

**TAREK BOUHALI**

**L'ADIPONECTINE, UN MODULATEUR DU RISQUE  
DE MALADIE CORONARIENNE  
ATHÉROSCLÉROTIQUE DANS  
L'HYPERCHOLESTÉROLÉMIE FAMILIALE**

**Mémoire présenté  
à la faculté des études supérieures de l'Université Laval  
comme exigence partielle du programme de maîtrise en médecine  
expérimentale—génétique des populations humaines  
offert à l'Université du Québec à Chicoutimi  
en vertu d'un protocole d'entente avec l'Université Laval  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)**

**FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC**

**et**

**DÉPARTEMENT DES SCIENCES HUMAINES  
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI  
SAGUENAY**

**OCTOBRE 2006**

**© Tarek Bouhali, 2006**



### *Mise en garde/Advice*

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

## RÉSUMÉ

Face à l'étendue épidémique, dans le monde industrialisé, du diabète, de l'obésité, du syndrome métabolique et des complications cardiovasculaires qui leurs sont associées, les connaissances acquises dans le domaine de l'athérosclérose se développent elles aussi à très grande allure. Aucune facette de cette problématique n'est négligée, qu'il s'agisse du dépistage des patients à risque, de la caractérisation des lésions ou du développement des armes thérapeutiques. L'hypercholestérolémie familiale représente un modèle judicieux de risque cardiovasculaire élevé, ce qui offre l'opportunité d'étudier les causes et les effets du développement précoce de l'athérosclérose.

Dans le cadre du présent projet de recherche, une attention a été portée à l'adiponectine. L'adiponectine est une adipocytokine sécrétée exclusivement par le tissu adipeux dont les propriétés cardioprotectrices sont de plus en plus pertinentes. L'élément principal que révèle cette étude est la nature de la relation entre les bas taux plasmatiques d'adiponectine et la survie sans aucun évènement coronarien dans une population de sujets hypercholestérolémiques familiaux. Ce qui suggère que l'adiponectine pourrait être un excellent marqueur du développement de l'athérosclérose et une potentielle cible thérapeutique chez les patients à risque.

## AVANT-PROPOS

Ceci est loin d'être le fruit d'un travail individuel, comme le stipulent les manuels académiques, mais plutôt, le fruit d'une longue et passionnante collaboration de toute une équipe. Il serait ingrat de déposer ce travail sans remercier les Docteurs Catherine Laprise et Daniel Gaudet, ma directrice et mon codirecteur de recherche qui n'ont épargné ni temps ni dévouement pour me guider le long de ce cheminement. Je vous en serai reconnaissant éternellement. Je tiens, sans complaisance aucune, à remercier Docteure Diane Brisson pour sa patience et toute sa disponibilité. Merci pour chaque réponse qui m'a sauvé des heures de questionnements et de maintes recherches. Le Professeur Antoine-Lutumba Ntetu, est pour grande chose dans ce cheminement, il me tient à cœur de lui signifier mes plus profonds remerciements.

Cette période d'étude aurait été inéluctablement longue sans la présence de toutes les étudiantes qui m'ont partagé les joies et les rires de même que les peines et les déprimés. Sans vous nommer, merci d'être de cet univers de mots, de chiffres, de sciences et de connaissances.

Les techniciennes de laboratoire ont été d'un grand secours dans la réalisation du volet pratique de la maîtrise. Merci de votre précieuse assistance.

Je tiens aussi à signifier ma gratitude envers ma famille, auprès de laquelle je trouve les plus nobles raisons d'être.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>ii</b>
<b>AVANT PROPOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>ix</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I</b> .....	<b>4</b>
<b>L'HYPERCHOLESTÉROLÉMIE FAMILIALE</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 Le métabolisme lipidique-lipoprotéique et l'expression de l'hypercholestérolémie familiale</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 Prévalence</b> .....	<b>8</b>
<b>1.3 Variabilité phénotypique</b> .....	<b>10</b>
1.3.1 Facteurs environnementaux .....	11
1.3.2 Facteurs métaboliques.....	12
1.3.2.1 Profil lipidique.....	12
1.3.2.2 La lipoprotéine(a).....	13
1.3.2.3 La protéine C-réactive (CRP).....	13
1.3.2.4 Le Fibrinogène.....	13
1.3.3 Facteurs génétiques.....	14
1.3.3.1 Les mutations dans le gène du LDLR .....	14

1.3.3.2	<i>Autres facteurs génétiques</i> .....	15
<b>CHAPITRE II</b> .....		<b>17</b>
<b>L'ATHÉROSCLÉROSE ET LE RISQUE CARDIOVASCULAIRE DANS</b>		
<b>L'HYPERCHOLESTÉROLÉMIE FAMILIALE</b> .....		
		<b>17</b>
2.1	<b>Introduction</b> .....	<b>17</b>
2.2	<b>Le stress oxydatif</b> .....	<b>19</b>
2.3	<b>Le syndrome métabolique et la modulation du risque cardiovasculaire</b> .....	<b>21</b>
2.3.1	Définitions et prévalence du syndrome métabolique.....	21
2.3.2	Dyslipidémies .....	22
2.3.3	Dysglycémie .....	22
2.3.4	Hypertension artérielle.....	23
2.3.5	Obésité .....	23
<b>CHAPITRE III</b> .....		<b>26</b>
<b>ADIPONECTINE : UN MODULATEUR DU RISQUE</b>		
<b>CARDIOVASCULAIRE</b> .....		
		<b>26</b>
3.1	<b>Introduction</b> .....	<b>26</b>
3.2	<b>La génétique de l'adiponectine</b> .....	<b>27</b>
3.2.1	Le gène.....	27
3.2.2	Le récepteur .....	30
3.2.3	L'héritabilité de l'adiponectine.....	30
3.3	<b>Adiponectine et l'expression des éléments du syndrome métabolique</b> .....	<b>31</b>
3.4	<b>Adiponectine, athérosclérose et inflammation</b> .....	<b>34</b>
3.5	<b>Adiponectine et le développement de nouvelles approches thérapeutiques</b>	<b>35</b>
3.5.1	Adiponectine et agoniste PPAR $\gamma$ .....	35
3.5.2	Effets du traitement par l'adiponectine.....	36
<b>CHAPITRE IV</b> .....		<b>39</b>
<b>LES TAUX PLASMATIQUES BAS D'ADIPONECTINE AUGMENTENT</b>		
<b>LE RISQUE DE MALADIE CORONARIENNE ATHÉROSCLÉROTIQUE</b>		
<b>PRÉCOCE DANS L'HYPERCHOLESTÉROLÉMIE FAMILIALE</b> .....		
		<b>39</b>

<b>4.1</b>	<b>Avant-propos</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2</b>	<b>Résumé</b> .....	<b>43</b>
<b>4.3</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>44</b>
<b>4.4</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>45</b>
<b>4.5</b>	<b>Methods</b> .....	<b>47</b>
4.5.1	Subjects and Clinical Data.....	47
4.5.2	Statistical analysis.....	47
<b>4.6</b>	<b>Results</b> .....	<b>51</b>
<b>4.7</b>	<b>Discussion</b> .....	<b>53</b>
<b>4.8</b>	<b>Acknowledgment</b> .....	<b>56</b>
<b>4.9</b>	<b>Disclosure</b> .....	<b>56</b>
<b>4.10</b>	<b>Figure legend</b> .....	<b>57</b>
<b>4.11</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>63</b>
<b><i>CHAPITRE V</i></b> .....		<b>71</b>
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b> .....		<b>71</b>
<b><i>CHAPITRE VI</i></b> .....		<b>76</b>
<b>CONCLUSION</b> .....		<b>76</b>
<b><i>BIBLIOGRAPHIE</i></b> .....		<b>78</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les maladies monogéniques majeures induisant une hypercholestérolémie familiale.....	9
Tableau 2 : Fréquence des mutations dans le gène du récepteur des LDL chez 343 enfants hétérozygotes originaires du Saguenay–Lac-Saint-Jean .....	10
Tableau 3 : Classes des mutations dans le gène du récepteur des LDL.....	14
Tableau 4 : Effet du type de mutation dans le gène du récepteur des LDL sur les taux plasmatiques de cholestérol et sur la coronaropathie chez les homozygotes .....	15
Table 5 : Baseline characteristics of the studied FH sample.....	60
Table 6 : Relative Risk (odds ratio) of Coronary Artery Disease (<60 years) Associated with Familial Hypercholesterolemia, Plasma Adiponectin Concentration and Correlates of Abdominal Fat Deposition.....	61
Table 7: Tertiles of plasma adiponectin concentrations, according to gender and age groups in FH.....	62



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Métabolisme des LDL .....	6
Figure 2 : Le recyclage du récepteur des LDL .....	7
Figure 3: Évolution naturelle de l'athérosclérose .....	20
Figure 4: Les fonctions du tissu adipeux .....	25
Figure 5 : Le gène de l'adiponectine .....	29
Figure 7: L'adiponectine et l'homéostasie énergétique.....	33
Figure 8: Effets des thiazolidinediones sur la production d'adiponectine.....	36
Figure 9: Association between plasma adiponectin, HDL-cholesterol, and waist circumference in FH .....	57
Figure 10: Analysis of cumulative survival regression (Cox model) of the age at first CAD symptoms among FH patients .....	57
Figure 11: Plasma adiponectin concentrations in non diabetic FH patients vs non FH patients with Type 2 diabetes.....	57

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC1	<i>ATP-binding cassette</i>
ACAT	Acyl-cholestérol-acyl-transférase
AdipoR	Récepteur d'adiponectine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPK	<i>5'-AMP-activated protein kinase</i>
ApM1	<i>Adipose most abundant gene transcript</i>
Apo	Apolipoprotéine
ApoB	Apolipoprotéine B
ARH	Hypercholestérolémie familiale récessive
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CETP	Protéine de transfert des esters de cholestérol
E.Coli	<i>Escherichia coli</i>
FATP-1	<i>Fatty acid transport protein-1</i>
GPB28	<i>Gelatin binding protein of 28 kDa</i>
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HeHF	Hétérozygote hypercholestérolémique familial
HF	Hypercholestérolémie familiale
HTA	Hypertension artérielle
HTGL	<i>Hepatic triglyceride lipase</i>
IDF	Fédération internationale du diabète
IDL	Lipoprotéine de densité intermédiaire

IDM	Infarctus du myocarde
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IMC	Indice de masse corporelle
LCAT	Lécithine cholestérol acyl transférase
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LDLox	Lipoprotéine de basse densité oxydée
LDLR	Récepteur des lipoprotéines de basse densité
Lp(a)	Lipoprotéine (a)
LRH-RE	<i>Liver receptor homolog-responsive element</i>
LRP	<i>Receptor-related protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCA	Maladie coronarienne athérosclérotique
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
MMPs	Matrice métalloprotéinase
MRFIT	<i>Multiple risk factor intervention trial</i>
NCEP-ATP III	<i>National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-kappaB</i>
NHANES	<i>National health and nutrition examination survey</i>
NHLBI	<i>National heart, lung and blood institute</i>
NO	Monoxyde d'azote
PCSK9	<i>Proprotein convertase subtilin/kexin type 9</i>
PLTP	<i>Phospholipid transfer protein</i>
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
PPRE	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor -responsive element</i>
RXR	Récepteur rétinol X
SLSJ	Saguenay–Lac-Saint-Jean
SR-B1	<i>Scavenger receptor, class B, type 1</i>
TG	Triglycérides
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TNF- $\beta$	<i>Tumor necrosis factor-<math>\beta</math></i>
UCP-2	<i>Uncoupling protein-2</i>

VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité

## INTRODUCTION

L'hypercholestérolémie familiale (HF) est un phénotype le plus fréquemment causé par une mutation dans le gène du récepteur des lipoprotéines de basse densité, mais qui peut parfois également être causé par la mutation dans d'autres gènes, en particulier NARC-1 et ARH. L'HF est considérée comme un modèle de pathologies avec des taux plasmatiques élevés de cholestérol-LDL et d'apolipoprotéine (apo)B, associés à un risque de maladie coronarienne athérosclérotique (MCA) extrêmement élevé. Cependant, on observe une variabilité substantielle de la sévérité de l'HF et de l'âge au début des manifestations de l'athérosclérose, et ceci, même chez des sujets partageant la même mutation induisant des taux de cholestérol plasmatiques comparables (1). Ceci démontre que l'élévation des taux de cholestérol ne peut expliquer à elle seule l'apparition prématurée de MCA. Par conséquent, l'identification de nouveaux facteurs de risque ou de protection s'impose. Ceux-ci, conjugués aux facteurs de risque classiques, pourraient permettre une meilleure estimation du risque d'athérosclérose et un meilleur pronostic dans la prévention primaire de MCA, surtout chez les patients hétérozygotes HF qui peuvent demeurer longtemps asymptomatiques.

La définition du profil génétique des maladies mendéliennes qui causent l'athérosclérose ou affectent le risque de son développement a nettement amélioré notre compréhension de la biologie fondamentale des MCA. L'étude de la physiopathologie de l'HF a notamment clarifié les mécanismes régulant le métabolisme lipidique et son effet pléiotrope sur le risque cardiovasculaire, non seulement lié à ce phénotype mais aussi à des perturbations métaboliques fréquentes associées à un risque populationnel majeur. Ces perturbations métaboliques sont actuellement regroupées sous la dénomination du syndrome métabolique. Ce dernier a d'ailleurs connu une recrudescence dans le monde

depuis une vingtaine d'année, en partie en raison de l'évolution quasi-épidémique de la prévalence de l'obésité dans le monde. Ceci explique le nombre important de publications scientifiques relatives à l'obésité et au tissu adipeux, d'où la découverte de nombreuses adipocytokines positionnant ainsi l'adipocyte au centre du métabolisme énergétique de l'organisme.

L'adiponectine a suscité, depuis sa découverte en 1995, beaucoup d'intérêt en se démarquant des autres adipocytokines par des taux plasmatiques réduits en cas d'obésité et d'insulinorésistance. Ses implications cliniques demeurèrent obscures jusqu'en 2001, où plusieurs études ont décrit son potentiel anti-diabétique, anti-athérosclérotique et anti-inflammatoire. L'adiponectine se présente actuellement comme un biomarqueur du syndrome métabolique. Les taux plasmatiques bas d'adiponectine sont associés à une augmentation de l'indice de masse corporelle, une baisse de la sensibilité à l'insuline, un profil lipidique défavorable et une augmentation des taux plasmatiques des marqueurs inflammatoires, et ainsi du risque de MCA.

L'objectif de cette étude est de se pencher sur l'étude de l'adiponectine comme facteur de protection vasculaire en utilisant un modèle monogénique de hausse des taux plasmatiques de cholestérol-LDL. La cohorte est constituée de patients HF de la région du Saguenay—Lac-Saint-Jean et suivis à la clinique des maladies lipidiques du Centre de santé et de services sociaux de Chicoutimi. Malgré un profil lipidique prédisposant aux pathologies vasculaires athérosclérotiques, plusieurs sujets HF n'ont souffert d'aucun symptôme de MCA tout au cours de leur vie même en l'absence de prise médicamenteuse ou d'observation d'un style de vie adéquat. Des taux plasmatique élevés d'adiponectine, tout comme ceux de cholestérol-HDL pourraient fournir une réponse à ce paradigme.

L'identification de l'adiponectinémie comme un modulateur du risque cardiovasculaire dans un modèle monogénique comme l'HF serait d'une grande utilité dans l'adaptation des stratégies de prévention primaire et secondaire des MCA. Cette protéine

pourrait aussi représenter une arme thérapeutique prometteuse qui trouverait ses indications dans le traitement des dyslipidémies et des maladies cardiovasculaires.

## CHAPITRE I

### L'HYPERCHOLESTÉROLÉMIE FAMILIALE

#### 1.1 Le métabolisme lipidique-lipoprotéique et l'expression de l'hypercholestérolémie familiale

Le cholestérol est une molécule hydrophobe qui assure l'intégrité structurale des membranes. Le cholestérol de l'organisme provient de deux sources, soit l'absorption alimentaire et la synthèse de novo (2). L'alimentation fournit quotidiennement 0,2 à 0,5 g de cholestérol. L'hydrolyse, l'absorption et la réestérification des lipides alimentaires engendreront la formation des chylomicrons qui sont des lipoprotéines composées de triglycérides (TG) dans une proportion de 85 à 92%, synthétisées exclusivement par l'antérocyte et secrétées au niveau des intestins. Les chylomicrons permettront ensuite le cheminement de ces lipides alimentaires jusqu'au foie (Figure 1).

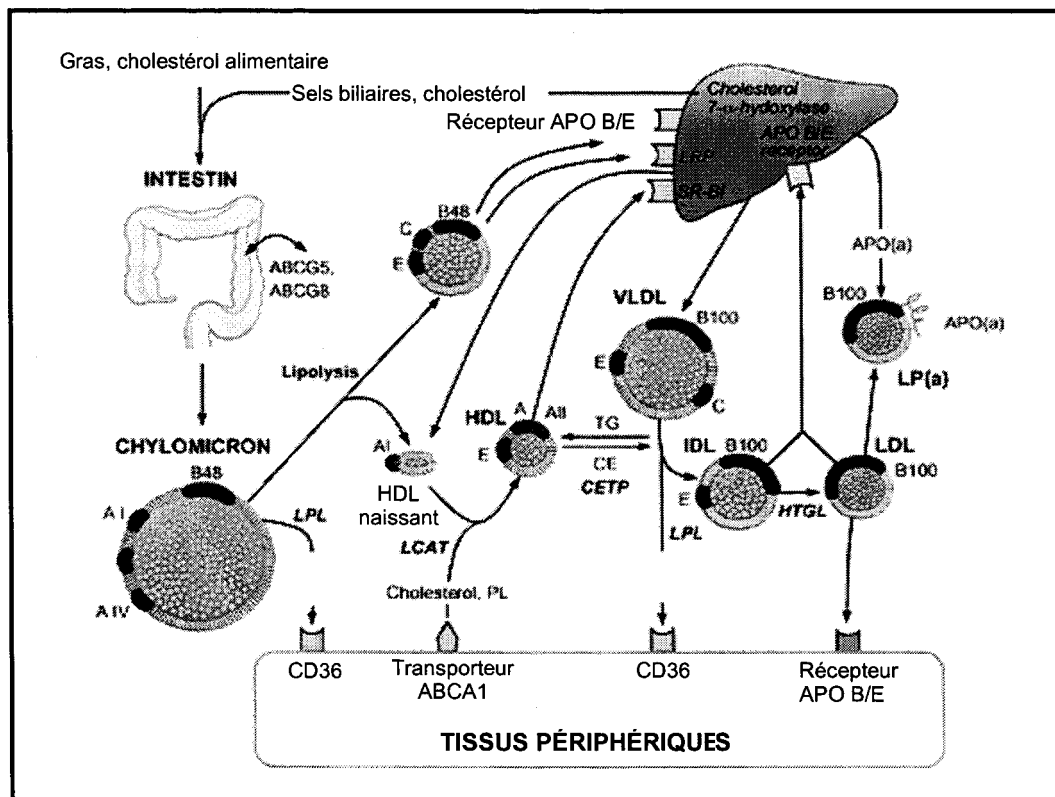
La synthèse de novo au niveau du foie et autres tissus produit, quant à elle, plus des trois quarts du cholestérol de l'organisme. Ce cholestérol sera mis en circulation sous la forme de lipoprotéines de très basse densité (VLDL), synthétisées et secrétées au niveau hépatique. Ces particules contiennent l'apolipoprotéine (apo)B-100, l'apoE, les esters de cholestérol, les TG et les phospholipides. Les chylomicrons et les particules VLDL naissantes seront par la suite dégradés par la lipase lipoprotéique, ancrée à la surface endothéliale. L'hydrolyse des TG transportés par les chylomicrons et les VLDL entraînera ainsi la libération de glycérol et d'acides gras libres. Ceux-ci seront emmagasinés dans les tissus périphériques comme réserve énergétique ou dégradés par la  $\beta$ -oxydation. Approximativement, 50% des particules VLDL naissantes sont éliminées de la circulation



par endocytose au niveau du foie. Le reste donnera naissance aux lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL). Une partie des IDL sont réabsorbées rapidement par le foie par le biais des récepteurs des lipoprotéines de basse densité (LDLR) qui reconnaissent spécifiquement les apoB ou E (récepteurs B/E hépatiques), alors que le reste est transformé en LDL, suivant l'hydrolyse par la lipase hépatique. Les particules LDL sont composées de cholestérol libre, de phospholipides, de TG, d'esters de cholestérol et d'apoB-100. L'élimination des particules LDL du plasma dépend principalement de l'endocytose. La majorité des LDL sont éliminées de la circulation par les LDLR par le biais de l'apoB-100. Les LDLR sont des glycoprotéines chargées négativement, présentes à la surface des membranes cellulaires de tous les tissus, en particulier au niveau du foie. Les LDL se lient à ces récepteurs pour pénétrer à l'intérieur des cellules par endocytose pour pouvoir ainsi se dissocier. Le récepteur est aussitôt recyclé, alors que l'apoB-100 et les esters de cholestérol sont hydrolysés. La réestérification du cholestérol est assurée par l'acyl-cholestérol-acyl-transférase (ACAT). De cette manière les LDLR gèrent les taux de cholestérol intracellulaire et du LDL circulant (2).

Le contrôle des concentrations en cholestérol des cellules a aussi recours aux lipoprotéines de haute densité (HDL) qui sont des particules bilamellaires constituées de cholestérol, de phospholipides et d'apoA-I. Elles sont synthétisées au niveau du foie et sécrétées dans la circulation sanguine par exocytose. Elles ont la capacité de collecter le cholestérol libre des tissus périphériques par le biais des transporteurs ABCA1 (*ATP-binding cassette*) (3) pour effectuer ainsi le transport à rebours jusqu'au foie où il sera excrété par la bile. Les apo A-I et les particules HDL pré- $\beta$  produites au niveau de l'intestin ou du foie ou par la lipolyse des lipoprotéines riches en TG induisent un flux de phospholipides et de cholestérol au niveau des membranes cellulaires. Ce processus est stimulé par la PLTP (*phospholipid transfer protein*). Quand la particule HDL est chargée de cholestérol libre, sa forme change de discoïde à sphérique par l'accumulation des esters de cholestérol, un processus initié par la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT), une enzyme activée par l'apo-A-I. Elle sera transportée jusqu'au foie où le cholestérol est extrait par le SR-B1 (*scavenger receptor, class B, type I*), le récepteur de prédilection des particules HDL au niveau hépatique (4). La lipolyse des chylomicrons et des VLDL fournit

les phospholipides, le cholestérol et les apolipoprotéines nécessaires à la transformation des particules HDL-3 en HDL-2. Inversement, les TG des HDL-2 sont hydrolysés par la lipase hépatique pour former ainsi des particules HDL-3 (Figure 1).

