regulation of PAI-1 expression by hypertriglyceridemic VLDL and Lp(a) in cultured human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17, 3215-3223.

Li, X. N., Song, J., Zhang, L., LeMaire, S. A., Hou, X., Zhang, C., Coselli, J. S., Chen, L., Wang, X. L., Zhang, Y., Shen, Y. H. (2009). Activation of the AMPK-FOXO3 pathway reduces fatty acid-induced increase in intracellular reactive oxygen species by upregulating thioredoxin. *Diabetes*, *58*, 2246-2257.

Liang, C. P., Han, S., Okamoto, H., Carnemolla, R., Tabas, I., Accili, D., Tall, A. R. (2004). Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages. *J.Clin.Invest.*, *113*, 764-773.

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

Libby, P., Ridker, P. M. (2004). Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment. *Am. J. Med.*, *116*, 9S-16S.

Lin, Y., Berg, A. H., Iyengar, P., Lam, T. K., Giacca, A., Combs, T. P., Rajala, M. W., Du, X., Rollman, B., Li, W., Hawkins, M., Barzilai, N., Rhodes, C. J., Fantus, I. G., Brownlee, M., Scherer, P. E. (2005). The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.*, *280*, 4617-4626.

Liu, W., Liu, Y., Lowe, Jr. W. L. (2001). The role of phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein kinases in insulin-like growth factor-I-mediated effects in vascular endothelial cells. *Endocrinology*, *142*, 1710-1719.

Long, S. D., Pekala, P. H. (1996). Regulation of Glut4 gene expression by arachidonic acid. Evidence for multiple pathways, one of which requires oxidation to prostaglandin E2. *J. Biol. Chem.*, *271*, 1138-1144.

Lopez-Garcia, E., Schulze, M. B., Manson, J. E., Meigs, J. B., Albert, C. M., Rifai, N., Willett, W. C., Hu, F. B. (2004). Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. *J. Nutr.*, *134*, 1806-1811.

Loscalzo, J. (1992). Antiplatelet and antithrombotic effects of organic nitrates. *Am.J.Cardiol.*, *70*, 18B-22B.

Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, *407*, 233-241.

Maddux, B. A., See, W., Lawrence, J. C. Jr., Goldfine, A. L., Goldfine, I. D., Evans, J. L. (2001). Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes*, *50*, 404-410.

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

Manolov, D. E., Koenig, W., Hombach, V., Torzewski, J. (2003). C-reactive protein and atherosclerosis—is there a causal link? *Histol. Histopathol.*, *18*, 1189-1193.

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

Massi-Benedetti, M., Federici, M. O. (1999). Cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: the role of hyperglycaemia. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.*, 107 Suppl 4, S120-S123.

Mattusch, F., Dufaux, B., Heine, O., Mertens, I., Rost, R. (2000). Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training. *Int. J. Sports Med.* 21, 21–24.

Mauger, J. F., Lévesque, J., Paradis, M. E., Bergeron, N., Tchernof, A., Couture, P., Lamarche, B. (2008). Intravascular kinetics of C-reactive protein and their relationships with features of the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93, 3158-3164.

Mazzone, T., Meyer, P. M., Feinstein, S. B., Davidson, M. H., Kondos, G. T., D'Agostino, R. B. Sr., Perez, A., Provost, J. C., Haffner, S. M. (2006). Effect of pioglitazone compared with glimepiride on carotid intima-media thickness in type 2 diabetes: a randomized trial. *JAMA*, 296, 2572-2581.

McGill, H. C. Jr., McMahan, C. A., Herderick, E. E., Zieske, A. W., Malcom, G. T., Tracy, R. E., Strong, J. P. (2002). Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation*, 105, 2712-2718.

McKeown, N. M., Meigs, J. B., Liu, S., Saltzman, E., Wilson, P. W., Jacques, P. F. (2004). Carbohydrate nutrition, insulin resistance, and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort. *Diabetes Care*, *27*, 538-546.

Medzhitov R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, *1*, 135–145.

Meigs, J. B., Hu, F. B., Rifai, N., Manson, J. E. (2004). Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, *291*, 1978-1986.

Meigs, J. B., O'donnell, C. J., Tofler, G. H., Benjamin, E. J., Fox, C. S., Lipinska, I., Nathan, D. M., Sullivan, L. M., D'Agostino, R. B., Wilson, P. W. (2006). Hemostatic markers of endothelial dysfunction and risk of incident type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes*, *55*, 530-537.

Meigs, J. B., Wilson, P. W., Fox, C. S., Vasan, R. S., Nathan, D. M., Sullivan, L. M., D'Agostino, R. B. (2006). Body mass index, metabolic syndrome, and risk of type 2 diabetes or cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *91*, 2906-2912.

Messier, V., Karelis, A. D., Robillard, M. E., Bellefeuille, P., Brochu, M., Lavoie, J. M., Rabasa-Lhoret, R. (2010). Metabolically healthy but obese individuals: relationship with hepatic enzymes. *Metabolism*, *59*, 20-24.

Meyer, K. A., Kushi, L. H., Jacobs, D. R. Jr., Folsom, A. R. (2001). Dietary fat and incidence of type 2 diabetes in older Iowa women. *Diabetes Care*, *24*, 1528-1535.

Miele, C., Riboulet, A., Maitan, M. A., Oriente, F., Romano, C., Formisano, P., Giudicelli, J., Beguinot, F., Van Obberghen, E. (2003). Human glycosylated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced insulin receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C α -mediated mechanism. *J.Biol.Chem.*, 278, 47376-47387.

Mikhail, N. (2009). The metabolic syndrome: insulin resistance. *Curr. Hypertens. Rep.*, 11, 156-158.

Milewicz, A., Tworowska, U., Demissie, M. (2001). Menopausal obesity--myth or fact? *Climacteric.*, 4, 273-283.

Mittendorfer, B., Liem, O., Patterson, B. W., Miles, J. M., Klein, S. (2003). What does the measurement of whole-body fatty acid rate of appearance in plasma by using a fatty acid tracer really mean? *Diabetes*, 52, 1641-1648.

Mold, C., Gewurz, H., Du Clos, T. W. (1999). Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology*, 42, 23-30.

Montagnani, M., Chen, H., Barr, V. A., Quon, M. J. (2001). Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca^{2+} but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J.Biol.Chem.*, 276, 30392-30398.

Montagnani, M., Golovchenko, I., Kim, I., Koh, G. Y., Goalstone, M. L., Mundhekar, A. N., Johansen, M., Kucik, D. F., Quon, M. J., Draznin, B. (2002). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J.Biol.Chem.*, 277, 1794-1799.

Montagnani, M., Ravichandran, L. V., Chen, H., Esposito, D. L., Quon, M. J. (2002). Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells. *Mol.Endocrinol.*, 16, 1931-1942.

Monti, L. D., Setola, E., Fragasso, G., Camisasca, R. P., Lucotti, P., Galluccio, E., Origgi, A., Margonato, A., Piatti, P. (2006). Metabolic and endothelial effects of trimetazidine on forearm skeletal muscle in patients with type 2 diabetes and ischemic cardiomyopathy. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.*, 290, E54-E59.

