



**HAL**  
open science

# Etude des adipokines en relation avec le syndrome métabolique et l'inflammation

Anastasia Samara

► **To cite this version:**

Anastasia Samara. Etude des adipokines en relation avec le syndrome métabolique et l'inflammation. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10105 . tel-01748521

**HAL Id: tel-01748521**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748521>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE NANCY POINCARÉ – NANCY 1  
2008**

**Ecole doctorale ‘Biologie Santé Environnement’**

**THESE**

Presentée et soutenue publiquement  
le 10/12/2008

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L’UNIVERSITE  
HENRI POINCARÉ –NANCY 1**

par

**Anastasia SAMARA**

Née le 8 Novembre 1980 à Naoussa (Grèce)

Titulaire du Diplôme d’Etudes Approfondies de  
métabolisme et mécanisme d’action des médicaments - Pharmacologie Clinique

Sujet :

**ETUDE DES ADIPOKINES EN RELATION AVEC LE SYNDROME  
METABOLIQUE ET L’INFLAMMATION.**

**MEMBRES DU JURY**

<b>Directeur de thèse</b>	Madame le Docteur Sophie VISVIKIS-SIEST	(Nancy, France)
<b>Rapporteurs</b>	Monsieur le Professeur Vincent Durlach Monsieur le Professeur Bernhard Winkelmann	(Reims, France) (Frankfurt, Allemagne)
<b>Juges</b>	Monsieur le Professeur Jean-Louis Guéant Madame la Professeur Catherine Boileau Monsieur le Professeur Claude Vigneron	(Nancy, France) (Paris, France) (Nancy, France)

**Laboratoire de rattachement :** INSERM ‘Génétique Cardiovasculaire - CIC 9501’  
Université Henri Poincaré - Nancy I  
Faculté de Pharmacie - Nancy

## **‘Cause et effet’**

Nous appelons cela ‘explication’ : mais c’est une ‘description’, ce qui nous distingue des stades plus anciens de la connaissance et de la science. Nous décrivons mieux, nous expliquons tout aussi peu que tous nos prédécesseurs. Nous avons découvert une succession multiple là où l’homme naïf et le chercheur des cultures plus anciennes ne voyaient que deux instances, ‘cause’ et ‘effet’, comme on le disait ; nous avons perfectionné l’image du devenir, mais nous ne sommes pas passés par-delà l’image, ni derrière l’image. Nous voyons la série des causes de manière bien plus complète dans chaque cas, nous concluons : telle et telle chose doivent d’abord se produire pour que telle autre s’ensuive, mais par là, nous n’avons rien compris.

Cause et effet : probablement n’existe-t-il jamais une telle dualité ; en vérité nous sommes face à un continuum dont nous isolons quelques éléments.

Petit extrait de Nietzsche (Le Gai savoir) pour nous rappeler que le chemin est beaucoup trop long. J’ajouterai ‘beau’, même si nous ne voyons pour l’instant ni derrière ni par-delà l’image.

Travailler au sein d'une équipe est toujours une richesse, un échange constant. Cette équipe a été mon micro - environnement durant cette thèse et nous avons beaucoup partagé.

Je voudrais remercier en particulier,

Le Docteur Sophie VISVIKIS-SIEST qui m'a accueillie dans son équipe et qui m'a rapidement témoigné de la confiance. Son enthousiasme m'a aidée à avancer. Son rythme de travail m'a poussée à être plus rigoureuse.

Bernard HERBETH qui m'a initiée aux analyses statistiques et à l'épidémiologie et m'a aidée à développer un sens critique dans l'interprétation des résultats.

Michèle PFISTER qui a été à mes côtés pour le travail technique, le CRB et puis pour tout l'amour qu'elle a su me donner en tant qu'amie.

Toute ma gratitude va également aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

## RESUME

Le syndrome métabolique (SM) décrit un concept ou un état pré-pathologique qui augmente le risque de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires (MCV). Les composantes classiques de cet état sont l'obésité, l'hypertension, le profil lipidique et la résistance à l'insuline, alors que l'inflammation ainsi que l'atteinte hépatique sont de plus en plus considérées comme des éléments nouveaux de ce cluster.

L'obésité joue un rôle crucial et probablement causal/central pour le développement et l'installation des autres composantes du SM. L'accumulation excessive de la masse grasse, particulièrement abdominale, entraîne une inflammation systémique de faible niveau. En effet, le tissu adipeux secrète des adipokines, telles que la leptine, la visfatine, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  qui sont impliquées dans le processus d'inflammation. Les adipokines sont les médiateurs des actions du tissu adipeux et pourraient engendrer des effets délétères sur l'organisme, avant l'installation d'une obésité sévère.

La Cohorte STANISLAS a permis de mener nos travaux de recherche, grâce :a) à son caractère longitudinal (3 points de recrutement avec un intervalle de 5 ans) et familial (familles nucléaires), b) à sa composition relativement homogène (des individus supposés sains, non atteints de diabète, de MCV ou d'une obésité sévère), c) au recueil de nombreuses données concernant les facteurs de risque classiques (caractéristiques anthropométriques, adiposité, pression artérielle, profil lipidique, glucose..) et nouveaux (marqueurs d'inflammation, activité des enzymes hépatiques, acide urique, leptine circulante..) du SM et d) à l'existence d'une banque de PBMCs (Peripheral Mononuclear Blood Cells-cellules mononuclées circulantes) qui s'ajoute au matériel biologique classique (sérum, plasma, ADN).

Ainsi, nous avons pu étudier d'une part, les associations de l'évolution de 5 ans de l'indice de masse corporelle (IMC) et de la leptine circulante avec les facteurs du SM classiques et nouveaux, et d'autre part, l'expression de certaines adipokines (leptine, visfatine, IL-6 et TNF $\alpha$ ) dans les PBMCs, afin d'approfondir leurs rôles dans le contexte de l'inflammation.

L'étude longitudinale sur les changements de l'IMC et les facteurs du SM a démontré que certains de ces facteurs évoluent ensemble au fil du temps (clusters) et que ces groupes de facteurs sont liés avec l'IMC en fonction du sexe. Nous avons pu distinguer 5 clusters : 'lipides à risque', 'lipides de protection', 'inflammation', 'pression artérielle', 'enzymes hépatiques'. Les associations entre les 'enzymes hépatiques' et 'lipides de protection' et les changements de l'IMC sont significatifs seulement chez les hommes, alors que le cluster 'inflammation' est associé avec les changements de l'IMC exclusivement chez les femmes, suggérant qu'une prise de poids équivalente, déclenche des mécanismes métaboliques qui diffèrent entre les deux sexes.

En ce qui concerne l'association du cluster 'inflammation' avec l'aggravation de l'IMC chez les femmes, elle pourrait être expliquée, au moins partiellement, par la leptine. Les taux circulants de cette adipokine sont associés avec les taux de la CRP (C-Reactive Protein-protéine C-réactive), indépendamment de l'adiposité chez les femmes. Dans le même contexte, nous avons étudié cette adipokine en relation avec un ensemble de facteurs du SM, en tenant compte de l'adiposité. Nous avons pu constater une association de la leptine avec la CRP seulement chez les femmes et avec les enzymes hépatiques, l'acide urique et le profil lipidique exclusivement chez les hommes. Ces résultats pourraient refléter des actions différentes de cette adipokine liées au sexe et indépendantes de la masse grasse.

Pour approfondir l'implication des adipokines dans l'inflammation, nous nous sommes focalisés sur un tissu plus spécifique de l'inflammation que le plasma, les PBMCs. Nous avons élargi notre champ d'intérêt en étudiant, par une puce faite 'maison', 10 voies métaboliques liées aux MCV (pression artérielle, adhésion cellulaire, coagulation, stress oxydant, métabolismes lipidique et du glucose et obésité, facteurs de croissance cellulaire, enzymes du métabolisme des médicaments, facteurs de transcription, système immunitaire et inflammation). La plupart des gènes (166 sur 182) étudiés étaient exprimés ; parmi eux les adipokines, avec des taux d'expression suffisants pour les quantifier, ce qui souligne l'intérêt des PBMCs en tant que modèle, pour explorer les mécanismes liant les adipokines à l'inflammation. La quantification de l'ARNm (RT-PCR) des adipokines, a démontré des associations, de la visfatine avec l'IMC et l'expression du TNF- $\alpha$ , et de la leptine avec la pression artérielle systolique et diastolique. Ces résultats confortent l'hypothèse d'une contribution de ces molécules aux facteurs de risque des MCV, tels que l'obésité et l'hypertension, dans le contexte de l'inflammation.

L'ensemble de nos résultats souligne le rôle-médiateur de la leptine et l'impact du sexe sur les actions de cette hormone et ouvre de nouvelles perspectives pour étudier les adipokines dans le contexte de l'inflammation, en proposant un modèle d'étude : les PBMCs.

## LISTE DES ABREVIATIONS

μL	Microlitre
AACE	American Association of Clinical Endocrinologists
ADA	American Diabetes Association
ADN	Acide Nucléique
ALAT	alanine aminotransférase
ANOVA	Analyse de Variance
Apo	Apolipoprotéine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASAT	Aspartate aminotransférase
CMP	Centre de Médecine Préventive
CRP	C-Reactive Protein
CV	CardioVasculaire
EGIR	European Group for the study of Insulin Resistance
FFA	Free Fatty Acids
FTO	Fat mass and obesity associated (Fto-mouse with fused toes)
GGT	Glutamyltransférase gamma
HDL	High Density Lipoprotein
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule 1
IDF	International Diabetes Federation
IL	Interleukine
IMC	Indice de Masse Corporelle (BMI-Body Mass Index)
IR	Insulinorésistance
kDa	Kilo Dalton
Kg	Kilogramme
L	Litre
LDL	Low Density Lipoprotein
MCV	Maladies CardioVasculaires
Min	Minute
mL	Millilitre
NCEP	National Cholesterol Education Program
NHLBI/AHA	National Heart, Lung and Blood Institute/American Heart Association
OMS	Organisme Mondiale de la Santé
PAD	Pression Artérielle Diastolique
PAL	Phosphatase Alcaline
PAS	Pression Artérielle Systolique
PBMCs	Peripheral Mononuclear Blood Cells
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT	Reverse Transcription
Sec	Second
SM	Syndrome Métabolique
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TGL	Triglycérides
Tm	Melting temperature (température de fusion)
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WBC	White Blood Cells (globules blancs)
WC	Waist Circumference (tour de taille)
WHR	Waist-to-hip ratio (rapport taille/hanches)

# TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS	5
CHAPITRE 1 – HYPOTHESES ET OBJECTIFS	8
CHAPITRE 2 – SITUATION DU SUJET	10
<b>I. Le syndrome métabolique</b>	11
<b>I.1 Historique et évolution du concept ‘syndrome métabolique’</b>	11
<b>I.2 Les définitions proposées pour le SM</b>	12
<b>I.3 Epidémiologie du SM</b>	13
<b>I.4 Physiopathologie du SM</b>	13
<i>I.4.1 Facteurs classiques</i>	14
<i>I.4.1.1 Insulinorésistance-IR</i>	14
<i>I.4.1.2 Intolérance au glucose</i>	16
<i>I.4.1.3 Dyslipidémie</i>	16
<i>I.4.1.4 Hypertension</i>	17
<i>I.4.1.5 Obésité</i>	18
<i>I.4.2 Facteurs nouveaux</i>	21
<i>I.4.2.1 Inflammation</i>	21
<i>I.4.2.2 Apolipoprotéines</i>	21
<i>I.4.2.3 Stéatose hépatique</i>	22
<i>I.4.2.4 Acide urique</i>	23
<i>I.4.3 Comment étudier le SM et ses facteurs ?</i>	23
<b>II. Le tissu adipeux</b>	25
<b>II.1. Organe endocrinien</b>	26
<b>II.2. Les adipokines</b>	27
<i>II.2.1 Leptine</i>	27
<i>II.2.1.1 Découverte et caractérisation</i>	27
<i>II.2.1.2 Récepteurs et sites d’actions de la leptine</i>	28
<i>II.2.1.3 Sources de la leptine</i>	29
<i>II.2.1.4 Rôles physiologiques</i>	30
<i>II.2.1.5 Régulation de la leptine</i>	32
<i>II.2.1.6 Résistance à la leptine</i>	33
<i>II.2.1.7 Leptine et système immunitaire</i>	33
<i>II.2.1.8 Leptine et inflammation</i>	37
<i>II.2.1.9 Implication dans la physiopathologie du SM</i>	38
<i>II.2.2 Visfatine</i>	40
<i>II.2.2.1 Découverte et caractérisation</i>	40
<i>II.2.2.2 Sources de la visfatine</i>	41
<i>II.2.2.3 Régulation de la visfatine</i>	41
<i>II.2.2.4 Visfatine et inflammation</i>	42

II.2.2.5 Implication de la visfatine dans l'obésité, le SM et le diabète	42
<b>CHAPITRE 3 – POPULATIONS ET METHODES</b>	<b>44</b>
<b>I. Populations</b>	<b>45</b>
<b>I.1 La cohorte STANISLAS</b>	<b>45</b>
I.1.1 Description générale	45
I.1.2 Questionnaires - Mode de vie	46
I.1.3 Données anthropométriques et cliniques	46
I.1.4 Impédance bioélectrique	47
I.1.5 Prélèvements sanguins	47
I.1.6 Dosages biologiques	48
I.1.7 Numération des globules blancs	49
I.1.8 Extraction de l'ADN	49
<b>I.2 Les sous-populations étudiées de la cohorte STANISLAS</b>	<b>51</b>
<b>II. Méthodes</b>	<b>55</b>
<b>II.1 Etudes en transcriptomique</b>	<b>55</b>
II.1.1 Extraction des ARN totaux	55
II.1.2 Puce faite 'maison'	57
II.1.3 RT-PCR quantitative absolue en temps réel	58
II.1.3.1 Reverse Transcription (RT)	58
II.1.3.2 Préparation de la sous-banque des ADNc	58
II.1.3.3 Principe de la quantification absolue	58
II.1.3.4 Choix des amorces	61
II.1.3.5 Préparation de la gamme étalon	65
II.1.3.6 Quantification absolue	66
<b>II.2 Genotypages</b>	<b>67</b>
<b>III. Analyses statistiques</b>	<b>69</b>
<b>III.1 Etudes individuelles</b>	<b>69</b>
III.1.1 Etudes d'associations phénotypiques	69
III.1.1.1 Tests non paramétriques	69
III.1.1.2 Comparaison de moyennes et pourcentages	69
III.1.1.3 Coefficient de corrélation et régression multiple	70
III.1.1.4 Test d'interaction du sexe	71
III.1.1.5 'Generalized Estimating Equation' (GEE)	71
III.1.2 Etudes d'associations génotypiques	71
III.1.2.1 Equilibre de Hardy-Weinberg	71
III.1.2.2 Déséquilibre de liaison	72
III.1.2.3 Modèles génétiques	73
<b>III.2 Analyse en composantes principales ('Factor Analysis')</b>	<b>73</b>