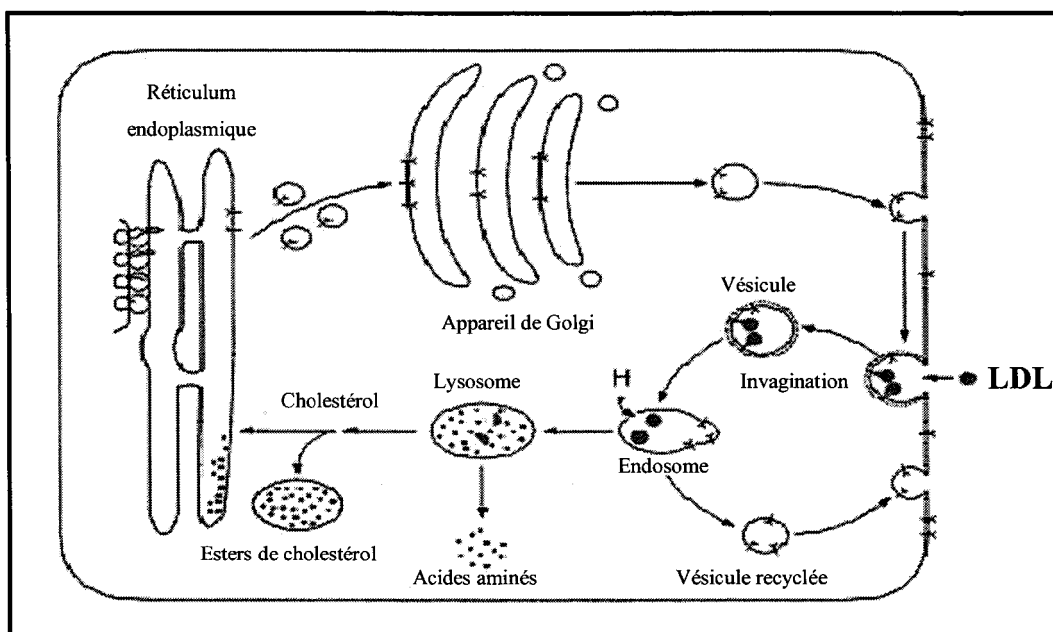


**Figure 1 : Métabolisme des LDL**

Modifié de : Lusis AJ. Annu. Rev. Genom. Human. Genet. 2004.5 :189-218

Lecithin cholestérol acyl transferase (LCAT); LDL receptor-related protein (LRP); scavenger receptor class B, Type 1 (SR-B1); apolipoprotéine (apo); cholesteryl ester transfer protein (CETP); ATP-binding cassette (ABC); lipoprotéine (a) (LP(a)); hepatic triglyceride lipase (HTGL); lipoprotéine de haute densité (HDL); lipoprotéine de basse densité (LDL); lipoprotéine de densité intermédiaire (IDL); lipoprotéine de très basse densité (VLDL).

Le facteur de risque le plus significatif de maladie coronarienne athérosclérotique (MCA) est relié au métabolisme de lipoprotéines. Les lipoprotéines consistent en un centre de lipides hydrophobes (triglycerides et esters de cholestérol) entouré par des phospholipides et de cholestérol libre. Les apolipoprotéines plasmatiques comprennent les apo(a), AI, AII, AIV, AV, B48, B100, CI, CII, CIII, et E. Les lipides peuvent être transférés entre les particules de lipoprotéines par le biais d'enzymes telles que *cholesteryl ester transfer protein* (CETP) et *phospholipid transfer protein* (PLTP).



**Figure 2 : Le recyclage du récepteur des LDL**

Modifié de Brown MS. et Goldstein JL. Science 1986 Apr 4; 232(4746):34-47.

Représentation schématique de la capitation des lipoprotéines par le LDLR. L'entrée du complexe récepteur-ligand dans la cellule se fait par le biais d'invaginations, après quoi ce complexe se trouve dans un environnement acide au sein d'un endosome où il subit une dissociation. Le récepteur revient alors à la surface cellulaire dans un processus de recyclage.

L'incapacité des récepteurs à assurer efficacement la liaison de l'apoB des LDL au niveau de la membrane cytoplasmique pourrait entraîner une diminution du catabolisme des LDL et une augmentation de leur temps de demi-vie, ce qui engendrerait une hausse de leurs taux plasmatiques. Ce mécanisme est impliqué dans l'expression de l'hypercholestérolémie familiale (HF), la forme la plus commune et la plus sévère des hypercholestérolémies monogéniques et la première maladie du métabolisme lipidique dont les aspects cliniques et moléculaires ont été décrits (5).

L'HF est une maladie autosomique dominante (6), causée principalement par la présence de mutations dans le gène du LDLR. Elle est caractérisée par une augmentation des concentrations plasmatiques de cholestérol-LDL et d'apoB, associée à un risque accru d'apparition prématurée de maladie coronarienne athérosclérotique (MCA). Chez les

hommes ayant une HF, la possibilité d'un infarctus du myocarde (IDM) avant l'âge de 60 ans serait augmentée de 75% comparativement aux sujets non-HF (7-9).

Dans les années 1930, Müller avait décrit la symptomatologie de l'HF par le développement de xanthomes, des taux élevés de cholestérol et des IDM et a incriminé un seul gène défectueux et héritable (10). Durant les années 1960, Khachadurian *et al* ont étudié ce phénotype dans un échantillon de familles libanaises et ont clarifié la distinction entre les formes homozygotes et hétérozygotes (11). Ils ont également confirmé la transmission de cette maladie monogénique sur le mode autosomique dominant. Durant la même décennie, Fredrickson *et al* décrivent l'HF comme un phénotype relié à une perturbation du métabolisme des LDL (12). Durant les années 1970, les travaux combinés de Ott *et al* (13), de Elston *et al* (14) et de Berg et Heiberg (15) ont démontré une association entre l'HF et le complément C3, un marqueur situé sur le chromosome 19. Se basant sur ces observations, Brown et Goldstein (16) ont ainsi démontré que l'HF est causée par une mutation dans le gène du LDLR.

## 1.2 Prévalence

Un caucasien sur 500 exprimerait l'HF dans le monde (17). Bien que ce phénotype soit associé à plus de 920 mutations du LDLR, il a été démontré qu'il peut aussi être le résultat de mutations dans le gène de l'apoB (18, 19), localisé au niveau du chromosome 2p23-24 (20-22). D'autres maladies récessives peuvent aussi être responsables d'un tableau clinique comparable, telles que la sitostérolémie et l'hypercholestérolémie familiale récessive (ARH). De plus, des études récentes ont identifié un troisième gène associé au phénotype clinique de l'HF, la *proprotein convertase subtilin/kexin type 9* (PCSK9) qui est située sur le chromosome 1p34.1-p32 (23).

Deux mutations R3500Q et R3500W associées à l'HF ont été identifiées dans le gène de l'apoB (19, 24), alors que plus de 920 mutations ont été identifiées dans le gène du LDLR (25, 26). La prévalence de ces mutations a été estimée dans différentes populations

et groupes ethniques et a été revue par le *Human Genome Epidemiology Network* (27). Ces études de prévalence ont suggéré que, en présence d'un effet fondateur, un petit nombre de mutations prédominantes pourrait se trouver dans quelques populations. Cependant, dans la majorité des populations, un large spectre de mutations distinctes dans le gène du LDLR est observé chez les sujets HF (27) (Tableau 1).

**Tableau 1 : Les maladies monogéniques majeures induisant une hypercholestérolémie familiale**

Maladie	Gène défectueux	Prévalence		Hausse LDL plasm.	Perturbations métaboliques
		générale	SLSJ		
<i>Autosomique Dominante</i>					
FH	LDLR				Baisse de l'élimination du LDL Augmentation de la production du LDL
Forme hétérozygote		1 : 400	1 : 80(28)	+++	
Forme homozygote		1 : 1x10 <sup>6</sup>	1 : 1x10 <sup>3</sup> (28)	+++++	
FDB	APOB				Baisse de l'élimination du LDL
Forme hétérozygote		1 : 1000(29)		++	
Forme homozygote		1 : 4x10 <sup>6</sup> (29)		+++	
FH3	PCSK9				inconnus
Forme hétérozygote		<1 : 25000		+++	
<i>Autosomique Récessive</i>					
ARH	ARH	<1 : 5x10 <sup>6</sup>		++++	Baisse de l'élimination du LDL
Sitostérolémie	ABCG5 ABCG8	<1 : 5x10 <sup>6</sup>		- à +++++	Baisse de l'élimination du LDL Baisse de l'excrétion du cholestérol

Dans la région du Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ), la haute prévalence de porteurs de mutations responsables de certaines maladies génétiques, particulièrement récessives, pourrait être expliquée surtout par l'effet fondateur qui est défini comme étant «une nouvelle population fondée par un petit groupe de fondateurs porteurs d'une petite fraction de la variation génétique totale de la population d'origine» (30). La littérature rapporte un effet fondateur notamment chez les libanais, les juifs ashkénazes, les néerlandais, les finlandais et les canadiens-français. Une étude épidémiologique chez les canadiens-français

a observé une prévalence accrue de 1/80 pour l'HF dans la région du SLSJ comparativement à 1/270 dans la province du Québec et à 1/900 dans la région de Montréal qui s'explique par le triple effet fondateur au SLSJ (28, 31). L'analyse des mutations dans le gène du LDLR sur 1460 chromosomes, dont la quasi-totalité de provenance de patients canadiens français HF a permis la découverte de 6 différentes mutations (32-35) expliquant 85% des HF au Québec (Tableau 2). Au SLSJ, deux mutations ( $\Delta >15$  kb et W66G à l'exon 3) expliquent 90 % des cas de HF (33).

**Tableau 2 : Fréquence des mutations dans le gène du récepteur des LDL chez 343 enfants hétérozygotes originaires du Saguenay–Lac-Saint-Jean**

Mutations	$\Delta >15$ kb	$\Delta 5$ kb	W66G	E207K	Y468X	C646Y	Autres
n	192	0	61	2	14	22	52
%	56	0	18	1	4	6	15

Source : Gagné C, Gaudet D. Les dyslipoprotéïnémies : l'approche clinique, 2<sup>e</sup> édition

### 1.3 Variabilité phénotypique

Cliniquement, les patients HF sont caractérisés par la présence de xanthomes tendineux, de xanthomes plans ou d'arcs lipoides cornéens et ramènent souvent une histoire familiale ou personnelle de MCA précoce (7). Les sujets hétérozygotes HF (HeHF) manifestent des taux plasmatiques de cholestérol-LDL deux fois plus élevés que ceux de la population générale, se situant entre 4,9 – 10,3 mmol/l. Les taux de TG se maintiennent souvent à des limites normales. Toutefois, quelques patients HeHF manifestent une élévation des taux de TG expliquée par une interaction avec d'autres variants géniques, tels que l'apoE2, ou avec des facteurs environnementaux, tels que la consommation d'alcool, l'obésité et le diabète type 2 (36). Les xanthomes tendineux sont un signe pathognomonique de l'HF, bien que leur identification ne soit pas toujours aisée. Il a été

récemment reporté que 29% des patients HF génétiquement diagnostiqués auraient des xanthomes tendineux achiliens mis en évidence par échographie (37). Il n'existe toutefois pas de critères diagnostiques absolus dans l'HF.

Chez la majorité des patients HF on observe un excès de dépôt de cholestérol au niveau de la paroi vasculaire induisant une accélération de l'athérosclérose et de maladies cardiovasculaires. Sans traitement, 75% des sujets HF masculins manifesteraient une MCA avant l'âge de 60 ans (8, 38-40). La moyenne de l'âge de l'apparition de la maladie cardiovasculaire se situe entre 40 et 45 ans chez les hommes. Chez les femmes, la maladie apparaîtra en moyenne 10 ans plus tard (41). Une fois l'âge de 60-70 ans atteint, ce risque s'atténue et tend à égaler celui de la population générale (38, 42).

Même si l'HF se présente comme une maladie monogénique, son expression phénotypique demeure aussi très variable en terme d'âge d'apparition et de sévérité. Le tableau clinique diffère substantiellement même chez les sujets partageant les mêmes mutations (8, 43), ce qui indique donc que plusieurs facteurs additionnels pourraient influencer l'évolution et les manifestations cliniques de la maladie et, de ce fait, le risque cardiovasculaire associé.

### **1.3.1 Facteurs environnementaux**

Comme pour leur implication dans la modulation du risque cardiovasculaire, les facteurs environnementaux jouent un rôle indiscutable dans la modulation de l'expression clinique de l'HF. L'influence des habitudes tabagiques et alimentaires est actuellement bien établie. Le tabagisme s'est d'ailleurs avéré à plusieurs reprises un puissant prédicteur de la mortalité par MCA chez les sujets HF (44). Pour ce qui est de l'influence de la diète, un des meilleurs exemples serait le cas de l'HF en Tunisie où il a été observé que, malgré des taux plasmatiques moyens de cholestérol-LDL de 16 mmol/l et une haute prévalence de xanthomes, plusieurs porteurs homozygotes d'une mutation dans le gène du LDLR n'ont jamais souffert de MCA précoce. Les hétérozygotes, quant à eux, n'ont manifesté

pratiquement aucun signe clinique associé à l'HF en plus d'une cholestérolémie normale. Il a été suggéré que la diète traditionnelle tunisienne, riche en gras insaturés (huile d'olive) et en carbohydrates mais pauvre en gras total, pourrait expliquer ces observations (45).

Ces quelques exemples démontrent clairement le rôle primordial que pourraient jouer les facteurs environnementaux. Toutefois, il reste à clarifier le rôle de nombreux autres facteurs suspects ou complètement inconnus pour jeter la lumière sur les variations considérables de l'évolution de l'HF. Parmi ceux-ci, il faut noter l'intérêt que suscite l'activité physique dans la modulation du profil phénotypique de l'HF.

### **1.3.2 Facteurs métaboliques**

De nombreuses publications font référence à l'implication de facteurs métaboliques dans la modulation de l'expression du tableau clinique de l'HF. Alors que certains de ceux-ci sont bien décrits, des observations plus récentes documentent l'effet de modulateurs métaboliques moins connus mais très prometteurs dans l'évaluation du risque cardiovasculaire individuel.

#### ***1.3.2.1 Profil lipidique***

Dans une étude récente (44), la taille des particules LDL est, avec l'âge et le genre, le principal facteur de risque du développement de MCA chez les patients HF. Plusieurs autres études ont démontré que des taux plasmatiques bas de cholestérol-HDL représentent un facteur de risque indépendant de MCA à la fois dans la population générale et HF (46). En fait, ce n'est pas uniquement le niveau plasmatique du cholestérol-HDL mais aussi le transport à rebours en général qui jouerait un rôle important dans la prédisposition à la MCA.



### **1.3.2.2 La lipoprotéine(a)**

Une récente étude prospective (47) a observé l'influence de l'élévation des lipoprotéine(a) sur le risque de MCA. Les hauts niveaux de lipoprotéine(a) ont été notés chez les patients HF (48), mais l'association entre la lipoprotéine(a) et le risque de MCA chez les HF demeure obscure. Toutefois, de récentes publications indiquent que chez les HF, la lipoprotéine(a) serait associée au risque de MCA uniquement chez les sujets qui ont manifesté des événements coronariens très précoces (44, 49). La lipoprotéine(a) agirait en inhibant le TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) en freinant la formation locale de la plasmine. Le TGF- $\beta$  jouerait un rôle cardioprotecteur en atténuant l'inflammation (50).

### **1.3.2.3 La protéine C-réactive (CRP)**

L'inflammation joue un rôle primordial dans l'athérogénèse par le biais du recrutement cellulaire, suivi du remodelage de la paroi vasculaire et du développement de la plaque d'athérosclérose. Les processus inflammatoires sont étroitement liés à la stabilité de la plaque athéromateuse aboutissant à sa déstabilisation et sa rupture. La CRP se présente comme un des marqueurs les plus prometteurs de ce processus, car ses taux plasmatiques élevés sont associés à un risque accru de maladies cardiovasculaires (51). Une étude de 337 patients HF (52) a révélé que la présence de MCA chez ces derniers était associée à des taux plasmatiques élevés de CRP.

### **1.3.2.4 Le Fibrinogène**

Une revue de 18 études prospectives a démontré que le fibrinogène est un facteur de risque indépendant de l'athérosclérose (53). Les sujets HF manifestent des taux plasmatiques élevés de fibrinogène qui sont corrélés positivement aux taux plasmatiques de cholestérol-LDL ce qui représenterait un indicateur du développement de l'athérosclérose infraclinique chez ces patients (54).

### 1.3.3 Facteurs génétiques

#### 1.3.3.1 Les mutations dans le gène du LDLR

La classe et le type de mutations sont reconnus pour avoir une influence sur les phénotypes de l'HF, leur impact sur le développement de MCA a été largement étudié (45, 55-57). Les 920 mutations du gène du LDLR peuvent être divisées en cinq classes, selon l'effet qu'elles exercent sur l'expression de la protéine (Tableau 3).

**Tableau 3 : Classes des mutations dans le gène du récepteur des LDL**

Classe	Site	Effet	Mutations présentes au Québec
I	Transcription	Absence de synthèse du LDLR	$\Delta > 15$ kb, Y468X
II	Transport	Défaut de transport du LDLR à la surface cellulaire	E207K, C646Y
III	Liaison à l'apoB	Absence de liaison entre les LDL et le LDLR	W66G, $\Delta$ 5 kb
IV	Surface Cellulaire	Liaison sans internalisation du complexe LDLR/ligand	
V	Cellule	Absence d'association du complexe LDLR et absence recyclage du LDLR	

Source : Gagné C, Gaudet D. Les dyslipoprotéïnémies : l'approche clinique, 2<sup>e</sup> édition

Les mutations dites nulles (appartenant à la classe I) induisent une activité du LDLR inférieure à 2 % de la normale en produisant peu ou pas de protéines, ceci explique le fait qu'elles sont associées à des apparitions plus précoces et plus sévères de MCA que les mutations défectives (Tableau 4).

**Tableau 4 : Effet du type de mutation dans le gène du récepteur des LDL sur les taux plasmatiques de cholestérol et sur la coronaropathie chez les homozygotes**

	$\Delta > 15$ kb	W66G	p
n	11	10	
<b>Coronaropathie</b>			
%	64	70	0,757
Âge	13 ± 2	24 ± 4	0,059
<b>Décès</b>			
%	64	20	0,044
Âge	22 ± 3	24 ± 1	0,09
<b>Cholestérolémie totale</b>	26 ± 1	16 ± 1	0,004

Source : Les dyslipoprotéïnémies : l'approche clinique, C. Gagné, D. Gaudet

En dépit de la perturbation métabolique classique que représente l'hypocatabolisme des LDL causé par la baisse de l'activité du LDLR, plusieurs études se sont penchées sur le fait que la surcharge de l'hépatocyte en cholestérol au cours de l'HF pourrait induire une augmentation de la sécrétion hépatique de l'apoB, qui serait responsable de l'élévation des taux plasmatiques du LDL (58, 59). La relation entre les différentes mutations du LDLR et le métabolisme de l'apoB n'est toutefois pas encore investiguée dans l'HF, bien que des études basées sur des cultures d'hépatocytes ont révélé une association entre le LDLR et le niveau de sécrétion de l'apoB (60-62).

### ***1.3.3.2 Autres facteurs génétiques***

Les interactions gène-gène et gène-environnement sont également à considérer dans la modulation du risque de maladies cardiovasculaires. Quelques variants génétiques qui ont un effet mineur sur les phénotypes dans la population générale auraient une influence plus importante chez les sujets HF à cause du haut risque *a priori* de MCA chez ces derniers. Certains de ceux-ci retiennent de plus en plus l'attention dans la littérature. Deux mutations dans le gène de la lipase lipoprotéique (D9N et N291S) ont été étudiées chez les sujets HF. Leurs présences simultanées modifient significativement le profil lipidique et augmente le risque de MCA (63, 64). Par contre, dans le gène de l'apoE, l'allèle E4

n'influence pas les taux plasmatiques des LDL mais serait associé à des taux plasmatiques bas de HDL ce qui augmenterait le risque de MCA. Cependant, dans une cohorte de sujets HF, l'allèle Taq1 B2 du gène de la CETP a été associé à des taux plasmatiques bas de LDL et hauts de HDL (65). Il est donc évident que le type de mutation du LDLR est un déterminant du phénotype de l'HF. Ceci n'exclut toutefois pas la contribution d'autres gènes.

## CHAPITRE II

### L'ATHÉROSCLÉROSE ET LE RISQUE CARDIOVASCULAIRE DANS L'HYPERCHOLESTÉROLÉMIE FAMILIALE

#### 2.1 Introduction

L'HF est une maladie dont les conséquences cardiovasculaires peuvent être dramatiques. Sans traitement, 40% des hommes HF et 18% des femmes HF développeraient de l'athérosclérose avant la quarantaine. Ces proportions augmentent respectivement à 68% et 45% avant 50 ans, et 96% et 74% avant 60 ans. Malgré le succès remarquable du traitement et de la prévention des MCA, la mortalité et les complications qui leurs sont relatives se positionnent toujours au premier rang des problèmes de santé dans les pays développés (66). Par conséquent, les mesures de lutte contre l'athérosclérose représentent un défi majeur de la médecine moderne (67).

Le développement de l'athérosclérose implique l'interaction entre l'endothélium vasculaire, les lipides plasmatiques, les cellules inflammatoires, les plaquettes et les cellules musculaires lisses. L'athérosclérose est enclenchée par l'activation et/ou la lésion de l'endothélium ce qui stimule la libération du MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*) par les monocytes, l'interféron- $\gamma$  et les TNF- $\beta$  (*tumor necrosis factor- $\beta$* ) par les cellules-T (68-70), en plus d'une attraction des cellules musculaires lisses. Les monocytes et les lymphocytes recrutés traversent la barrière endothéliale pour s'accumuler au niveau de l'intima, induisant ainsi une réponse inflammatoire locale (71).

Les monocytes se différencient en macrophages et expriment les récepteurs scavenger ce qui favorise l'engorgement en lipides circulants pour ainsi former les cellules spumeuses. L'endothélium et les leucocytes activés libèrent des médiateurs fibrogéniques incluant une variété de facteurs de croissance. Ceux-ci stimulent la réplication des cellules musculaires lisses qui, à leur tour, secrètent une enzyme qui dégrade l'élastine et le collagène en réponse aux stimuli inflammatoires. Cette dégradation de la matrice extracellulaire permet l'infiltration des cellules musculaires lisses à travers la lumière élastique et l'assise collagèneuse, formant ainsi la plaque. Ultérieurement, la plaque acquiert une enveloppe fibreuse et éventuellement se calcifie (72).

Le dysfonctionnement des cellules endothéliales est un événement précoce dans la pathogenèse de l'athérosclérose dont l'élément clé est la réduction de la bioactivité du monoxyde d'azote (NO).

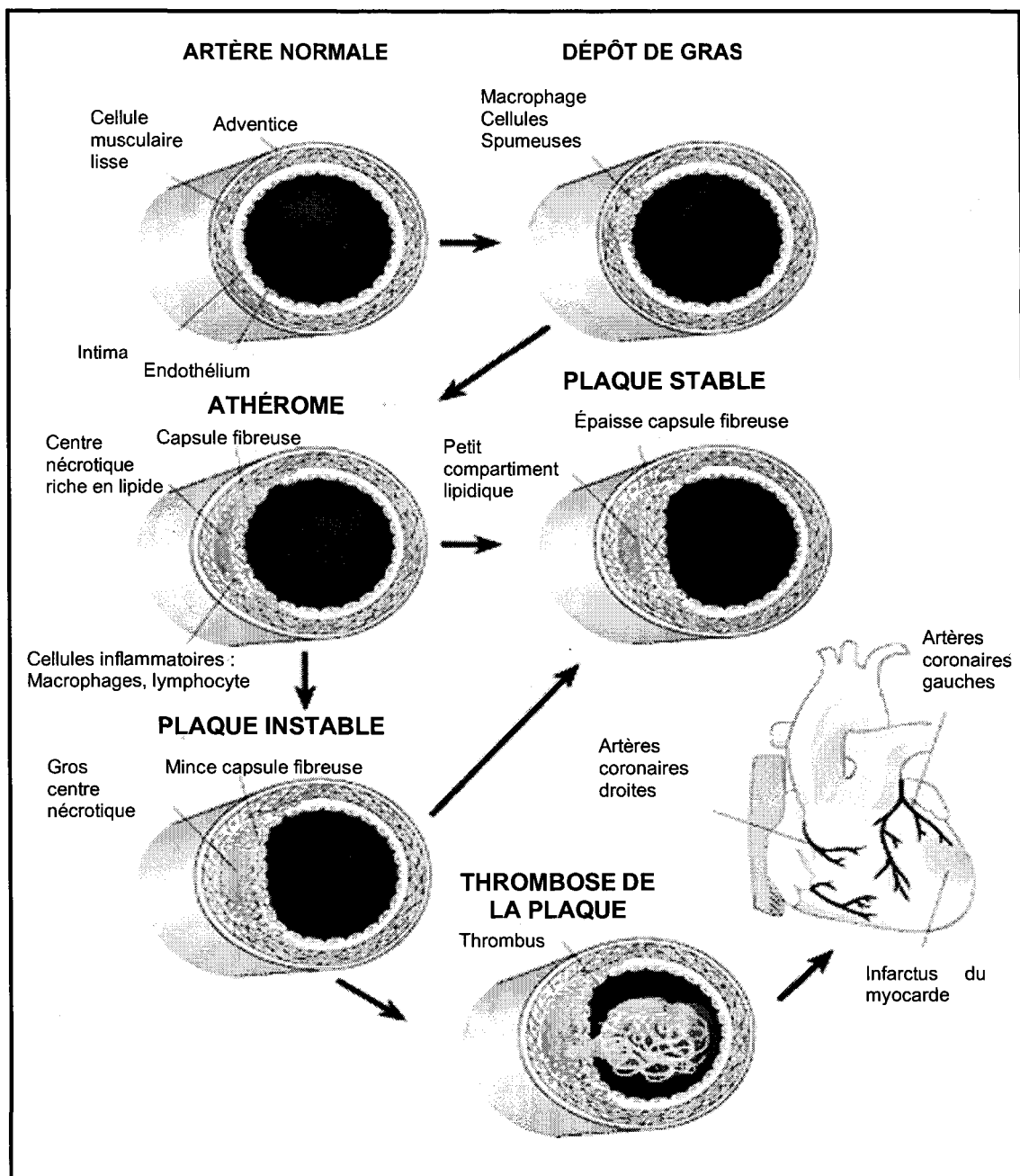
Le NO est un puissant vasodilatateur dont la première action prouvée est celle de contrer l'effet vasoconstricteur du système rénine-angiotensine, du système nerveux sympathique et autres vasoconstricteurs. Cette vasodilatation joue un rôle important dans la régulation du flux sanguin. Le NO agit sur l'adhésion des monocytes à la paroi endothéliale et réduit le stress oxydatif en inhibant la transcription du MCP-1 et du VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule- 1*) qui jouent un important rôle dans l'inflammation. Le NO inhibe aussi la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (73).