Montonen, J., Knekt, P., Härkänen, T., Järvinen, R., Heliövaara, M., Aromaa, A., Reunanen, A. (2005). Dietary patterns and the incidence of type 2 diabetes. *Am. J. Epidemiol.*, 161, 219-227.

Mozaffarian, D., Pischon, T., Hankinson, S. E., Rifai, N., Joshipura, K., Willett, W. C., Rimm, E. B. (2004). Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79, 606-612.

Mugabo, Y., Li, L., Renier, G. (2010). The Connection Between C-Reactive Protein (CRP) and Diabetic Vasculopathy. Focus on Preclinical Findings. *Curr. Diabetes Rev.*, 6, 27-34.

Muniyappa, R., Iantorno, M., Quon, M. J. (2008). An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, 37, 685-711.

Muniyappa, R., Montagnani, M., Koh, K. K., Quon, M. J. (2007). Cardiovascular actions of insulin. *Endocr.Rev.*, 28, 463-491.

Nakanishi, N., Yoshida, H., Matsuo, Y., Suzuki, K., Tataru, K. (2002). White blood-cell count and the risk of impaired fasting glucose or type II diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetologia*, 45, 42-48.

Nappo, F., Esposito, K., Cioffi, M., Giugliano, G., Molinari, A. M., Paolisso, G., Marfella, R., Giugliano, D. (2002). Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 39, 1145-1150.

Navab, M., Berliner, J. A., Watson, A. D., Hama, S. Y., Territo, M. C., Lusis, A. J., Shih, D. M., Van Lenten, B. J., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., Fogelman, A. M. (1996). The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 16, 831-842.

Nguyen, M. T., Satoh, H., Favelyukis, S., Babendure, J. L., Imamura, T., Sbodio, J. I., Zalevsky, J., Dahiyat, B. I., Chi, N. W., Olefsky, J. M. (2005). JNK and tumor necrosis factor- α mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J.Biol.Chem.*, 280, 35361-35371.

Nigro, J., Osman, N., Dart, A. M., Little P. J. (2006). Insulin Resistance and Atherosclerosis. *Endocrine Reviews*, 27, 242-259.

Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H. P., Giardino, I., Brownlee, M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, *404*, 787-790.

Nissen, S. E., Tuzcu, E. M., Schoenhagen, P., Crowe, T., Sasiela, W. J., Tsai, J., Orazem, J., Magorien, R. D., O'Shaughnessy, C., Ganz, P. (2005). Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.*, *352*, 29-38.

Nordestgaard, B.G., Agerholm-Larson, B., Stender, S. (1997). Effect of exogenous hyperinsulinaemia on atherogenesis in cholesterol-fed rabbits. *Diabetologia*, *40*, 512-520.

Nystrom, F. H., Quon, M. J. (1999). Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell Signal*, *11*, 563-574.

Ochrietor, J. D., Harrison, K. A., Zahedi, K., Mortensen, R. F. (2000). Role of STAT3 and C/EBP in cytokine-dependent expression of the mouse serum amyloid P-component (SAP) and C-reactive protein (CRP) genes. *Cytokine*, *12*, 888-899.

Ohlson, L. O., Larsson, B., Svärdsudd, K., Welin, L., Eriksson, H., Wilhelmsen, L., Björntorp, P., Tibblin, G. (1985). The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes*, *34*, 1055-1058.

Oliveira, E.B., Gotschlich, E.C., Liu, T.-Y. (1980). Comparative studies on the binding properties of human and rabbit C-reactive proteins. *J. Immunol.*, 124,1396-1402.

Orchard, T. J. (1999). Glycemic control and CAD risk: a heretical thought. *Diabetes Care*, 22, 1220.

Orchard, T. J., Eichner, J., Kuller, L. H., Becker, D. J., McCallum, L. M., Grandits, G. A. (1994). Insulin as a predictor of coronary heart disease: interaction with apolipoprotein E phenotype. A report from the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Ann.Epidemiol.*, 4, 40-45.

Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Nakamura, T., Nishida, M., Kumada, M., Okamoto, Y., Ohashi, K., Nagaretani, H., Kishida, K., Nishizawa, H., Maeda, N., Kobayashi, H., Hiraoka, H., Matsuzawa, Y. (2003). Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation*, 107, 671-674.

Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 306, 457-461.

Paffen, E., DeMaat, M. P. (2006). C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor? *Cardiovasc. Res.*, 71, 30-39.

Pajvani, U. B. , Hawkins, M. , Combs, T. P. , Rajala, M. W., Doebber, T., Berger, J. P., Wagner, J. A., Wu, M., Knopps, A., Xiang, A. H., Utzschneider, K. M., Kahn, S. E., Olefsky, J. M., Buchanan, T. A., Scherer, P. E. (2004). Complex distribution, not

absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J. Biol. Chem.*, 279, 12152 – 12162.

Palinski, W., Rosenfeld, M. E., Ylä-Herttuala, S., Gurtner, G. C., Socher, S. S., Butler, S. W., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Steinberg, D., Witztum, J. L. (1989). Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 86, 1372-1376.

Palinski, W., Ylä-Herttuala, S., Rosenfeld, M. E., Butler, S. W., Socher, S. A., Parthasarathy, S., Curtiss, L. K., Witztum, J. L. (1990). Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. *Arteriosclerosis*, 10, 325-335.

Palusinski, R. P., Vaisman, D., Pasceri, V. (2002). Synergy between CD14 and C-reactive protein in endothelial cell activation. *Circulation*, 106 (suppl II):II-2634. Abstract.

Panagiotakos, D., Pitsavos, C., Chrysohoou, C., Palliou, K., Lentzas, I., Skoumas, I., Stefanadis, C. (2009). Dietary patterns and 5-year incidence of cardiovascular disease: a multivariate analysis of the ATTICA study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 19, 253-263.

Pannacciulli, N., Cantatore, F. P., Minenna, A., Bellacicco, M., Giorgino, R., De Pergola, G. (2001). Urinary albumin excretion is independently associated with C-reactive protein levels in overweight and obese nondiabetic premenopausal women *J. Intern. Med.*, 250, 502-507.

Paoletti, R., Bolego, C., Poli, A., Cignarella, A. (2006). Metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Vasc. Health. Risk. Manag.*, 2, 145-152.

Paradisi, G., Steinberg, H. O., Hempfling, A., Cronin, J., Hook, G., Shepard, M. K., Baron, A. D. (2001). Polycystic ovary syndrome is associated with endothelial dysfunction. *Circulation*, *103*, 1410-1415.

Pasceri, V., Cheng, J. S., Willerson, J. T., Yeh, E. T. (2001). Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation*, *103*, 2531-2534.

Pasceri, V., Willerson, J. T., Yeh, E. T. (2000). Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*, *102*, 2165-2168.

Pearson, T. A., Mensah, G. A., Alexander, R. W., Anderson, J. L., Cannon, R. O. 3rd, Criqui, M., Fadl, Y. Y., Fortmann, S. P., Hong, Y., Myers, G. L., Rifai, N., Smith, S. C. Jr., Taubert, K., Tracy, R. P., Vinicor, F. (2003). Markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. A statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation*, *107*, 499-511.

Pedersen, B. K., Fischer, C. P. (2007). Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. *10*, 265–271.

Peng, N., Liu, J. T., Gao, D. F., Lin, R., Li, R. (2007). Angiotensin II-induced C-reactive protein generation: inflammatory role of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *193*, 292-298.