## **I. Etudes sur les facteurs de risque cardiovasculaires associés au SM dans la cohorte STANISLAS** 76

### **I.1 Influence des variations de l'IMC sur les modifications des facteurs du SM (Publication No1)** 77

<i>I.1.1 Pourquoi cette étude ?</i>	77
<i>I.1.2 Associations entre l'évolution de l'IMC et les facteurs liés au SM</i>	78
<i>I.1.3 Matrice de corrélations entre les changements des variables</i>	78
<i>I.1.4 Analyse en composantes principales</i>	78
<i>I.1.5 Associations entre les 5 facteurs et l'évolution de l'IMC</i>	79
<i>I.1.6 Points forts de l'étude</i>	83
<i>I.1.7 Originalité de l'étude</i>	84
<i>I.1.8 Associations communes entre les hommes et les femmes</i>	84
<i>I.1.9 Associations en fonction du sexe</i>	84
<i>I.1.10 Remarques sur les clusters</i>	86
<i>I.1.11 Quelques réflexions sur cette étude</i>	87

### **I.2 Relations de la leptine circulante avec les facteurs du SM en tenant compte des indices classiques de l'obésité (masse grasse, rapport tour de taille/hanches) (Publication No2)** 88

<i>I.2.1 La nécessité de cette étude</i>	88
<i>I.2.2 Associations entre la masse grasse totale, le rapport taille/hanches et la leptine avec les facteurs du SM chez les hommes et les femmes</i>	89
<i>I.2.3 Associations de la leptine avec les facteurs du SM, indépendamment de la masse grasse totale et en fonction du sexe</i>	89
<i>I.2.4 Points forts de l'étude</i>	92
<i>I.2.5 Particularité et résultats principaux de l'étude</i>	92
<i>I.2.6 Comment expliquer les associations trouvées spécifiques au sexe ?</i>	92
<i>I.2.7 Quelques commentaires</i>	94
<i>I.2.8 Limite de l'étude</i>	95

## **II. FTO, nouveau gène impliqué dans l'obésité** 96

### **II.1 Effets des polymorphismes du gène FTO sur les changements de l'IMC chez les enfants dans la Cohorte Stanislas (Publication No3)** 96

<i>II.1.1 Quelle est l'intérêt de réaliser cette étude ?</i>	96
<i>II.1.2 Associations trouvées chez les enfants et adolescents</i>	96
<i>II.1.3 Nouveaux éléments apportés par cette étude</i>	98

## **III. Aspects techniques** 99

### **III.1 Réflexions sur la stratégie en transcriptomique dans la cohorte STANISLAS** 99

<i>III.1.1 Extraction des ARN totaux et contamination par ADN génomique</i>	99
<i>III.1.2 PCR quantitative absolue</i>	100
<i>III.1.3 Normalisation</i>	101

<b>IV. Etudes des PBMCs en transcriptomique</b>	104
<b>IV.1 PBMCs comme modèle pour étudier l'obésité et l'hypertension dans le contexte de l'inflammation (Publication No4)</b>	105
<i>IV.1.1 Inflammation comme processus central et PBMCs comme tissu-cible pour les facteurs de risque des MCV</i>	105
<i>IV.1.2 Stratégie suivie</i>	106
<i>IV.1.3 Intérêt des PBMCs dans les MCV</i>	106
<i>IV.1.4 Distribution globale de l'expression des 182 gènes</i>	107
<i>IV.1.5 Distribution par voie métabolique</i>	109
<i>IV.1.6 Taux d'expression de l'ARNm</i>	110
<i>IV.1.7 Validation des microarrays par RT-PCR quantitative</i>	110
<i>IV.1.8 Discrimination des individus en fonction des facteurs de risque</i>	111
<i>IV.1.9 Originalité de l'étude</i>	112
<i>IV.1.10 Intérêt pour la compréhension de la physiopathologie des MCV</i>	113
<b>IV.2. Expression de la leptine dans les PBMCs et relations avec la pression artérielle (Publication No5)</b>	114
<i>IV.2.1 Pourquoi étudier la leptine dans les PBMCs ?</i>	114
<i>IV.2.2 Expression de la leptine dans les PBMCs</i>	115
<i>IV.2.3 Associations avec la PAD et la PAS</i>	115
<i>IV.2.4 Quelques réflexions sur l'expression de la leptine dans les PBMCs</i>	118
<b>IV.3 Expression de la visfatine dans les PBMCs et relations avec l'IMC et le TNF-<math>\alpha</math> (Publication No6)</b>	120
<i>IV.3.1 Nouvelle adipokine : la visfatine</i>	120
<i>IV.3.2 Expression de la visfatine et du TNF-<math>\alpha</math> dans les PBMCs</i>	120
<i>IV.3.3 Associations de la visfatine avec le TNF-<math>\alpha</math></i>	122
<i>IV.3.4 Visfatine et inflammation de faible niveau</i>	123
<i>IV.3.5 Visfatine et adiposité</i>	124
<i>IV.3.6 TNF-<math>\alpha</math> et adiposité</i>	124
<i>IV.3.7 CRP vs visfatine et TNF-<math>\alpha</math></i>	125
<i>IV.3.8 Autres approches (tissu adipeux, plasma) pour l'étude de la visfatine en relation avec l'inflammation et l'obésité</i>	125
<b>CHAPITRE 5 – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	128
<b>I. Conclusions</b>	129
<b>II. Perspectives</b>	131
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	132
<b>ANNEXES</b>	152
<b>PUBLICATIONS</b>	172

## **AVANT PROPOS**

L'obésité est notamment un facteur de risque pour le développement du syndrome métabolique (SM) et des maladies cardiovasculaires (MCV), comme démontré par un grand nombre d'études épidémiologiques. Toutefois, la gravité de l'impact de l'obésité dépend du degré d'accumulation de la masse grasse (en surpoids, obésité modeste, obésité sévère) et de sa distribution (région sous-cutanée, abdominale), les deux paramètres étant dépendants des rôles des molécules secrétées par ce tissu. Bien que la plupart des recherches étudie l'obésité sévère, il semble que déjà en état de surpoids, des mécanismes pré-pathologiques commencent à s'installer, surtout dans le cas d'une accumulation de masse grasse à la région viscérale. Les études récentes, en particulier sur la leptine, renforcent l'importance pré-pathologique de ces adipokines comme des hormones avec des propriétés multiples et supportent de plus en plus son implication dans les mécanismes pré-pathologiques et parmi eux, l'inflammation.

Bien que les adipokines soient produites principalement par les cellules adipocytaires, leur caractérisation en tant qu'hormones signifie qu'elles ont des actions sur plusieurs organes et voies biologiques qui ne sont pas forcément liées ou proportionnelles à l'accumulation de la masse grasse dans l'organisme. Une prise de poids modeste peut entraîner le démarrage de mécanismes pré-pathologiques, au moins partiellement, par l'intermédiaire des adipokines. Ainsi, nous nous sommes fixé comme objectif, une étude approfondie de ces adipokines en relation avec les facteurs de risque de MCV et leur évolution dans le temps qui pourrait éclaircir et attribuer des rôles supplémentaires à ces molécules. De plus, les études sur la physiopathologie de l'obésité nécessitent une certaine prudence en ce qui concerne le choix de la population ainsi que son homogénéité en parlant du degré d'obésité et de la présence d'autres maladies. Or souvent, les populations choisies peuvent introduire des biais provenant de l'hétérogénéité de la population. La cohorte STANISLAS nous permet d'approfondir la physiopathologie de l'obésité, grâce justement à sa composition de sujets supposés sains qui ne sont pas atteints d'une obésité grave ou d'autres maladies aiguës ou chroniques.

L'évolution dans la compréhension des rôles des adipokines impose d'élargir le champ de leur investigation, aussi bien en choisissant d'explorer des mécanismes non obligatoirement liés à l'obésité, qu'en proposant l'étude d'autres tissus, outre le tissu adipeux, comme sources potentielles de ces molécules. En effet, les cellules du système immunitaire pourraient être un tissu-cible pour étudier les adipokines sous l'angle de l'inflammation, puisqu'elles participent au dialogue complexe entre le tissu adipeux et les cellules du système immunitaire *via* des récepteurs sur ces cellules. Dans ce contexte, nous nous sommes servis

de la banque de PBMCs de la cohorte STANISLAS, un outil adapté pour étudier ces molécules dans un tissu étroitement lié à l'inflammation.

## **CHAPITRE 1 – HYPOTHESES ET OBJECTIFS**

L'obésité prend de plus en plus les proportions d'une épidémie. Pourtant, la population générale est touchée plutôt par un état de surpoids ou une obésité modeste. Dans cet état, dit pré-pathologique, les manifestations cliniques résultant des effets délétères d'une accumulation de masse grasse ne sont pas toujours apparentes. Cependant, une augmentation faible du poids pourrait déjà altérer l'équilibre des mécanismes biologiques et le fonctionnement physiologique des organes et ceci, via les actions des adipokines.

En plus, une inflammation de faible niveau, manifestée chez les sujets déjà en surpoids, suggère un dialogue entre le tissu adipeux et les cellules du système immunitaire qui commence bien avant l'excès d'accumulation de la masse grasse et l'installation d'une obésité sévère.

Dans cet esprit de pré-pathologie dans le contexte de l'obésité, nous avons choisi d'étudier la leptine et une nouvelle adipokine, récemment découverte, dont les rôles sont peu décrits, la visfatine.

L'objectif général de nos travaux de recherche a été de :

**Contribuer à la connaissance de la physiopathologie de l'obésité par l'étude des adipokines en relation avec les facteurs du syndrome métabolique et également avec l'inflammation de faible niveau.**

Nos objectifs spécifiques se déclinent ainsi :

1. Observer l'impact des changements modestes, à court terme (5 ans), de l'indice de masse corporelle (IMC) sur les facteurs, classiques et nouvellement décrits par la littérature, du SM chez les hommes et les femmes.
2. Etudier l'implication de la leptine dans les relations précédentes, en tenant compte de l'adiposité.
3. Démontrer la présence des adipokines, leptine et visfatine, dans un tissu lié à l'inflammation, les PBMCs.
4. Quantifier l'ARNm des adipokines, (leptine, visfatine), du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 dans les PBMCs et mettre en évidence des associations éventuelles avec l'IMC et la pression artérielle.

La réponse aux objectifs décrits ci-dessus pourrait fournir des éléments supplémentaires à la connaissance de la contribution des adipokines à la physiopathologie de l'obésité, si peu étudié.

## **CHAPITRE 2 – SITUATION DU SUJET**

## **I. Le syndrome métabolique**

Le terme ‘syndrome métabolique’ (SM) correspond à un ‘cluster’ de facteurs de risque des maladies cardiovasculaires (MCV) [Girman et al. 2004 ; Isomma et al. 2001 ; Lakka et al. 2002 ; Malik et al. 2004 ; Galassi et al. 2006] et du diabète de type 2 [Grundy et al. 2004a]. Le SM décrit un concept ou un état qui n’est pas une pathologie en soi. Il est plutôt qualifié d’état pré-pathologique qui augmente le risque de MCV et de diabète de type 2. Globalement, le SM peut être considéré comme la co-occurrence (partielle/totale) d’une obésité viscérale, d’une dyslipidémie, d’une hyperglycémie (intolérance au glucose, glycémie à jeun anormale), d’une insulino-résistance (IR) et d’une hypertension, toutes étant des facteurs de risque pour les MCV.

### **I.1 Historique et évolution du concept ‘syndrome métabolique’**

La conception du syndrome métabolique (SM) est relativement ancienne. Dès 1923, Kylin décrit la co-occurrence d’hypertension, d’hyperglycémie et d’hyperuricémie [Kylin 1923]. Plus tard, en 1947, Vague souligne l’importance de la distribution de la masse grasse et il énonce que la topographie de la masse grasse corporelle est mieux corrélée aux complications de l’obésité (diabète, hypertension, MCV) que n’est l’excès de graisse et utilise les termes d’obésité androïde (accumulation du tissu adipeux au niveau de l’abdomen) et d’obésité gynoïde (accumulation du tissu adipeux au niveau des hanches et des cuisses) [Vague 1947]. Dans les années 1960, plusieurs chercheurs ont observé un lien entre l’obésité, l’IR et leurs complications associées [Albrink et Meigs 1965 ; Welborn et al. 1966].

Ce travail de recherche, visant à mieux observer et décrire le concept d’un état, où plusieurs complications ont des relations entre elles et augmentent le risque des MCV et du diabète, a vu une évolution depuis et, en 1988, à l’occasion du congrès annuel de l’association américaine de diabète (American Diabetes Association-ADA), Reaven décrit sous le nom de ‘syndrome X’ une constellation d’anomalies associées à l’IR qui en est l’élément central [Reaven 1988]. Après cela, d’autres dénominations ont été proposées : le ‘deadly quartet’ [Kaplan 1989], le syndrome d’IR [DeFronzo et Ferrannini 1991] ou encore le syndrome dysmétabolique [Groop et Orho-Melander 2001].

Le concept du SM a été bien accepté dans la communauté scientifique, malgré les contraintes dues à l’explication des causes de cet état, mais c’est seulement en 1998 que la première initiative pour développer une définition du SM est reconnue au niveau international. Dans un effort de se mettre en accord pour une définition et pour offrir un outil aux cliniciens et aux

chercheurs, l'Organisation Mondiale de la Santé-OMS (World Health Organisation-WHO) a proposé un ensemble de critères en 1998 [Alberti et Zimmet 1998] et cette version a été révisée en 1999 [WHO 1999].