La plaque d'athérosclérose ou l'athérome est un élément clé dans le développement de l'athérosclérose. La formation de l'athérome se fait à un âge précoce, souvent durant l'adolescence. L'évolution dépendra de plusieurs facteurs, tels que le sexe, les facteurs génétiques et autres facteurs comme l'hyperlipoprotéïnémie. Une fois initié, l'athérome reste stable durant plusieurs années, causant uniquement quelques rares symptômes comme une angine stable ou des claudications. Toutefois, l'intervention de quelques facteurs peut rendre instable une plaque préalablement stable, donnant ainsi occasion à des événements de gravité supérieure tel que l'infarctus du myocarde (74). L'instabilité de la plaque se produit quand les médiateurs inflammatoires inhibent la synthèse du collagène

par l'expression des collagénases des cellules spumeuses. Ce processus amincit l'enveloppe fibreuse, la rendant faible et vulnérable à la rupture (75). Dans les lésions athérosclérotiques rupturées, une activité intense des peroxydases a été relevée. Les oxydants générés par la myelopéroxydase joueraient un rôle dans la rupture de la plaque. La voie suspectée impliquerait la famille des enzymes appelée la matrice métalloprotéinase (MMPs) particulièrement les MMP-1, -3 et -9, qui sont capables de dégrader le collagène et l'élastine qui constituent les éléments structuraux majeurs de la lésion, suggérant ainsi que l'activation de ces enzymes jouerait un rôle dans la dégradation de la matrice et provoquerait la rupture (Figure 3).

## 2.2 Le stress oxydatif

Récemment, un grand intérêt a été accordé à la contribution du stress oxydatif dans les maladies vasculaires en général et l'athérosclérose en particulier (76). Bien que les taux élevés de cholestérol-LDL jouent un rôle important dans le développement de l'athérosclérose, des études *in vitro* suggèrent que les particules LDL elles-mêmes ne sont pas athérogéniques. La modification oxydative des LDL jouerait en effet un rôle primordial dans la pathogenèse de l'athérosclérose (77). Chez les patients HF on observe à la fois une augmentation de la concentration des particules LDL et un prolongement de leur temps de résidence plasmatique avant qu'elles soient internées par leurs récepteurs. Ainsi, plus de particules LDL resteront plus longtemps exposées aux modifications, aboutissant à la formation de particules chargées négativement donc hautement oxydables ce qui contribue à augmenter le potentiel athérogénique de l'HF (78). Les mécanismes par lesquels les particules LDL oxydées (LDLox) aboutissent au développement de l'athérosclérose sont nombreux. Parmi les plus étudiés, on retrouve l'incapacité des macrophages à dégrader les LDLox qui se conjugue au pouvoir d'inhibition et de cytotoxicité qu'exerce le LDLox sur ces mêmes macrophages et ainsi, à un recrutement plus grand de monocytes au niveau de la région sous-intimale (79).



**Figure 3: Évolution naturelle de l'athérosclérose**

Modifié de : Lulis AJ. Annu. Rev. Genom. Human. Genet. 2004.5 :189-218

L'athérosclérose est une maladie progressive caractérisée par l'accumulation de lipides et d'éléments fibreux dans les artères. Les lésions les plus précoces de l'athérosclérose consistent en une accumulation de macrophages engorgés de cholestérol appelés cellules spumeuses. À ce stade, ces lésions demeurent asymptomatiques mais ce sont les précurseurs des lésions plus avancées caractérisées par le dépôt de débris nécrotiques et de cellules musculaires lisses. Ces athéromes acquièrent une capsule fibreuse couvrant un centre nécrotique riche en lipides. La plaque athéromateuse devient de plus en plus complexes et peut subir des calcifications, des ulcérations et des hémorragies. Les lésions les plus avancées peuvent augmenter de volume au point de bloquer le flux sanguin aboutissant à une occlusion aiguë qui se manifeste par un infarctus du myocarde. La thrombose est associée à une rupture ou une érosion des plaques vulnérables possédant une mince capsule fibreuse.



## 2.3 Le syndrome métabolique et la modulation du risque cardiovasculaire

### 2.3.1 Définitions et prévalence du syndrome métabolique

En 1998, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) initia une consultation pour définir les critères du syndrome métabolique (80). Consécutivement, le NCEP-ATP III (*National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III*) (81) et le groupe européen de l'étude de l'insulinorésistance (82) proposèrent une définition englobant l'intolérance au glucose (glycémie à jeûn  $\geq 6,1$  mmol/L), l'obésité (tour de taille  $\geq 102$  cm (homme) ou  $\geq 88$  cm (femme)), l'hypertension (tension artérielle  $> 135/85$  mmHg et/ou médication) et la dyslipidémie (TG  $\geq 1,7$  mmol/L ou cholestérol-HDL  $< 1,04$  (homme) ou  $> 1,29$  (femme) mmol/L). En mai 2004, des experts de la fédération internationale du diabète (*IDF*) tentèrent d'établir une définition unifiée du syndrome métabolique. Le même processus a été entrepris par le NHLBI (*National Heart, Lung and Blood Institut*) et l'Association américaine du cœur (*AHA*). Suite à cet exercice, le syndrome métabolique a été défini par la présence d'une obésité abdominale (tour de taille  $> 94$  cm chez les hommes et  $> 80$  cm chez les femmes) et deux des critères suivants :

- TG  $\geq 1,7$  mmol/L ; cholestérol-HDL  $< 0,9$  (homme) ou  $< 1,1$  (femme) mmol/L
- Tension artérielle  $> 130/85$  mmHg ou médication
- Glycémie à jeûn  $\geq 5,6$  mmol/L

La prévalence du syndrome métabolique tel que défini par le NCEP-ATP III s'élèverait à 22% selon l'étude du *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) (83), ce taux augmente à 44% si on considère uniquement les sujets de 50 ans et plus (84). Le risque cardiovasculaire étant plus élevé chez les sujets présentant un syndrome métabolique. D'ailleurs, il a été estimé que le risque de morbidité cardiovasculaire associé au syndrome métabolique serait plus élevé que celui associé à chacune de ses propres composantes individuelles (85).

### 2.3.2 Dyslipidémies

L'hyperlipidémie est un facteur de risque évident de l'athérosclérose. Les taux plasmatiques élevés des lipides en général et du cholestérol-LDL en particulier sont étroitement liés au développement de l'athérosclérose. Les résultats de l'étude de Framingham (86) et ceux de l'étude *Multiple Risk Factor Intervention Trial* (MRFIT) (87) ont démontré que l'augmentation du risque des coronaropathies serait proportionnelle à l'élévation du taux plasmatique du cholestérol. Des études cliniques randomisées ont observé que la thérapie hypolipidimante réduit jusqu'à 30% le risque d'évènements coronariens (88).

Les taux plasmatiques élevés du cholestérol-LDL sont dus à une sécrétion hépatique excessive de lipoprotéines ou à un défaut d'élimination du LDL (89) ce qui favorise l'internement du LDL au niveau de l'intima et son oxydation par les radicaux libres générés par les cellules adjacentes, telles que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages. Le LDL oxydé est extrêmement athérogène en stimulant la sécrétion de différentes cytokines par l'endothélium qui favorisent l'accumulation des monocytes et des macrophages et résultent en la formation des cellules spumeuses. Le noyau de la plaque d'athérosclérose est composé de cellules spumeuses qui tiennent origine des macrophages et des cellules musculaires lisses très chargés en cholestérol.

### 2.3.3 Dysglycémie

La détérioration de l'action de l'insuline dans le métabolisme du glucose inclut son incapacité de freiner la production de ce dernier par le foie et les reins et de favoriser sa captation et son métabolisme au niveau de certains tissus connus pour leur sensibilité à l'insuline, tels que le muscle et le tissu adipeux (90). La relation entre les troubles de la glycémie à jeun ou la tolérance au glucose et l'insulinorésistance est bien établie chez l'humain (91). Ainsi, pour compenser le manque d'action de l'insuline, la sécrétion et l'élimination de cette dernière doivent être modifiées. L'accélération du développement de l'athérosclérose chez les patients HF diabétiques ou intolérants au glucose serait due à l'augmentation du taux plasmatique de résidus de lipoprotéines (92).

### 2.3.4 Hypertension artérielle

L'insulinorésistance est reliée à l'hypertension artérielle (HTA) (93) et contribue à la hausse de sa prévalence dans le cadre du syndrome métabolique (94). Lorsqu'elle est administrée en intraveineux chez des sujets avec un poids normal, l'insuline agit comme un vasodilatateur (95). L'insuline influence aussi la réabsorption rénale du sodium (96) et stimule le système nerveux sympathique (97). Chez les sujets HF, l'HTA est plus fréquemment observée chez ceux manifestant une MCA que chez ceux sans MCA (98).

### 2.3.5 Obésité

Durant les trois dernières décennies, l'obésité a augmenté dramatiquement dans les pays industrialisés. Au Canada, entre 1985 et 1998, la prévalence de l'obésité (telle que définie par un IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) est passée de 5,6% à 14,8% (99). Aux Etats-Unis, cette prévalence est passée de 12% en 1991 à 17,9% en 1998 puis à 20,9% en 2001 (100, 101).

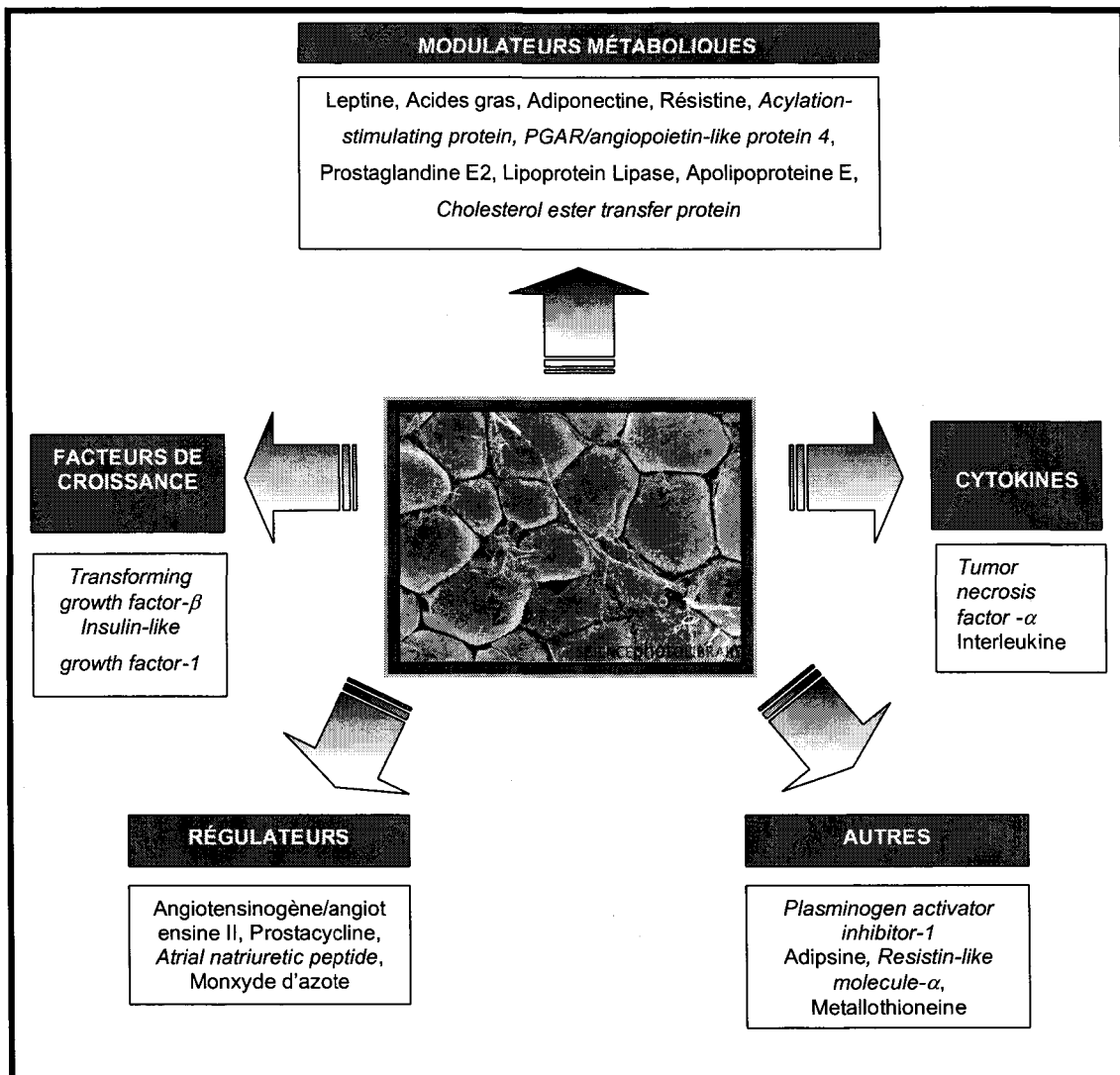
L'association entre l'obésité et l'athérosclérose est bien documentée. Steinberg *et al* ont démontré que le degré de la vasodilatation est inversement proportionnel au degré de l'obésité (102). Arco *et al* ont observé que le flux sanguin en réponse au stress de cisaillement est atténué chez les sujets obèses (103). Dans la même vision, Tack *et al* ont démontré que la réponse vasodilatatrice à l'insuline est aussi atténuée chez les obèses (104). Westerbacka *et al* ont établi une association entre le dysfonctionnement endothélial et le degré de l'obésité (105). Toutefois, ces études n'ont pas fourni la description des mécanismes qui aboutissent à ces dysfonctionnements endothéliaux.

Le tissu adipeux suscite de plus en plus d'intérêt. Longtemps considéré comme une réserve énergétique inerte (106), il se distingue actuellement par ses multiples fonctions endocrines, paracrines et autocrines, faisant de lui un organe au centre de l'homéostasie énergétique (Figure 4). Par conséquent, son déséquilibre peut influencer le fonctionnement d'autres systèmes. Il est reconnu actuellement que le tissu adipeux secrète une multitude de substances bioactives qui modulent ses propres fonctions et aussi celles d'autres organes en réponse à des stimuli neuronaux, hormonaux et nutritionnels. Les adipocytes sont aptes à

augmenter leur diamètre de 20 à 200  $\mu\text{m}$ . Toutefois, la multiplication du nombre des cellules est aussi responsable de perturbations non négligeables (107). Un sujet avec un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à  $30\text{kg}/\text{m}^2$  serait quatre fois plus à risque de développer une maladie cardiovasculaire qu'un sujet avec IMC égal ou inférieur à  $25\text{kg}/\text{m}^2$  (73).

Par sa prévalence élevée, l'obésité évolue actuellement sur un mode épidémique dans les pays industrialisés et pèse lourdement sur leurs systèmes de santé (108, 109). Ceci serait dû en grande partie au mode de vie tel que la sédentarité. L'obésité représente désormais un facteur de risque indiscutable du diabète non-insulino dépendant, des coronaropathies, de l'hypertension et du syndrome métabolique.

Le tour de taille est inclus dans plusieurs définitions du syndrome métabolique (80-82). Il a été démontré que le tissu adipeux viscéral serait derrière l'excès du taux plasmatique d'acides gras libres post-prandiaux chez les sujets obèses et par conséquent plus étroitement relié au syndrome métabolique que le tissu adipeux sous-cutané (110, 111). L'obésité est associée aux troubles du métabolisme des lipides et aux facteurs de coagulation ce qui contribue à hausser le risque de MCA (112). Dans un échantillon de sujets HF, Gaudet *et al.* ont constaté que, malgré une insulïnémie et un tour de taille plus bas chez les sujets HF que chez les non-HF, la contribution de l'hyperinsulïnémie et de l'obésité abdominale dans l'apparition de MCA est plus évidente chez les HF (113).



**Figure 4: Les fonctions du tissu adipeux**

Le tissu adipeux a des fonctions endocrines, paracrines et autocrines, faisant de lui un organe au centre de l'homéostasie énergétique. Il est reconnu actuellement que le tissu adipeux sécrète une multitude de substances bioactives qui modulent ses propres fonctions et aussi celles d'autres organes en réponse à des stimuli neuronaux, hormonaux et nutritionnels.

## CHAPITRE III

### ADIPONECTINE : UN NOUVEAU MODULATEUR DU RISQUE CARDIOVASCULAIRE

#### 3.1 Introduction

Scherer *et al* ont été les premiers à cloner, en 1995, l'ADN complémentaire (ADNc) de l'adiponectine chez la souris et l'ont appelé Acrp30 (*adipose complement-related protein of 30 kDa*) (114). Hu *et al* ont identifié une protéine, qu'ils ont nommée adipoQ, qui circule à des niveaux bas chez les souris ob/ob (115). Maeda *et al* ont isolé le ADNc-adiponectine au niveau du tissu adipeux humain (apM1 : *adipose most abundant gene transcript*) (116). La même année l'équipe de Nakano a identifié la protéine d'adiponectine qu'ils ont nommée GPB28 (*gelatin binding protein of 28 kDa*) (117). Ils ont aussi présenté la structure du gène comme un polypeptide de 244 acides aminés avec un signal sécrétoire à la terminaison amine, une petite région non hélicale, 22 répétitions collagène et un domaine globulaire (117).

L'adiponectine est présente dans le plasma et au niveau du tissu adipeux. Sa synthèse est induite durant l'adipogenèse, pendant la différenciation des préadipocytes en adipocytes. Il s'agit d'une protéine de 247 acides aminés possédant une séquence aminée terminale, un domaine non homologue, un domaine collagène contenant plusieurs répétitions et enfin un domaine globulaire (114). L'ARNm de l'adiponectine serait sous-exprimé chez les sujets obèses à un stade précoce et demeure ainsi après le développement du diabète. Il s'avère que l'expression de l'adiponectine est enclenchée durant l'adipogenèse et qu'une inhibition lui est imposée durant le développement de l'obésité

(115). Les modifications post-translotionnelles sont d'une grande importance dans les activités biologiques de l'adiponectine (118). L'ablation transgénique du gène de l'adiponectine chez les souris recevant une diète riche en glucides induirait l'insulinorésistance et un gain de poids (119). Par ailleurs, l'adiponectine augmenterait la captation des acides gras dans le muscle par l'intermédiaire du FATP-1 (*Fatty acid transport protein-1*), une protéine transmembranaire impliquée dans la captation des acides gras plasmatiques. Toutes ces perturbations seraient toutefois corrigées chez la souris infectée par un vecteur adénoviral exprimant l'adiponectine (120).

Contrairement à la leptine, le taux plasmatique de l'adiponectine est réduit chez les sujets obèses (taux moyen 3,7 µg/ml) comparativement aux sujets non obèses (8,9 µg/ml), ce qui fait de l'adiponectine la seule protéine du tissu adipeux qui serait abaissée en cas d'obésité (121). Dans un échantillon de femmes obèses comparées à des femmes non obèses, l'adiponectine est négativement corrélée avec l'IMC et la masse du gras corporel de même qu'avec les taux plasmatiques de leptine (122). Chez les indiens Pima comme chez les caucasiens, l'adiponectine présente aussi une corrélation négative avec l'IMC, le pourcentage de gras corporel et avec le rapport taille/hanche et ce, même si les concentrations plasmatiques sont plus reliées au degré de l'insulinorésistance qu'au degré d'adiposité (123). Dans une autre étude, une perte de poids de 21 % fait augmenter les niveaux plasmatiques d'adiponectine de 46 % (124). L'étude suggère un rétrocontrôle négatif entre la masse du gras corporel et la production de l'adiponectine. Dans une autre étude, la perte de poids induit une augmentation du taux plasmatique de l'adiponectine chez les diabétiques et les non-diabétiques (40 à 60 %) (125).

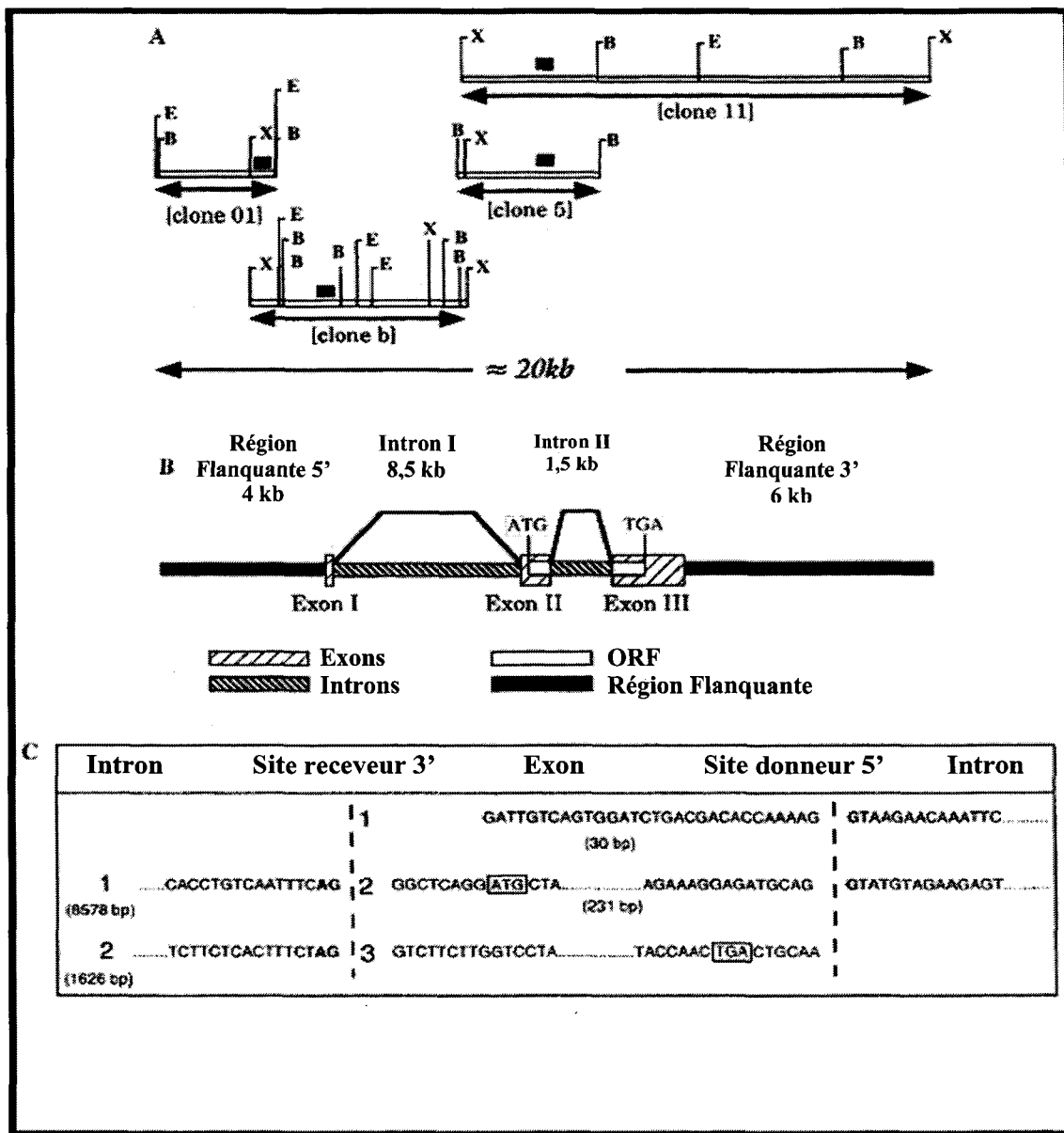
## **3.2 La génétique de l'adiponectine**

### **3.2.1 Le gène**

Trois équipes de recherche ont localisé le gène apM1 de l'adiponectine sur le chromosome 3q27 ((126), (127), (128)). Chez la souris, le gène d'adiponectine est situé dans la région télomérique du chromosome 16, une région qui est synténique du locus

3q27 chez l'humain (Figure 5) (128). Des études d'association ont mis en évidence que la même région code pour l'obésité, le diabète et le syndrome métabolique (129). Récemment, Froguel *et al.* ont publié une revue de littérature scientifique sur la description de la génétique de l'adiponectine (130). Le gène s'étale sur 16 kb et est composé de 3 exons et 2 introns (127).