Pepys, M. B., Baltz, M. L. (1983). Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv. Immunol.*, *34*, 141-212.

Pepys, M. B., Hirschfield, G. M., Tennent, G. A., Gallimore, J. R., Kahan, M. C., Bellotti, V., Hawkins, P. N., Myers, R. M., Smith, M. D., Polara, A., Cobb, A. J., Ley, S. V., Aquilina, J. A., Robinson, C. V., Sharif, I., Gray, G. A., Sabin, C. A., Jenvey, M. C., Kolstoe, S. E., Thompson, D., Wood, S. P. (2006). Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. *Nature*, *440*, 1217-1221.

Pepys, M.B., Rowe, I.F., Baltz, M.L. (1985). C-reactive protein: binding lipids and lipoproteins. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, *27*, 83-111.

Perticone, F., Maio, R., Sciacqua, A., Andreozzi, F., Iemma, G., Perticone, M., Zoccali, C., Sesti, G. (2008). Endothelial dysfunction and C-reactive protein are risk factors for diabetes in essential hypertension. *Diabetes*, *57*, 167-171.

Petersen, A. M., Pedersen, B. K. (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *J. Appl. Physiol.*, *98*, 1154–1162.

Petersen, K. F., Dufour, S., Befroy, D., Lehrke, M., Hendler, R. E., Shulman, G. I. (2005). Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, *54*, 603-608.

Petersen, K. F., Shulman, G. I. (2006). Etiology of insulin resistance. *Am. J. Med.*, 119, S10-S16.

Piatti, P. M., Monti, L. D., Conti, M., Baruffaldi, L., Galli, L., Phan, C. V., Guazzini, B., Pontiroli, A. E., Pozza, G. (1996). Hypertriglyceridemia and hyperinsulinemia are potent inducers of endothelin-1 release in humans. *Diabetes*, 45, 316-321.

Pischon, T., Hankinson, S. E., Hotamisligil, G. S., Rifai, N., Willett, W. C., Rimm, E. B. (2003). Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women. *Circulation*, 108, 155-160.

Pittas, A. G., Joseph, N. A., Greenberg, A. S. (2004). Adipocytokines and insulin resistance. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 89, 447-452.

Potenza, M. A., Marasciulo, F. L., Chieppa, D. M., Brigiani, G. S., Formoso, G., Quon, M. J., Montagnani, M. (2005). Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.*, 289, H813-H822.

Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E., Ridker, P. M. (2001). C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, 286, 327-334.

Pradhan, A. D., Ridker, P. M. (2002). Do atherosclerosis and type 2 diabetes share a common inflammatory basis? *Eur. Heart. J.*, 23, 831-834.

- Preiss-Landl, K., Zimmermann, R., Hammerle, G., Zechner, R., (2002). Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr.Opin.Lipidol.*, 13, 471-481.
- Prentki, M., Nolan, C. J. (2006). Islet β cell failure in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.*, 116, 1802-1812.
- Prince, R.L., Larkins, R.G., Alford, F.P. (1981). The effect of acetylsalicylic acid on plasma glucose and the response of glucose regulatory hormones to intravenous glucose and arginine in insulin treated diabetics and normal subjects. *Metabolism*, 30, 293-298.
- Pyorala, K. (1979). Relationship of glucose tolerance and plasma insulin to the incidence of coronary heart disease: results from two population studies in Finland. *Diabetes*, 2, 131-141.
- Quagliaro, L., Piconi, L., Assaloni, R., Da Ros, R., Maier, A., Zuodar, G., Ceriello, A. (2005). Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production. *Atherosclerosis*, 183, 259-267.
- Quehenberger, P., Bierhaus, A., Fasching, P., Muellner, C., Klevesath, M., Hong, M., Stier, G., Sattler, M., Schleicher, E., Speiser, W., Nawroth, P. P. (2000). Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor- κ B in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes*, 49, 1561-1570.

Radomski, M. W., Moncada, S. (1993). The biological and pharmacological role of nitric oxide in platelet function. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 344, 251-264.

Rajala, M. W., Scherer, P. E. (2003). Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*. 144, 3765-3773.

Rallidis, L. S., Paschos, G., Liakos, G. K., Velissaridou, A. H., Anastasiadis, G., Zampelas, A. (2003). Dietary alpha-linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis*, 167, 237-242.

Rask-Madsen, C., Dominguez, H., Ihlemann, N., Hermann, T., Kober, L., Torp-Pedersen, C. (2003). Tumor necrosis factor-alpha inhibits insulin's stimulating effect on glucose uptake and endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation*, 108, 1815-1821.

Rask-Madsen, C., Ihlemann, N., Krarup, T., Christiansen, E., Kober, L., Nervil Kistorp, C., Torp-Pedersen, C. (2001). Insulin therapy improves insulin-stimulated endothelial function in patients with type 2 diabetes and ischemic heart disease. *Diabetes*, 50, 2611-2618.

Razani, B., Chakravarthy, M. V., Semenkovich, C. F. (2008). Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*,37, 603-621.

Reaven, G. (1988). Banting Lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37, 1595-1607.

Reaven, G. (2002). Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation*, *106*, 286-288.

Reaven, G. M., Hollenbeck, C., Jeng, C-Y., Wu, M. S., Chen, Y. D. (1988). Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes*, *37*, 1020-1024.

Reaven, G. M., Lithell, H., Landsberg, L. (1996). Hypertension and associated metabolic abnormalities-the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N. Engl. J. Med.*, *334*, 374-381.

Resnick, H. E., Jones, K., Ruotolo, G., Jain, A. K., Henderson, J., Lu, W., Howard, B. V. (2003). Insulin resistance, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular disease in nondiabetic american indians: the Strong Heart Study. *Diabetes Care*, *26*, 861-867.

Reusch, J. E. (2003). Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: what is it about glucose? *J.Clin.Invest.*, *112*, 986-988.

Reusch JE, Bhuripanyo P, Carel K, Leitner JW, Hsieh P, DePaolo D, Draznin B (1995). Differential requirement for p21ras activation in the metabolic signaling by insulin. *J. Biol. Chem.*, *270*, 2036-2040.

Reynolds GD, Vance RP. (1987). C-reactive protein immunohistochemical localization in normal and atherosclerotic human aortas. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, *111*, 265-269.

Richardson, D. K., Kashyap, S., Bajaj, M., Cusi, K., Mandarino, S. J., Finlayson, J., DeFronzo, R. A., Jenkinson, C. P., Mandarino, L. J. (2005). Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increase the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, *280*, 10290-10297.

Richardson, P. D., Davies, M. J., Born, G. V. (1989). Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet*, *2*, 941-944.

Ridker, P. M., Cannon, C. P., Morrow, D., Rifai, N., Rose, L. M., McCabe, C. H., Pfeffer, M. A., Braunwald, E., Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 (PROVE IT-TIMI 22) Investigators. (2005). C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N.Engl.J.Med.*, *352*, 20-28.

Ridker, P. M., Cushman, M., Stampfer, M. J., Tracy, R. P., Hennekens, C. H. (1997). Inflammation, aspirin and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N. Engl. J. Med.*, *336*, 973-979.