## **I.2 Les définitions proposées pour le SM**

Après la première définition par l'OMS, le groupe européen d'IR (European Group for the study of Insulin Resistance-EGIR) [Balkau et Charles 1999] et le NCEP-ATPIII (National Cholesterol Educational Program Adult Treatment Panel III [NCEP-ATPII 2001] ont formulé des définitions. Ces trois définitions ont des similitudes, notamment en ce qui concerne les facteurs de risque retenus (intolérance au glucose, hypertension, obésité et dyslipidémie) mais elles diffèrent en terme de détails et de critères. La définition de l'OMS inclut un critère supplémentaire, la microalbuminurie. Les définitions de l'OMS et de l'EGIR privilégient l'IR, à laquelle viennent s'ajouter d'autres critères. En revanche, celle du NCEP-ATPIII attribue un poids équivalent à chacun des critères, prend doublement en compte la dyslipidémie [triglycérides (TGL), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C)] et retient un seuil de pression artérielle plus bas que celui retenu par l'OMS et l'EGIR. D'autres différences entre les définitions concernent le nombre de critères nécessaires (3 parmi 6 pour l'OMS et l'EGIR et 3 parmi 5 pour le NCEP-ATPIII) ou les différences dans les combinaisons de critères. La définition de l'OMS est plus appropriée pour la recherche contrairement à la définition d'NCEP-ATPIII qui sert plutôt comme un outil pour les cliniciens et ceci grâce à la simplicité de cette définition, puisqu'elle demande une simple mesure du glucose à jeun, alors que l'autre définition exige un test de tolérance au glucose.

D'autres définitions ont été proposées. Il est à mentionner la définition de l'association américaine d'endocrinologie (American Association of Clinical Endocrinologists-AACE) [Einhorn et al. 2003] qui ne suggère pas l'obésité comme élément principal du SM.

Les différentes définitions amènent inévitablement à des évaluations variables de la prévalence du SM et aux problèmes de comparaisons des différentes études. En plus, les seuils définis, principalement pour l'obésité, varient entre ethnies. Ainsi, la fédération internationale du diabète (International Diabetes Federation-IDF) a proposé une définition [Alberti et al. 2005] où pour la première fois, le sexe et les seuils sont inclus en fonction de l'ethnie pour l'obésité centrale mesurée par le tour de taille. Cette politique de l'IDF d'établir une définition qui pourrait être utilisée mondialement, a été également adoptée par le

NHLBI/AHA (National Heart, Lung and Blood Institute/American Heart Association) [Grundy et al. 2004b].

### **I.3 Epidémiologie du SM**

Malgré les essais des dernières années d'atteindre à une définition unique du SM, il demeure difficile de comparer les prévalences du SM estimées pour différentes populations. Ceci provient de plusieurs paramètres : design de l'étude, sélection de l'échantillon, définition du SM appliquée, âge et sexe de la population, ethnie, niveau social et économique....

Une revue exhaustive [Cameron et al. 2004] rassemble les données sur la prévalence du SM dans différentes populations et pays. Il remarque que dans les études avec des individus de la même tranche d'âge, il existe une grande variation de la prévalence entre les hommes et les femmes, soulignant l'importance du sexe. Pour des populations d'adultes, la prévalence varie entre 8% (Inde) et 24% (Etats-Unis) pour les hommes et entre 7% (France) et 46% (Inde) pour les femmes.

Dans la même revue, il est également discuté l'importance de l'ethnie, démontrée par la comparaison de la prévalence du SM, en utilisant la même définition (NCEP-ATPIII) et la même tranche d'âge, d'hommes d'origines finnoise et américaine.

Un autre facteur qui joue un rôle important pour le SM est l'âge. En effet, dans une étude réalisée chez des sujets Iraniens, la prévalence du SM a été inférieure à 10% pour les hommes et les femmes âgés de 20-29 ans, et elle augmentait à 38% et 67% pour le groupe d'âge de 60 - 68 ans respectivement.

Le 'Diabetes Atlas' publié par l'IDF montre à quel point il est difficile de réussir des comparaisons fructueuses entre populations quant au SM et aux complications associées à cet état [Sicree et al. 2003].

### **I.4 Physiopathologie du SM**

Malgré les différentes définitions et critères du SM, globalement, nous pouvons distinguer les composants suivants : IR, intolérance au glucose, dyslipidémie, hypertension et obésité.

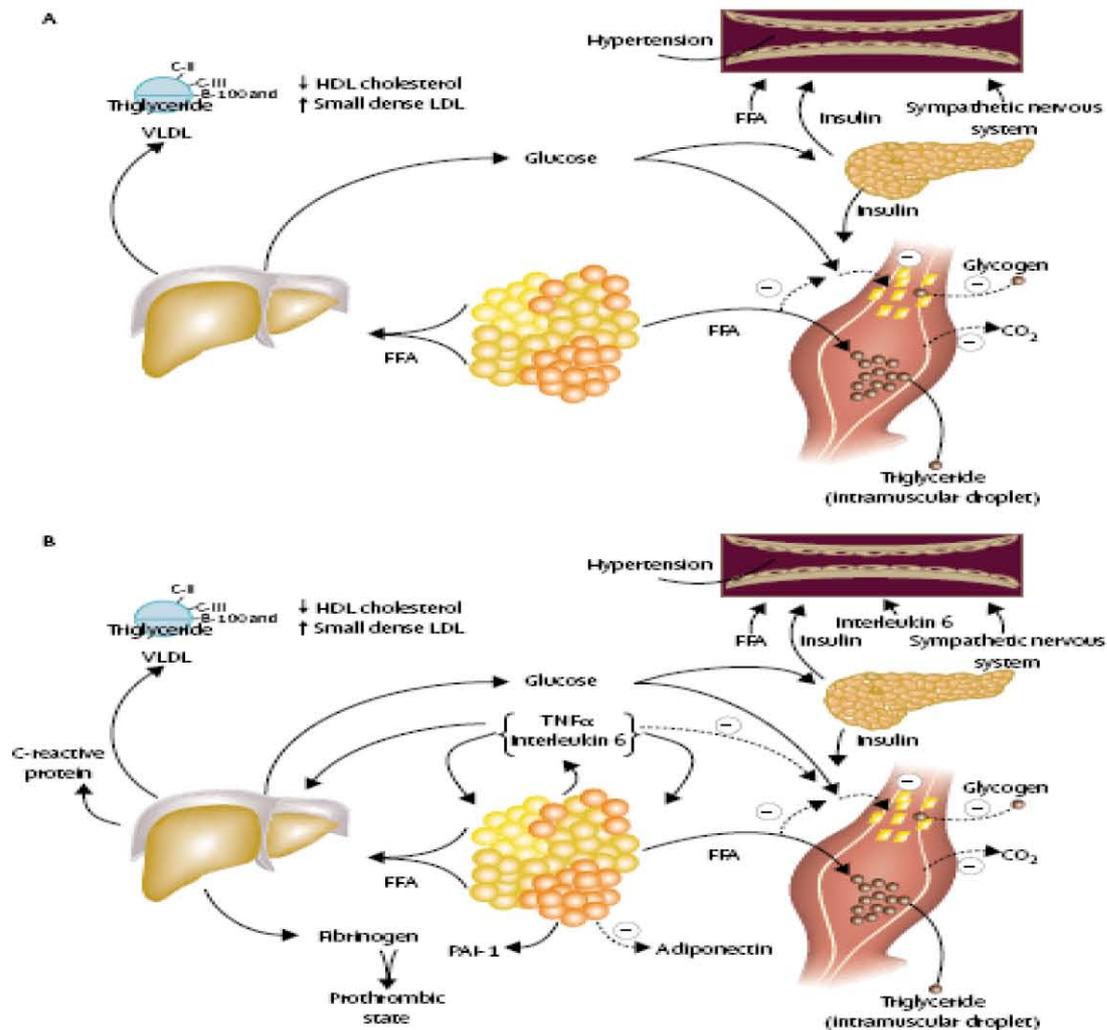
### *1.4.1 Facteurs classiques*

#### *1.4.1.1 Insulinorésistance-IR*

L'hypothèse la plus acceptée pour décrire la physiopathologie du SM repose sur la résistance à l'insuline. L'IR a été habituellement vue sous un angle glucocentrique (par exemple, un défaut de l'action de l'insuline, résulte en une hyperinsulinémie pour maintenir des taux normaux du glucose plasmatique). L'IR est un état correspondant à une altération de la réponse des cellules-cibles à l'insuline (cellules adipeuses, musculaires, hépatiques..), et globalement, de tout l'organisme à des concentrations plasmatiques usuelles de l'insuline. Au niveau des cellules adipeuses, l'IR conduit à l'augmentation de la lipolyse des TGL stockés dans ces cellules et par conséquent à l'augmentation des taux des TGL dans le sang. Au niveau des cellules musculaires, l'IR diminue l'entrée du glucose dans ces cellules (et par conséquent le stockage sous forme de glycogène) et la formation de glycogène dans les hépatocytes. Ces deux situations conduisent à l'augmentation des taux sanguins du glucose.

Les complications qui surgissent de l'IR, ainsi que les causes du développement de l'IR constituent actuellement un champ riche en recherche. Il est intéressant de citer une revue récente qui se focalise sur le rôle de l'hyperinsulinémie sur l'IR [Shanik et al. 2008]. Une augmentation aiguë de l'insuline a des effets stimulateurs sur les cellules-cibles, mais des taux sanguins de l'insuline constamment élevés conduisent à une désensibilisation de ces cellules par des mécanismes multiples au niveau des récepteurs des cellules ou à d'autres niveaux de signalisation cellulaire. L'IR est associée à une exposition constante des taux sanguins élevés d'insuline sans que l'on sache si l'hyperinsulinémie ou l'IR apparaît en premier. Or il semble que l'hyperinsulinémie perpétue l'IR.

La Figure 1 montre la physiopathologie du SM avec l'IR comme mécanisme central [Eckel et al. 2005].



**Figure 1. Physiopathologie du SM (insulinorésistance). Adopté par Eckel et al. 2005.**

A : Les acides gras libres (Free Fatty Acids-FFA) sont émis en abondance par une masse étendue de tissu adipeux. Dans le foie, les FFA conduisent à une augmentation de la production du glucose et des TGL, et de la sécrétion des VLDLs. Les anomalies des lipides et lipoprotéines associées incluent la diminution de la concentration en HDL-C et une augmentation de la densité des LDLs. Les FFA réduisent également l'insulinosensibilité au niveau musculaire en inhibant l'entrée du glucose médiée par l'insuline. Les défauts associés incluent une diminution de la transformation du glucose en glycogène et une augmentation de l'accumulation des lipides sous forme des TGL. L'élévation de la concentration circulante en glucose et dans une certaine mesure des FFA augmente l'insulinosécrétion qui conduit à une hyperinsulinémie. L'hyperinsulinémie peut conduire à une augmentation de la réabsorption rénale sodique et à une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique et contribuer ainsi au développement de l'hypertension. L'augmentation des FFA circulants peut aussi conduire à l'hypertension.

B : Les effets endocrines et paracrines de l'état pro-inflammatoire se superposent et contribuent à l'IR produite par des FFA en excès. L'augmentation de la sécrétion de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$ , par différentes cellules du tissu adipeux, conduit à une aggravation de l'IR et à la lipolyse des stocks de TGL qui sont transformés en FFA circulants. L'IL-6 et d'autres cytokines sont également augmentées et peuvent conduire à des productions hépatiques élevées de glucose et des VLDLs, ainsi qu'à une augmentation de l'IR au niveau musculaire. Les cytokines et les FFA augmentent aussi la production hépatique de fibrinogène et de l'inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène (Plasminogen Activator Inhibitor-1 PAI-1) qui complète la surproduction de PAI-1 par le tissu adipeux. Ceci conduit à un état pro-thrombotique. Des diminutions dans la production de l'adiponectine, une adipokine anti-inflammatoire et insulinosensibilisante, sont également associées au SM et pourraient contribuer à la physiopathologie du SM.

#### *1.4.1.2 Intolérance au glucose*

Les altérations de l'action de l'insuline sur le métabolisme du glucose, comprennent la diminution de la capacité de cette hormone d'inhiber la production du glucose par le foie et les reins et de faciliter l'entrée du glucose dans des tissus-cibles (muscles, tissu adipeux...). La relation entre l'intolérance au glucose (Impaired Glucose Tolerance-IGT), la glycémie à jeun anormale (Impaired Fasting Glucose-IFG) et l'IR est bien documentée chez les humains et les rongeurs. Afin de compenser les défauts de l'action de l'insuline, l'insulinosécrétion et la clearance de l'insuline doivent être modifiées afin de maintenir l'euglycémie [Eckel et al. 2005].

Le réseau des complications qui impliquent le métabolisme du glucose et les fonctions de l'insuline dans le SM est complexe ; néanmoins, il est reconnu que l'hyperglycémie et l'intolérance au glucose constituent un facteur de risque majeur pour les MCV [Gerstein 1997 ; Leiter 2006].

#### *1.4.1.3 Dyslipidémie*

La dyslipidémie du SM associe TGL élevés, HDL-C bas et LDL (low density lipoprotein) petites et denses indépendamment du taux de LDL-C (low density lipoprotein cholesterol) et accumulation postprandiale de lipoprotéines riches en TGL.

Dans le cas de l'IR, l'augmentation du flux d'acides gras vers le foie entraîne une élévation de la synthèse hépatique des TGL. Cependant, dans les conditions physiologiques, l'insuline inhibe la sécrétion des VLDL (very low density lipoprotein) dans la circulation systémique [Lewis et Steiner 1996]. Cette réponse est en partie un effet de l'insuline sur la dégradation de l'ApoB (apolipoprotein B) [Taghibiglou et al. 2002]. Mais l'insuline est aussi lipogénique et augmente la transcription et l'activité de nombreux gènes liés à la biosynthèse des TGL [Foufelle et Ferre 2002 ; Taghibiglou et al. 2002]. Par ailleurs, l'IR pourrait aussi conduire à une réduction des concentrations de lipoprotéine lipase dans les tissus périphériques [Eckel et al. 1995], mais cette altération semble être moins importante que la surproduction des VLDL dans l'établissement de l'hypertriglycéridémie.