**Figure 5 : Le gène de l'adiponectine**

Scherer *et al.* Biochem Biophys Res Commun. 2001 Feb 2;280(4):1120-9.

Schéma de la structure du gène de l'adiponectine. (A) Les clones génomiques dérivés d'un fragment d'ADN plus grand, indiquant les sites de restrictions. (B) La structure du gène représentant les exons, les introns, et les régions flanquantes. (C) Les séquences des jonctions exon-intron.

### 3.2.2 Le récepteur

Plusieurs équipes de recherche se sont penchées sur l'identification et la localisation des récepteurs de l'adiponectine. En 2003, Yamauchi *et al* ont reporté le clonage de l'ADNc codant pour les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 (131). AdipoR1 est localisé au niveau du chromosome 1p36.13-q41, alors que AdipoR2 se trouve au niveau du chromosome 12p13.31. Les deux récepteurs sont exprimés dans la majorité des organes avec une prédominance de AdipoR1 au niveau du muscle squelettique et une prédominance du AdipoR2 au niveau du foie. Ces récepteurs contiennent sept domaines transmembranaires et activent des molécules comme les *peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$*  (PPAR- $\alpha$ ), *5'-AMP-activated protein kinase* (AMPK) et *mitogen-activated kinase* (MAPK) (131). D'autres équipes ont décrit la structure et le mode de multimérisation de l'adiponectine (114, 117, 121, 132, 133). Plus récemment, l'expression de ces deux récepteurs a été démontrée au niveau des cellules  $\beta$  pancréatiques chez la souris et l'humain. Cette expression est accentuée par l'exposition des cellules  $\beta$  aux acides gras insaturés. L'exposition à l'adiponectine augmenterait aussi l'expression de la lipase lipoprotéique. Ceci suggère que la régulation du récepteur de l'adiponectine au niveau des cellules  $\beta$  pancréatiques pourrait représenter un nouveau mécanisme modulant l'effet de l'adiponectine (134).

### 3.2.3 L'héritabilité de l'adiponectine

Commuzzie *et al* de même que Vasseur *et al* ont observé une grande contribution génétique dans l'expression du niveau plasmatique de l'adiponectine (42% à 70%)(135),(136). Une récente étude chez 805 enfants américains d'origine hispanique a estimé que l'adiponectinémie est hautement héritable comptant pour 93 % de la variance des niveaux plasmatiques (137).

### 3.3 Adiponectine et l'expression des éléments du syndrome métabolique

Il est actuellement admis que le tissu adipeux, tel un organe endocrinien, pourrait moduler, sinon induire, l'insulinorésistance au niveau d'autres tissus de l'organisme par la sécrétion de cytokines. Une étude expérimentale sur les singes Rhésus (138) a révélé une association entre l'adiponectine et le développement de l'insulinorésistance. L'adiponectinémie serait en effet déjà réduite dans la phase prédiabétique et évoluerait en parallèle avec la baisse de la sensibilité à l'insuline. L'adiponectinémie serait réduite aussi chez les souris lipodystrophiques, chez lesquelles le traitement à l'adiponectine réduirait l'insulinorésistance, améliorant ainsi le contrôle de l'homéostasie glycémique (139). Kubota *et al* ont par ailleurs constaté que les souris hétérozygotes pour le gène *Acrp30* manifesteraient une insulinorésistance plus modérée que celles des souris ne possédant aucune copie du même gène, alors que l'insulinémie demeurerait similaire (119).

Chez l'humain, le niveau de l'adiponectinémie est réduit chez les sujets insulinorésistants et semble être inversement relié à l'insulinorésistance et aussi au rapport insulinémie à jeun/insulinorésistance. Cependant, il ne semble pas y avoir un effet immédiat de l'insuline sur l'adiponectinémie (125). Weyer *et al* ont par ailleurs observé que le degré de l'adiponectinémie serait plus relié au degré de l'insulinorésistance qu'au degré de l'adiposité (123). Dans la même étude, réalisée chez les indiens Pima et les caucasiens, l'auteur révèle que la concentration de l'adiponectine est corrélée positivement avec la sensibilité à l'insuline et diminue significativement avec la baisse de la tolérance au glucose et ceci quelle que soit l'origine ethnique.

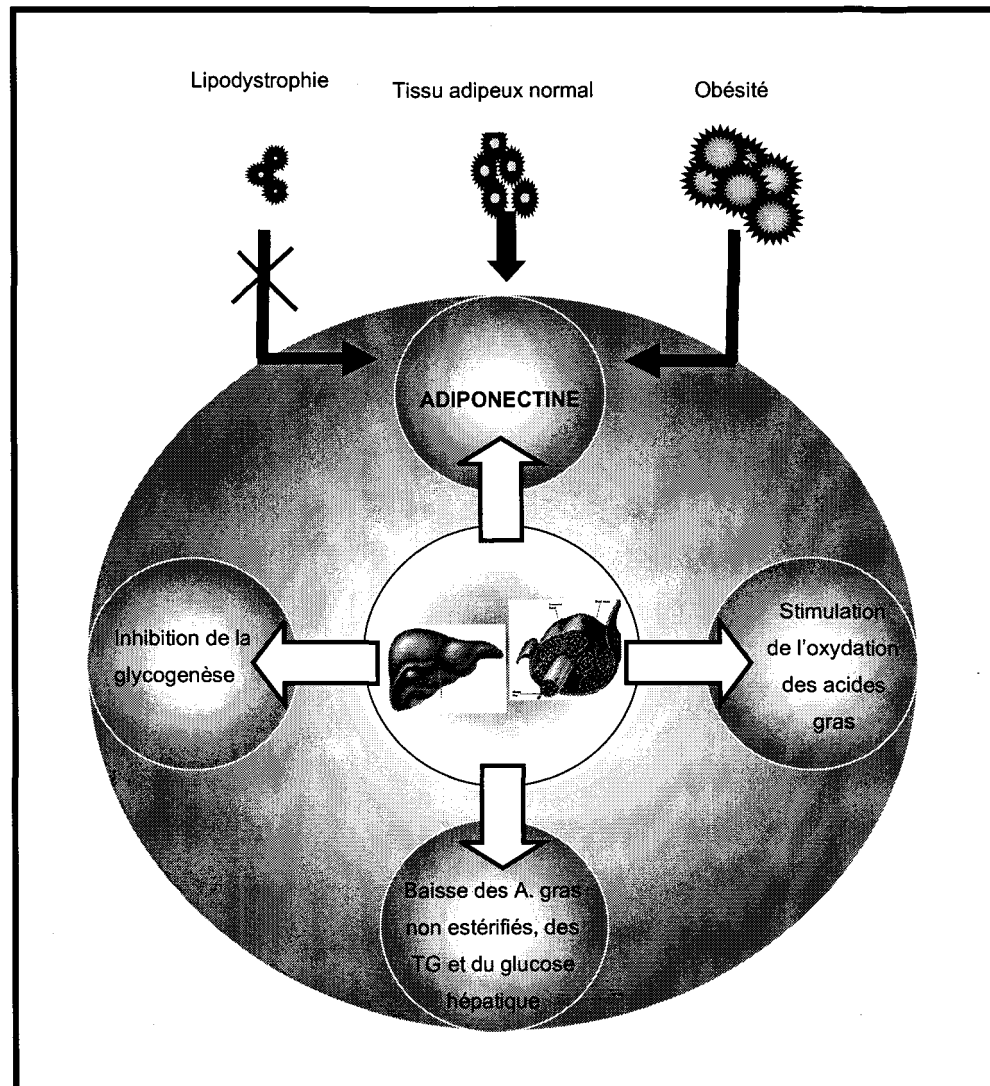
Pour élucider l'implication de l'adiponectine dans les mécanismes aboutissant à l'insulinorésistance, Fasshauer *et al* ont noté que l'insulinorésistance induite par les catécholamines passerait par l'inhibition de l'expression du gène de l'adiponectine dans les cellules 3T3-L1(140). Le même auteur a également observé que le TNF- $\alpha$  inhiberait l'expression de ce gène (141). D'un autre côté, l'adiponectine aurait aussi un effet inhibiteur sur les NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappaB*) induites par les TNF- $\alpha$  et ceci par

l'activation de la *cAMP protein kinase A* (142). Halleux *et al* relèvent que l'expression de l'adiponectine est inhibée par les glucocorticoïdes (143). L'insuline et l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1) augmenteraient la synthèse de l'adiponectine. Cet effet serait atténué par les inhibiteurs de la transcription et de la traduction. Ces observations démontrent donc que l'adiponectine et le TNF- $\alpha$  auraient des effets antagonistes au niveau du tissu adipeux et de la paroi vasculaire.

Le *peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$*  (PPAR $\gamma$ ), dont le lien avec la modulation de l'homéostasie glycémique est maintenant bien connu, serait une autre variable pouvant associer le métabolisme de l'adiponectine à l'expression des éléments du syndrome métabolique. L'activation des PPAR $\gamma$ , qui contrôlent l'expression de plusieurs facteurs impliqués dans le métabolisme lipidique et dans l'insulino-sensibilité, augmenterait les concentrations plasmatiques d'adiponectine (144). L'action des thiazolidinediones antidiabétiques, qui sont des agonistes du PPAR $\gamma$ , serait d'ailleurs en partie expliquée par leur effet direct sur l'adiponectine. Tel que démontré par les travaux de Maeda *et al* qui indiquent que la correction de l'insulinorésistance par l'administration de thiazolidinediones aux patients présentant une intolérance au glucose augmente le taux plasmatique de l'adiponectine (145).

L'adiponectine augmente d'autre part l'expression des protéines impliquées dans le métabolisme des acides gras, telles que l'Acyl-CoA oxidase et l'UCP-2 (*uncoupling protein-2*) dans le muscle squelettique (139). L'adiponectine supprime le flux des acides gras dans le foie et diminue la glycogénèse (Figure 7). De plus, l'administration *in vivo* de l'adiponectine diminuerait la production du glucose en inhibant l'expression hépatique des enzymes de la glycogénèse (phosphoenolpyruvate carboxykinase et glucose-6-phosphatase). L'infusion intraveineuse d'adiponectine n'a pas d'effet sur l'absorption tissulaire du glucose, la glycolyse et la glucogénèse mais réduit la production hépatique du glucose en réduisant l'expression des enzymes impliquées dans la néoglucogénèse (146). L'adiponectine est une protéine insulino-sensibilisante en augmentant la capacité de l'insuline à supprimer la glycogénèse hépatique. L'hépatocyte est l'une des cibles

principales de l'adiponectine. La baisse de la glycémie n'est donc pas associée à une augmentation du niveau d'insuline plasmatique mais à la baisse de la production hépatique de glucose dans des conditions d'hypoinsulinémie (147).



**Figure 7: L'adiponectine et l'homéostasie énergétique**

La sécrétion de l'adiponectine est abondante dans le tissu adipeux normal et abaissée dans le tissu adipeux obèse. L'adiponectine augmente l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique et stimule la production du glucose par le foie. Ces actions induisent une réduction des taux plasmatiques des acides gras, des triglycérides, du glucose circulant et des acides gras non estérifiés.

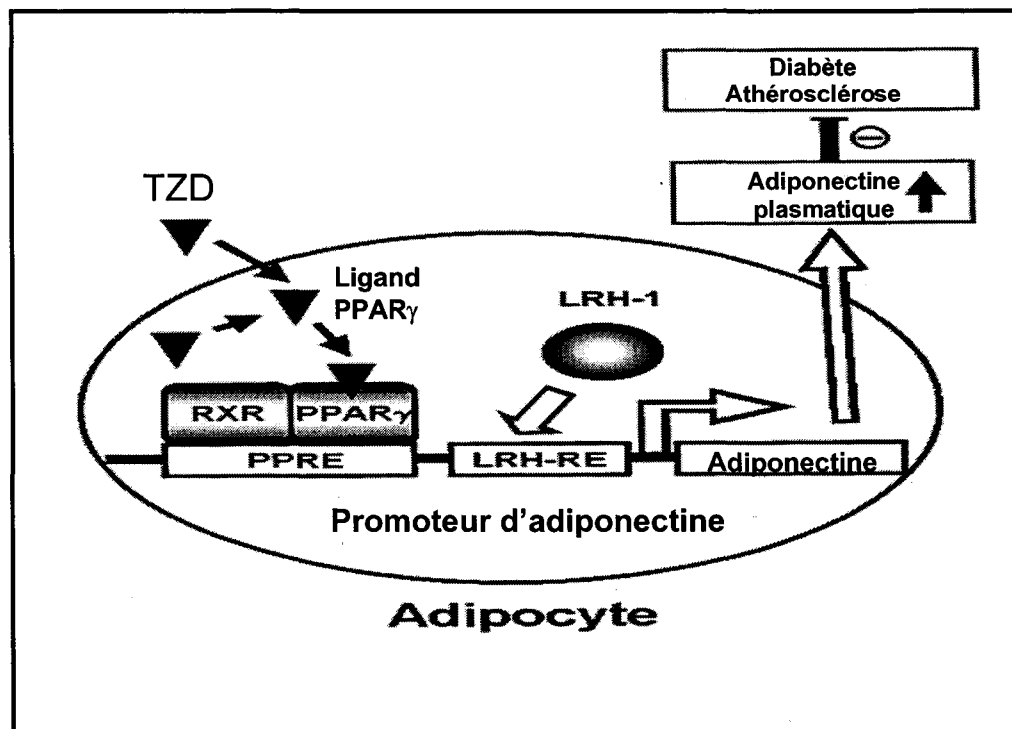
### 3.4 Adiponectine, athérosclérose et inflammation

Les taux plasmatiques d'adiponectine se sont distingués de ceux des autres adipocytokines par leur baisse en cas d'obésité et depuis, cette protéine a suscité un intérêt grandissant. Ouchi *et al* ont démontré que l'adiponectinémie est réduite chez les patients présentant une coronaropathie (148). Hotta *et al* (125) ont indiqué que l'hypoadiponectinémie dans le diabète serait un indicateur du développement des macroangiopathies. L'adiponectine a un effet inhibiteur sur la prolifération des précurseurs des myelomonocytes de la moelle épinière en induisant leur apoptose par la réduction de l'expression du gène antiapoptotique (Bcl-2) comme sur la phagocytose et la production des TNF- $\alpha$  par les macrophages, bien que cet effet ne soit pas spécifique. L'adiponectine a un effet anti-inflammatoire direct (149). Cette dernière notion a été relevée la même année par Ouchi *et al* (142) qui ont observé que l'adiponectine inhiberait l'adhérence des monocytes en supprimant les NF-kB induits par les TNF- $\alpha$  et ceci par la voie d'activation du *cAMP protein kinase A*. L'adiponectine et les TNF- $\alpha$  ont un effet antagoniste au niveau du tissu adipeux et de la paroi vasculaire (145). L'adiponectine module aussi les fonctions endothéliales et a un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules musculaires lisses induites par les facteurs de croissance. L'adiponectine s'accumule dans la paroi vasculaire des vaisseaux lésés par cathéter mais non dans les vaisseaux intacts. L'adiponectine inhibe la transformation des macrophages en cellules spumeuses (150). Kubota *et al* (119), qui travaillent avec souris déficientes pour le gène d'adiponectine, ont observé qu'il y avait deux fois plus d'augmentation de l'épaississement néointimal en présence d'une lésion de l'artère fémorale, suggérant un rôle de l'adiponectine dans le maintien de l'intégrité de la paroi vasculaire.

### 3.5 Adiponectine et le développement de nouvelles approches thérapeutiques

#### 3.5.1 Adiponectine et agoniste PPAR $\gamma$

Les thiazolidinediones sont des ligands des récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$  et induisent une sensibilisation à l'insuline. Combs *et al* (144), Yamauchi *et al* (139) et Maeda *et al* (145) ont tous confirmé que les agonistes des PPAR $\gamma$  ont un effet modulateur sur l'expression de l'adiponectine en prévenant l'hypertrophie des adipocytes et en abaissant le contenu hépatique et musculaire en TG. Le traitement au rosiglitazone et au pioglitazone induit une augmentation de l'adiponectinémie (124, 151). L'effet antiathérogène des thiazolidinediones dans l'insulinorésistance serait expliqué par leur effet direct sur l'adiponectine. La correction de l'insulinorésistance par l'administration de thiazolidinediones aux patients présentant une intolérance au glucose augmente le taux plasmatique de l'adiponectine (Figure 8) (145).



**Figure 8: Effets des thiazolidinediones sur la production d'adiponectine**

Modifié de: Iwaki M. *Diabetes* 52:1655–1663, 2003

L'expression du gène l'adiponectine au niveau du tissu adipeux est maintenue par des ligands PPAR $\gamma$  endogènes ou exogènes par la liaison de l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /Récepteur rétinolide X (RXR) au PPRE (*PPAR-responsive element*) au niveau du promoteur du gène d'adiponectine. La hausse de la transcription du gène d'adiponectine par le biais du PPRE et du LRH-RE (*Liver receptor homolog - Responsive element*) induit une augmentation de la production et de la sécrétion de l'adiponectine par l'adipocyte.

### 3.5.2 Effets du traitement par l'adiponectine

De nombreuses études ont évoqué le potentiel thérapeutique de l'adiponectine surtout dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose avec un grand avantage sur l'insuline et la leptine, du fait de la stabilité de ses taux plasmatiques qui demeurent constants indépendamment du rythme circadien ou de l'alimentation (125).

Le premier article décrivant l'utilisation expérimentale du recombinant de l'adiponectine a été publié par le groupe de Matsuzawa (148) qui a observé que l'adiponectine avait un effet sur l'adhésion des monocytes. En étudiant l'effet de l'adiponectine sur l'accumulation des lipides dans les cultures de macrophages (150), la



même équipe avait observé que cette protéine peut limiter l'accumulation des lipides et inhiber la captation des particules acétylées de LDL.

Une étude sur les souris (139) a par ailleurs démontré que l'administration de l'adiponectine est associée à une réduction des taux d'acides gras circulant et une hausse de leur oxydation, induisant ainsi une diminution du contenu en TG dans les muscles squelettiques. Le traitement à l'adiponectine réduit l'insulinorésistance chez les souris lipoactophiques et améliore l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie. Le domaine globulaire exerce plus d'effet que l'adiponectine complète. Fruebis *et al* (152), menant des expériences *in vivo* sur les souris, observèrent que l'administration du recombinant de l'adiponectine fait baisser la glycémie (indépendamment de l'insuline ou du glucagon) et la concentration d'acides gras non estérifiés.

L'adiponectine influence activement l'insulinorésistance et l'obésité. Elle enlève l'inhibition de l'utilisation du glucose par les cellules musculaires causée par les acides gras. L'administration prolongée de cette protéine induit une perte soutenue de poids sans modification de l'alimentation. La partie globulaire de l'adiponectine seule peut stimuler l'oxydation des lipides et baisser la glycémie sans la présence du domaine collagène. Le fragment C-terminal est moins abondant que la protéine complète. Ces effets sont dus à la capacité de l'adiponectine à stimuler le catabolisme mitochondrial des acides gras dans les cellules musculaires. L'adiponectine n'a aucun effet sur la lipase hormonosensible au niveau du tissu adipeux indiquant que la réduction du taux plasmatique des acides gras résulterait plutôt de l'accélération de l'absorption tissulaire que de l'inhibition de la lipolyse. Dans l'étude de Berg *et al* (147) on trouve que l'administration du recombinant complet de l'adiponectine produit par les mammifères influence la glycémie et les TG, cependant ni l'adiponectine complète ni sa région globulaire, produite par E.Coli, ont cette activité. La baisse de la glycémie n'est pas associée à une augmentation du niveau de l'insuline (l'augmentation du niveau du glucagon est due uniquement à la baisse de la glycémie). Le traitement à la thiazolidinedione augmente l'expression de l'adiponectine chez les souris. L'adiponectine augmente l'habileté des taux bas d'insuline à supprimer la glycogénèse

hépatique (l'adiponectine est une protéine insulino-sensibilisante). L'hépatocyte est l'une des cibles principales de l'adiponectine.

L'adiponectine agit comme une cytokine pléiotropique et n'est pas uniquement reliée au gras corporel mais aussi à plusieurs interactions cellule-cellule comme l'inflammation, l'hématopoïèse et le système immunitaire. De ce fait, le recombinant d'adiponectine représenterait une arme prometteuse dans le traitement et la prévention de la maladie cardiovasculaire.

## **CHAPITRE IV**

### **LES TAUX PLASMATIQUES BAS D'ADIPONECTINE AUGMENTENT LE RISQUE DE MALADIE CORONARIENNE ATHÉROSCLÉROTIQUE PRÉCOCE DANS L'HYPERCHOLESTÉROLÉMIE FAMILIALE**

#### 4.1 Avant-Propos

L'HF, une maladie monogénique, est considérée comme un modèle d'élévation des taux plasmatique de cholestérol-LDL et d'apoB. Son évolution est imprégnée de complications athérosclérotiques survenant à un âge moyen de 40 ans chez les hommes HF et de 50 ans chez les femmes HF. L'expression phénotypique de cette maladie diffère largement d'un patient à un autre, ce qui laisse présumer l'influence d'autres facteurs que les variants géniques documentés ou les facteurs environnementaux. L'adiponectine, une cytokine sécrétée exclusivement par le tissu adipeux pourrait représenter un important modulateur du développement de MCA et peut être même une cible thérapeutique prometteuse chez les patients à risque de coronaropathies. Le but de la présente étude était d'évaluer la relation entre les taux plasmatiques d'adiponectine et l'âge de survenue de MCA dans un échantillon de sujets HF.