Ridker, P. M., Danielson, E., Fonseca, F. A., Genest, J., Gotto, A. M. Jr., Kastelein, J. J., Koenig, W., Libby, P., Lorenzatti, A. J., MacFadyen, J. G., Nordestgaard, B. G., Shepherd, J., Willerson, J. T., Glynn, R. J.: JUPITER Study Group. (2008). Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N. Engl. J. Med.*, *359*, 2195-2207.

Ridker, P. M., Rifai, N., Clearfield, M., Downs, J. R., Weis, S. E., Miles, J. S., Gotto, A. M. Jr; Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study Investigators. (2001).

Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N.Eng.J.Med.*, 344, 1959-1965.

Ridker P.M, Rifai N., Rose L., Buring JE., Cook NR. (2002). Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.*, 347, 1557-65.

Ridker, P. M., Rifai, N., Stampfer, M. J., Hennekens, C. H. (2000). Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, 101, 1767-1772.

Ridker, P. M., Wilson, P. W., Grundy, S. M. (2004). Should C-reactive protein be added to metabolic syndrome and to assessment of global cardiovascular risk? *Circulation*, 109, 2818-2825.

Rifai, N., Ridker, P. M. (2002). Inflammatory markers and coronary heart disease. *Curr. Opin. Lipidol.*, 13, 383-389.

Rojas A., Romay S., Gonzalez D., Herrera B., Delgado R., Otero K. (2000). Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by albumin-derived advanced glycosylation end products. *Circ. Res.*, 86, E50-E54.

Rollins B.J., Walz A., Baggiolini M. (1991). Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood*, 78, 1112-1116.

Romano, M., Guagnano, M. T., Pacini, G., Vigneri, S., Falco, A., Marinopiccoli, M., Manigrasso, M. R., Basili, S., Davì, G. (2003). Association of inflammation markers with impaired insulin sensitivity and coagulative activation in obese healthy women. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 88, 5321-5326.

Rösen, P., Nawroth, P. P., King, G., Möller, W., Tritschler, H. J., Packer, L. (2001). The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab.Res.Rev.*, 17, 189-212.

Rosenfeld, M. E., Palinski, W., Ylä-Herttuala, S., Butler, S., Witztum, J. L. (1990). Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. *Arteriosclerosis*, 10, 336-349.

Ross, R. (1995). Cell biology of atherosclerosis. *Annu.Rev.Physiol.*, 57, 791-804.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N.Engl.J.Med.*, 340, 115-126.

Ross, R., Glomset, J. A. (1976). The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N.Engl.J.Med.*, 295, 369-377.

Ross, R., Glomset, J. A. (1976). The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N.Engl.J.Med.*, 295, 420-425.

Ross, R., Harker, L. (1976). Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science*, 193, 1094-1100.

Rossetti, L. (2000). Perspective: Hexosamines and nutrient sensing. *Endocrinology*, 141, 1922-1925.

Rudich, A., Tirosh, A., Potashnik, R., Hemi, R., Kanety, H., Bashan, N. (1998). Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, 47, 1562-1569.

Rutter, M. K., Meigs, J. B., Sullivan, L. M., D'Agostino, R. B. Sr., Wilson, P. W. (2005). Insulin resistance, the metabolic syndrome, and incident cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Diabetes*, 54, 3252-3257.

Ryan, A. S., Nicklas, B. J. (2004). Reductions in plasma cytokine levels with weight loss improve insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *Diabetes Care*, 27, 1699-1705.

Saely, C. H., Koch, L., Schmid, F., Marte, T., Aczel, S., Langer, P., Hoefle, G., Drexel, H. (2006). Adult Treatment Panel III 2001 but not International Diabetes Federation 2005 criteria of the metabolic syndrome predict clinical cardiovascular events in subjects who underwent coronary angiography. *Diabetes Care*, 29, 901-907.

Saltiel, A. R., Kahn, C. R. (2001). Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414, 799-806.

Samad, F., Yamamoto, K., Loskutoff, D. J. (1996). 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.

Samad, F., Yamamoto, K., Pandey, M., Loskutoff, D. J. (1997). Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. *Mol. Med.*, *3*, 37-48.

Samaha, F. F., Iqbal, N., Seshadri, P., Chicano, K. L., Daily, D. A., McGrory, J., Williams, T., Williams, M., Gracely, E. J., Stern, L. (2003). A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *N. Engl. J. Med.*, *348*, 2074-2081.

Sampson, M. J., Davies, I. R., Braschi, S., Ivory, K., Hughes, D. A. (2003). Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, *167*, 129-134.

Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., de Ancos, B., Plaza, L., Olmedilla, B., Granado, F., Martín, A. (2003). High-pressurized orange juice consumption affects plasma vitamin C, antioxidative status and inflammatory markers in healthy humans. *J. Nutr.*, *133*, 2204-2209.

Sano, T., Umeda, F., Hashimoto, T., Nawata, H., Utsumi, H. (1998). Oxidative stress measurement by in vivo electron spin resonance spectroscopy in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, *41*, 1355-1360.

Santomauro, A.T.M.G., Boden, G., Silva, M., Rocha, D. M., Santos, R. F., Ursich, M. J., Strassmann, P. G., Wajchenberg, B. L. (1999). Overnight lowering of free fatty acids with

acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes*, *48*, 1836-1841.

Sartipy, P., Loskutoff, D. J. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *100*, 7265-7270.

Schieffer, B., Luchtefeld, M., Braun, S., Hilfiker, A., Hilfiker-Kleiner, D., Drexler, H. (2000). Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. *Circ. Res.*, *87*, 1195-1201.

Schmidt, A. M., Hori, O., Brett, J., Yan, S. D., Wautier, J. L., Stern, D. (1994). Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler.Thromb.*, *14*, 1521-1528.

Schmidt, M.I., Duncan, B. B., Sharrett, A. R., Lindberg, G., Savage, P. J., Offenbacher, S., Azambuja, M. I., Tracy, R. P., Heiss, G. (1999). Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet*, *353*, 1649-1652.

Schneider, D. J., Sobel, B. E. (1991). Augmentation of synthesis of plasminogen activator inhibitor type 1 by insulin and insulin-like growth factor type I: implications for vascular disease in hyperinsulinemic states. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *88*, 9959-9963.

Schnyder, B., Pittet, M., Durand, J., Schnyder-Candrian, S. (2002). Rapid effects of glucose on the insulin signaling of endothelial NO generation and epithelial Na transport. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.*, 282, E87-E94.

Schulze, M. B., Rimm, E. B., Li, T., Rifai, N., Stampfer, M. J., Hu, F. B. (2004). C reactive protein and incident cardiovascular events among men with diabetes. *Diabetes Care*, 27, 889-94.

Schwartz, R., Osborne-Lawrence, S., Hahner, L., Gibson, L. L., Gormley, A. K., Vongpatanasin, W., Zhu, W., Word, R. A., Seetharam, D., Black, S., Samols, D., Mineo, C., Shaul, P. W. (2007). C-reactive protein downregulates endothelial NO synthase and attenuates reendothelialization *in vivo* in mice. *Circ.Res.*, 100, 1452-1459.

Schwartz, C. J., Valente, A. J., Sprague, E. A., Kelley, J. L., Nerem, R. M. (1991). The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin. Cardiol.*, 14, 11-16.