La diminution des concentrations en HDL-C observée dans le SM est la conséquence de changements dans la composition et le métabolisme des HDL. En présence d'une hypertriglycéridémie, une baisse du contenu en cholestérol des particules HDL conduit à une diminution des esters de cholestérol du noyau des HDL accompagnée d'une augmentation variable des TGL, rendant la particule HDL petite et dense, une fonction en partie due à la CETP (Cholestérol Ester Transfer Protein) [Murakami et al. 1995]. Ce changement dans la

composition des HDL conduit aussi à une augmentation de la clearance des HDL [Brinton et al. 1991]. La relation qui lie ces changements à l'IR est probablement indirecte et apparaît de concert avec les changements observés dans le métabolisme des lipoprotéines riches en TGL [Eckel et al. 2005].

La composition des LDL est modifiée de façon similaire. Comme nous l'évoquions plus haut, les individus atteints de SM possèdent des LDL petites et denses, hautement athérogènes, avec une durée de vie plus longue que les LDL 'normales' ce qui les rend plus facilement oxydables, d'où un catabolisme accru par les macrophages de la paroi artérielle. Dans certaines études, l'altération de la composition des LDL est un facteur de risque indépendant des MCV [Zambon et al. 1999]. Néanmoins, l'association avec les MCV n'est pas indépendante, mais liée à des changements concomitants dans d'autres lipoprotéines et à d'autres facteurs de risque [Sacks et Campos 2003].

#### *1.4.1.4 Hypertension*

La relation entre hypertension et IR a été bien établie [Ferrannini et al. 1987] et implique certains mécanismes différents. Une revue a fait le point sur l'hypertension primaire [Reaven 2003]. Il en ressort que : 1) les patients présentant une hypertension primaire sont insulino-résistants et hyperinsulinémiques, 2) les sujets normotendus, parents du premier degré de patients atteints d'une hypertension primaire, sont relativement hyperinsulinémiques et insulino-résistants comparés à un groupe de contrôles sans histoire familiale d'hypertension et 3) des études de populations ont montré que l'IR estimée par l'hyperinsulinémie pouvait prédire le développement de l'hypertension primaire chez les enfants, les adolescents et les adultes. Cependant, l'auteur souligne que s'il existe des individus insulino-résistants qui développent une hypertension primaire, tous les patients atteints d'hypertension primaire ne sont pas insulino-résistants.

Une autre revue récente [Yanai et al. 2008] discute les mécanismes impliqués dans le développement de l'hypertension dans le cadre du SM et il signale l'obésité viscérale, l'IR, l'activité élevée du système sympathique, le stress oxydant et le dysfonctionnement de l'endothélium, le système rénine-angiotensine et les médiateurs d'inflammation tels que la protéine C-réactive (C-reactive protein-CRP).

#### *1.4.1.5 Obésité*

L'OMS a défini des seuils d'indice de masse corporelle (IMC) pour classer les individus :  $IMC < 17\text{kg/m}^2$  : maigreur modeste ou sévère,  $IMC \geq 40\text{kg/m}^2$  : obésité classe III (obésité sévère) [WHO 1995].

Comme discuté auparavant, l'IR semble avoir un rôle central dans le développement du SM et dans l'aggravation des autres composants du SM. Cependant, l'importance cruciale de l'obésité et en général de l'adiposité dans le modèle du SM est également soutenue [Despres et Lemieux 2006]. Ceci dit, il existe des sujets avec une IR qui ne sont pas obèses [Ruderman et al. 1998].

L'évolution parallèle de l'obésité et du diabète de type 2 a conduit à la conception du terme 'diabesity' pour fortifier le lien entre ces deux états [Astrup et Finer 2000 ; Pincock 2006 ; Zimmet et al. 2001]. Pourtant, tout individu étant obèse n'est pas susceptible de développer de l'IR ou du diabète. L'utilisation de l'indice de tour de taille ou du rapport taille/hanches dans les définitions du SM, introduit la notion de l'accumulation viscérale de la masse grasse. Pour tout niveau d'adiposité, les individus avec une distribution sélective de la masse grasse viscérale ont un risque plus élevé de développer une IR que les sujets avec une distribution de la masse grasse 'périphérique' Despres et al. 1990 ; Despres 2006].

En parlant de l'utilité du tour de taille, il y a un point à discuter. Un tour de taille élevé peut être dû à une augmentation de l'accumulation de la masse grasse abdominale aux niveaux sous-cutané ou viscéral. Cette distinction se réalise par des méthodes d'imagerie [Lee et al. 2004]. Cette distinction est importante, puisque la distribution de la masse grasse au niveau abdominal entraîne des mécanismes différents dans le cas d'une accumulation sous-cutanée ou viscérale. En effet, l'accumulation de la masse grasse dans la région abdominale viscérale résulte en l'augmentation du flux des acides gras dérivés par le tissu adipeux vers le foie, par la circulation splanchnique, alors que l'accumulation dans la région sous-cutanée conduit à la libération des acides gras dans la circulation, en évitant ainsi des effets directs sur le métabolisme hépatique.

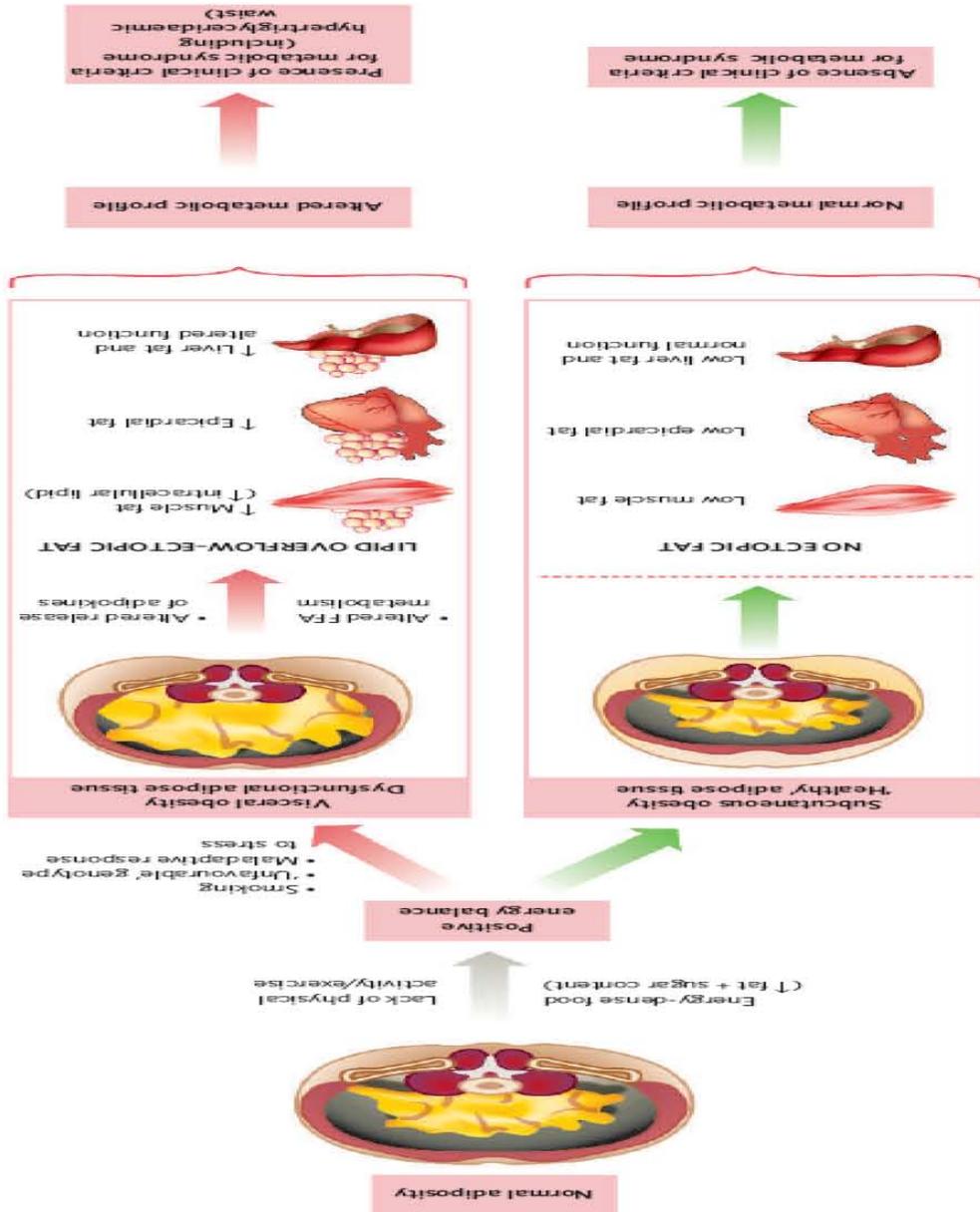
Il semble que le métabolisme altéré des acides gras peut contribuer à l'état de l'IR chez des individus avec une obésité viscérale. Les adipocytes hypertrophiés de la région abdominale ont une action lipolytique élevée qui est résistante à l'effet anti-lipolytique de l'insuline [Mauriege et al. 1995 ; Mittelman et al. 2002]. Par conséquent, le flux des acides gras peut conduire à l'augmentation de la production du glucose par le foie. L'IR au niveau hépatique est associée à une diminution de la dégradation de l'ApoB et avec une augmentation de la production des lipoprotéines riches en TGL.

En plus, le tissu adipeux est un organe avec des rôles endocriniens et il produit des molécules telles que les cytokines TNF- $\alpha$  et IL-6, et les adipokines leptine et adiponectine [Trayhurn et Wood 2004].

Ces hypothèses, impliquant le métabolisme des acides gras et l'action endocrinienne du tissu adipeux, supportent un rôle causal de l'obésité dans la physiopathologie du SM. Cependant, une autre possibilité, qui n'exclut pas la contribution des mécanismes décrits auparavant, est que l'excès de masse grasse viscérale représente un marqueur de l'incapacité du tissu gras sous-cutané de stocker la surcharge de graisse due au déséquilibre calorique. Ce déficit du tissu adipeux sous-cutané de stocker la graisse en excès, conduit au dépôt de la graisse sur d'autres organes tels que le foie, les muscles, le cœur. Ceci est décrit comme le modèle de dépôt de graisse ectopique ('ectopic fat deposition') [Miranda et al. 2005] (Figure 2).

Si nous partons du principe que l'obésité a un rôle causal pour l'évolution du SM et de ses composants, il faut en même temps tenir compte de certains paramètres. Les études sur l'obésité font souvent abstraction de deux points importants : 1) le sexe des individus et, 2) le niveau d'obésité ou plutôt d'adiposité. Comme décrit depuis déjà longtemps par Vague et al. [Vague 1947] la distribution de la masse grasse est différente entre les hommes et les femmes. A ceci, vient se rajouter l'observation par imagerie que cette distribution diffère également avec l'évolution de l'adiposité [Schreiner et al. 1996]. Autrement dit, les hommes et femmes avec le même IMC, qui est l'indice classique pour la mesure de l'obésité, accumulent de la masse grasse dans des sites différents. Il faut ainsi, stratifier les populations par sexe, quant à l'étude de l'obésité, puisqu'il est probable que l'impact de l'excès de la masse grasse est différent entre les deux sexes. En ce qui concerne le niveau de l'adiposité, nous ne savons, ni à partir de quel IMC ou niveau d'adiposité commencent ses effets nocifs sur le métabolisme (poids normal avec un excès de masse grasse dans l'abdomen, surpoids ?) ni si ses effets sont proportionnels à l'accumulation de la masse grasse. Il serait ainsi préférable d'étudier à chaque fois des tranches d'IMC relativement restreintes et ceci est rarement le cas. Un exemple pourrait être l'étude de l'obésité des individus d'un poids normal à une obésité modeste pour observer éventuellement son impact sur des composants du SM ou facteurs de risque. L'étude de cette marge d'IMC, qui représente globalement la population générale, pourrait apporter certaines connaissances dans le domaine pré-pathologique du SM.

**Figure 2. Le modèle de dépôt de graisse ectopique. Adopté par Despres et Lemieux 2006.** L'accumulation excessive de la masse grasse viscérale peut être associée d'une manière causale avec les traits de l'IR mais elle peut également être un marqueur de dysfonctionnement du tissu adipeux, ce dernier étant incapable de stocker correctement la graisse en excès. Suivant ce modèle, la capacité du corps de maîtriser l'excès énergétique (provenant d'une consommation calorifique excessive, d'une activité physique diminuée ou, d'une combinaison des deux) peut déterminer la susceptibilité de l'individu au développement du SM. Il est suggéré que lorsque la graisse en excès est stockée dans le tissu adipeux sous-cutané, l'individu est protégé contre le développement du SM. En revanche, dans le cas d'absence ou de déficience du tissu adipeux ou dans le cas d'une IR, l'excès de graisse se dépose sur des sites indésirables, tels que le foie, le cœur, les muscles et la région viscérale ; un phénomène décrit comme un dépôt de graisse ectopique. Les facteurs associés à une IR ou une accumulation préférentielle au niveau du tissu adipeux viscéral sont, le tabagisme, la susceptibilité génétique à l'obésité viscérale et un profil associé à une réponse mal adaptée au stress, parmi d'autres. Les conséquences de ce déficit incluent l'obésité viscérale, l'IR, une dyslipidémie athérogénique, un état pro-thrombotique et pro-inflammatoire. Ce dysfonctionnement peut être détecté au niveau clinique par la présence simultanée d'un tour de taille élevé et d'une hypertriglycéridémie, une condition connue comme 'taille hypertriglycéridémiant'.



## *1.4.2 Facteurs nouveaux*

### *1.4.2.1 Inflammation*

L'association du SM avec l'inflammation est bien documentée [Sutherland et al. 2004]. Comme déjà signalé, le tissu adipeux produit des molécules pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6..) et dans le cas de l'obésité, les macrophages infiltrent le tissu adipeux [Weisberg et al. 2003]. Ce mécanisme pourrait contribuer au profil inflammatoire trouvé chez des individus avec une obésité abdominale [Yudkin et al. 1999]. Les taux sanguins de CRP sont élevés chez des sujets avec une obésité viscérale [Lemieux et al. 2001]. La relation entre l'adiposité et l'inflammation a été également démontrée par une étude où la perte de poids chez des sujets obèses a été associée avec l'expression des gènes (dans le tissu adipeux) associés à l'inflammation [Clement et al. 2004].