Ma contribution à cette étude était de participer à élaborer le protocole, d'effectuer les manipulations de laboratoires, de participer aux analyses statistiques ainsi que de rédiger l'article. Le Dr Daniel Gaudet, mon codirecteur de recherche, qui est le directeur du Centre de médecine génique communautaire (CMGC) de l'Université de Montréal, a élaboré le protocole de recherche, procédé à l'évaluation phénotypique des sujets. Il a par ailleurs supervisé l'analyse des résultats et la rédaction de l'article. Le Dre Diane Brisson, professionnelle de recherche au CMGC, a participé à l'élaboration du protocole, a supervisé les analyses statistiques et a collaboré à la rédaction de l'article. Le Dre Catherine Laprise, Professeure-chercheure de l'Université du Québec à Chicoutimi, qui est ma directrice de recherche, a supervisé le travail de laboratoire et la rédaction. Les Dres Julie St-Pierre et Marie-Claude Vohl ont collaboré à la révision scientifique du papier. Le Dr John Kastelein, directeur des départements de médecine vasculaire, d'épidémiologie clinique et de biostatistiques de l'Université d'Amsterdam, a collaboré à l'élaboration du protocole. Le Dr Jean-Pierre Desprès, directeur de l'Institut de cardiologie de l'hôpital Laval, a participé à l'élaboration des hypothèses relatives au métabolisme de l'adiponectine. Les Drs Gérald Tremblay et Patrice Perron, respectivement cardiologue et endocrinologue du Centre de

santé et de services sociaux de Chicoutimi, ont participé au recrutement et à la caractérisation phénotypique des sujets de l'échantillon. Les Dres Maud Vissers et Barbara Hutten, chercheuses au département de médecine vasculaire et d'épidémiologie clinique et de biostatistiques, respectivement, de l'Université d'Amsterdam, ont participé à l'analyse des résultats.

Cet article a été soumis sous une forme modifiée (modifications mineures) pour publication dans la revue *Atherosclerosis*.

Low plasma adiponectin exacerbates the risk of premature coronary artery  
disease in familial hypercholesterolemia

**Tarek Bouhali<sup>a,b</sup>, Diane Brisson<sup>a</sup>, Julie St-Pierre<sup>a,c</sup>, Gerald Tremblay<sup>a</sup>, Patrice Perron<sup>a</sup>, Catherine Laprise<sup>a,b</sup>, Marie-Claude Vohl<sup>d</sup>, Maud N. Vissers<sup>e</sup>, Barbara A. Hutten<sup>f</sup>, Jean-Pierre Després<sup>c</sup>, John J. P. Kastelein<sup>e</sup>, Daniel Gaudet<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Lipid Research Group and University of Montreal Community Genomic Medicine Center,  
Chicoutimi University Hospital, Chicoutimi, Canada;

<sup>b</sup>Université du Québec à Chicoutimi, Canada;

<sup>c</sup>Quebec Heart Institute, Laval Hospital, Sainte-Foy, Canada

<sup>d</sup>Department of Food Science and Nutrition, Laval University, Quebec, Canada

<sup>e</sup>Department of Vascular Medicine and <sup>f</sup>Department of Clinical Epidemiology and  
Biostatistics, University of Amsterdam, The Netherlands.

**Address for correspondence and requests:**

Daniel Gaudet, MD. PhD,

University of Montreal Community Genomic Medicine Center

Chicoutimi University Hospital

305, St. Vallier, Chicoutimi (Quebec)

G7H 5H6, CANADA

TEL (418) 541-1077, FAX (418) 541-1116

E-mail: [daniel.gaudet@umontreal.ca](mailto:daniel.gaudet@umontreal.ca)

**Total word count: 5 410**

**Number of tables: 3**

**Number of figures: 3**

**Bouhali et al, Adiponectin modulates CAD risk in FH**

## 4.2 Résumé

L'hypercholestérolémie familiale (HF) est un trait mendélien associé à une augmentation des taux plasmatiques du cholestérol-LDL et de l'apolipoprotéine B, de même qu'à la présence de xanthes tendineux et un risque accru de maladie coronarienne athérosclérotique (MCA) prématurée. Dans l'HF, le risque de MCA prématurée est exacerbé par la présence d'obésité abdominale et d'insulinorésistance. L'hypo adiponectinémie est l'une des anomalies métaboliques qui accompagnent l'obésité et l'insulinorésistance. L'objectif de la présente étude était d'examiner la relation entre les taux plasmatiques d'adiponectine et l'âge lors du diagnostic du premier événement coronarien dans l'HF. Les concentrations plasmatiques d'adiponectine ont été mesurées par ELISA chez 568 sujets HF non-diabétiques d'origine canadienne-française. La MCA a été définie selon des critères cliniques bien déterminés. Des régressions multivariées ont été utilisées pour évaluer l'association entre l'adiponectine et la MCA dans l'HF. Les sujets ont été groupés en terciles d'adiponectinémie selon leur âge et leur genre. Le groupe de patients manifestant une basse adiponectinémie est celui qui s'est avéré le plus à risque de développer une MCA à un âge précoce (risque relatif=1,73; p=0,006) et ceci même après ajustement pour les facteurs pouvant affecter les valeurs d'adiponectinémie, tels que ceux reliés à l'obésité. Les résultats suggèrent que les taux plasmatiques bas d'adiponectine sont associés à un plus grand risque de développement de MCA prématurée dans l'HF et viennent consolider l'idée proposant l'adiponectine comme une cible thérapeutique prometteuse chez les patients à haut risque de développement de MCA.

### 4.3 Abstract

**Background**— Familial hypercholesterolemia (FH) is characterized by increased risk for premature coronary artery disease (CAD). This risk is exacerbated in the presence of abdominal obesity and insulin resistance. Low adiponectin is part of the clustering of metabolic abnormalities associated with abdominal obesity and insulin resistance. The present study, therefore, aims to examine the relationship between plasma adiponectin and age at CAD diagnosis in FH patients.

**Methods and results**— Plasma adiponectin was measured by ELISA in 568 non-diabetic FH individuals of French-Canadian origin. CAD was defined according to strict clinical criteria. Prior to analyses, patients were grouped according to age and gender-specific tertiles of plasma adiponectin levels. Multivariate Cox proportional hazards regression was used to estimate the association between plasma adiponectin levels and age at diagnosis of CAD. Overall, FH patients in the lowest tertile of plasma adiponectin exhibited CAD at a significantly younger age (hazard ratio=1.73, confidence interval 95%: [1.19 - 2.53];  $p = 0.004$ ).

**Conclusions**— These results suggest that low plasma adiponectin is associated with an increased risk of premature CAD over and above the already exaggerated risk seen in FH patients.

**Key Words:** Adiponectin; adipocytokines; coronary artery disease; hypercholesterolemia; risk factors;



#### 4.4 Introduction

Familial hypercholesterolemia (FH) is a clinical syndrome characterized by high plasma concentrations of low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol and apolipoprotein (apo) B, tendinous xanthomas and an increased risk of premature coronary artery disease (CAD). Most often, FH is caused by mutations in the LDL receptor (LDLR) gene, although this syndrome can also be the consequence of genetic variations in the ARH and NARC-1 genes (1-3). FH is the most prevalent monogenic disorder worldwide and an important genetic cause of myocardial infarction (3). In absence of treatment, almost 50% of men and more than 20% of women, heterozygous for LDLR gene mutations, will develop CAD before the age of fifty (3, 4). FH affects approximately 1 per 350 (0.3%) individuals among Caucasians, but the prevalence is significantly higher in some population clusters worldwide, such as in Lebanon, North Africa, South Africa, Finland, the Netherlands and among French-Canadians (5, 6). In the Saguenay region (Quebec, Canada), the prevalence reaches 1 per 80 (1.1%) (7).

Hyperapobetalipoproteinemia (hyperapoB) is not exclusively observed in FH, but it is also associated with obesity and insulin resistance-related phenotypes (8). Whereas several complex metabolic pathways are involved in apoB metabolism and modulate CAD risk, numerous genetic and non-genetic factors are responsible for the heterogeneity of CAD risk in individuals with hyperapoB.

Non-FH subjects with abdominal obesity and hyperinsulinemia exhibit a CAD risk equivalent to that of FH subjects with neither abdominal obesity nor hyperinsulinemia (9, 10). Adiponectin has been studied in relation with these factors and other features of the metabolic syndrome (11). This molecule is an adipocyte-derived plasma protein, highly abundant in plasma, with concentrations ranging from 5 to 30  $\mu\text{g/ml}$  (0.01% of total plasma) (12, 13). Its levels correlate positively with HDL-cholesterol, independently from all known correlates of HDL-cholesterol (14), but it is negatively associated with the metabolic syndrome (15). For instance, although it is well known that excess visceral

adiposity is associated with reduced HDL-cholesterol levels, a recent study indicated that for any given level of visceral obesity, patients with low plasma adiponectin levels were characterized by even more markedly reduced plasma HDL-cholesterol (16).

The aim of the present study was to assess the association between plasma adiponectin and age at first CAD event in non-diabetic FH patients.

## 4.5 Methods

### 4.5.1 Subjects and Clinical Data

The Saguenay Lac-Saint Jean (SLSJ) region (Quebec, Canada) has a population of 270,000 inhabitants, which is comparable to the population of Iceland (17). The prevalence of FH in the SLSJ population is 1.1% and has been estimated from three complementary sources: (1) the Hardy Weinberg formula (based on the repertory of known homozygous subjects in this region) (7), (2) the proportion of individuals with LDL-C concentrations above the 99<sup>th</sup> percentile in the same population as assessed by the Quebec Heart Health Survey (a randomly selected public health survey conducted in 1991 as part of a pan-Canadian health study) and finally (3) the number of FH individuals and families having been evaluated as part of a health prevention and promotion program in the mid 90s (18). All three approaches were concordant in estimating the total FH population in the SLSJ region at approximately 3,000, of which 80% are adults aged between 18-65 years. Following a systematic public health screening protocol implemented in 1993 (19), more than 60% of FH adults in this age group have since been met and evaluated at the Chicoutimi University Hospital Lipid Clinic. Due to founder effect, almost 70% of all known FH cases in the SLSJ population are the consequence of two specific variations in the LDLR gene: a point (W66G) missense mutation (also known as the French-Canadian-2 mutation), which originates from the Charlevoix region and explains 50% of cases, and a non-sense 15kb deletion in promoter and exon 1 (the French-Canadian-1 mutation), originating from the Bas-Saint-Laurent region and introduced in the SLSJ population in the early 20<sup>th</sup> century (20). This last mutation accounts for 20% of FH cases. Three other mutations explain an additional 15% of molecular diagnosed FH in SLSJ and are related to a founder effect as well (7). After the exclusion of diabetic individuals (approximately 7% of the adult FH population) and those with renal failure, this study comprised a sample of 568 French-Canadian adult FH subjects (283 men and 286 women) from the SLSJ region in Quebec, Canada (Table 1). All these patients were evaluated at the Chicoutimi University Hospital Lipid Clinic. FH diagnosis was based on: (1) the presence of a mutation in the LDLR gene; or (2) the presence of a mutation in the LDLR gene in a first degree relative

and one of the following: typical tendinous xanthomata or plasma LDL-cholesterol over the 95<sup>th</sup> percentile in the absence of a secondary cause of hypercholesterolemia; or (3) LDL-cholesterol over the 95<sup>th</sup> percentile and the following: a familial history of raised plasma LDL-cholesterol transmitted in an autosomal dominant pattern and tendinous xanthomata. Molecular screening of FH included the detection of nine LDLR gene mutations accounting for the majority of cases in the province of Quebec. Two deletions (5 kb and >15 kb) were detected by Southern Blotting (20), and the W66G, E207K, C646Y, C152W, R329X, C347R and Y468X mutations were detected by dot-blot hybridization of genomic DNA amplified by polymerase chain reaction (PCR) with allele specific oligonucleotide probes or by PCR-based restriction fragment analysis (21-23). The presence of LDLR gene mutations has been confirmed in 81.5% of patients. Subjects with renal failure or diagnosed type 2 diabetes, defined according to the World Health Organization criteria (24), were excluded. Among the 568 FH patients having met the criteria described above and who agreed to participate in this study, the presence of CAD was ascertained in 177 individuals on the basis of: (a) clinical and ECG criteria of myocardial infarction according to the consensus document of the joint European Society of Cardiology and the American College of Cardiology committee (25) or, (b) evidence of coronary stenosis of at least 50% in >1 main coronary arteries following coronary angiography for the investigation of ischemic heart disease (9). More than half of MI patients and all non MI (typical angina or a positive exercise tolerance test or both) FH patients of this study having been classified as CAD had angiographic confirmation of their status. Smoking habits were classified dichotomously as “non-smoker” versus “smoker”. When met at the Chicoutimi lipid clinics for the first time, all FH patients are evaluated by a multidisciplinary team and asked to stop their lipid lowering medication for 2 to 4 weeks in order to estimate the effect and compliance to the prescribed AHA diet, to obtain a complete baseline lipid profile including apo B and to establish a familial metabolic profile of risk. This is performed under close medical and nutritional monitoring. In this study, 35% of CAD patients had never been evaluated at the lipid clinic before their coronary event. Thus, blood samples were obtained without lipid-lowering medication after a 12 hour-overnight fast from the antecubital vein into vacutainer tubes containing EDTA. The HDL subfraction was obtained after precipitation of LDL ( $d > 1.006$  g/ml) in the infranatant with heparin and

MnCl<sub>2</sub> (26). An oral glucose tolerance test was performed following a 12-h fast (27). Glucose, cholesterol and triglyceride levels were enzymatically measured on a Multiparity Analyzer CX7 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) and plasma apoB concentration was assessed by nephelometry (28). Serum creatinine was measured using the kinetic Jaffe reaction method (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). The Beckman BUN Analyser was used to determine the urea concentration in whole blood. Fasting plasma adiponectin concentrations were measured with ELISA, a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (B-bridge International, Inc. San Jose, CA, USA). Anthropometric measures were performed as previously described (29). Subjects gave informed consent to participate in this study and were assigned a code that systematically denormalizes all clinical data and allows to built family trees and assess familial relations without having access to nominal information (30). This project received the approval of the Chicoutimi University Hospital Ethics Committee.

#### **4.5.2 Statistical analysis**

Due to their skewed distribution, plasma triglyceride and adiponectin values were log<sub>10</sub>-transformed before analyses, and geometric means are presented. Conditional logistic regression models were constructed in order to investigate the independent relationship between coronary artery disease, considered as the dependent variable, and adiponectin concentration, the presence of FH and the effect of covariates potentially affecting adiponectin concentrations, particularly age, gender, HDL-cholesterol and waist circumference. The Pearson product-moment correlation coefficient was computed to quantify the association between plasma adiponectin and HDL-cholesterol concentrations as well as waist circumference. Plasma adiponectin concentrations were adjusted for HDL-cholesterol and waist circumference and then ranked in tertiles according to age groups (under 40 years old, 40 to 60 years old, and over 60) and by gender for the survival analysis (Cox proportional hazards regression) since age and gender are known to interfere with plasma adiponectin levels (14). Subjects in in the second tertile (which included the sample median and mean adiponectin values) were considered as the reference group to which an odds ratio of 1.0 was set for comparison purposes to illustrate the modulator effect of

adiponectinemia on age of the first coronary events. Gender, smoking habit, LDL-cholesterol concentrations and time interval between CAD events and blood sampling for adiponectin analyses (retrospective events) were included in multivariate models. CAD events that occurred after the adiponectin measure (prospective events) were ranged at a time interval of 0. Effects of discrete variables were evaluated dichotomously. All statistical analyses were performed with the SPSS package (release 11.0, SPSS, Chicago III).

## 4.6 Results

Features of the study population are presented in Table 1. Overall, the mean plasma adiponectin concentration in FH was  $8.07 \pm 4.30$   $\mu\text{g/ml}$ . However, the group of FH patients with CAD had significantly lower adiponectin concentrations than unaffected FH individuals. Both groups presented extremely high but comparable plasma apo B, total cholesterol and LDL-cholesterol concentrations. In addition, FH patients with CAD tended to have lower HDL-cholesterol and higher anthropometrics values. As shown in Figure 1, plasma adiponectin concentrations were significantly correlated with plasma HDL-cholesterol levels and waist circumference ( $p < 0.001$ ). Thus, all multivariate analyses took into account the effect of these covariates. Table 2 presents multivariate logistic analyses performed to determine the contribution of adiponectin and FH to coronary artery disease before and after adjustment for the waist girth and HDL-cholesterol levels. In the first model, in which the contribution of FH was examined before the inclusion of adiponectin and correlates of abdominal adiposity, the relative odds of expressing coronary artery disease was 1.7 fold higher than in the non FH group ( $p < 0.001$ ). In all models, the contribution of adiponectin to CAD risk was independent of that of FH. Further adjustment for the potentially confounding effects of abdominal fat deposition did not substantially weaken the relation of FH or adiponectin per se to the risk of coronary artery disease (models 3 and 4 in Table 2). Multivariate Cox regression revealed that low plasma adiponectin concentrations (values in the lowest tertile as defined in Table 3) were associated with shorter survival without CAD (hazard ratio (HR) = 1.73, C.I. 95%: [1.19 – 2.53];  $p = 0.004$ ) as compared to middle tertile (Figure 2). This tendency was also evident when women and men were analysed separately, but no longer significant in the female cohort due the low number of subjects (data not shown). This association was independent of HDL-cholesterol and waist circumference, gender, smoking, LDL-cholesterol concentration, creatinine, and time interval between CAD and plasma adiponectin measure (Figure 2). Figure 3 compares plasma adiponectin concentrations between the non diabetic FH patients of the present study and a sample of non FH diabetic patients originating from the same population. Overall, patients with diabetes had significantly lower adiponectin

concentrations than FH patients. However, 40% of FH patients having adiponectin levels below the mean value observed in the CAD-free diabetic group had CAD.



## 4.7 Discussion

In the present study, we observed a significant relationship between low plasma adiponectin and shorter CAD-free survival in a sample of well-characterized patients having extremely high plasma LDL-cholesterol and apo B levels. These results suggest that low plasma adiponectin is associated with an increased risk of premature CAD over and above the already exaggerated risk seen in FH patients. Adiponectin is an adipocytokine displaying pleiotropic signal effects (11). Over the last few years, adiponectin has generated substantial interest due to its potential implication as a modulator of CAD and type 2 diabetes risk. On the one hand, it has been reported that plasma adiponectin levels are lower in CAD patients, and that such low plasma adiponectin levels in diabetic subjects were a predictor of macroangiopathy (31). On the other hand, it has been suggested that high levels of adiponectin are in fact cardioprotective (32). As previously proposed, several mechanisms could explain the protective role of adiponectin in atherogenesis. Adiponectin accumulates in the vascular wall when the endothelial barrier is injured and suppresses the macrophage-to-foam cell transformation (33). Kubota et al. also observed that intimal thickness was two-fold greater in adiponectin *-/-* mice than in the wild-type animals when the femoral artery was injured, suggesting a protective role for adiponectin in neointimal formation (34). Low plasma adiponectin has also been reported to be associated with the sequential expression of metabolic syndrome components and to predict the presence of an atherogenic lipid profile (11). Published results have attributed the protective effects of hyperadiponectinemia to its possible action on plasma HDL-cholesterol (16, 35). Raised HDL-cholesterol has been previously associated with prolonged CAD-free survival in the general population as well as in FH (36). FH status per se is associated with an increased risk of premature CAD (37, 38) but several risk factors – age, smoking, family history of premature CAD, abdominal obesity, diabetes or insulin resistance, low HDL-cholesterol, high blood pressure and lipoprotein (a), among others – contribute to CAD risk modulation in FH (38). To our knowledge, no studies have specifically assessed the role of adiponectin (alone or associated with other emerging CAD risk markers) in FH expression. Although premature CAD risk is significantly higher among FH subjects, substantial variability has been observed in the age at onset of atherosclerotic manifestations, even in patients sharing

the same genetic defect and comparable plasmatic LDL-cholesterol levels (3, 38). This suggests that a single assessment of raised plasma LDL-cholesterol, at a single, specific moment and context, cannot alone explain the prematurity of the CAD manifestations. In this regard, we have previously reported that FH subjects exhibiting hyperinsulinemia and abdominal obesity are at dramatically higher risk of CAD than those with neither FH nor abdominal obesity (9). Adiponectin, a correlate of obesity and insulin resistance, is likely to become a relevant mediator of the relationship between abdominal obesity and CAD. Although plasma adiponectin concentrations might be influenced by renal function (37), the association of adiponectin with premature CAD expression in FH was independent of creatinine and blood urea nitrogen in this cohort.

Some aspects of our study require further discussion. Temporality of association was an important issue to consider in this study. It is documented that over a period of 10 years, adiponectinemia does not fluctuate much in healthy subjects below 70 years of age (39). In the present study, we have evaluated mean adiponectinemia and its distribution in FH subjects of various age groups; age structure effect was included in our analysis models. In addition, since plasma adiponectin levels were assessed relative to the CAD event, regression models have included the time lapse so as to adjust results for this difference. Most coronary events that occurred retrospectively to the adiponectin measure did so within a 5-year interval, and it is unlikely that adiponectinemia fluctuated much within that period. To ensure that results suffered no bias due to the related approach, different survival analysis models were elaborated. In fact, the association reported herein remained the same whether the retrospective or prospective CAD events were considered separately or whether only the events that had occurred less than 3 years before the adiponectin measures were taken into account. As shown in Table 3, for both genders, there was a significant trend for plasma adiponectin concentration to increase with age in FH. The relationship between adiponectin and age remained significant after adjustment for plasma HDL-cholesterol concentrations and waist circumference ( $p < 0.001$ ). This observation can result from a survival effect, FH patients with higher values being more likely to survive longer. In addition to a potential survival effect, it is noteworthy that an increase in adiponectin

concentration with aging has previously been reported (40). Several factors may contribute to an elevation of adiponectin levels with aging, including decreased concentration of sex steroid hormones and lower inhibition of testosterone and estrogen on adiponectin production (41, 42). However, the present study was not designed to answer this issue and a prospective study would be more suitable to clarify the relationship between age and plasma adiponectin concentration in FH. Finally, although a large number of studies have investigated the implication of adiponectin in vascular remodeling, we still do not have enough evidence to consider this promising protein as clinically useful in the assessment of CAD risk. Furthermore, methods to quantify this adipocytokine are not yet standardized. The native protein circulates in two main forms: a lower molecular weight (LMW) hexamer and multimeric structure of high molecular weight (HMW) (43). Further studies are needed to determine the best clinical marker between HMW and LMW. Taking these limitations in consideration, our results nevertheless provide, for the first time, evidence that adiponectin concentration might be a covariate of premature CAD risk expression in FH.

In summary, our findings are consistent with clinical observations suggesting that low plasma adiponectin may exacerbate premature CAD over and above the already exaggerated risk seen in FH, a model of raised plasma LDL-cholesterol and premature CAD.

#### **4.8 Acknowledgment**

J. St-Pierre is the recipient of the "Walter & Jessie Boyd & Charles Scriver" M.D./Ph.D. Studentship Award from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Canadian Genetic Diseases Network, the Canadian Gene Cure Foundation, and Theratechnologies (A. Jean Degrandpré Scholarship Award). C. Laprise is the chairholder of the Canada Research Chair for genetic determinants in asthma ([www.chairs.gc.ca](http://www.chairs.gc.ca)). MC. Vohl is a research scholar from the FRSQ. J.P Després is professor of human nutrition, lipidology and prevention of cardiovascular disease and the Scientific Director of the International Chair on Cardiometabolic Risk at Université Laval. D. Gaudet is the chairholder of the Canada Research Chair in preventive genetics and community genomics ([www.chairs.gc.ca](http://www.chairs.gc.ca)). This project was supported by the ECOGENE-21 project from the CAHR program (grant #CAR43283) and AstraZeneca Canada Inc.

#### **4.9 Disclosure**

Dr. Després is a consultant for Sanofi Aventis. The Chair on Cardiometabolic Risk at Université Laval is supported by an unrestricted grant awarded to Université Laval by Sanofi Aventis. The Chair is an academic organisation completely independent from Sanofi Aventis and the authors did not receive any contribution from Sanofi Aventis to support this research. This project was supported by an unrestricted grant from AstraZeneca Canada Inc received by D. Gaudet.

#### 4.10 Figure legend

**Figure 9:** Association between plasma adiponectin, HDL-cholesterol, and waist circumference in FH, adjusted for the effect of age and gender. Empty squares represent patients without CAD (N= 391), whereas filled squares represent patients with CAD ( N= 177).

**Figure 10:** Analysis of cumulative survival regression (Cox model) of the age at first CAD symptoms among FH patients according to tertiles of plasma adiponectin concentrations. Adiponectin values were adjusted for HDL-cholesterol concentrations and waist circumference, and ranked in tertiles according to age group (under 40, 40 to 60 and over 60 years old) and gender. Gender, smoking, LDL-cholesterol concentrations, creatinine and time interval between adiponectinemia measure and retrospective CAD events were included in model as covariates. Subjects in the second tertile of adiponectin, according to Table 3, were considered as the reference group to which an hazard ratio of one was set for comparison, whereas low and high plasma adiponectin levels are used to designate subjects in tertiles one and three, respectively.