Scott, E. M., Greenwood, J. P., Vacca, G., Stoker, J. B., Gilbey, S. G., Mary, D. A. (2002). Carbohydrate ingestion, with transient endogenous insulinaemia, produces both sympathetic activation and vasodilatation in normal humans. *Clin.Sci. (Lond)* 102, 523–529.

Seip, M., Trygstad, O. (1996). Generalized lipodystrophy, congenital and acquired (lipoatrophy). *Acta. Paediatr. Suppl.*, 413, 2-28.

Shah, P. K. (2003). Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 41, 15S-22S.

Shai, I., Schwarzfuchs, D., Henkin, Y., Shahar, D. R., Witkow, S., Greenberg, I., Golan, R., Fraser, D., Bolotin, A., Vardi, H., Tangi-Rozental, O., Zuk-Ramot, R., Sarusi, B., Brickner, D., Schwartz, Z., Sheiner, E., Marko, R., Katorza, E., Thiery, J., Fiedler, G. M., Blüher, M., Stumvoll, M., Stampfer, M. J.; Dietary Intervention Randomized Controlled Trial (DIRECT) Group. (2008). Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N. Engl. J. Med.*, 359, 229-241.

Shamsuzzaman, A. S., Winnicki, M., Wolk, R., Svatikova, A., Phillips, B. G., Davison, D. E., Berger, P. B., Somers, V. K. (2004). Independent association between plasma leptin and C-reactive protein in healthy humans. *Circulation*, 109, 2181-2185.

Shankar, R. R., Wu, Y., Shen, H. Q., Zhu, J. S., Baron, A. D. (2000). Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes*, 49, 684-687.

Shi, A., Kokoeva, V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., Flier JS. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 116, 3015-3025.

Shih, D. M., Xia, Y. R., Wang, X. P., Miller, E., Castellani, L. W., Subbanagounder, G., Cheroutre, H., Faull, K. F., Berliner, J. A., Witztum, J. L., Lusis, A. J. (2000). Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.*, 275, 17527-17535.

Shoelson, S. 2002. Invited comment on W. Ebstein: on the therapy of diabetes mellitus, in particular on the application of sodium salicylate. *J. Mol. Med.* 80, 618-619.

Shoelson, S. E., Herrero, L., Naaz, A. (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*, 132, 2169-2180.

Shoelson, S. E., Lee, J., Goldfine, A. B. (2006). Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 116, 1793-1801.

Shoelson, S.E., Lee, J., Yuan, M. (2003). Inflammation and the IKK β /I κ B/NF- κ B axis in obesity and diet-induced insulin resistance. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 27, S49-S52.

Shrive, A. K., Cheetham, G. M., Holden, D., Myles, D. A., Turnell, W. G., Volanakis, J. E., Pepys, M. B., Bloomer, A. C., Greenhough, T. J. (1996). Three dimensional structure of human C-reactive protein. *Nat. Struct. Biol.*, 3, 346-354.

Singh, P., Hoffmann, M., Wolk, R., Shamsuzzaman, A. S. M., Somers, V. K. (2007). Leptin induces C-reactive protein expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 27, e302-e307.

Singh, U., Devaraj, S., Vasquez-Vivar, J., Jialal, I. (2007). C-reactive protein decreases endothelial nitric oxide synthase activity *via* uncoupling. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 43, 780-791.

So, W. Y., Ng, M. C., Lee, S. C., Sanke, T., Lee, H. K., Chan, J. C. (2000). Genetics of type 2 diabetes mellitus. *Hong. Kong. Med. J.*, 6, 69-76.

Soinio, M., Marniemi, J., Laakso, M., Lehto, S., Rönnemaa, T. (2006). High sensitivity C-reactive protein and coronary disease mortality in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 29, 329-333.

Song, Y., Manson, J. E., Tinker, L., Rifai, N., Cook, N. R., Hu, F. B., Hotamisligil, G. S., Ridker, P. M., Rodriguez, B. L., Margolis, K. L., Oberman, A., Liu, S. (2007). Circulating levels of endothelial adhesion molecules and risk of diabetes in an ethnically diverse cohort of women. *Diabetes*, 56, 1898-1904.

Souza, V., Escobar Mdel, C., Bucio, L., Hernández, E., Gómez-Quiroz, L. E., Gutiérrez Ruiz, M. C. (2009). NADPH oxidase and ERK1/2 are involved in cadmium induced-STAT3 activation in HepG2 cells. *Toxicol. Lett.*, 187, 180-186.

Spranger, J., Kroke, A., Möhlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M. M., Ristow, M., Boeing, H., Pfeiffer, A. F. (2003). Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*, 52, 812-817.

Staels, B., Fruchart J-C. (2005). Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*, 54, 2460-2470.

Staessen, J., Amery, A., Fagard, R. (1990). Isolated systolic hypertension in the elderly. *J. Hypertens.*, 8, 393-405.

Staiger, H., Staiger, K., Stefan, N., Wahl, H. G., Machicao, F., Kellerer, M., Häring, H. U. (2004). Palmitate-induced interleukin-6 expression in human coronary artery endothelial cells. *Diabetes*, 53, 3209-3216.

Stary, H. C. (2000). Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20, 1177-1178.

Statistique Canada. Enquête sur la santé dans les collectivités canadiennes. (2004). www.statcan.gc.ca

Steinberg, G. R. (2007). Inflammation in obesity is the common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance. *Cell Cycle.*, 6, 888-894.

Steinberg, H. O., Brechtel, G., Johnson, A., Fineberg, N., Baron, A. D. (1994). Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J. Clin. Invest.*, 94, 1172-1179.

Steinberg, H. O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A., Brechtel, G., Baron, A. D. (1996). Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 97, 2601-2610.

Steinberg, H. O., Tarshoby, M., Monestel, R., Hook, G., Cronin, J., Johnson, A., Bayazeed, B., Baron, A. D. (1997). Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *J. Clin. Invest.*, 100, 1230-1239.

Stefan, N., Kantartzis, K., Machann, J., Schick, F., Thamer, C., Rittig, K., Balletshofer, B., Machicao, F., Fritsche, A., Häring, H. U. (2008). Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch. Intern. Med.*, 168, 1609-1616.

Stewart, S. H., Mainous, A. G. 3rd, Gilbert, G. (2002). Relation between alcohol consumption and C-reactive protein levels in the adult US population. *J. Am. Board. Fam. Pract.*, 15, 437-442.

Su, J., Tian, H., Liu, R., Liang, J. (2002). Inhibitive effects of glucose and free fatty acids on proliferation of human vascular endothelial cells in vitro. *Chin. Med. J.*, 115, 1486-1490.

Succurro, E., Marini, M. A., Frontoni, S., Hribal, M. L., Andreozzi, F., Lauro, R., Perticone, F., Sesti, G. (2008) Insulin secretion in metabolically obese, but normal weight, and in metabolically healthy but obese individuals. *Obesity (Silver Spring)*. 16, 1881-1886.

Summers, S. A. (2006). Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog. Lipid. Res.*, 45, 42-72.

Sury, M. D., Frese-Schaper, M., Mühlemann, M. K., Schulthess, F. T., Blasig, I. E., Täuber, M. G., Shaw, S. G., Christen, S. (2006). Evidence that N-acetylcysteine inhibits TNF-alpha-induced cerebrovascular endothelin-1 upregulation via inhibition of mitogen- and stress-activated protein kinase. *Free Radic.Biol.Med.*, 41, 1372-1383.