En dehors de la CRP, d'autres protéines circulantes telles que l'orosomucoïde et l'haptoglobine (ISP-Inflammation Sensitive Proteins) semblent gagner du terrain dans la recherche des MCV [Engstrom et al. 2003a]. Une autre étude a démontré que les taux élevés de ces protéines sont associés à la prédiction de la prise de poids [Engstrom et al. 2003b]. Cependant, les rôles de ces molécules dans l'obésité et le SM sont à découvrir.

Enfin, les taux des globules blancs circulants sont associés avec le SM [Hsieh et al. 2007 ; Kim JA et al. 2006a ; Onat et al. 2006].

### *1.4.2.2 Apolipoprotéines*

La dyslipidémie est considérée comme un composant du SM mais sur quelle base, épidémiologique ou autre, pourrait-on supposer que, par exemple, l'hypertriglycéridémie a un caractère de gravité égal à celui d'une HDL-C basse? Ceci dit, les perturbations du métabolisme lipidique, observées dans le cas du SM, sont complexes et leur compréhension nécessite la prise en compte des apolipoprotéines dans ces mécanismes [Sniderman et Faraj 2007]. La revue de Sniderman et Faraj discute certains résultats des études, en concluant que la dyslipidémie du SM doit être redéfinie en incluant les ApoB et ApoAI (apolipoprotéine AI). De plus, des études épidémiologiques ont montré que le rapport ApoB/ApoAI est très associé avec le SM et avec chacun de ses composants. En plus, l'ApoB a été associée plus que les TGL ou les marqueurs de cholestérol, avec les marqueurs d'inflammation et l'IR. En se basant sur ces résultats, il serait en effet judicieux d'inclure ces molécules dans l'étude du SM et de ses composants.

#### *1.4.2.3 Stéatose hépatique*

Comme déjà mentionné, dans le cas de l'obésité il peut y avoir un dépôt de masse grasse sur des organes tels que le foie. La relation entre la stéatose hépatique non-alcoolique et le SM est de plus en plus mise en évidence. Environ 90% de patients avec une stéatose hépatique non-alcoolique ont 1 ou plusieurs facteurs du SM et 33% ont un SM caractérisé [Marchesini et al. 2003]. Il semble alors que cet état de stéatose soit la représentation au niveau hépatique du SM. Les individus en surpoids ou obèses avec des taux modestement élevés des enzymes hépatiques ALAT (alanine aminotransférase), ASAT (aspartate aminotransférase), GGT (glutamyltransférase gamma) sont les premiers à être suspectés d'avoir une stéatose hépatique non-alcoolique. La méthode la plus précise est la biopsie du foie mais il existe d'autres méthodes non-invasives telles que l'ultrasonographie, la tomographie etc. Cependant, ces méthodes sont difficilement applicables pour de grandes populations dans le cadre d'études épidémiologiques ou cliniques [Rector et al. 2008].

Une distribution de la masse grasse viscérale, une stéatose débutante, et une intolérance au glucose, sont souvent simultanément observées chez des sujets en surpoids ou avec un poids normal [Banerji et al. 1995 ; Goto et al. 1995]. Les concentrations de HDL-C sont diminuées [Seppala-Lindroos et al. 2002] et les concentrations de TGL et de cholestérol sont élevées [McMillan et al. 2007 ; Seppala-Lindroos et al. 2002] dans le cas de la stéatose hépatique non-alcoolique. Quant à l'IR, il n'est pas très clair si l'IR au niveau du foie est la cause ou le résultat d'une stéatose hépatique non-alcoolique [Adiels et al. 2006 ; Marchesini et al. 2005]. Il est considéré que l'IR est un élément important pour le développement de cette stéatose par les voies suivantes : 1) activation de la sécrétion des adipokines, avec des rôles pro-inflammatoires, par les adipocytes, 2) altération du ratio de synthèse et transport des TGL par les hépatocytes et 3) augmentation de la lipolyse dans le tissu adipeux, qui conduit à une libération des acides gras libres qui passent par la veine portale vers le foie, exposant ainsi cet organe à un excès d'acides gras. Une fois que la stéatose est développée, d'autres mécanismes, tels que l'inflammation, où les adipokines jouent un rôle très important, prolongent et aggravent cet état [Rector et al. 2008]. L'inflammation du foie est associée avec l'installation et la gravité du SM [Ryan et al. 2005].

Les enzymes hépatiques ALAT, ASAT et GGT sont des marqueurs habituellement utilisés pour la stéatose hépatique et l'augmentation de leurs taux reflète les atteintes du foie, résultant de l'infiltration des acides gras et de la stimulation des mécanismes d'inflammation. Des études récentes indiquent que les taux sanguins élevés de ces enzymes sont associés avec tous

les composants du SM [Liangpunsakul et Chalasani 2005 ; Oh et al. 2006 ; Yamada et al. 2006].

#### *1.4.2.4 Acide urique*

Il y a de plus en plus d'études qui suggèrent que l'acide urique est associé aux MCV et au SM [Gagliardi et al. 2008]. Cette revue rassemble des études qui montrent que les taux élevés de l'acide urique sont associés avec le SM [Onat et al. 2006 ; Yoo et al. 2005] et ses composants, l'hypertension [Lin et al. 2004 ; Verdecchia et al. 2000], l'obésité abdominale [Takahashi et al. 1997], l'inflammation [Frohlich et al. 2000 ; Ruggiero et al. 2006] ...

Certaines études suggèrent que l'hyperinsulinémie, due à l'IR et à l'obésité viscérale, conduit à l'augmentation de l'absorption de l'acide urique par les reins qui, par conséquent, conduit aux taux sanguins élevés de l'acide urique. En dehors des problèmes de clearance rénale, il y a l'hypothèse que l'association entre l'IR et les taux élevés d'acide urique est expliquée par les taux élevés des TGL [Giacomello et al. 1997]. Par ailleurs, les associations de l'acide urique avec l'obésité peuvent être expliquées par le comportement alimentaire. Très souvent, les sujets obèses consomment beaucoup de viande et cette consommation élevée conduit à l'augmentation des taux d'acide urique dans la circulation, puisque l'acide urique est le produit final du métabolisme des purines.

Malgré l'évolution des connaissances de l'acide urique en relation avec le SM, il reste encore à clarifier s'il est un indicateur ou un facteur de risque du SM. Cependant, on a de plus en plus tendance à l'inclure dans les composants principaux du SM dans les études du SM et de ses facteurs [Onat et al. 2006].

#### *1.4.3 Comment étudier le SM et ses facteurs ?*

Il est bien établi que la co-apparition des facteurs du SM chez un individu est loin d'être due au hasard. Il semble alors que le SM soit un état physiopathologique qui existe réellement mais nous ne savons pas si cet état est tout simplement la somme de ces composants où s'il a une valeur supplémentaire à apporter dans la pratique clinique [Reilly et Rader 2003]. Autrement dit, nous nous demandons si l'addition de ces facteurs à juste des effets proportionnels ou si cette addition conduit à des effets beaucoup plus nocifs que les effets attribués par chacun des facteurs composant ce syndrome. En plus, à ces facteurs, avec l'évolution des connaissances dans le domaine, viennent s'en ajouter d'autres dont nous ne savons pas s'ils sont des causes, des effets, ou de simples manifestations du SM.

Les opinions varient quant à l'utilité de la notion du SM. Il n'est pas encore clair s'il faut le définir exclusivement en rapport avec l'IR, les conséquences métaboliques de l'obésité, les risques de MCV, ou simplement le considérer comme la somme des facteurs statistiquement associés. Ainsi, différentes approches existent. Certaines étudient l'impact du SM en tant qu'entité sur le risque des MCV, d'autres se focalisent sur l'IR ou l'obésité en considérant les autres facteurs comme conséquences de ces facteurs, et d'autres essayent de décortiquer le SM en ses composants et observer leurs interrelations.

En effet, il est possible que parmi tous les facteurs du SM, certains s'agrègent et sont liés plus avec l'obésité ou l'IR et, par conséquent, évoluent ensemble au fil du temps. Telle a été notre hypothèse de départ et pour cette raison nous avons observé l'évolution des facteurs classiques et nouveaux du SM à court terme (5 ans) dans notre cohorte. Notre approche a consisté à étudier les agrégations des facteurs du SM en supposant l'obésité comme le facteur central. Pour mettre en évidence alors, des agrégats, nous avons appliqué l'analyse en composantes principales qui permet de classer ensemble les facteurs les plus associés entre eux. Cette analyse permet de diminuer le nombre de facteurs, de les rassembler et d'observer également des relations nouvelles entre des facteurs que nous ne considérons pas associés entre eux. En même temps, il faut interpréter les résultats de cette analyse avec précaution, puisque c'est la personne qui effectue l'analyse qui définit le nombre d'agrégats à obtenir et le seuil pour qu'un facteur entre dans un agrégat. Il est évident alors, qu'une partie de l'analyse est dépendante du manipulateur et que c'est à lui d'utiliser le plus efficacement cet outil. Cependant, cette analyse demeure un très bon outil pour créer des 'clusters' à partir d'un grand nombre de facteurs.

Pour conclure, chaque approche différente du SM apporte des éléments importants pour la compréhension de cet état. Notre approche a eu comme but d'étudier l'évolution des facteurs du SM et les agrégats de leur évolution, en fonction de la prise de poids, dans la population générale. Nous considérons que cette étude peut apporter des connaissances pour mieux comprendre les associations entre ces facteurs avant que le SM s'installe.

## II. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux blanc est un tissu majoritairement composé par des adipocytes qui sont des cellules différenciées, spécialisées dans le stockage de la graisse. En dehors du tissu adipeux blanc, il existe le tissu adipeux brun qui joue un rôle important dans l'homéostasie de l'organisme lorsqu'il est exposé au froid [Cinti 2006], mais ses rôles physiologiques, ainsi que son implication dans différentes pathologies ne sont pas encore bien connus.

Le tissu adipeux secrète des hormones avec plusieurs rôles physiologiques ; ce qui permet de le considérer plutôt comme un organe endocrinien qu'un simple site de stockage. Ce dialogue moléculaire sert à informer l'organisme sur l'équilibre énergétique et participe à l'homéostasie et à la fonction physiologique de plusieurs organes. En effet, le tissu adipeux est composé par d'autres types de cellules, en dehors des adipocytes. Il est très vascularisé et innervé, ce qui permet des liaisons entre ce tissu et le reste de l'organisme pour la régulation du métabolisme. Le tissu adipeux est en équilibre dynamique, grâce à la différenciation et à l'apoptose de cellules adipeuses, en réponse à l'état nutritionnel, aux changements de l'environnement, à la consommation des médicaments, à la grossesse... Dans le cas de l'obésité, le tissu adipeux est infiltré par des macrophages.

La base de la fonction des adipocytes est d'accumuler et libérer les acides gras. Les adipocytes stockent de l'énergie pour l'organisme sous forme des TGL dans le cas d'un excès calorique et mettent à disposition les TGL dans le cas de manque calorique, d'activité physique intense, de jeûne etc. Chez l'homme, les TGL stockés dans les adipocytes proviennent de la circulation, puisque la capacité du tissu adipeux à produire des TGL par une lipogenèse *de novo* est très faible et insignifiante par rapport à cette capacité du foie. Ainsi, les TGL de l'alimentation et synthétisés *de novo* par le foie, sont transportés vers le tissu adipeux par des lipoprotéines. Les TGL ne rentrent pas dans les adipocytes mais ils sont hydrolysés et ce sont ensuite les acides gras qui entrent dans les adipocytes. Lorsque l'organisme a besoin des lipides, les acides gras passent dans la circulation et sont distribués à plusieurs tissus. Les acides gras sont également des molécules signaux et des substrats pour la production des lipoprotéines par le foie. [Wang et al. 2008].

Sous des conditions normales, les adipocytes sont capables de maîtriser l'équilibre entre lipolyse et lipogenèse pour répondre à des besoins physiologiques. L'importance du tissu adipeux peut se démontrer par deux exemples : 1) lorsqu'il y a un manque en masse grasse (lipotrophie) des complications similaires à celles du diabète de type 2 se manifestent

[Hegele et al. 2007] et 2) l'état de surpoids et d'obésité est associé avec des maladies chroniques telles que le SM, le diabète de type 2 et les MCV. Il est évident alors, que le tissu adipeux joue un rôle intrinsèque dans l'homéostasie du glucose et des lipides.

Pourtant, il est à noter que le tissu adipeux exerce ses rôles en concert avec le reste de l'organisme. Il régule ses fonctions en relation avec les signaux externes du tissu, tels que les signaux provenant du système nerveux, et les substrats et hormones provenant de la circulation. Il faut souligner également que le tissu adipeux est spécifique des espèces [Arner 2005], et comme énoncé auparavant, des différences existent au niveau de la distribution de la masse grasse qui dépendent du sexe, et au niveau du métabolisme de la masse grasse et de ses propriétés de sécrétion en fonction du site/dépôt de cette masse grasse [Klaus et Keijer 2004].

## **II.1. Organe endocrinien**

L'identification de la leptine en 1994 [Zhang et al. 1994] a conduit à la conception du tissu adipeux comme organe endocrinien. Cependant, bien plus tôt, en 1987, Siiteri avait mis en évidence le rôle endocrinien de ce tissu, par le fait que les adipocytes produisent des hormones stéroïdes [Siiteri 1987]. En 1996, Smith a caractérisé le tissu adipeux comme un organe endocrinien grâce aux rôles de la leptine [Smith 1996]. Ensuite, en 1998, Mohamed-Ali et al. se sont intéressés à observer globalement l'ensemble des molécules secrétées par le tissu adipeux et ont pu identifier les substances, avec un rôle endocrine (hormones) et avec un rôle paracrine, produites par le tissu adipeux [Mohamed-Ali et al. 1998]. Depuis, la recherche dans le domaine a beaucoup évolué avec la découverte d'autres molécules et avec la caractérisation de leurs rôles.

Les actions autocrines/paracrines jouent un rôle dans le remodelage du tissu adipeux, l'angiogenèse et l'adipogenèse. D'autres molécules secrétées par le tissu adipeux ont plutôt des actions endocrines et peuvent *via* la circulation, non pas locale mais systémique, participer à la régulation des mécanismes tels que l'appétit et l'équilibre énergétique.