**Figure 11:** Plasma adiponectin concentrations in non diabetic FH patients vs non FH patients with Type 2 diabetes. Overall, non diabetic FH patients tended to have higher adiponectin values than patients with type 2 diabetes. However, 40% of FH patients of this study who had plasma adiponectin concentration below the mean value observed among CAD-free diabetic patients had CAD. This suggests that low plasma adiponectin may exacerbate premature CAD over and above the already exaggerated risk seen in FH, a genetic model of raised plasma LDL-cholesterol and premature CAD. Geometric means of adiponectin values (+/-SEM) are shown.

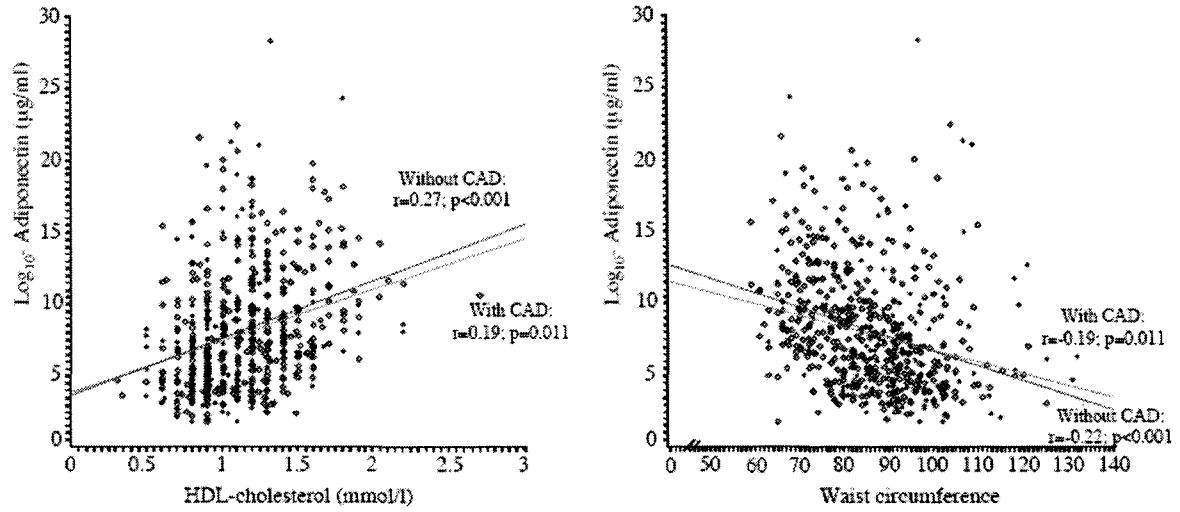


Figure 9

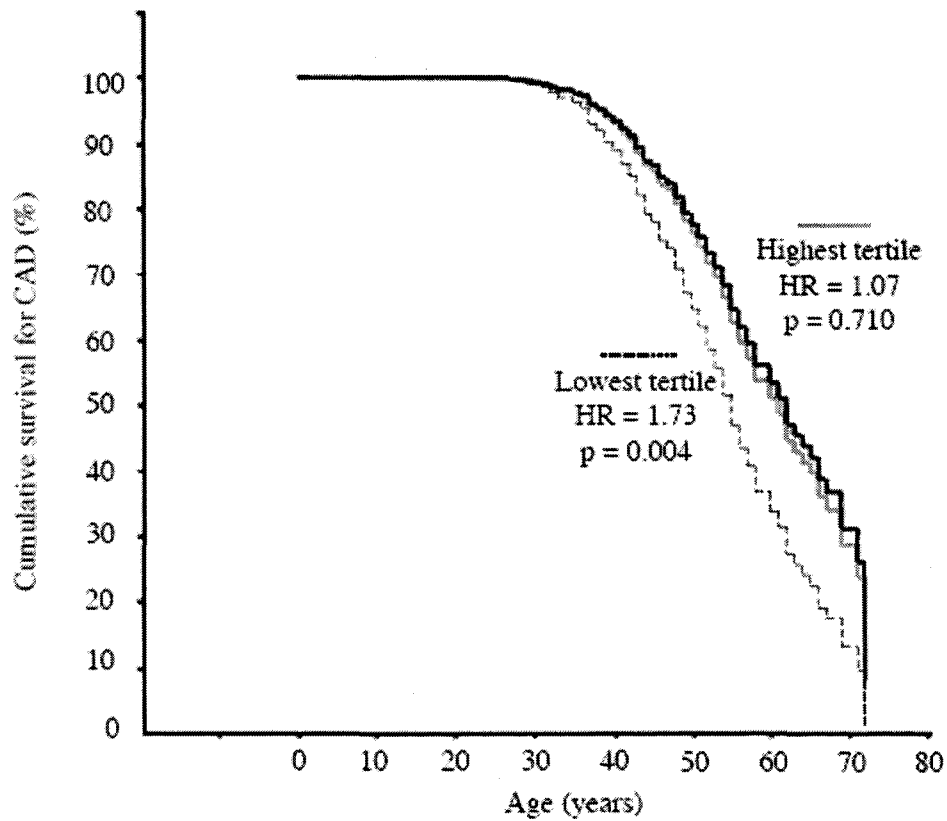


Figure 10

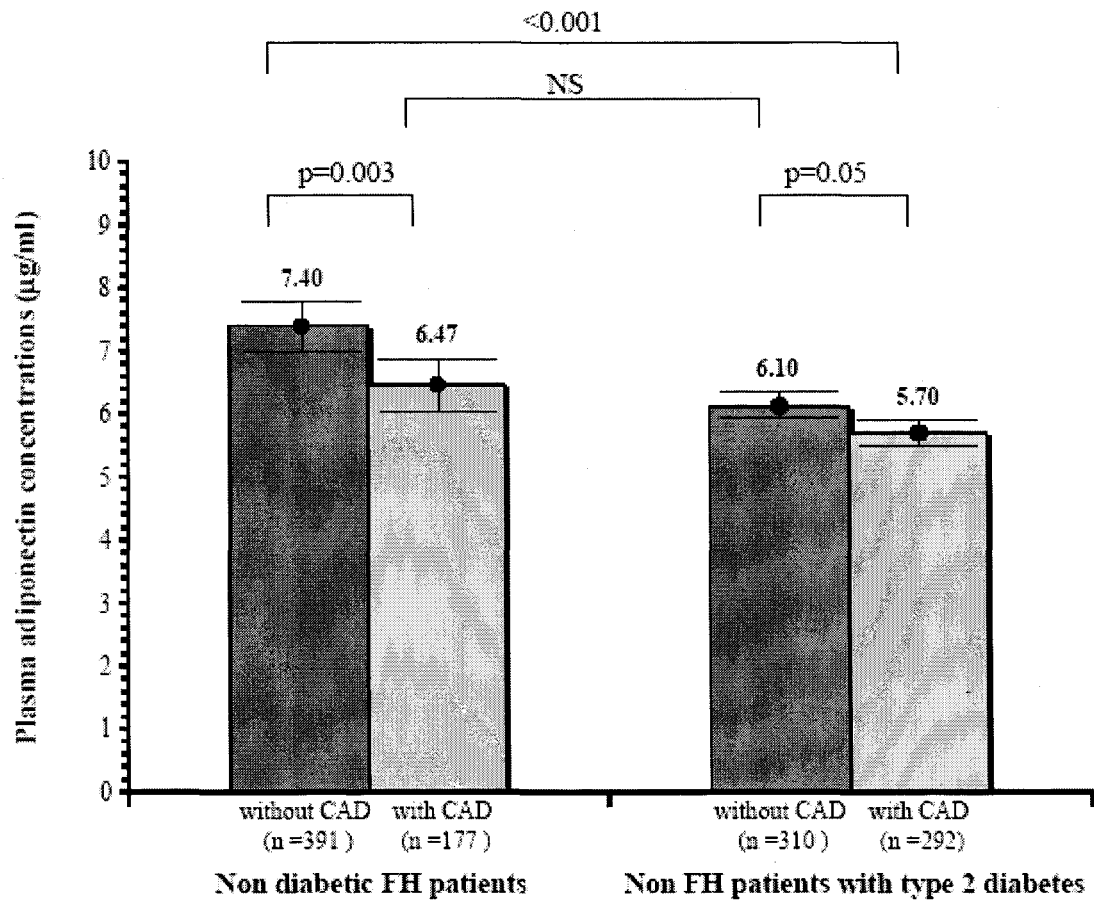


Figure 11

**Table 5 : Baseline characteristics of the studied FH sample**

	<b>Without CAD (n=391)</b>	<b>With CAD (n=177)</b>	<b><i>P-value</i></b>
Waist circumference (cm)	84.2 ± 12.3	89.8 ± 12.5	<0.001
Smoking habit (%)*	25.3	31.6	NS
Cholesterol (mmol/L)	9.06 ± 1.56	9.12 ± 1.85	NS
HDL-Cholesterol (mmol/L)	1.17 ± 0.33	1.05 ± 0.30	<0.001
LDL-Cholesterol (mmol/L)	7.06 ± 1.53	7.13 ± 1.80	NS
Triglycerides (mmol/L) †	1.60 ± 1.00	1.81 ± 1.02	0.007
Apolipoprotein B (g/L) †	1.50 ± 0.36	1.49 ± 0.42	NS
Blood pressure (mmHg)			
Systolic	122.6 ± 17.8	127.4 ± 19.8	0.004
Diastolic	78.0 ± 11.5	78.9 ± 10.9	NS
Adiponectin (µg/ml) †	7.40 ± 4.11	6.47 ± 4.62	0.004

Mean ± SD. \*Proportion of current smoker subjects. †Geometric mean and P-value after log<sub>10</sub>-transformation were used for triglyceride and adiponectin levels. ‡n=452. Lipid and adiponectin levels correspond to values without lipid-lowering medication. NS: p>0.1. Data were adjusted for age and gender.



**Table 6 : Relative Risk (odds ratio) of Coronary Artery Disease (<60 years) Associated with Familial Hypercholesterolemia, Plasma Adiponectin Concentration and Correlates of Abdominal Fat Deposition.**

Variable	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
	Odds ratio	Odds ratio	Odds ratio	Odds ratio
FH	1.71	1.61	1.61	1.48
95% CI	[1.40-1.99]	[1.30-1.99]	[1.30-1.99]	[1.20-1.84]
<i>P</i> -value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Adiponectin* (µg/ml)		0.43	0.45	0.63
95% CI		[0.29-0.62]	[0.31-0.67]	[0.42-0.94]
<i>P</i> -value		<0.001	<0.001	0.023
HDL-C (mmol/L)			0.30	0.30
95% CI			[0.22-0.39]	[0.22-0.39]
<i>P</i> -value			<0.001	<0.001
Waist girth (cm)				1.09
95% CI				[0.60-1.00]
<i>P</i> -value				NS

Sample size: N= 2938, including the 568 FH individuals of the present study and 2370 non FH and non diabetics subjects. All models included the following covariates: age, gender and smoking habits. \*Plasma adiponectin values were log<sub>10</sub>-transformed. CI= confidence interval. FH = Presence of familial hypercholesterolemia due to LDL-receptor gene mutation. Waist-TG: waist circumference > 90 cm in men or 85 cm in women in presence of hypertriglyceridemia (fasting triglycerides > 2.0 mmol/L). NS = p>0.05

**Table 7: Tertiles of plasma adiponectin concentrations, according to gender and age groups in FH**

Age (years)		Men			Women		
		Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3
< 40	n	30	30	30	35	36	35
	mean	3.83	6.36	10.8	4.51	7.39	12.18
	minimum	1.00	4.96	7.42	2.47	5.99	8.82
	maximum	4.79	7.38	20.50	5.79	8.76	22.86
40-60	n	58	58	58	47	47	47
	mean	4.52	6.63	11.01	4.72	8.36	14.04
	minimum	2.11	5.51	8.07	1.31	6.75	10.37
	maximum	5.50	8.06	23.71	6.67	10.31	28.20
> 60	n	6	7	6	12	13	13
	mean	5.68	9.12	13.11	5.69	8.87	14.25
	minimum	3.00	7.62	10.56	2.83	7.40	11.11
	maximum	7.02	10.49	20.33	7.23	11.02	20.49

#### 4.11 BIBLIOGRAPHIE

1. Abifadel, M., M. Varret, J.P. Rabes, D. Allard, K. Ouguerram, M. Devillers, C. Cruaud, S. Benjannet, L. Wickham, D. Erlich, A. Derre, L. Villegier, M. Farnier, I. Beucler, E. Bruckert, J. Chambaz, B. Chanu, J.M. Lecerf, G. Luc, P. Moulin, J. Weissenbach, A. Prat, M. Krempf, C. Junien, N.G. Seidah and C. Boileau, Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*, 2003. 34(2): p. 154-156.
2. Garcia, C.K., K. Wilund, M. Arca, G. Zuliani, R. Fellin, M. Maioli, S. Calandra, S. Bertolini, F. Cossu, N. Grishin, R. Barnes, J.C. Cohen and H.H. Hobbs, Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science*, 2001. 292(5520): p. 1394-1398.
3. Goldstein, J., Familial hypercholesterolemia, In scriver CB, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited disease*. New york, McGraw-Hill Book Co., 2000. 8th ed(8th ed.): p. 2863 - 2913.
4. Moorjani, S., M. Roy, A. Torres, C. Betard, C. Gagne, M. Lambert, D. Brun, J. Davignon and P. Lupien, Mutations of low-density-lipoprotein-receptor gene, variation in plasma cholesterol, and expression of coronary heart disease in homozygous familial hypercholesterolaemia. *Lancet*, 1993. 341(8856): p. 1303-1306.
5. Lansberg, P.J., S. Tuzgol, M.A. van de Ree, J.C. Defesche and J.J. Kastelein, [Higher prevalence of familial hypercholesterolemia than expected in adult patients of four family practices in Netherlands]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2000. 144(30): p. 1437-1440.

6. Moorjani, S., M. Roy, C. Gagne, J. Davignon, D. Brun, M. Toussaint, M. Lambert, L. Campeau, S. Blauchman and P. Lupien, Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Quebec Province. *Arteriosclerosis*, 1989. 9(2): p. 211-216.
7. Vohl, M.C., S. Moorjani, M. Roy, D. Gaudet, A.L. Torres, A. Minnich, C. Gagne, G. Tremblay, M. Lambert, J. Bergeron, P. Couture, P. Perron, S. Blauchman, L.D. Brun, J. Davignon, P.J. Lupien and J.P. Despres, Geographic distribution of French-Canadian low-density lipoprotein receptor gene mutations in the Province of Quebec. *Clin Genet*, 1997. 52(1): p. 1-6.
8. Reaven, G., Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation*, 2002. 106(3): p. 286-288.
9. Gaudet, D., M.C. Vohl, P. Perron, G. Tremblay, C. Gagne, D. Lesiege, J. Bergeron, S. Moorjani and J.P. Despres, Relationships of abdominal obesity and hyperinsulinemia to angiographically assessed coronary artery disease in men with known mutations in the LDL receptor gene. *Circulation*, 1998. 97(9): p. 871-877.
10. Jansen, A.C., E.S. van Aalst-Cohen, M.W. Tanck, M.D. Trip, P.J. Lansberg, A.H. Liem, H.W. van Lennep, E.J. Sijbrands and J.J. Kastelein, The contribution of classical risk factors to cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: data in 2400 patients. *J Intern Med*, 2004. 256(6): p. 482-490.
11. Trujillo, M.E. and P.E. Scherer, Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med*, 2005. 257(2): p. 167-175.

12. Arita, Y., S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi and Y. Matsuzawa, Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 257(1): p. 79-83.
13. Nakano, Y., T. Tobe, N.H. Choi-Miura, T. Mazda and M. Tomita, Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)*, 1996. 120(4): p. 803-812.
14. Cnop, M., P.J. Havel, K.M. Utzschneider, D.B. Carr, M.K. Sinha, E.J. Boyko, B.M. Retzlaff, R.H. Knopp, J.D. Brunzell and S.E. Kahn, Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia*, 2003. 46(4): p. 459-469.
15. Kondo, H., I. Shimomura, Y. Matsukawa, M. Kumada, M. Takahashi, M. Matsuda, N. Ouchi, S. Kihara, T. Kawamoto, S. Sumitsuji, T. Funahashi and Y. Matsuzawa, Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes*, 2002. 51(7): p. 2325-2328.
16. Cote, M., P. Mauriege, J. Bergeron, N. Almeras, A. Tremblay, I. Lemieux and J.P. Despres, Adiponectinemia in visceral obesity: impact on glucose tolerance and plasma lipoprotein and lipid levels in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(3): p. 1434-9.
17. Sriver, C.R., Human genetics: lessons from Quebec populations. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2001. 2: p. 69-101.

18. Gaudet, D., G. Tremblay, P. Perron, C. Gagne, Y. Ouadahi and S. Moorjani, [Familial hypercholesterolemia in eastern Quebec: a public health problem? The experience of the hyperlipidemia clinic of Chicoutimi]. *Union Med Can*, 1995. 124(2): p. 54-60.
19. Gaudet, D., C. Gagne, P. Perron, P. Couture and S. Tonstad, Ethical issues in molecular screening for heterozygous familial hypercholesterolemia: the complexity of dealing with genetic susceptibility to coronary artery disease. *Community Genet*, 1999. 2(1): p. 2-8.
20. Ma, Y.H., C. Betard, M. Roy, J. Davignon and A.M. Kessling, Identification of a second "French Canadian" LDL receptor gene deletion and development of a rapid method to detect both deletions. *Clin Genet*, 1989. 36(4): p. 219-228.
21. Couture, P., M.C. Vohl, C. Gagne, D. Gaudet, A.L. Torres, P.J. Lupien, J.P. Despres, F. Labrie, J. Simard and S. Moorjani, Identification of three mutations in the low-density lipoprotein receptor gene causing familial hypercholesterolemia among French Canadians. *Hum Mutat*, 1998. Suppl 1: p. S226-231.
22. Leitersdorf, E., E.J. Tobin, J. Davignon and H.H. Hobbs, Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. *J Clin Invest*, 1990. 85(4): p. 1014-1023.
23. Vohl, M.C., P. Couture, S. Moorjani, A.L. Torres, C. Gagne, J.P. Despres, P.J. Lupien, F. Labrie and J. Simard, Rapid restriction fragment analysis for screening four point mutations of the low-density lipoprotein receptor gene in French Canadians. *Hum Mutat*, 1995. 6(3): p. 243-246.

24. WHO, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: Report of a WHO Consultation. Part 1. Diagnosis and classification of Diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization. 1999.
25. Alpert, J.S., K. Thygesen, E. Antman and J.P. Bassand, Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2000. 36(3): p. 959-969.
26. Havel, R.J., H.A. Eder and J.H. Bragdon, The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*, 1955. 34(9): p. 1345-53.
27. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 1997. 20(7): p. 1183-97.
28. Laurell, C.B., Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem*, 1966. 15(1): p. 45-52.
29. Standardization of anthropometric measurements. In: Lohman T, R.A., Martorel R, eds. *The Airlie (VA) Consensus Conference*. Champaign, IL: Human Kinetics; 1988:39-80.
30. Gaudet, D., S. Arsenault, C. Belanger, T. Hudson, P. Perron, M. Bernard and P. Hamet, Procedure to protect confidentiality of familial data in community genetics and genomic research. *Clin Genet*, 1999. 55(4): p. 259-64.

31. Hotta, K., T. Funahashi, Y. Arita, M. Takahashi, M. Matsuda, Y. Okamoto, H. Iwahashi, H. Kuriyama, N. Ouchi, K. Maeda, M. Nishida, S. Kihara, N. Sakai, T. Nakajima, K. Hasegawa, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Hanafusa and Y. Matsuzawa, Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. 20(6): p. 1595-9.
32. Pischon, T., C.J. Girman, G.S. Hotamisligil, N. Rifai, F.B. Hu and E.B. Rimm, Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *Jama*, 2004. 291(14): p. 1730-7.
33. Ouchi, N., S. Kihara, Y. Arita, M. Nishida, A. Matsuyama, Y. Okamoto, M. Ishigami, H. Kuriyama, K. Kishida, H. Nishizawa, K. Hotta, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, S. Yamashita, T. Funahashi and Y. Matsuzawa, Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*, 2001. 103(8): p. 1057-63.
34. Kubota, N., Y. Terauchi, T. Yamauchi, T. Kubota, M. Moroi, J. Matsui, K. Eto, T. Yamashita, J. Kamon, H. Satoh, W. Yano, P. Froguel, R. Nagai, S. Kimura, T. Kadowaki and T. Noda, Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem*, 2002. 277(29): p. 25863-6.
35. Rothenbacher, D., H. Brenner, W. Marz and W. Koenig, Adiponectin, risk of coronary heart disease and correlations with cardiovascular risk markers. *Eur Heart J*, 2005. 26(16): p. 1640-6.



36. Gaudet, D., T. Bouhali, P. Couture, J. Bergeron, G. Tremblay, P. Perron, M.-C. Vohl, L.P. Russe, T.J. Hudson and C. Gagne, HDL-cholesterol and other covariables associated with CAD-free survival among familial hypercholesterolemic heterozygotes or homozygotes over 70 years of age. *Atherosclerosis Supplements*, 2003. 4(2): p. 333-334. (Abstract)
37. Isobe, T., S. Saitoh, S. Takagi, H. Takeuchi, Y. Chiba, N. Katoh and K. Shimamoto, Influence of gender, age and renal function on plasma adiponectin level: the Tanno and Sobetsu study. *Eur J Endocrinol*, 2005. 153(1): p. 91-8.
38. Jansen, A.C., S. van Wissen, J.C. Defesche and J.J. Kastelein, Phenotypic variability in familial hypercholesterolaemia: an update. *Curr Opin Lipidol*, 2002. 13(2): p. 165-71.
39. Adamczak, M., E. Rzepka, J. Chudek and A. Wiecek, Ageing and plasma adiponectin concentration in apparently healthy males and females. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2005. 62(1): p. 114-8.
40. Cnop M, H.P., Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD, Kahn SE., Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia.*, 2003. Apr;46(4):459-69.
41. Nishizawa, H., I. Shimomura, K. Kishida, N. Maeda, H. Kuriyama, H. Nagaretani, M. Matsuda, H. Kondo, N. Furuyama, S. Kihara, T. Nakamura, Y. Tochino, T. Funahashi and Y. Matsuzawa, Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes*, 2002. 51(9): p. 2734-41.

42. Combs, T.P., A.H. Berg, M.W. Rajala, S. Klebanov, P. Iyengar, J.C. Jimenez-Chillaron, M.E. Patti, S.L. Klein, R.S. Weinstein and P.E. Scherer, Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes*, 2003. 52(2): p. 268-76.
  
43. Pajvani, U.B., X. Du, T.P. Combs, A.H. Berg, M.W. Rajala, T. Schulthess, J. Engel, M. Brownlee and P.E. Scherer, Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem*, 2003. 278(11): p. 9073-85.

## CHAPITRE V

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans la présente étude l'adiponectinémie est significativement corrélée aux taux plasmatiques de cholestérol-HDL ainsi qu'au tour de taille, ce qui suggère de prendre en considération l'effet de ces deux dernières variables dans les modèles d'analyses statistiques. Dans l'échantillon étudié, les taux plasmatiques d'adiponectine ont tendance à augmenter avec l'âge et ceci pour les deux sexes. Cette relation entre adiponectinémie et âge est demeuré significative même après ajustement pour les taux de cholestérol-HDL et pour le tour de taille. Les basses concentrations d'adiponectine sont associées à une courte survie sans MCA chez les sujets HF, indépendamment du cholestérol-HDL, du cholestérol-LDL, du tour de taille, du genre, des habitudes tabagiques, des taux de créatinine et du temps séparant le moment de l'évènement coronarien de la mesure de l'adiponectinémie. Dans les deux modèles statistiques uni et multivarié, l'association entre les hauts taux plasmatiques d'adiponectine et la survie sans évènements coronariens n'a pas été significative. Cependant, cette hyperadiponectinémie s'est révélée associée à un bas risque de MCA chez les sujets ayant des taux élevés de cholestérol-HDL.