Szalai, A. J., McCrory, M. A., Cooper, G. S., Wu, J., Kimberly, R. P. (2002). Association between baseline levels of C-reactive protein (CRP) and a dinucleotide repeat polymorphism in the intron of the CRP gene. *Genes Immun.*, 3, 14-19.

Szmitko, P. E., Fedak, P. W., Weisel, R. D., Stewart, D. J., Kutryk, M. J., Verma, S. (2003). Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation*, *107*, 3093-3100.

Taddei, S., Galetta, F., Viridis, A., Ghiadoni, L., Salvetti, G., Franzoni, F., Giusti, C., Salvetti, A. (2000). Physical activity prevents age-related impairment in nitric oxide availability in elderly athletes. *Circulation*, *101*, 2896–2901.

Taher, M. M., Garcia, J. G., Natarajan, V. (1993). Hydroperoxide-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, *303*, 260-266.

Tai, E. S., Demissie, S., Cupples, L. A., Corella, D., Wilson, P. W., Schaefer, E. J. Ordovas, J. M. (2002). Association between the PPARA L162V polymorphism and plasma lipid levels: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, *22*, 805-810.

Tan, K. C., Chow, W. S., Tam, S., Bucala, R., Betteridge, J. (2004). Association between acute-phase reactants and advanced glycation end products in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, *27*, 223-228.

Taskinen, S., Hyvonen, M., Kovanen, P. T., Meri, S., Pentikainen, M. O. (2005). C-reactive protein binds to the 3beta-OH group of cholesterol in LDL particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *329*, 1208-1216.

Tataranni, P. A., Ortega, E. (2005) A Burning Question. Does an adipokines-induced activation of the immune system mediate the effect of overnutrition on type 2 diabetes? *Diabetes*, 54, 917-927.

Tchernof, A., Nolan, A., Sites, C. K., Ades, P. A., Poehlman, E. T. (2002). Weight loss reduces C-reactive protein levels in obese postmenopausal women. *Circulation*, 105, 564-569.

Teoh, H., Quan, A., Lovren, F., Wang, G., Targari, S., Szmitko, P. E., Szalai, A. J., Ward, M. E., Verma, S. (2008). Impaired endothelial function in C-reactive protein overexpressing mice. *Atherosclerosis*, 201, 318-25.

Tesauro, M., Rizza, S., Iantorno, M., Campia, U., Cardillo, C., Lauro, D., Leo, R., Turriziani, M., Cocciolillo, G. C., Fusco, A., Panza, J. A., Scuteri, A., Federici, M., Lauro, R., Quon, M. J. (2007). Vascular, metabolic, and inflammatory abnormalities in normoglycemic offspring of patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 56, 413-419.

The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1993). *N.Engl.J.Med.*, 329, 977-986.

Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of high Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. (2002). *Circulation*, 106, 3143-3421.

Thompson, D., Pepys, M.B., Wood, S.P. (1999). The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*, 7,169-177.

Thompson, S. G., Kienast, J., Pyke, S. D., Haverkate, F., van de Loo, J. C. (1995). Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N. Engl. J. Med.*, 332, 635-641.

Tiikkainen, M., Häkkinen, A. M., Korshennikova, E., Nyman, T., Mäkimattila, S., Yki-Järvinen, H. (2004). Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 53, 2169-2176.

Tilg, H., Moschen, A. R. (2008). Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med*. 2008, 14, 222-231.

Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M. B., Dinarello, C. A., Mier, J. W. (1994). Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*, 83, 113-118.

Tiong, A. Y., Brieger, D. (2005). Inflammation and coronary artery disease. *Am. Heart J.*, 150, 11-18.

Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B. M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79, 1147-1156.

Torzewski, J., Torzewski, M., Bowyer, D. E., Frohlich, M., Koenig, W., Waltenberger, J., Fitzsimmons, C., Hombach, V. (1998). C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18, 1386-1392.

Trichopoulou, A., Bamia, C., Trichopoulos, D. (2005). Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece. *Arch.Intern.Med.*, 165, 929-935.

Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C., Trichopoulos, D. (2003). Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N.Engl.J.Med.*, 348, 2599-2608.

Trichopoulou, A., Orfanos, P., Norat, T., Bueno-de-Mesquita, B., Ocké, M. C., Peeters, P. H., van der Schouw, Y. T., Boeing, H., Hoffmann, K., Boffetta, P., Nagel, G., Masala, G., Krogh, V., Panico, S., Tumino, R., Vineis, P., Bamia, C., Naska, A., Benetou, V., Ferrari, P., Slimani, N., Pera, G., Martinez-Garcia, C., Navarro, C., Rodriguez-Barranco, M., Dorronsoro, M., Spencer, E. A., Key, T. J., Bingham, S., Khaw, K. T., Kesse, E., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M. C., Berglund, G., Wirfalt, E., Hallmans, G., Johansson, I., Tjonneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Hundborg, H. H., Riboli, E., Trichopoulos, D. (2005). Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *B.M.J.*, 330, 991.

Tripathy, D., Mohanty, P., Dhindsa, S., Syed, T., Ghanim, H., Aljada, A., Dandona, P. (2003). Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes*, 52, 2882-2887.

Tsao, T. S., Stenbit, A. E., Factor, S. M., Chen, W., Rossetti, L., Charron, M. J. (1999). Prevention of insulin resistance and diabetes in mice heterozygous for GLUT4 ablation by transgenic complementation of GLUT4 in skeletal muscle. *Diabetes*, *48*, 775-782.

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

Unger, R. H. (2002). Lipotoxic diseases. *Annu.Rev.Med.*, *53*, 319-336.

Utzschneider, K. M., Kahn, S. E. (2006). Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *91*, 4753-4761.

van de Ree, M. A., Huisman, M. V., Princen, H. M., Meinders, A. E., Kluft, C. (2003). DALI Study Group. Strong decrease of high sensitivity C reactive protein with high-dose atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, *166*, 129-135.

van Dielen, F. M., Buurman, W. A., Hadfoune, M., Nijhuis, J., Greven, J. W. (2004). Macrophage inhibitory factor, plasminogen activator inhibitor-1, other acute phase proteins, and inflammatory mediators normalize as a result of weight loss in morbidly obese subjects treated with gastric restrictive surgery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *89*, 4062-4068.

Veerababu, G., Tang, J., Hoffman, R. T., Daniels, M. C., Hebert, L. F. Jr., Crook, E. D., Cooksey, R. C., McClain, D. A. (2000). Overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in the liver of transgenic mice results in enhanced glycogen

storage, hyperlipidemia, obesity, and impaired glucose tolerance. *Diabetes*, *49*, 2070-2078.

Venugopal, S. K., Devaraj, S., Jialal, I. (2005). Macrophage conditioned medium induces the expression of C-reactive protein in human aortic endothelial cells. *Am.J.Pathol.*, *166*, 1265-1271.

Verma, S., Badiwala, M. V., Weisel, R. D., Li, S. H., Wang, C. H., Fedak, P. W., Li, R. K., Mickle, D. A. (2003). C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, *126*, 1886-1891.

Verma, S., Devaraj, S., Jialal, I. (2006). Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? C-reactive protein promotes atherothrombosis. *Circulation*, *113*, 2135-2150.