Les adipocytes sont hautement spécialisés dans la sécrétion des protéines et plusieurs études d'expression dans le tissu adipeux ont démontré qu'il est très actif à ce niveau. Il secrète des molécules telles que la leptine, la visfatine, l'adiponectine, la resistine, des cytokines également, telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6...[Wang et al. 2008].

## II. 2. Les adipokines

Le nombre de plus en plus élevé des protéines signaux identifiées comme produites par le tissu adipeux a créé le besoin de leur accorder un nom collectif. Le terme initialement proposé par Funahashi et al. a été 'adipocytokines' [Funahashi et al. 1999] et ce terme a été utilisé extensivement. Cependant, ce nom sous-entend que les protéines secrétées par les adipocytes sont des cytokines ou des molécules similaires aux cytokines. Il est vrai que ceci est le cas pour certaines molécules comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 mais non pas pour la majorité des molécules produites par les adipocytes. Ainsi, ce terme a été remplacé par le terme 'adipokines' [Trayhurn et Wood 2004]. La sécrétion est la caractéristique d'une importance critique pour définir une molécule comme adipokine, puisque ce terme a été faussement utilisé pour d'autres molécules telles que l'adiponutrine qui est une protéine transmembranaire plutôt qu'un produit de sécrétion [Wiesner et al. 2004]. Le même terme a été également utilisé pour décrire une protéine produite par le tissu adipeux en général et pas uniquement par les adipocytes. Par exemple, les protéines secrétées par les macrophages qui infiltrent le tissu adipeux. Il est à préciser que le terme adipokines doit s'appliquer exclusivement aux protéines produites et secrétées par les adipocytes [Wang et al. 2008].

Les adipokines possèdent une multitude de fonctions dans plusieurs systèmes et mécanismes : appétit et équilibre énergétique, homéostasie, immunité, métabolisme des lipides, pression artérielle, inflammation, angiogenèse, sensibilité de l'insuline...[Trayhurn et Wood 2004]. Etant donné leurs implications dans ces mécanismes, il ne serait pas surprenant qu'elles jouent des rôles importants dans la physiopathologie du SM.

Ici, nous allons nous intéresser à deux adipokines, la leptine et la visfatine. Ces adipokines ont des rôles relativement bien définis ; or elles révèlent de plus en plus de nouvelles fonctions qui restent à explorer.

### II.2.1 Leptine

#### II.2.1.1 Découverte et caractérisation

Une mutation chez la souris, conduisant à une obésité morbide (gène *ob*) a été identifiée en 1950 [Ingalls et al. 1950]. Les souris homozygotes pour la mutation *ob* et *db*, connues comme souris *ob/ob* et *db/db* respectivement, développent une obésité et un diabète similaires à l'obésité morbide chez l'homme [Coleman 1978]. Ces découvertes ont créé un intérêt pour caractériser ce gène (clonage et séquençage) chez la souris et son homologue chez l'homme

[Zhang et al. 1994]. La protéine de la leptine est composée de 167 acides aminés, avec un résidu de 21 acides aminés qui est le peptide-signal (la protéine de la leptine a 146 acides aminés) et cette structure est hautement conservée parmi les différentes espèces.

En 1995, il a été démontré que l'expression du gène dit *ob* à l'époque, est augmenté dans le cas de l'obésité chez l'homme d'une façon proportionnelle à la sévérité de l'obésité [Considine et al. 1995 ; Zhang et al. 1994]. La même année, la structure du gène chez l'homme, ainsi que son positionnement dans le génome, ont été mis en évidence [Isse et al. 1995]. Ils ont trouvé que le gène avait trois exons, séparés par deux introns (environ 20 kilobases), qu'il se positionne sur le chromosome 7q31.3 et que le gène donne un seul transcrit. D'autres études [Gong et al. 1996] ont ensuite décrit plus extensivement la structure du gène, ainsi que les différents sites de régulation de l'expression du gène au niveau du promoteur. L'expression du gène *ob* est induite pendant la différenciation des adipocytes et est régulée par différents signaux hormonaux (glucocorticoïdes, cytokines, insuline..).

Des expériences d'injection de la leptine (provenant du mot 'leptos' qui veut dire mince en grec) chez les souris *ob/ob* ont démontré que cette molécule peut normaliser le poids et cette observation a depuis, très tôt, conduit à la proposition que la leptine joue un rôle très important dans la régulation de l'équilibre énergétique [Campfield et al. 1995 ; Halaas et al. 1995 ; Pelleymounter et al. 1995]. Puisque cette nouvelle molécule a présenté un tel intérêt, il a été émergeant de caractériser sa structure protéique [Zhang et al. 1997]. Ils ont ainsi utilisé la leptine E-100 (substitution à la position 100 d'une glutamine par une tryptophane) qui correspond à une protéine très similaire à la protéine 'sauvage', au niveau de la structure et des propriétés biologiques, mais qui est plus facile à solubiliser et à cristalliser. La structure de la leptine E-100 a montré qu'elle peut être classée dans la famille des cytokines de structure hélicoïdale à longue-chaine qui inclut des cytokines telles que l'IL-6, l'IL-11, l'IL-12....

### *II.2.1.2 Récepteurs et sites d'action de la leptine*

La démonstration, que l'injection périphérique ou centrale (au niveau du cerveau) de la leptine recombinante chez les souris *ob/ob* a diminué le poids et la consommation de nourriture, a conduit à l'hypothèse que la leptine est impliquée dans le réseau du système nerveux pour la régulation de l'équilibre énergétique [Campfield et al. 1995]. Suite à cette observation, Tartaglia et al. ont essayé d'expliquer par quel mécanisme la leptine pénètre le système nerveux central [Tartaglia et al. 1995]. Chez la souris, ils ont identifié un récepteur de la leptine, le OB-R au niveau du plexus choroïde et ce récepteur ressemblait aux récepteurs de

classe I des cytokines. Puisque le plexus choroïde est responsable de la génération du liquide céphalorachidien et fait partie de la barrière entre le sang circulant et le cerveau, Caro et al. ont fait l'hypothèse que la fonction du récepteur de la leptine à ce niveau a comme rôle, le transport de la leptine dans le cerveau [Caro et al. 1996 ; Tartaglia et al. 1995]. Ainsi, ils ont émis l'hypothèse de la résistance à la leptine dans le cas de l'obésité, puisque les taux élevés de leptine circulante conduisent à une saturation du récepteur OB-R et par conséquent le système de transport chez les obèses fonctionnerait d'une façon moins efficace.

Nous pouvons distinguer plusieurs isoformes du récepteur OB-R. Toutes ces isoformes ont une partie extracellulaire et une partie transmembranaire communes mais la partie intracellulaire varie entre les isoformes. Le OB-Rb qui est l'isoforme 'complet', contient des motifs intracellulaires nécessaires pour l'activation de la voie des 'Janus Kinases (JAK)/Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)'. Il est considéré comme le récepteur fonctionnel. Cet isoforme se trouve en grandes quantités au niveau du cerveau (hypothalamus, thalamus...) [Tartaglia et al. 1997]. Il est également exprimé par les cellules  $\beta$  pancréatiques et c'est *via* ce récepteur que la leptine exerce ses effets inhibiteurs sur la sécrétion de l'insuline [Arora 2008]. Dans l'isoforme 'court', autrement dit, le récepteur OB-Ra, une partie intracellulaire est manquante et cet isoforme est trouvé abondamment dans le plexus choroïde et joue un rôle dans le transport de la leptine dans le cerveau. Enfin, le récepteur soluble OB-Re facilite le transport de la leptine dans la circulation. Ce récepteur n'a, ni la partie intracellulaire, ni la partie transmembranaire [Arora 2008 ; Tartaglia 1997].

Les récepteurs de la leptine ont été également trouvés dans les tissus périphériques tels que les poumons, les reins, le foie, le pancréas, les muscles...L'isoforme 'court' au niveau des reins semble jouer un rôle pour la clearance de la leptine [Mantzoros 1999]. Les récepteurs de la leptine sont aussi présents dans différents types de cellules du système immunitaire [LaCava et Matarese 2004].

Il a été estimé que sous des conditions physiologiques, seulement 5-25% des récepteurs OB-R se trouvent à la surface cellulaire, alors que la majorité se trouve à l'intérieur de la cellule. Les récepteurs OB-Ra et OB-Rb sont internalisés par les lysosomes et ensuite dégradés. Certaines études suggèrent que l'internalisation des récepteurs OB-Rb est plus grande que pour les autres et que le récepteur 'court' se recycle plus vite à la surface cellulaire. Ces observations pourraient contribuer à expliquer la résistance sélective à la leptine, en se basant sur le fait qu'il existe une dégradation préférentielle du récepteur OB-Rb [Arora 2008].

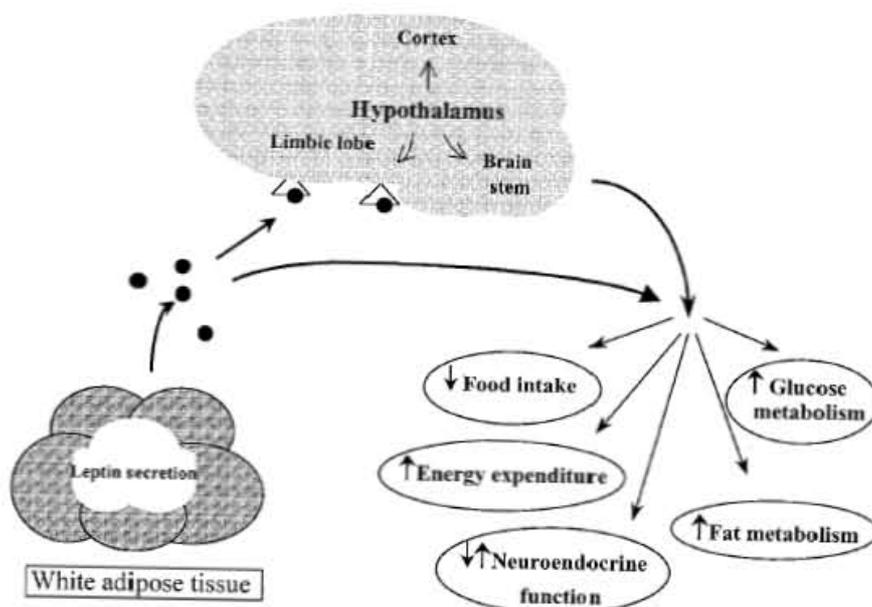
### *II.2.1.3 Sources de la leptine*

La source majeure de la leptine est le tissu adipeux. Contrairement à la plupart des molécules produites par des cellules du tissu adipeux, autres que les adipocytes, la leptine est produite par les adipocytes [Fain et al. 2004]. Des études ont démontré que le tissu adipeux sous-cutané produit plus de leptine que le tissu adipeux viscéral [Van et al. 1998]. Il a été également démontré que la production de la leptine par le tissu adipeux sous-cutané est plus élevée par rapport au tissu adipeux viscéral pour des individus d'un IMC de 45kg/m<sup>2</sup> et qu'en revanche cette production n'était pas différente pour des individus d'un IMC de 32 kg/m<sup>2</sup>, suggérant que l'IMC peut influencer l'expression régionale de la leptine [Fain et al. 2004]. Ainsi, le site de dépôt de la masse grasse et la sévérité de l'obésité semblent avoir un impact important sur l'expression de la leptine.

La leptine est également produite par l'estomac [Cinti et al. 2000], le placenta et les tissus fœtaux [Cervero et al. 2006]. Il est intéressant de noter que dans un modèle de maladie auto-immune chez la souris, la leptine a été trouvée exprimée par les lymphocytes T avec probablement un rôle autocrine/paracrine dans la prolifération des lymphocytes [Sanna et al. 2003].

#### II.2.1.4 Rôles physiologiques

La Figure 3 montre globalement les actions de la leptine.



**Figure 3. Représentation globale des actions de la leptine. Adopté par Mantzoros 1999.**

La leptine agit soit directement soit par l'activation de centres spécifiques au niveau du système nerveux central sur la diminution de la consommation de nourriture, sur l'augmentation de la dépense d'énergie, sur le métabolisme du glucose et des lipides et sur les fonctions endocriniennes.

La concentration de la leptine circulante est très associée avec la masse grasse totale et avec l'IMC. Au départ elle a été conçue comme un signal de satiété, une hormone qui semblait informer le cerveau sur l'accumulation de la masse grasse et sur l'équilibre énergétique. La détection des récepteurs de la leptine sur des tissus périphériques a suggéré que cette hormone exerce également ses effets sur le métabolisme par des actions directes sur ces tissus. La leptine agit sur le métabolisme lipidique et du glucose indépendamment des signaux de satiété envoyés au cerveau.

Chez l'homme, le 'pattern' de sécrétion journalière de la leptine est hautement organisé [Sinha et al. 1996]. La marge des taux plasmatiques de la leptine pour les sujets sains est 3-5ng/ml et les concentrations chez les sujets obèses varient entre 8 et 90 ng/ml [Arora 2008].

La leptine a une régulation double dans la physiologie humaine. Pendant les périodes de maintenance du poids, c'est-à-dire quand il y a un équilibre énergétique, les taux de la leptine circulante reflètent la masse grasse totale. Lors d'un déséquilibre énergétique (prise de poids ou perte de poids) les changements dynamiques de la concentration plasmatique de la leptine servent comme un témoin de ce déséquilibre et influencent l'action des voies impliquées dans la régulation énergétique. Les taux élevés de la leptine informent le cerveau d'un excès d'énergie et ce signal conduit à des adaptations au niveau de l'appétit et de la dépense énergétique pour résister au développement de l'obésité. Les effets physiologiques d'une diminution de la concentration de la leptine sont plus importants que ceux d'une augmentation de la leptine.

L'inhibition de la consommation de nourriture par la leptine se produit *via* une voie au niveau du système nerveux qui implique des actions communes de la leptine et de l'insuline. Ainsi, les signaux périphériques de ces deux hormones arrivent dans le cerveau et ceci résulte en une régulation de l'homéostasie du métabolisme et du comportement alimentaire au niveau de l'hypothalamus.