L'élément principal que révèle cette étude est la nature de la relation entre les bas taux plasmatiques d'adiponectine et la survie sans aucun évènement coronarien dans une population de sujets HF connus pour avoir des taux élevés de cholestérol-LDL. Ces écarts de concentrations de cholestérol plasmatique se reflètent sur la sévérité et l'âge d'apparition des manifestations cardiovasculaires, ce qui fait de l'HF une maladie étroitement liée à des complications coronariennes à la fois précoces et sévères et dont le pronostic est souvent fâcheux (4). Au cours des cinq dernières années, les preuves n'ont cessé de s'accumuler,

identifiant l'adiponectine comme une molécule cardioprotective manifestant diverses implications pléiotropiques. En fait cette adipocytokine, découverte en 1995, n'a commencé à être le sujet d'études fonctionnelles qu'en 2001. À l'opposé des autres hormones sécrétées par le tissu adipeux, l'adiponectine se voit abaissée chez les obèses. Au-delà de ses implications dans le métabolisme lipidique et lipoprotéique, de nombreuses études se sont penchées sur l'association de ses taux plasmatiques et de l'apparition des MCA et du diabète de type 2 (11). L'association de l'hypoadiponectinémie au diabète de type 2 est en effet un indicateur du développement de macroangiopathies ce qui augmenterait le risque de l'athérosclérose (27). Les concentrations plasmatiques d'adiponectine pourraient prédire les événements cardiovasculaires des années avant leur développement. Cette adipocytokine se présente non seulement comme un marqueur mais aussi comme un élément causal de MCA. Par leur capacité d'améliorer la sensibilité à l'insuline et de corriger le profil lipidique, les concentrations élevées d'adiponectine agiraient sur un schéma de protection du système cardiovasculaire et ceci indépendamment des facteurs de risques traditionnels de MCA tels que les statuts inflammatoire et glycémique (28).

Plusieurs voies mécanistiques ont été investiguées dans le but d'élucider le rôle de l'adiponectine dans la modulation de l'expression de MCA. Durant les stades primaires de l'athérosclérose, les monocytes circulants s'attachent aux cellules endothéliales pour ainsi s'infiltrer dans l'espace sous-endothélial et initier leur différenciation en macrophages. Ces derniers s'engorgent de particules LDL modifiées et se transforment à leur tour en cellules spumeuses, marquant ainsi le stade clé de la pathogenèse de l'athérosclérose. L'adiponectine interviendrait à cette étape en réduisant l'accumulation intracellulaire des lipides au sein des macrophages modulant de cette manière leur transformation en cellules spumeuses (29). Après avoir démontré que l'administration d'adiponectine chez des souris lipoatrophiques et des souris manifestant un diabète de type 2 améliorerait la sensibilité à l'insuline (30-10), l'équipe de Kubota, travaillant avec le même modèle animal mais avec un déficit génétique au niveau du gène d'adiponectine, avait observé que l'adiponectine joue un rôle important dans la régulation de la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie du métabolisme du glucose. Les souris adipo +/- manifestant une réduction de 60 % des taux

plasmatiques d'adiponectine étaient significativement plus insulino-résistantes que le modèle sauvage. Ceci dit, une baisse de 40 à 70% de l'adiponectinémie serait associée au développement de l'insulinorésistance. Cette étude a démontré que l'adiponectine jouerait un rôle vasculo-protecteur *in vivo*, en démontrant que les souris adipo -/- manifestaient deux fois plus d'épaississement néointimal que les souris sauvages. Cet effet protecteur serait la conséquence de l'action directe de l'adiponectine sur la paroi vasculaire et sur les macrophages (30). En récapitulant de nombreuses études traitant de l'implication de l'adiponectine dans les multiples composantes du syndrome métabolique, Scherer *et al* ont démontré l'utilité de prendre en considération les taux plasmatiques d'adiponectine comme un biomarqueur de ce syndrome en rapportant l'étroite relation entre l'hypoadiponectinémie et la hausse de l'IMC, la baisse de la sensibilité à l'insuline, le défavorable profil lipidique, les hauts taux plasmatiques des marqueurs inflammatoires ainsi que le risque accru de maladie cardiovasculaire. L'adiponectinémie représenterait alors un indicateur vraisemblable du développement des complications même infracliniques du syndrome métabolique (11).

Même si les mécanismes physiologiques des multiples actions attribuées à l'adiponectine n'ont pas encore été élucidés, il semblerait qu'elle soit impliquée dans la régulation des processus inflammatoires et du métabolisme des lipides et des lipoprotéines qui contribuent au développement de l'athérosclérose (149). Parmi ces processus, les concentrations plasmatiques de cholestérol-HDL représentent un déterminant essentiel du risque de MCA. Plusieurs études ont observé l'association significative entre l'adiponectinémie et les concentrations de cholestérol-HDL (31). Le rôle anti-athérogénique du HDL est surtout dû à sa participation dans le transport à rebours du cholestérol qui assure l'extraction de l'excès de cholestérol du système vasculaire vers le foie pour être transformé en sels biliaires (31-20). Les particules HDL ont aussi des propriétés anti-oxydatives et anti-inflammatoires (31-21). Les hauts taux plasmatiques de cholestérol-HDL ont été trouvés significativement associés à une survie prolongée sans évènements cardiovasculaires dans la population générale comme dans l'HF (32).

Bien que l'HF soit classée comme une maladie monogénique, son expression demeure d'une variabilité considérable et ceci en terme de l'âge du début et de la sévérité de ses complications athérosclérotiques. Le tableau clinique diffère substantiellement d'un individu à un autre même si ceux-ci sont porteurs d'une aberration génétique identique et manifestant des taux plasmatiques de cholestérol-LDL identiques. Des facteurs de risque et d'autres de protection sont alors considérés comme influençant l'expression phénotypique de l'HF, tels que l'âge, le genre, les habitudes tabagiques, l'histoire familiale de MCA prématurée, l'obésité, l'insulinorésistance, les taux plasmatiques bas de cholestérol-HDL, l'hypertension artérielle ainsi que la lipoprotéine (a). Ceci explique l'évidence que la surveillance des taux de cholestérol-LDL ne saurait à elle seule suffire à dresser un tableau clinique fidèle de la maladie ni à prévoir l'allure de l'évolution et de l'apparition des complications cardiovasculaires.

Dans une étude antérieure, il a été observé que les sujets HF obèses et manifestant une hyperinsulinémie ont un plus haut risque de développer une MCA que les sujets non-HF et non-obèse (9). Cette observation est venue confirmer les conclusions de l'étude cardiovasculaire de Québec (9-19) qui décrivait l'association de l'hyperinsulinémie à la MCA indépendamment du poids, de la tension artérielle et du profil lipidique. L'obésité abdominale est reconnue actuellement comme étant une des composantes métaboliques les plus importantes chez les sujets insulino-résistants au même niveau que les taux plasmatiques bas de cholestérol-HDL, des taux élevés d'apoB et de TG. Il existe une forte corrélation entre l'adiponectinémie, à la fois à l'obésité et à l'insulinorésistance, et elle affecterait vraisemblablement les manifestations vasculaires athérosclérotiques de l'HF. Étant présumé influençable par l'élimination urinaire, l'association entre l'adiponectinémie et la MCA était vérifiée et trouvée indépendante de la concentration plasmatique de l'urée dans notre échantillon.

Il a été observé que les fluctuations de l'adiponectinémie sont négligeables durant une décennie, chez le même sujet, avant l'âge de 70 ans. Il semble que seuls les hommes d'au moins 70 ans voient leur adiponectinémie augmenter avec l'âge (153). Pour cette

raison nous avons tenu à évaluer la moyenne et la distribution de l'adiponectinémie des différents groupes d'âge des sujets. Ainsi l'effet de la structure de l'âge a été inclus dans les modèles d'analyse statistique. Le dosage de l'adiponectine a été effectué à distance de l'évènement coronarien, ce qui pourrait représenter un biais. Nous avons inclus cette distance temporelle dans les modèles de régression. La majorité des évènements se sont produits à un intervalle de 5 ans avant l'évènement coronarien, un temps durant lequel les fluctuations sont négligeables. Toutefois, pour s'assurer que les résultats soient dénués de biais, de multiples modèles de survie ont été élaborés sans que l'association ne soit affectée. De plus, les associations observées sont demeurées significatives également après études séparées selon que l'évènement s'est produit avant ou après la mesure de l'adiponectine, ou même en tenant uniquement en considération les évènements se produisant dans un intervalle ne dépassant pas 3 ans du moment de cette mesure.

Même s'il existe de plus en plus d'évidences impliquant l'adiponectine dans la modulation du remaniement endothélial lors de l'athérosclérose, cette étude ne se veut pas la vocation de prendre en considération les taux plasmatiques de cette adipocytokine comme un élément dans l'évaluation diagnostique, clinique ou pronostique, du moins dans l'état actuel des connaissances et aussi longtemps que les méthodes de sa quantification demeureront non-standardisées.

L'adiponectine circule sous forme d'un hexamère de faible poids moléculaire (LMW) et d'un multimère de haut poids moléculaire (HMW) (36). La détermination de la forme active de cette molécule demeure quelque peu controversée et le meilleur marqueur biologique parmi les deux oligomères est encore à clarifier. Toutefois, les présents résultats suggèrent que l'adiponectine est une covariable non négligeable dans l'estimation du risque de MCA dans l'expression de l'HF.

## **CHAPITRE VI**

### **CONCLUSION**

L'HF est une maladie autosomale dominante connue pour être associée à des hausses importantes des niveaux plasmatiques de cholestérol-LDL et du risque de MCA prématurée. L'expression clinique de MCA chez les sujets HF est hautement variable en terme d'âge d'apparition et de sévérité. La MCA est connue actuellement comme un trait complexe, avec une contribution des facteurs génétiques et environnementaux. Le développement de l'insulinorésistance et du diabète sont aussi des états associés à la MCA.

Durant la dernière décennie, nombre d'études ont analysé les facteurs de risque qui sont identifiés actuellement par des variables traditionnelles, telles que l'âge, le genre, l'aspect clinique ou moléculaire. La présence ou l'absence de ces facteurs modifie le risque absolu et aide à stratifier le sujet HF selon les objectifs de taux plasmatiques de cholestérol-LDL à atteindre. Toutefois, la présence des facteurs de risque traditionnels majeurs compte uniquement pour la moitié de la variabilité du risque de MCA. D'autres facteurs de risque ont depuis été identifiés et appelés nouveaux facteurs de risque dans le but de raffiner la prédiction du risque individuel. Parmi ces nouveaux facteurs, on note des facteurs de risque lipidiques et non-lipidiques.

L'adiponectine est une adipocytokine unique et essentielle, produite abondamment par l'adipocyte et présente à des niveaux plasmatiques élevés. Chez les sujets sains, l'adiponectine accomplirait son rôle en prévenant le développement des remaniements vasculaires et la perturbation du métabolisme du glucose et des lipides. Les récentes études chez l'humain, comme chez les modèles animaux, ont démontré clairement que



l'adiponectine joue un rôle dans la prévention des différentes composantes du syndrome métabolique. L'hypoadiponectinémie, conjuguée à une élévation des TNF- $\alpha$  ou des PAI-1 observées chez les sujets présentant une obésité viscérale, s'intègre dans le profil qui accompagne l'athérosclérose et de nombreux désordres métaboliques, incluant l'insulinorésistance. Tous ces éléments définissent le syndrome métabolique. Par la description de la nature de la relation qui existe entre les taux plasmatiques d'adiponectine et l'apparition des complications athérosclérotiques et l'HF, la présente étude ramène un nouvel élément qui pourrait permettre de raffiner l'évaluation du risque coronarien chez les patients manifestant une ou plusieurs composantes du syndrome métabolique en général et ceux manifestant une HF en particulier. Le défi des études ultérieures serait de déterminer si l'adiponectine est un facteur de protection direct de l'athérosclérose ou bien si elle agit en modulant le métabolisme lipidique et/ou en régulant la sensibilité à l'insuline.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Joep C. Defesche, M.E. Wittekoek and J.J.P. Kastelein, *Familial hypercholesterolemia: Molecular genetics and clinical expression*. *Atherosclerosis*, Volume, Issues, October 1997, Page, 1997. 134(1-2): p. 110.
2. Mayes, P.A., *Cholestérol synthesis, transport, and secretion*. Harper's Biochemistry., 1998. 3rd ed. Edited by R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, and V.W. Rodwell. Appleton & Lange, Norwalk, Conn.: p. 266-278.
3. Attie, A.D., J.P. Kastelein and M.R. Hayden, *Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis*. *J Lipid Res*, 2001. 42(11): p. 1717-26.
4. Acton, S., A. Rigotti, K.T. Landschulz, S. Xu, H.H. Hobbs and M. Krieger, *Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor*. *Science*, 1996. 271(5248): p. 518-20.
5. Goldstein, J.L., H.H. Hobbs and M.S. Brown, *Familial hypercholesterolemia*. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly and D. Valle, editors. McGraw-Hill. New York, New York, USA. 2001: p. 2863-2913.
6. Goldstein, J.L., W.R. Hazzard, H.G. Schrott, E.L. Bierman and A.G. Motulsky, *Hyperlipidemia in coronary heart disease. I. Lipid levels in 500 survivors of myocardial infarction*. *J Clin Invest*, 1973. 52(7): p. 1533-43.

7. Goldstein, J.L., H.H. Hobbs and M.S. Brown, *Familial hypercholesterolemia. In: The metabolic basis of inherited disease*. 1995: p. pp. 1981-2030.
8. Group, S.S.C.o.b.o.t.S.B.R., *Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia*. *Bmj*, 1991. 303(6807): p. 893-6.
9. Slack, J., *Risks of ischaemic heart-disease in familial hyperlipoproteinaemic states*. *Lancet*, 1969. 2(7635): p. 1380-2.
10. Muller, C., *Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris*. *Acta Med Scand*, 1938. 89: p. 75-84.
11. Khachadurian, A.K. and L.A. Khachadurian, *The Inheritance Of Renal Glycosuria*. *Am J Hum Genet*, 1964. 16: p. 189-94.
12. Fredrickson, D.S., R.I. Levy and R.S. Lees, *Fat transport in lipoproteins--an integrated approach to mechanisms and disorders*. *N Engl J Med*, 1967. 276(5): p. 273-81 concl.
13. Ott, J., H.G. Schrott, J.L. Goldstein, W.R. Hazzard, F.H. Allen, Jr., C.T. Falk and A.G. Motulsky, *Linkage studies in a large kindred with familial hypercholesterolemia*. *Am J Hum Genet*, 1974. 26(5): p. 598-603.
14. Elston, R.C., K.K. Namboodiri, R.C. Go, R.M. Siervogel and C.J. Glueck, *Probable linkage between essential familial hypercholesterolemia and third complement component (C3)*. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 1976. 12(7): p. 294-7.
15. Berg, K. and A. Heiberg, *Linkage between familial hypercholesterolemia with xanthomatosis and the C3 polymorphism confirmed*. *Cytogenet Cell Genet*, 1978. 22(1-6): p. 621-3.

16. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*. Science, 1986. 232(4746): p. 34-47.
17. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia*. J Biol Chem, 1974. 249(16): p. 5153-62.
18. Innerarity, T.L., K.H. Weisgraber, K.S. Arnold, R.W. Mahley, R.M. Krauss, G.L. Vega and S.M. Grundy, *Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(19): p. 6919-23.
19. Soria, L.F., E.H. Ludwig, H.R. Clarke, G.L. Vega, S.M. Grundy and B.J. McCarthy, *Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(2): p. 587-91.
20. Knott, T.J., S.C. Rall, Jr., T.L. Innerarity, S.F. Jacobson, M.S. Urdea, B. Levy-Wilson, L.M. Powell, R.J. Pease, R. Eddy, H. Nakai and et al., *Human apolipoprotein B: structure of carboxyl-terminal domains, sites of gene expression, and chromosomal localization*. Science, 1985. 230(4721): p. 37-43.
21. Law, S.W., K.J. Lackner, A.V. Hospattankar, J.M. Anchors, A.Y. Sakaguchi, S.L. Naylor and H.B. Brewer, Jr., *Human apolipoprotein B-100: cloning, analysis of liver mRNA, and assignment of the gene to chromosome 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(24): p. 8340-4.
22. Law, S.W., N. Lee, J.C. Monge, H.B. Brewer, Jr., A.Y. Sakaguchi and S.L. Naylor, *Human ApoB-100 gene resides in the p23----pter region of chromosome 2*. Biochem Biophys Res Commun, 1985. 131(2): p. 1003-12.

23. Abifadel, M., M. Varret, J.P. Rabes, D. Allard, K. Ouguerram, M. Devillers, C. Cruaud, S. Benjannet, L. Wickham, D. Erlich, A. Derre, L. Villegier, M. Farnier, I. Beucler, E. Bruckert, J. Chambaz, B. Chanu, J.M. Lecerf, G. Luc, P. Moulin, J. Weissenbach, A. Prat, M. Krempf, C. Junien, N.G. Seidah and C. Boileau, *Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia*. *Nat Genet*, 2003. 34(2): p. 154-6.
24. Gaffney, D., J.M. Reid, I.M. Cameron, K. Vass, M.J. Caslake, J. Shepherd and C.J. Packard, *Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidemia*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. 15(8): p. 1025-9.
25. Heath, K.E., M. Gahan, R.A. Whittall and S.E. Humphries, *Low-density lipoprotein receptor gene (LDLR) world-wide website in familial hypercholesterolaemia: update, new features and mutation analysis*. *Atherosclerosis*, 2001. 154(1): p. 243-6.
26. Villegier, L., M. Abifadel, D. Allard, J.P. Rabes, R. Thiart, M.J. Kotze, C. Beroud, C. Junien, C. Boileau and M. Varret, *The UMD-LDLR database: additions to the software and 490 new entries to the database*. *Hum Mutat*, 2002. 20(2): p. 81-7.
27. Austin, M.A., C.M. Hutter, R.L. Zimmern and S.E. Humphries, *Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review*. *Am J Epidemiol*, 2004. 160(5): p. 407-20.
28. Moorjani, S., M. Roy, C. Gagne, J. Davignon, D. Brun, M. Toussaint, M. Lambert, L. Campeau, S. Blaichman and P. Lupien, *Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Quebec Province*. *Arteriosclerosis*, 1989. 9(2): p. 211-6.

29. Myant, N.B., *Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparisons with familial hypercholesterolaemia*. *Atherosclerosis*, 1993. 104(1-2): p. 1-18.
30. Mayr, E., *Animal Species and Evolution*. Cambridge: Harvard University Press, 1963: p. 797p.
31. De Braekeleer, M., *Geographic distribution of 18 autosomal recessive disorders in the French Canadian population of Saguenay-Lac-Saint-Jean, Quebec*. *Ann Hum Biol*, 1995. 22(2): p. 111-22.
32. Hobbs, H.H., M.S. Brown, D.W. Russell, J. Davignon and J.L. Goldstein, *Deletion in the gene for the low-density-lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia*. *N Engl J Med*, 1987. 317(12): p. 734-7.
33. Leitersdorf, E., E.J. Tobin, J. Davignon and H.H. Hobbs, *Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population*. *J Clin Invest*, 1990. 85(4): p. 1014-23.
34. Ma, Y.H., C. Betard, M. Roy, J. Davignon and A.M. Kessling, *Identification of a second "French Canadian" LDL receptor gene deletion and development of a rapid method to detect both deletions*. *Clin Genet*, 1989. 36(4): p. 219-28.
35. Vohl, M.C., S. Moorjani, M. Roy, D. Gaudet, A.L. Torres, A. Minnich, C. Gagne, G. Tremblay, M. Lambert, J. Bergeron, P. Couture, P. Perron, S. Blauchman, L.D. Brun, J. Davignon, P.J. Lupien and J.P. Despres, *Geographic distribution of French-Canadian low-density lipoprotein receptor gene mutations in the Province of Quebec*. *Clin Genet*, 1997. 52(1): p. 1-6.

36. Kobayashi, J. and H. Mabuchi, *Severely elevated serum triglycerides in a case of heterozygous familial hypercholesterolemia with the 317 cysteine to serine mutation in the LDL receptor gene*. Eur J Intern Med, 2005. 16(3): p. 202-203.
37. Descamps, O.S., X. Leysen, F. Van Leuven and F.R. Heller, *The use of Achilles tendon ultrasonography for the diagnosis of familial hypercholesterolemia*. Atherosclerosis, 2001. 157(2): p. 514-8.
38. Group, S.S.C.o.b.o.t.S.B.R., *Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolaemia: implications for clinical management*. Atherosclerosis, 1999. 142(1): p. 105-12.
39. Bhatnagar, D., J. Morgan, S. Siddiq, M.I. Mackness, J.P. Miller and P.N. Durrington, *Outcome of case finding among relatives of patients with known heterozygous familial hypercholesterolaemia*. Bmj, 2000. 321(7275): p. 1497-500.
40. *Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia*. Bmj, 1991. 303(6807): p. 893-6.
41. *American Heart Association. Heart, and Stroke Statistics: 2003 Update. Dallas, Texas. American Heart Association; 2002.*
42. Sijbrands, E.J., R.G. Westendorp, M. Paola Lombardi, L.M. Havekes, R.R. Frants, J.J. Kastelein and A.H. Smelt, *Additional risk factors influence excess mortality in heterozygous familial hypercholesterolaemia*. Atherosclerosis, 2000. 149(2): p. 421-5.

43. Sijbrands, E.J., R.G. Westendorp, J.C. Defesche, P.H. de Meier, A.H. Smelt and J.J. Kastelein, *Mortality over two centuries in large pedigree with familial hypercholesterolaemia: family tree mortality study*. *Bmj*, 2001. 322(7293): p. 1019-23.
44. Hopkins, P.N., S. Stephenson, L.L. Wu, W.A. Riley, Y. Xin and S.C. Hunt, *Evaluation of coronary risk factors in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia*. *Am J Cardiol*, 2001. 87(5): p. 547-53.
45. Slimane, M.N., S. Lestavel, X. Sun, F. Maatouk, A.K. Soutar, M.H. Ben Farhat, V. Clavey, P. Benlian and M. Hammami, *Fh-Souassi: a founder frameshift mutation in exon 10 of the LDL-receptor gene, associated with a mild phenotype in Tunisian families*. *Atherosclerosis*, 2001. 154(3): p. 557-65.
46. Real, J.T., F.J. Chaves, I. Martinez-Uso, A.B. Garcia-Garcia, J.F. Ascaso and R. Carmena, *Importance of HDL cholesterol levels and the total/ HDL cholesterol ratio as a risk factor for coronary heart disease in molecularly defined heterozygous familial hypercholesterolaemia*. *Eur Heart J*, 2001. 22(6): p. 465-71.
47. Danesh, J., R. Collins and R. Peto, *Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies*. *Circulation*, 2000. 102(10): p. 1082-5.
48. Lingenhel, A., H.G. Kraft, M. Kotze, A.V. Peeters, F. Kronenberg, R. Kruse and G. Utermann, *Concentrations of the atherogenic Lp(a) are elevated in FH*. *Eur J Hum Genet*, 1998. 6(1): p. 50-60.



49. Vohl, M.C., D. Gaudet, S. Moorjani, G. Tremblay, P. Perron, C. Gagne, D. Lesiege, J. Bergeron, P.J. Lupien and J.P. Despres, *Comparison of the effect of two low-density lipoprotein receptor class mutations on coronary heart disease among French-Canadian patients heterozygous for familial hypercholesterolaemia*. Eur J Clin Invest, 1997. 27(5): p. 366-73.
50. Boffa, M.B., S.M. Marcovina and M.L. Koschinsky, *Lipoprotein(a) as a risk factor for atherosclerosis and thrombosis: mechanistic insights from animal models*. Clin Biochem, 2004. 37(5): p. 333-43.
51. Blake, G.J. and P.M. Ridker, *High sensitivity C-reactive protein for predicting cardiovascular disease: an inflammatory hypothesis*. Eur Heart J, 2001. 22(5): p. 349-52.
52. Mohrschladt, M.F., M.P. de Maat, R.G. Westendorp and A.H. Smelt, *C-reactive protein in patients with familial hypercholesterolemia: no effect of simvastatin therapy*. Atherosclerosis, 2001. 157(2): p. 491-4.
53. Danesh, J., R. Collins, P. Appleby and R. Peto, *Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies*. Jama, 1998. 279(18): p. 1477-82.
54. Otto, C., M.M. Ritter, W.O. Richter, R. Minkenberg and P. Schwandt, *Hemorrhologic abnormalities in defined primary dyslipoproteinemias with both high and low atherosclerotic risks*. Metabolism, 2001. 50(2): p. 166-70.