Verma, S., Li, S. H., Badiwala, M. V., Weisel, R. D., Fedak, P. W., Li, R. K., Dhillon, B., Mickle, D. A. (2002). Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation*, *105*, 1890-1896.

Verma, S., Wang, C. H., Li, S. H., Dumont, A. S., Fedak, P. W., Badiwala, M. V., Dhillon, B., Weisel, R. D., Li, R. K., Mickle, D. A., Stewart, D. J. (2002). A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation*, *106*, 913-919.

Verma, S., Yao, L., Stewart, D. J., Dumont, A. S., Anderson, T. J., McNeill, J. H. (2001). Endothelin antagonism uncovers insulin-mediated vasorelaxation in vitro and in vivo. *Hypertension*, *37*, 328-333.

Vessby, B. (2000). Dietary fat and insulin action in humans. *Br. J. Nutr.*, *83*, S91-96.

Vessby, B. (2003). Dietary fat, fatty acid composition in plasma and the metabolic syndrome. *Curr. Opin. Lipidol.*, *14*, 15-19.

Vincent, D., Ilany, J., Kondo, T., Naruse, K., Fisher, S. J., Kisanuki, Y. Y., Bursell, S., Yanagisawa, M., King, G. L., Kahn, C. R. (2003). The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance. *J.Clin.Invest.*, *111*, 1373-1380.

Vincent, M. A., Clerk, L. H., Lindner, J. R., Price, W. J., Jahn, L. A., Leong-Poi, H., Barrett, E. J. (2006). Mixed meal and light exercise each recruit muscle capillaries in healthy humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, *290*, E1191-E1197.

Vincent, M. A., Dawson, D., Clark, A. D., Lindner, J. R., Rattigan, S., Clark, M. G., Barrett, E. J. (2002). Skeletal muscle microvascular recruitment by physiological hyperinsulinemia precedes increases in total blood flow. *Diabetes*, *51*, 42-48.

Vischer, U. M. (1999). Hyperglycemia and the pathogenesis of atherosclerosis: lessons from murine models. *Eur.J.Endocrinol.*, *140*, 1-3.

Vitale, C., Cerquetani, E., Wajngarten, M., Leonardo, F., Silvestri, A., Mercurio, G., Fini, M., Ramirez, J. A., Rosano, G. M. (2003). In patients with coronary artery disease

endothelial function is associated with plasma levels of C-reactive protein and is improved by optimal medical therapy. *Ital. Heart. J.* 4, 627-632.

Volanakis, J.E. (1982). Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 389, 235-250.

Volanakis, J. E., Wirtz, K.W.A. (1979). Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers. *Nature*, 281, 155-157.

Volek, J. S., Feinman, R. D. (2005). Carbohydrate restriction improves the features of Metabolic Syndrome. Metabolic Syndrome may be defined by the response to carbohydrate restriction. *Nutr Metab.*, 2, 31.

Volek, J. S., Sharman, M. J., Forsythe, C. E. (2005). Modification of lipoproteins by very low-carbohydrate diets. *J. Nutr.*, 135, 1339-1342.

Vollenweider, P., Tappy, L., Randin, D., Schneiter, P., Jequier, E., Nicod, P., Scherrer, U. (1993). Differential effects of hyperinsulinemia and carbohydrate metabolism on sympathetic nerve activity and muscle blood flow in humans. *J. Clin. Invest.*, 92, 147-154.

Vozarova, B., Weyer, C., Lindsay, R. S., Pratley, R. E., Bogardus, C., Tataranni, P. A. (2002). High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes*, 51, 455-461.

Wallace, A. M., McMahon, A. D., Packard, C. J., Kelly, A., Shepherd, J., Gaw, A., Sattar, N. (2001). Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation*, *104*, 3052-3056.

Wallis, M. G., Smith, M. E., Kolka, C. M., Zhang, L., Richards, S. M., Rattigan, S., Clark, M. G. (2005). Acute glucosamine-induced insulin resistance in muscle in vivo is associated with impaired capillary recruitment. *Diabetologia*, *48*, 2131-2139.

Wang, C., Liu, J., Guo, F., Ji, Y., Liu, N. (2009). Endothelin-1 induces the expression of C-reactive protein in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *389*, 537-542.

Wang, C. C., Gurevich, I., Draznin, B. (2003). Insulin affects vascular smooth muscle cell phenotype and migration via distinct signaling pathways. *Diabetes*, *52*, 2562-2569.

Wang, C. H., Li, S. H., Weisel, R. D., Fedak, P. W., Dumont, A. S., Szmitko, P., Li, R. K., Mickle, D. A., Verma, S. (2003). C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation*, *107*, 1783-1790.

Wang, J., Ruotsalainen, S., Moilanen, L., Lepistö, P., Laakso, M., Kuusisto, J. (2007). The metabolic syndrome predicts cardiovascular mortality: a 13-year follow-up study in elderly non-diabetic Finns. *Eur. Heart. J.*, *28*, 857-864.

Wang, J. J., Li, H. B., Kinnunen, L., Hu, G., Järvinen, T. M., Miettinen, M. E., Yuan, S., Tuomilehto, J. (2007). How well does the metabolic syndrome defined by five definitions

predict incident diabetes and incident coronary heart disease in a Chinese population?

Atherosclerosis, 192, 161-168.

Wang, L., Folsom, A. R., Zheng, Z. J., Pankow, J. S., Eckfeldt, J. H. (2003). ARIC Study Investigators. Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78, 91-98.

Wang, X. L., Zhang, L., Youker, K., Zhang, M. X., Wang, J., LeMaire, S. A., Coselli, J. S., Shen, Y. H. (2006). Free fatty acids inhibit insulin signaling-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation through upregulating PTEN or inhibiting Akt kinase. *Diabetes*, 55, 2301-2310.

Watanabe, S., Tagawa, T., Yamakawa, K., Shimabukuro, M., Ueda, S. (2005). Inhibition of the renin-angiotensin system prevents free fatty acid-induced acute endothelial dysfunction in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25, 2376-2380.

Wautier M. P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D. M., Schmidt, A. M., Wautier, J. L. (2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.*, 280, E685-E694.

Weigert, C., Brodbeck, K., Staiger, H., Kausch, C., Machicao, F., Häring, H. U., Schleicher, E. D. (2004). Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.*, 279, 23942-23952.

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., Ferrante, A. W. Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J.Clin.Invest.*, 112, 1796-1808.

Weiss, R., Kaufman, F. R. (2008). Metabolic complications of childhood obesity: identifying and mitigating the risk. *Diabetes Care*, 31 (Suppl.2), S310-S316.

Welham, M. J., Bone, H., Levings, M., Learmonth, L., Wang, L. M., Leslie, K. B., Pierce, J. H., Schrader, J. W. (1997). Insulin receptor substrate-2 is the major 170-kDa protein phosphorylated on tyrosine in response to cytokines in murine lymphohemopoietic cells. *J.Biol.Chem.*, 272, 1377-1381.

Wellen, K. E., Hotamisligil, G. S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J.Clin.Invest.*, 115, 1111-1119.

Wendt, T., Harja, E., Bucciarelli, L., Qu, W., Lu, Y., Rong, L. L., Jenkins, D. G., Stein, G., Schmidt, A. M., Yan, S. F. (2006). RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 185, 70-77.