La régulation du comportement alimentaire par la leptine est en synergie avec des peptides qui régulent l'appétit au niveau central. Il existe un équilibre entre les peptides qui augmentent (neuropeptide Y, noradrénaline, orexines...) et qui diminuent l'appétit [sérotonine, 'cocaine- amphetamine-related transcripts (CART)...].

La leptine est également un régulateur endocrinien qui passe par l'axe hypothalamo-pituitaire-thyroïdien. L'état de malnutrition est associé avec une diminution de la leptine et de l'activité de l'axe thyroïdien.

Une augmentation physiologique de la leptine peut diminuer la sécrétion de l'insuline. La leptine inhibe la production d'insuline par le pancréas à des concentrations de l'ordre de 0.01nmol/l. La leptine peut également agir sur la sécrétion de l'insuline *via* le système nerveux central. En revanche, l'insuline augmente la production de la leptine et l'axe leptine-insuline consiste en un réseau de régulation bidirectionnel entre le tissu adipeux et le pancréas. Dans le cas de l'obésité, l'hypérinsulinémie, qui peut précéder l'IR, peut conduire à une augmentation de la production de la leptine. La sensibilité diminuée à la leptine peut entraîner une dérégulation de l'axe entre la leptine et l'insuline, résultant à une augmentation de la production de l'insuline et à une aggravation de l'IR.

La leptine et l'insuline, qui sont des signaux de satiété à long terme, peuvent, en synergie avec des signaux à court terme (cholécystokinine), agir pour réussir la régulation énergétique. Ainsi, les signaux à court terme et à long terme interagissent d'une manière orchestrée (au niveau central et périphérique).

La leptine a aussi d'autres actions, dans le métabolisme lipidique des muscles et du foie par exemple [Arora 2008].

Récemment, il a été démontré que la leptine joue un rôle au niveau de la reproduction [Power et Schulikn 2008] et, en parlant du système nerveux, elle est impliquée dans les mécanismes de plasticité des neurones [Valerio et al. 2006].

La leptine agit alors sur plusieurs organes et axes que nous ne détaillerons pas ici.

#### *II.2.1.5 Régulation de la leptine*

L'expression de la leptine par les adipocytes a été corrélée avec le contenu de ces cellules en lipides ainsi qu'avec la taille de l'adipocyte [Maffei et al. 1995]. Cependant, il a été récemment trouvé que l'expression de la leptine dépend également du type de lipides provenant de l'alimentation [Fernandez-Quintela et al. 2007].

Comme énoncé auparavant, un axe existe entre la leptine et l'insuline. L'insuline semble être une hormone qui influence considérablement l'expression de la leptine par le tissu adipeux [Havel 2000]. La réponse de l'insuline à l'augmentation des taux sanguins de glucose et de lipides, suite à une consommation alimentaire, précède les changements des concentrations plasmatiques de la leptine.

Les glucocorticoïdes semblent également stimuler la production de la leptine [Hardie et al. 1996 ; Rentsch et Chiesi 1996]. Cependant, les glucocorticoïdes endogènes n'ont probablement pas une action physiologique sur l'induction de l'expression de la leptine,

puisque, dans des conditions de taux augmentés des glucocorticoïdes (à jeun..), les taux de leptine circulante diminuent [Dubuc et al. 1998].

La différence des taux circulants de la leptine entre les hommes et les femmes suggère que le sexe a un rôle dans la production de la leptine [Saad et al. 1997]. Les femmes ont plus de masse grasse totale que les hommes mais cette caractéristique n'explique pas cette différence puisque pour la même masse grasse totale, la production de la leptine chez les femmes est plus grande que chez les hommes. Il semble que les adipocytes des femmes produisent plus de leptine [Hellstrom et al. 2000 ; Lonnqvist et al. 1997], comparées aux hommes et ceci peut être, au moins partiellement, expliqué par l'implication de la leptine dans les fonctions de reproduction.

Dans le cas de l'obésité, il existe un état inflammatoire au niveau du tissu adipeux et dans l'organisme en général. Différentes cytokines, telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6, participent dans les mécanismes inflammatoires et régulent l'expression de la leptine [Bullo et al. 2003 ; Gil et al. 2007].

#### *II.2.1.6 Résistance à la leptine*

L'obésité représente un état de résistance à la leptine. Les sujets obèses ont une IR avec des taux élevés de leptine et d'insuline. L'échec de la leptine de réussir l'homéostasie métabolique et l'équilibre énergétique, malgré les taux circulants élevés, suppose un état de sensibilité diminuée à la leptine. Cette résistance est considérée comme le résultat de la combinaison d'une résistance au niveau des récepteurs périphériques et d'une capacité diminuée de transport de la leptine dans le cerveau [Arora 2008]. L'hyperleptinémie est souvent considérée comme la conséquence d'une résistance à la leptine, mais quelques études donnent une autre explication [Scarpace et Zhang 2007]. La surexpression chronique de la leptine au niveau du cerveau induit une résistance à la leptine avec des caractéristiques similaires à celles associées avec l'obésité. Ces caractéristiques se résument en la diminution du nombre des récepteurs de la leptine et la diminution des signaux intracellulaires. Ces expériences chez les animaux, suggèrent que l'hyperleptinémie dans le cas de l'obésité, résulte en la résistance à la leptine.

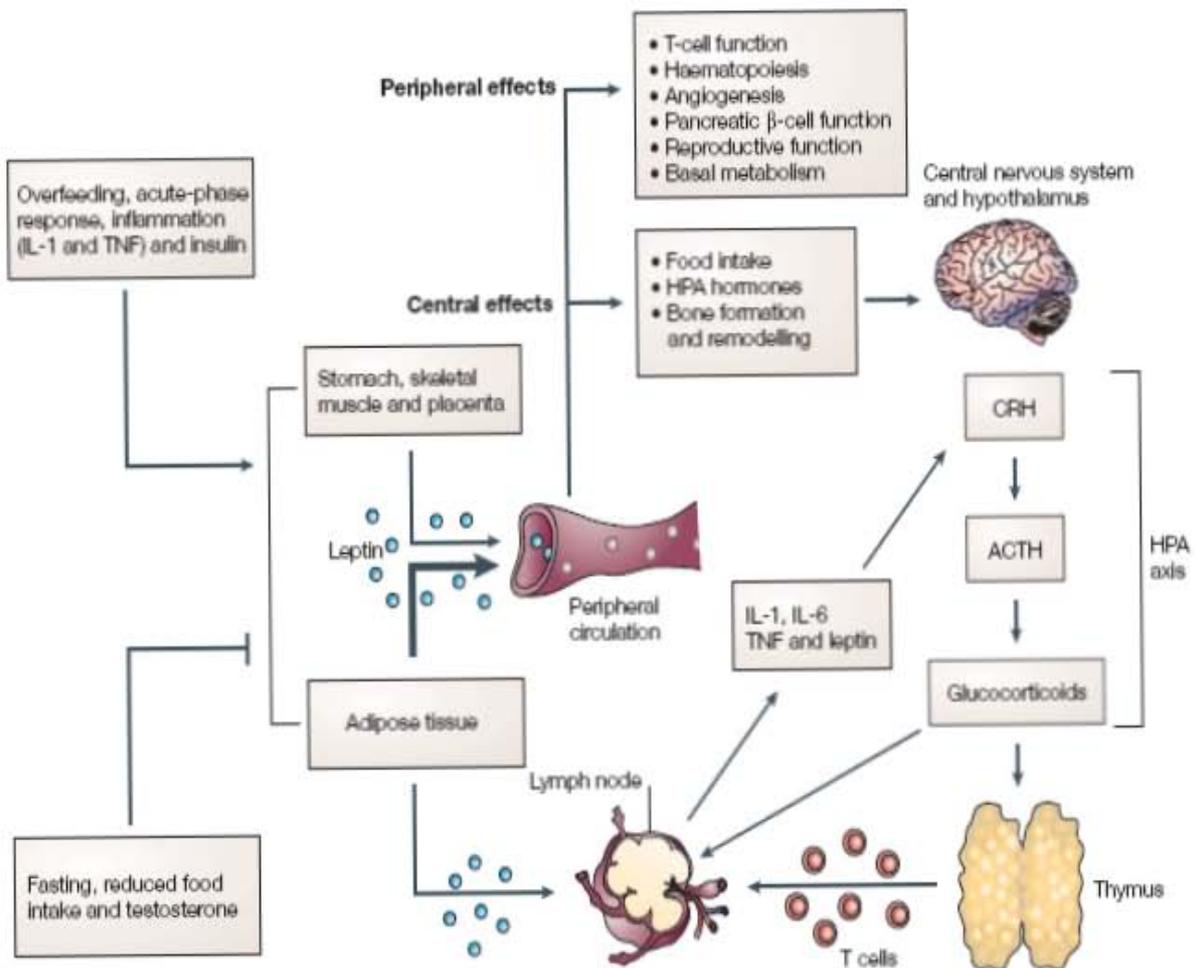
#### *II.2.1.7 Leptine et système immunitaire*

Puisque la leptine possède des récepteurs au niveau des cellules immunitaires, elle a des actions sur ces cellules et par conséquent, elle participe à l'homéostasie du système immunitaire.

Un nombre d'études a constaté les liens entre les systèmes immunitaire et endocrinien [Haddad et al. 2002 ; Turnbull et Rivier 1999]. Les médiateurs entre ces deux systèmes sont des cytokines, telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-1, et des adipokines, telle que la leptine et informent le système nerveux central de l'inflammation périphérique. En plus, comme le tissu adipeux est associé anatomiquement avec des agrégats de cellules lymphoïdes (ganglions lymphatiques, moelle osseuse), il y a un réseau d'interactions locales entre eux et la leptine participe activement dans ce réseau [Matarese et al. 2002]. Par exemple, le TNF- $\alpha$  et les chimiokines favorisent la différenciation des adipocytes et la sécrétion de la leptine et la leptine de son côté favorise la différenciation des lymphocytes T [Bruun et al. 2002 ; Gerhardt et al. 2001]. Le réseau de communication de la leptine avec les systèmes périphérique et central est visualisé sur la Figure 4.

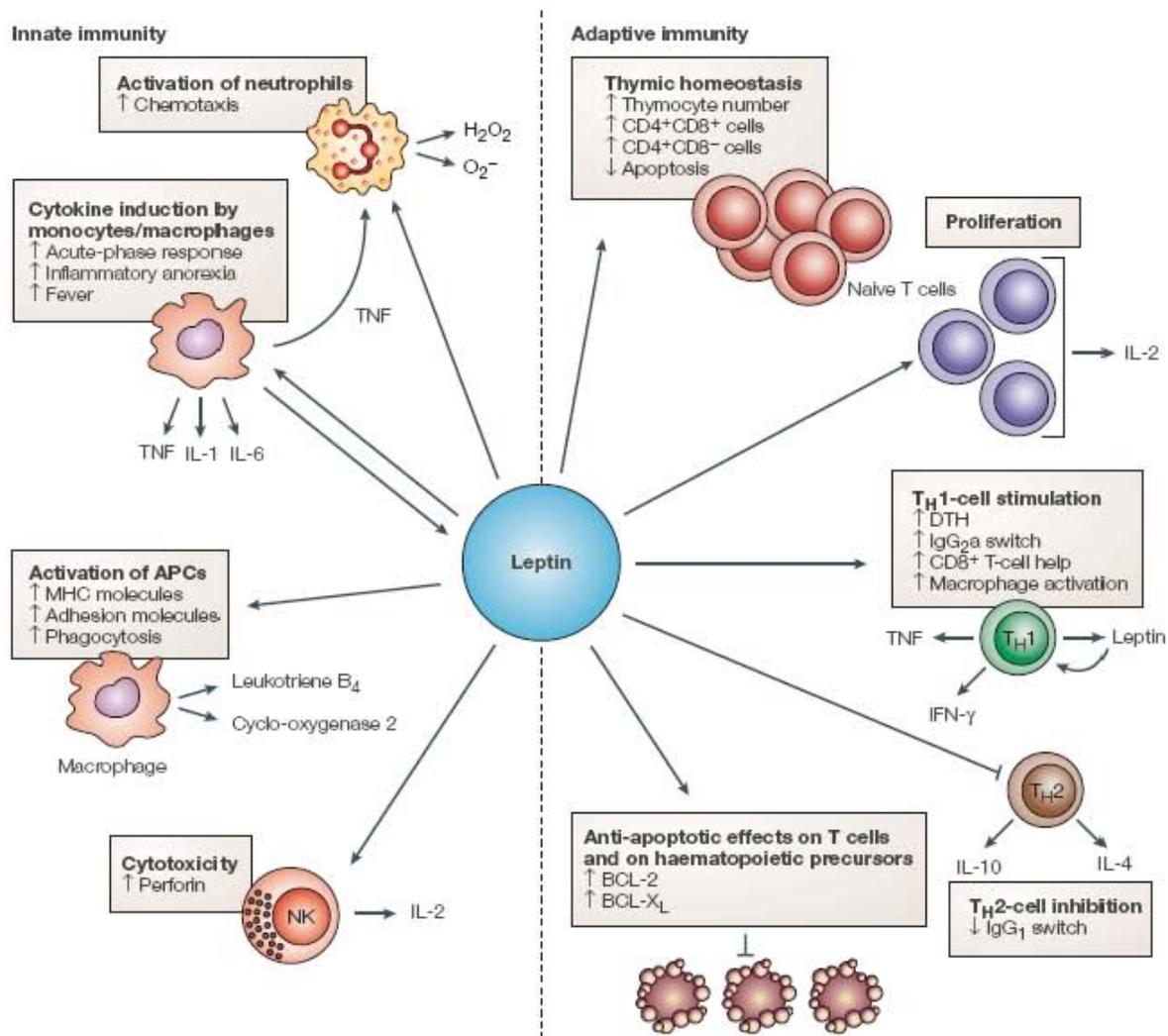
Le fait que les cellules immunitaires aient des récepteurs OB-Rb indique un rôle de la leptine dans l'activation de ces cellules et la transduction des signaux [LaCava et Matarese 2004].

La leptine est impliquée, avec des rôles bien définis, dans le système immunitaire inné et adaptatif (Figure 5).