55. Bertolini, S., A. Cantafora, M. Averna, C. Cortese, C. Motti, S. Martini, G. Pes, A. Postiglione, C. Stefanutti, I. Blotta, L. Pisciotta, M. Rolleri, S. Langheim, M. Ghisellini, I. Rabbone and S. Calandra, *Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. 20(9): p. E41-52.
56. Chaves, F.J., J.T. Real, A.B. Garcia-Garcia, O. Puig, J.M. Ordovas, J.F. Ascaso, R. Carmena and M.E. Armengod, *Large rearrangements of the LDL receptor gene and lipid profile in a FH Spanish population*. *Eur J Clin Invest*, 2001. 31(4): p. 309-17.
57. Durst, R., R. Colombo, S. Shpitzen, L.B. Avi, Y. Friedlander, R. Wexler, F.J. Raal, D.A. Marais, J.C. Defesche, M.Y. Mandelstam, M.J. Kotze, E. Leitersdorf and V. Meiner, *Recent origin and spread of a common Lithuanian mutation, G197del LDLR, causing familial hypercholesterolemia: positive selection is not always necessary to account for disease incidence among Ashkenazi Jews*. *Am J Hum Genet*, 2001. 68(5): p. 1172-88.
58. Sniderman, A.D., X.J. Zhang and K. Cianflone, *Governance of the concentration of plasma LDL: a reevaluation of the LDL receptor paradigm*. *Atherosclerosis*, 2000. 148(2): p. 215-29.
59. Thompson, G.R., R.P. Naoumova and G.F. Watts, *Role of cholesterol in regulating apolipoprotein B secretion by the liver*. *J Lipid Res*, 1996. 37(3): p. 439-47.
60. Hornick, C.A., T. Kita, R.L. Hamilton, J.P. Kane and R.J. Havel, *Secretion of lipoproteins from the liver of normal and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. 80(19): p. 6096-100.

61. Horton, J.D., H. Shimano, R.L. Hamilton, M.S. Brown and J.L. Goldstein, *Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmasks hyperlipidemia resulting from production of lipid-rich VLDL*. J Clin Invest, 1999. 103(7): p. 1067-76.
62. Twisk, J., D.L. Gillian-Daniel, A. Tebon, L. Wang, P.H. Barrett and A.D. Attie, *The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion*. J Clin Invest, 2000. 105(4): p. 521-32.
63. Wittekoek, M.E., E. Moll, S.N. Pimstone, M.D. Trip, P.J. Lansberg, J.C. Defesche, J.J. van Doormaal, M.R. Hayden and J.J. Kastelein, *A frequent mutation in the lipoprotein lipase gene (D9N) deteriorates the biochemical and clinical phenotype of familial hypercholesterolemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. 19(11): p. 2708-13.
64. Wittekoek, M.E., S.N. Pimstone, P.W. Reymers, L. Feuth, G.J. Botma, J.C. Defesche, M. Prins, M.R. Hayden and J.J. Kastelein, *A common mutation in the lipoprotein lipase gene (N291S) alters the lipoprotein phenotype and risk for cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia*. Circulation, 1998. 97(8): p. 729-35.
65. Carmena-Ramon, R., J.F. Ascaso, J.T. Real, G. Najera, J.M. Ordovas and R. Carmena, *Association between the TaqIB polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein gene locus and plasma lipoprotein levels in familial hypercholesterolemia*. Metabolism, 2001. 50(6): p. 651-6.
66. Gagne, C., S. Moorjani, D. Brun, M. Toussaint and P.J. Lupien, *Heterozygous familial hypercholesterolemia. Relationship between plasma lipids, lipoproteins, clinical manifestations and ischaemic heart disease in men and women*. Atherosclerosis, 1979. 34(1): p. 13-24.

67. Scheuner, M.T., *Genetic evaluation for coronary artery disease*. Genet Med, 2003. 5(4): p. 269-85.
68. Boring, L., J. Gosling, M. Cleary and I.F. Charo, *Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. Nature, 1998. 394(6696): p. 894-7.
69. Gu, L., Y. Okada, S.K. Clinton, C. Gerard, G.K. Sukhova, P. Libby and B.J. Rollins, *Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice*. Mol Cell, 1998. 2(2): p. 275-81.
70. Mach, F., A. Sauty, A.S. Iarossi, G.K. Sukhova, K. Neote, P. Libby and A.D. Luster, *Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells*. J Clin Invest, 1999. 104(8): p. 1041-50.
71. Magliano, D.J., D. Liew, E.L. Ashton, V. Sundararajan and J.J. McNeil, *Novel biomedical risk markers for cardiovascular disease*. J Cardiovasc Risk, 2003. 10(1): p. 41-55.
72. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. 362(6423): p. 801-9.
73. Williams, I.L., S.B. Wheatcroft, A.M. Shah and M.T. Kearney, *Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanisms of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. 26(6): p. 754-64.
74. Soufi, M., A.M. Sattler, B. Maisch and J.R. Schaefer, *Molecular mechanisms involved in atherosclerosis*. Herz, 2002. 27(7): p. 637-48.

75. Libby, P., P.M. Ridker and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. *Circulation*, 2002. 105(9): p. 1135-43.
76. Keaney, J.F., Jr., M.G. Larson, R.S. Vasan, P.W. Wilson, I. Lipinska, D. Corey, J.M. Massaro, P. Sutherland, J.A. Vita and E.J. Benjamin, *Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(3): p. 434-9.
77. Heinecke, J.W., *Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis*. *Am J Cardiol*, 2003. 91(3A): p. 12A-16A.
78. Sanchez-Quesada, J.L., C. Otal-Entraigas, M. Franco, O. Jorba, F. Gonzalez-Sastre, F. Blanco-Vaca and J. Ordonez-Llanos, *Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia*. *Am J Cardiol*, 1999. 84(6): p. 655-9.
79. Witztum, J.L. and D. Steinberg, *Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis*. *J Clin Invest*, 1991. 88(6): p. 1785-92.
80. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *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*, 1998. 15(7): p. 539-53.
81. (NCEP), N.C.E.P., *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)*. *Jama*, 2001. 285(19): p. 2486-97.

82. Balkau, B. and M.A. Charles, *Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)*. *Diabet Med*, 1999. 16(5): p. 442-3.
83. Ford, E.S., W.H. Giles and W.H. Dietz, *Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey*. *Jama*, 2002. 287(3): p. 356-9.
84. Wilson, P.W. and S.M. Grundy, *The metabolic syndrome: practical guide to origins and treatment: Part I*. *Circulation*, 2003. 108(12): p. 1422-4.
85. Isomaa, B., P. Almgren, T. Tuomi, B. Forsen, K. Lahti, M. Nissen, M.R. Taskinen and L. Groop, *Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome*. *Diabetes Care*, 2001. 24(4): p. 683-9.
86. Anderson, K.M., W.P. Castelli and D. Levy, *Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study*. *Jama*, 1987. 257(16): p. 2176-80.
87. Martin, M.J., S.B. Hulley, W.S. Browner, L.H. Kuller and D. Wentworth, *Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men*. *Lancet*, 1986. 2(8513): p. 933-6.
88. Maron, D.J., S. Fazio and M.F. Linton, *Current perspectives on statins*. *Circulation*, 2000. 101(2): p. 207-13.
89. Lougheed, M. and U.P. Steinbrecher, *Mechanism of uptake of copper-oxidized low density lipoprotein in macrophages is dependent on its extent of oxidation*. *J Biol Chem*, 1996. 271(20): p. 11798-805.

90. Sowers, J.R., P.S. Sowers and J.D. Peuler, *Role of insulin resistance and hyperinsulinemia in development of hypertension and atherosclerosis*. J Lab Clin Med, 1994. 123(5): p. 647-52.
91. Hunter, S.J. and W.T. Garvey, *Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system*. Am J Med, 1998. 105(4): p. 331-45.
92. Yanagi, K., S. Yamashita, S. Kihara, T. Nakamura, S. Nozaki, Y. Nagai, T. Funahashi, K. Kameda-Takemura, Y. Ueyama, S. Jiao, M. Kubo, K. Tokunaga and Y. Matsuzawa, *Characteristics of coronary artery disease and lipoprotein abnormalities in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia associated with diabetes mellitus or impaired glucose tolerance*. Atherosclerosis, 1997. 132(1): p. 43-51.
93. Ferrannini, E., G. Buzzigoli, R. Bonadonna, M.A. Giorico, M. Oleggini, L. Graziadei, R. Pedrinelli, L. Brandi and S. Bevilacqua, *Insulin resistance in essential hypertension*. N Engl J Med, 1987. 317(6): p. 350-7.
94. Hanley, A.J., A.J. Karter, A. Festa, R. D'Agostino, Jr., L.E. Wagenknecht, P. Savage, R.P. Tracy, M.F. Saad and S. Haffner, *Factor analysis of metabolic syndrome using directly measured insulin sensitivity: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study*. Diabetes, 2002. 51(8): p. 2642-7.
95. Steinberg, H.O., G. Brechtel, A. Johnson, N. Fineberg and A.D. Baron, *Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release*. J Clin Invest, 1994. 94(3): p. 1172-9.

96. DeFronzo, R.A., C.R. Cooke, R. Andres, G.R. Faloon and P.J. Davis, *The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man.* J Clin Invest, 1975. 55(4): p. 845-55.
97. Anderson, E.A., R.P. Hoffman, T.W. Balon, C.A. Sinkey and A.L. Mark, *Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans.* J Clin Invest, 1991. 87(6): p. 2246-52.
98. Vuorio, A.F., H. Turtola, K.M. Piilahti, P. Repo, T. Kanninen and K. Kontula, *Familial hypercholesterolemia in the Finnish north Karelia. A molecular, clinical, and genealogical study.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. 17(11): p. 3127-38.
99. Katzmarzyk, P.T., *The Canadian obesity epidemic: an historical perspective.* Obes Res, 2002. 10(7): p. 666-74.
100. Mokdad, A.H., E.S. Ford, B.A. Bowman, W.H. Dietz, F. Vinicor, V.S. Bales and J.S. Marks, *Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001.* Jama, 2003. 289(1): p. 76-9.
101. Mokdad, A.H., M.K. Serdula, W.H. Dietz, B.A. Bowman, J.S. Marks and J.P. Koplan, *The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998.* Jama, 1999. 282(16): p. 1519-22.
102. Steinberg, H.O., H. Chaker, R. Leaming, A. Johnson, G. Brechtel and A.D. Baron, *Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance.* J Clin Invest, 1996. 97(11): p. 2601-10.
103. Arcaro, G., M. Zamboni, L. Rossi, E. Turcato, G. Covi, F. Armellini, O. Bosello and A. Lechi, *Body fat distribution predicts the degree of endothelial dysfunction in uncomplicated obesity.* Int J Obes Relat Metab Disord, 1999. 23(9): p. 936-42.



104. Tack, C.J., M.K. Ong, J.A. Lutterman and P. Smits, *Insulin-induced vasodilatation and endothelial function in obesity/insulin resistance. Effects of troglitazone.* Diabetologia, 1998. 41(5): p. 569-76.
105. Westerbacka, J., S. Vehkavaara, R. Bergholm, I. Wilkinson, J. Cockcroft and H. Yki-Jarvinen, *Marked resistance of the ability of insulin to decrease arterial stiffness characterizes human obesity.* Diabetes, 1999. 48(4): p. 821-7.
106. Flier, J.S., *The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway?* Cell, 1995. 80(1): p. 15-8.
107. Gong, D., R. Yang, Munir KM, R. Horenstein and A. Shuldiner, *New progress in adipocytokine research.* Curr Opin lipidol, 2003. 10: p. 115-121.
108. Freedman, D.S., L.K. Khan, M.K. Serdula, D.A. Galuska and W.H. Dietz, *Trends and correlates of class 3 obesity in the United States from 1990 through 2000.* Jama, 2002. 288(14): p. 1758-61.
109. Ogden, C.L., K.M. Flegal, M.D. Carroll and C.L. Johnson, *Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000.* Jama, 2002. 288(14): p. 1728-32.
110. Bajaj, M. and M.A. Banerji, *Type 2 diabetes in South Asians: a pathophysiologic focus on the Asian-Indian epidemic.* Curr Diab Rep, 2004. 4(3): p. 213-8.
111. Tanaka, S., C. Horimai and F. Katsukawa, *Ethnic differences in abdominal visceral fat accumulation between Japanese, African-Americans, and Caucasians: a meta-analysis.* Acta Diabetol, 2003. 40 Suppl 1: p. S302-4.

112. Depres, J., *Obesity and lipid metabolism: relevance of body fat distribution*. Current Opinion in Lipidologie, 1991(2:5): p. 115.
113. Gaudet, D., M.C. Vohl, P. Perron, G. Tremblay, C. Gagne, D. Lesiege, J. Bergeron, S. Moorjani and J.P. Despres, *Relationships of abdominal obesity and hyperinsulinemia to angiographically assessed coronary artery disease in men with known mutations in the LDL receptor gene*. Circulation, 1998. 97(9): p. 871-7.
114. Scherer, P.E., S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini and H.F. Lodish, *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes*. J Biol Chem, 1995. 270(45): p. 26746-9.
115. Hu, E., P. Liang and B.M. Spiegelman, *AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity*. J Biol Chem, 1996. 271(18): p. 10697-703.
116. Maeda, K., K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa and K. Matsubara, *cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. 221(2): p. 286-9.
117. Nakano, Y., T. Tobe, N.H. Choi-Miura, T. Mazda and M. Tomita, *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma*. J Biochem (Tokyo), 1996. 120(4): p. 803-12.
118. Wang, Y., A. Xu, C. Knight, L.Y. Xu and G.J. Cooper, *Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity*. J Biol Chem, 2002. 277(22): p. 19521-9.

119. Kubota, N., Y. Terauchi, T. Yamauchi, T. Kubota, M. Moroi, J. Matsui, K. Eto, T. Yamashita, J. Kamon, H. Satoh, W. Yano, P. Froguel, R. Nagai, S. Kimura, T. Kadowaki and T. Noda, *Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation*. J Biol Chem, 2002. 277(29): p. 25863-6.
120. Maeda, N., I. Shimomura, K. Kishida, H. Nishizawa, M. Matsuda, H. Nagaretani, N. Furuyama, H. Kondo, M. Takahashi, Y. Arita, R. Komuro, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Tochino, K. Okutomi, M. Horie, S. Takeda, T. Aoyama, T. Funahashi and Y. Matsuzawa, *Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30*. Nat Med, 2002. 8(7): p. 731-7.
121. Arita, Y., S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi and Y. Matsuzawa, *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 257(1): p. 79-83.
122. Matsubara, M., K. Namioka and S. Katayose, *Decreased plasma adiponectin concentrations in women with low-grade C-reactive protein elevation*. Eur J Endocrinol, 2003. 148(6): p. 657-62.
123. Weyer, C., T. Funahashi, S. Tanaka, K. Hotta, Y. Matsuzawa, R.E. Pratley and P.A. Tataranni, *Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. 86(5): p. 1930-5.
124. Yang, W.S., C.Y. Jeng, T.J. Wu, S. Tanaka, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, J.P. Wang, C.L. Chen, T.Y. Tai and L.M. Chuang, *Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients*. Diabetes Care, 2002. 25(2): p. 376-80.

125. Hotta, K., T. Funahashi, Y. Arita, M. Takahashi, M. Matsuda, Y. Okamoto, H. Iwahashi, H. Kuriyama, N. Ouchi, K. Maeda, M. Nishida, S. Kihara, N. Sakai, T. Nakajima, K. Hasegawa, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Hanafusa and Y. Matsuzawa, *Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. 20(6): p. 1595-9.
126. Saito, K., T. Tobe, S. Minoshima, S. Asakawa, J. Sumiya, M. Yoda, Y. Nakano, N. Shimizu and M. Tomita, *Organization of the gene for gelatin-binding protein (GBP28)*. *Gene*, 1999. 229(1-2): p. 67-73.
127. Takahashi, M., Y. Arita, K. Yamagata, Y. Matsukawa, K. Okutomi, M. Horie, I. Shimomura, K. Hotta, H. Kuriyama, S. Kihara, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Funahashi and Y. Matsuzawa, *Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000. 24(7): p. 861-8.
128. Das, K., Y. Lin, E. Widen, Y. Zhang and P.E. Scherer, *Chromosomal localization, expression pattern, and promoter analysis of the mouse gene encoding adipocyte-specific secretory protein Acrp30*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 280(4): p. 1120-9.
129. Kissebah, A.H., G.E. Sonnenberg, J. Myklebust, M. Goldstein, K. Broman, R.G. James, J.A. Marks, G.R. Krakower, H.J. Jacob, J. Weber, L. Martin, J. Blangero and A.G. Comuzzie, *Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(26): p. 14478-83.
130. Vasseur, F., F. Lepretre, C. Lacquemant and P. Froguel, *The genetics of adiponectin*. *Curr Diab Rep*, 2003. 3(2): p. 151-8.

131. Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizo, S. Kita, T. Sugiyama, M. Miyagishi, K. Hara, M. Tsunoda, K. Murakami, T. Ohteki, S. Uchida, S. Takekawa, H. Waki, N.H. Tsuno, Y. Shibata, Y. Terauchi, P. Froguel, K. Tobe, S. Koyasu, K. Taira, T. Kitamura, T. Shimizu, R. Nagai and T. Kadowaki, *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects*. Nature, 2003. 423(6941): p. 762-9.
  
132. Tsao, T.S., H.E. Murrey, C. Hug, D.H. Lee and H.F. Lodish, *Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30)*. J Biol Chem, 2002. 277(33): p. 29359-62.
  
133. Waki, H., T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Ito, S. Uchida, S. Kita, K. Hara, Y. Hada, F. Vasseur, P. Froguel, S. Kimura, R. Nagai and T. Kadowaki, *Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin*. J Biol Chem, 2003. 278(41): p. 40352-63.
  
134. Kharroubi, I., J. Rasschaert, D.L. Eizirik and M. Cnop, *Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 312(4): p. 1118-22.
  
135. Comuzzie, A.G., T. Funahashi, G. Sonnenberg, L.J. Martin, H.J. Jacob, A.E. Black, D. Maas, M. Takahashi, S. Kihara, S. Tanaka, Y. Matsuzawa, J. Blangero, D. Cohen and A. Kissebah, *The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. 86(9): p. 4321-5.
  
136. Vasseur, F., N. Helbecque, C. Dina, S. Lobbens, V. Delannoy, S. Gaget, P. Boutin, M. Vaxillaire, F. Lepretre, S. Dupont, K. Hara, K. Clement, B. Bihain, T. Kadowaki and P. Froguel, *Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal*

- promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians.* Hum Mol Genet, 2002. 11(21): p. 2607-14.
137. Butte, N.F., A.G. Comuzzie, G. Cai, S.A. Cole, N.R. Mehta and C.A. Bacino, *Genetic and environmental factors influencing fasting serum adiponectin in Hispanic children.* J Clin Endocrinol Metab, 2005.
  138. Hotta, K., T. Funahashi, N.L. Bodkin, H.K. Ortmeier, Y. Arita, B.C. Hansen and Y. Matsuzawa, *Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys.* Diabetes, 2001. 50(5): p. 1126-33.
  139. Yamauchi, T., J. Kamon, H. Waki, Y. Terauchi, N. Kubota, K. Hara, Y. Mori, T. Ide, K. Murakami, N. Tsuboyama-Kasaoka, O. Ezaki, Y. Akanuma, O. Gavrilova, C. Vinson, M.L. Reitman, H. Kagechika, K. Shudo, M. Yoda, Y. Nakano, K. Tobe, R. Nagai, S. Kimura, M. Tomita, P. Froguel and T. Kadowaki, *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity.* Nat Med, 2001. 7(8): p. 941-6.
  140. Fasshauer, M., J. Klein, S. Neumann, M. Eszlinger and R. Paschke, *Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes.* FEBS Lett, 2001. 507(2): p. 142-6.
  141. Fasshauer, M., J. Klein, S. Neumann, M. Eszlinger and R. Paschke, *Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. 290(3): p. 1084-9.
  142. Ouchi, N., S. Kihara, Y. Arita, Y. Okamoto, K. Maeda, H. Kuriyama, K. Hotta, M. Nishida, M. Takahashi, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Nakamura, S. Yamashita, T.

- Funahashi and Y. Matsuzawa, *Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway*. *Circulation*, 2000. 102(11): p. 1296-301.
143. Halleux, C.M., M. Takahashi, M.L. Delporte, R. Detry, T. Funahashi, Y. Matsuzawa and S.M. Brichard, *Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 288(5): p. 1102-7.
144. Combs, T.P., J.A. Wagner, J. Berger, T. Doebber, W.J. Wang, B.B. Zhang, M. Tanen, A.H. Berg, S. O'Rahilly, D.B. Savage, K. Chatterjee, S. Weiss, P.J. Larson, K.M. Gottesdiener, B.J. Gertz, M.J. Charron, P.E. Scherer and D.E. Moller, *Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization*. *Endocrinology*, 2002. 143(3): p. 998-1007.
145. Maeda, N., M. Takahashi, T. Funahashi, S. Kihara, H. Nishizawa, K. Kishida, H. Nagaretani, M. Matsuda, R. Komuro, N. Ouchi, H. Kuriyama, K. Hotta, T. Nakamura, I. Shimomura and Y. Matsuzawa, *PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein*. *Diabetes*, 2001. 50(9): p. 2094-9.
146. Combs, T.P., A.H. Berg, S. Obici, P.E. Scherer and L. Rossetti, *Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30*. *J Clin Invest*, 2001. 108(12): p. 1875-81.
147. Berg, A.H., T.P. Combs, X. Du, M. Brownlee and P.E. Scherer, *The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action*. *Nat Med*, 2001. 7(8): p. 947-53.

148. Ouchi, N., S. Kihara, Y. Arita, K. Maeda, H. Kuriyama, Y. Okamoto, K. Hotta, M. Nishida, M. Takahashi, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Funahashi and Y. Matsuzawa, *Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin*. *Circulation*, 1999. 100(25): p. 2473-6.
149. Yokota, T., K. Oritani, I. Takahashi, J. Ishikawa, A. Matsuyama, N. Ouchi, S. Kihara, T. Funahashi, A.J. Tenner, Y. Tomiyama and Y. Matsuzawa, *Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages*. *Blood*, 2000. 96(5): p. 1723-32.
150. Ouchi, N., S. Kihara, Y. Arita, M. Nishida, A. Matsuyama, Y. Okamoto, M. Ishigami, H. Kuriyama, K. Kishida, H. Nishizawa, K. Hotta, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, S. Yamashita, T. Funahashi and Y. Matsuzawa, *Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages*. *Circulation*, 2001. 103(8): p. 1057-63.
151. Hirose, H., T. Kawai, Y. Yamamoto, M. Taniyama, M. Tomita, K. Matsubara, Y. Okazaki, T. Ishii, Y. Oguma, I. Takei and T. Saruta, *Effects of pioglitazone on metabolic parameters, body fat distribution, and serum adiponectin levels in Japanese male patients with type 2 diabetes*. *Metabolism*, 2002. 51(3): p. 314-7.
152. Fruebis, J., T.S. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M.R. Erickson, F.T. Yen, B.E. Bihain and H.F. Lodish, *Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(4): p. 2005-10.



153. Adamczak, M., E. Rzepka, J. Chudek and A. Wiecek, *Ageing and plasma adiponectin concentration in apparently healthy males and females*. Clin Endocrinol (Oxf), 2005. 62(1): p. 114-8.