Wick, G., Berger, P., Jansen-Dürr, P., Grubeck-Loebenstein, B. (2003). A Darwinian-evolutionary concept of age-related diseases. *Exp. Gerontol.*, 38, 13-25.

Widlansky, M. E., Gokce, N., Kearney, J. F., Vita, J. A. (2003). The clinical implications of endothelial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 42, 1149-1160.

Wight, T. N., Merrilees, M. J. (2004). Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ. Res.* *94*, 1158-1167.

Williams, K.J., Tabas, I. (1995). The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, *15*, 551-561.

Williamson, R.T. 1901. On the treatment of glycosuria and diabetes mellitus with sodium salicylate. *Br. Med. J.*, *1*, 760-762.

Wilson, P. W., D'Agostino, R. B., Parise, H., Sullivan, L., Meigs, J. B. (2005). Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, *112*, 3066-3072.

Wilson, P. W., Meigs, J. B. (2008). Cardiometabolic risk: a Framingham perspective. *Int. J. Obes. (Lond.)*, *32*, (Suppl 2), S17-S20.

Witztum, J. L. (1994). The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*, *344*, 793-795.

Wolff, S. P., Jiang, Z. Y., Hunt, J. V. (1991). Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free. Radic. Biol. Med.*, *10*, 339-352.

Wolford, J. K., Gruber, J. D., Ossowski, V. M., Vozarova, B., Antonio, Tataranni, P., Bogardus, C., Hanson, R. L. (2003). A C-reactive protein promoter polymorphism is associated with type 2 diabetes mellitus in Pima Indians. *Mol. Genet. Metab.*, *78*, 136-144.

Wolk, R., Berger, P., Lennon, R. J., Brilakis, E. S., Johnson, B. D., Somers, VK. (2004). Plasma leptin and prognosis in patients with established coronary atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, *44*, 1819-1824.

Worthley, S. G., Osende, J. I., Helft, G., Badimon, J. J., Fuster, V. (2001). Coronary artery disease: pathogenesis and acute coronary syndromes. *Mt. Sinai. J. Med.*, *68*, 167-181.

Wu, H. Y., Jeng, Y. Y., Yue, C. J., Chyu, K. Y., Hsueh, W. A., Chan, T.M. (1994). Endothelial-dependent vascular effects of insulin and insulin-like growth factor I in the perfused rat mesenteric artery and aortic ring. *Diabetes*, *43*, 1027-1032.

Wu, Y., Song, P., Xu, J., Zhang, M., Zou, M. H. (2007). Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, *282*, 9777-9788.

Xi, X. P., Graf, K., Goetze, S., Hsueh, W. A., Law, R. E. (1997). Inhibition of MAP kinase blocks insulin-mediated DNA synthesis and transcriptional activation of c-fos by Elk-1 in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, *417*, 283-286.

Xiao, S. C., Zhu, S. H., Xia, Z. F., Ma, B., Cheng, D. S. (2009). Successful treatment of a critical burn patient with obstinate hyperglycemia and septic shock from pan-drug-resistant strains. *Med. Sci. Monit.*, *15*, CS163-165.

Xu, B., Chibber, R., Ruggiero, D., Kohner, E., Ritter, J., Ferro, A. (2003). Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J.*, *17*, 1289-1291.

Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J.Clin.Invest.*, *112*, 1821-1830.

Xu, J. W., Morita, I., Ikeda, K., Miki, T., Yamori, Y. (2007). C-reactive protein suppresses insulin signaling in endothelial cells: role of spleen tyrosine kinase. *Mol.Endocrinol.*, *21*, 564-573.

Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E. G., McGeer, P. L. (2001). Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am.J.Pathol.*, *158*, 1039-1051.

Yasunari, K.; Kohono, M.; Kano, H.; Yokokawa, M.; Yoshikawa, J. (1997). Mechanisms of action of troglitazone in prevention of high glucose-induced migration and proliferation of cultured coronary smooth muscle cells. *Circ. Res.*, *81*, 953-962.

Yeh, E. T., Willerson, J. T. (2003). Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. *Circulation*, *107*, 370-371.

Yu, C., Chen, Y., Cline, G. W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J. K., Cushman, S. W., Cooney, G. J., Atcheson, B., White, M. F., Kraegen, E. W., Shulman,

G. I. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J. Biol. Chem.*, 277, 50230-50236.

Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z. W., Karin, M., Shoelson, S. E. 2001. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of *Ikk β* . *Science*. 293, 1673-1677.

Yudkin, J. S., Stehouwer, C. D., Emeis, J. J., Coppack, S. W. (1999). C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 972-978.

Yusuf, S., Sleight, P., Pogue, J., Bosch, J., Davies, R., & Dagenais, G. (2000). Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N.Engl.J.Med.*, 342, 145-153.

Zampelas, A., Panagiotakos, D. B., Pitsavos, C., Das, U. N., Chrysohoou, C., Skoumas, Y., Stefanadis, C. (2005). Fish consumption among healthy adults is associated with decreased levels of inflammatory markers related to cardiovascular disease: the ATTICA study. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 46, 120-124.

Zee, R. Y., Germer, S., Thomas, A., Raji, A., Rhees, B., Ridker, P. M., Lindpaintner, K., Williams, G. H., Nathan, D. M., Martin, M. (2008). C-reactive protein gene variation and type 2 diabetes mellitus: a case-control study. *Atherosclerosis*, 197, 931-936.

Zee, R. Y. L., Ridker, P. M. (2002). Polymorphism in the human C-reactive protein gene, plasma concentrations of CRP, and the risk of future arterial thrombosis. *Atherosclerosis*, 162, 217-219.

Zeng, G., Nystrom, F. H., Ravichandran, L. V., Cong, L. N., Kirby, M., Mostowski, H., & Quon, M. J. (2000). Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation*, 101, 1539-1545.

Zeng, G., Quon, M. J. (1996). Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J.Clin.Invest.*, 98, 894-898.

Zhang, D., Jiang, S. L., Rzewnicki, D., Samols, D., Kushner, I. (1995). The effect of interleukin-1 on C-reactive protein expression in Hep3B cells is exerted at the transcriptional level. *Biochem. J.*, 310, 143-148.

Zhang, D., Sun, M., Samols, D., Kushner, I. (1996). STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. *J. Biol. Chem.*, 271, 9503-9509.

Zhang, L., Wheatley, C. M., Richards, S. M., Barrett, E. J., Clark, M. G., Rattigan, S. (2003). Tnf-alpha acutely inhibits vascular effects of physiological but not high insulin or contraction. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.*, 285, E654-E660.

Zhong, Y., Li, S. H., Liu, S. M., Szmitko, P. E., He, X. Q., Fedak, P. W., Verma, S. (2006). C-Reactive protein upregulates receptor for advanced glycation end products expression in human endothelial cells. *Hypertension.*, 48, 504-511.

Zoppini, G., Galante, P., Zardini, M., Muggeo, M. (1994). Phosphotyrosine protein profiles in monocytes after insulin and IGF-1 stimulation. *Eur.J.Clin.Invest.*, 24, 275-278.

Zwaka, T. P., Hombach, V., Torzewski, J. (2001). C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation*, 103, 1194 -1197.