**Figure 4. Effets neuroendocriniens de la leptine aux niveaux central et périphérique. Adopté par La Cava et Matarese 2004.**

Les systèmes endocrinien et immunitaire communiquent d'une façon bidirectionnelle *via* des ligands et des récepteurs communs. L'axe hypothalamo-pituitaire-adrénergique (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal HPA) est une des structures principales, responsable de cette communication, et de la sécrétion des hormones HPA (corticotrophine-relaisante, CHR, adénocorticotrophine, ACTH, et glucocorticoïdes) pendant les réponses au stress et aux phénomènes immunitaires associés au contrôle de l'inflammation. Des molécules telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  peuvent influencer la sécrétion des hormones HPA. La leptine est une hormone qui elle aussi peut influencer la production des hormones HPA. La leptine qui est principalement produite par le tissu adipeux, et dans une certaine mesure par l'estomac, les muscles et le placenta, est sécrétée dans le sang et passe dans la circulation périphérique. Une fois dans la circulation, la leptine a des actions centrales et périphériques. Au niveau de l'hypothalamus, la leptine régule l'appétit, la masse osseuse et la production des hormones HPA. Au niveau périphérique, la leptine : 1) induit le métabolisme basal, 2) influence la fonction de reproduction, 3) régule la fonction des cellules  $\beta$  du pancréas et la sécrétion de l'insuline, 4) participe à l'angiogénèse, 5) régule le mécanisme hématopoïétique et, 6) influence la génération des cellules T par le thymus et la différenciation des cellules 'T helper 1' ( $T_H1$ ) dans les ganglions lymphatiques. L'insuline, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  stimulent la production de la leptine, alors que la restriction calorique et quelques hormones comme la testostérone, diminuent sa sécrétion.



**Figure 5. Effets de la leptine sur les systèmes immunitaire inné et adaptatif. Adopté par La Cava et Matarese 2004.**

La leptine agit sur le système immunitaire inné et également adaptatif. Au niveau du système inné, la leptine module l'activité des neutrophiles par l'augmentation de chimiotaxie et par la sécrétion des radicaux d'oxygène ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ) via des mécanismes directs et indirects. Chez l'homme, il semble que cette action de la leptine soit médiée par le  $TNF-\alpha$  produit par les monocytes. La leptine augmente la phagocytose par les monocytes/macrophages et induit la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires et l'expression des molécules d'adhésion. La leptine augmente aussi la capacité toxique des cellules 'natural killers' (NK) et la sécrétion de la perforine et de l'IL-2 par ces cellules. Au niveau du système adaptatif, la leptine module la génération, la maturation et la survie des cellules T du thymus, en diminuant leur ratio d'apoptose. Aux cellules T 'naïves', la leptine augmente leur prolifération et la sécrétion d'IL-2. Chez les cellules T 'mémoire', la leptine privilégie la stimulation des cellules  $T_H1$  par l'induction de la production de l'interféron  $\gamma$  ( $IFN-\gamma$ ) et du  $TNF-\alpha$ . Ce processus est maintenu par une voie autocrine où la leptine est produite par les  $T_H1$  et agit sur les  $T_H1$ . Enfin, la leptine a des effets anti-apoptotiques sur les cellules T matures et sur les précurseurs hématopoïétiques.

APC, antigen presenting cell (cellules présentant l'antigène); MHC, major histocompatibility complex (complexe majeur d'histocompatibilité); DTH, delayed-type hypersensitivity (hypersensibilité retardée)

### *II.2.1.8 Leptine et inflammation*

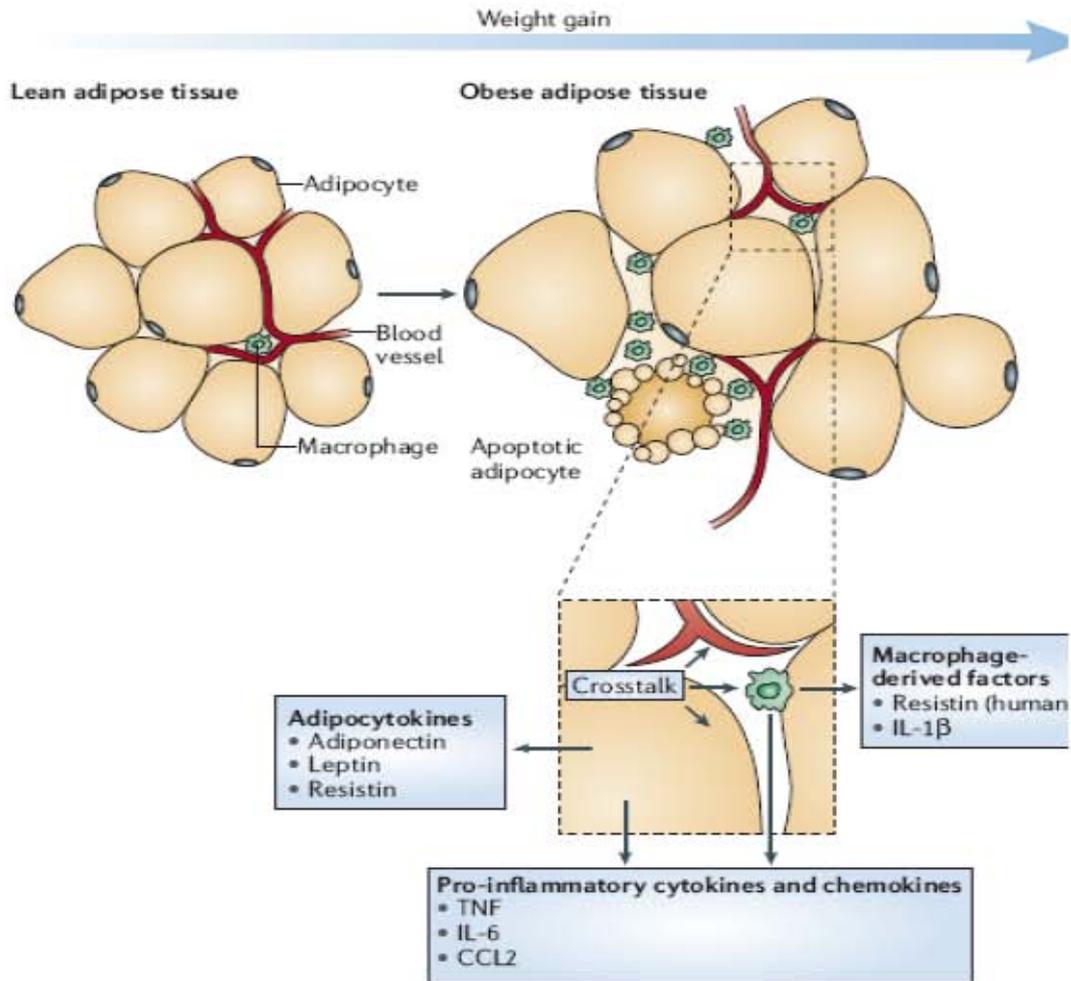
Le tissu adipeux contient, en dehors des adipocytes et des pre-adipocytes, des cellules endothéliales, des fibroblastes, des leucocytes et des macrophages. Les macrophages sont dérivés de la moelle osseuse et leur quantité dans le tissu adipeux, dépend du degré d'obésité. L'obésité est associée à une inflammation chronique de faible niveau qui est caractérisée par une production anormale de cytokines, une augmentation de la CRP circulante, et par l'activation des voies pro-inflammatoires [Wellen et Hotamisligil 2005]. Bien que ces voies pro-inflammatoires soient activées au niveau du tissu adipeux, les connaissances de la contribution des adipocytes comme source de cytokines, adipokines et chimiokines circulantes sont inexacts. A la production de ces molécules par le tissu adipeux contribuent également les macrophages qui sont très nombreux dans ce tissu dans le cas de l'obésité. Les macrophages semblent être la source principale du TNF- $\alpha$ , alors que pour l'IL-6, les adipocytes contribuent à un tiers de sa concentration dans la circulation chez des sujets obèses [Fantuzzi 2005]. Une fois que les macrophages sont présents dans le tissu adipeux, ils perpétuent, avec la participation des adipocytes et d'autres cellules dans le tissu adipeux, leur recrutement et la production des molécules pro-inflammatoires [Tilg et Moschen 2006] (Figure 6).

Ainsi la leptine, par ses actions locales au niveau du tissu adipeux, ses actions au niveau du système nerveux, et au niveau du système immunitaire, contribue d'une manière cruciale dans le processus d'inflammation, mais ses rôles exacts ne sont pas encore bien décrits.

L'inflammation de faible niveau a été également observée dans le cas de l'IR liée à l'obésité [Hotamisligil et al. 1993 ; Wellen et Hotamisligil 2005] et la leptine peut jouer un rôle important dans ce mécanisme, puisqu'elle est très liée avec les voies métaboliques de l'insuline et avec l'IR [Antuna-Puente et al. 2008].

Il existe également quelques études qui suggèrent un rôle de la leptine circulante dans le dysfonctionnement et le remodelage vasculaire, dans le contexte d'inflammation, d'obésité et d'IR [Chudek et Wiecek 2006 ; Cleland et al. 2000 ; Singer et Grandt 2007].

Dans ce chapitre, nous nous sommes focalisés sur la leptine et l'inflammation associée à l'obésité, or la leptine est impliquée dans d'autres états qui sont associés avec l'inflammation, tels que les maladies autoimmunes, le cancer...[Ting et Moschen 2006].



**Figure 6. Tissu adipeux : composants cellulaires et molécules synthétisées. Adopté par Tilg et Moschen 2006.**

L'extension du tissu adipeux dans le cas de prise de poids conduit au recrutement des macrophages *via* plusieurs signaux, qui incluent la production des chimiokines par les adipocytes (par exemple le ligand 2 des CC chimiokines, en anglais CC-chemokine ligand 2, CCL2). Ces macrophages se trouvent autour des adipocytes apoptotiques. Des médiateurs variables provenant des adipocytes et des macrophages pourraient contribuer au développement d'une inflammation locale et systémique. L'ensemble des adipokines-cytokines peut créer un milieu pro-inflammatoire favorable.

#### *II.2.1.9 Implication dans la physiopathologie du SM*

La leptine joue un rôle dans le développement du SM *via* l'obésité. Cependant, comme discuté auparavant, cette hormone a plusieurs rôles physiologiques et ces effets délétères dans le cas du SM, peuvent apparaître avant l'installation d'une obésité aggravée. Ceci dit, elle exerce ses actions, dès le commencement d'une accumulation faible de graisse, c'est-à-dire, dès le début d'un déséquilibre métabolique dans l'organisme. En effet, une étude a démontré que la leptine est associée avec les paramètres du SM, indépendamment de l'obésité [Franks et al. 2005]. Il faut noter quelques études qui ont trouvé une association entre la leptine et l'insuline circulantes chez les hommes, indépendamment de la composition corporelle en

graisse [Valtueña et al. 2005], et une association de la leptine circulante avec l'IR et l'inflammation, indépendamment du tour de taille [Wannamethee et al. 2007]. Une autre étude a suggéré des associations entre des marqueurs métaboliques (leptine) et d'inflammation (CRP), d'une manière dépendante du sexe [Ukkola et Kesaniemi 2007], en suggérant ainsi que les complications métaboliques peuvent différer entre les hommes et les femmes. Pourtant, la seule étude qui a pu démontrer clairement une association de la leptine circulante avec un facteur du SM, l'inflammation (par la mesure des taux circulants de la CRP), indépendamment de la masse grasse et en fonction du sexe, est celle de Abdullah et al. [Abdullah et al. 2006].

Quant aux mécanismes par lesquels la leptine agit sur les facteurs d'une importance majeure dans le SM (IR, hypertension, dyslipidémie et inflammation), il existe quelques données mais nous sommes loin de connaître toutes les actions de la leptine en ce qui concerne le SM. Ainsi, la leptine peut moduler la pression artérielle par ses actions aux niveaux vasculaire et rénal et au niveau du système nerveux sympathique. La leptine peut diminuer la pression artérielle par l'induction de la production de l'oxyde nitrique par l'endothélium vasculaire. Pourtant, cet effet peut être modulé par la présence d'une résistance à la leptine dans le cas de l'obésité. La leptine induit également la production de l'endothéline 1 par les cellules endothéliales des vaisseaux chez l'homme. La leptine induit l'oxydation des acides gras et une action de la leptine altérée peut conduire à l'accumulation des acides gras sur des organes tels que les muscles et le pancréas. Ce dépôt de graisse provoque une apoptose des cellules de ces tissus. La lipotoxicité qui se développe au niveau des muscles et du pancréas entraîne une IR et un dysfonctionnement des cellules  $\beta$  respectivement. La leptine peut également contribuer au développement du SM par des actions prolifératives, pro-inflammatoires, pro-thrombotiques et oxydatives. Les actions prolifératives de la leptine s'effectuent *via* l'activation des facteurs mitogéniques. Cette hormone inhibe l'expression de la thrombomoduline, une protéine anti-thrombotique dans les cellules endothéliales des vaisseaux chez l'homme [Correia et Rahmouni 2006].

Depuis sa découverte, la leptine attire l'attention des scientifiques et semble être une hormone avec des propriétés majeures pour l'organisme à différents niveaux et avec des rôles dans le développement du SM. Malgré l'accumulation des connaissances sur la leptine, il y a encore des pistes de recherche inexploitées et des questions sans réponse.

## *II.2.2 Visfatine*

### *II.2.2.1 Découverte et caractérisation*

L'année de la découverte de la leptine, un autre gène a été caractérisé, le Pre-B-cell Colony-Enhancing Factor (PBEF). La moelle osseuse est le premier site de lymphogenèse des cellules B puisqu'elle fournit un microenvironnement des cellules souches dans lequel les cellules B peuvent se différencier. Plusieurs facteurs induisent la différenciation de ces cellules ; parmi eux l'IL-7 et le facteur des cellules souches (stem cell factor-SCF). Samal et al. ont voulu chercher d'autres facteurs qui participent dans ce mécanisme et ils ont trouvé une nouvelle molécule qui agit en synergie avec l'IL-7 et le SCF. En se basant sur cette fonction, ils ont appelé cette molécule PBEF. Cette molécule était exprimée par les cellules souches de la moelle osseuse et par les lymphocytes activés. Ils ont ainsi caractérisé le gène du PBEF (clonage et séquençage). Le gène se positionne sur le chromosome 7q22.2 et était considéré comme ayant trois transcrits (il a été trouvé ensuite que le PBEF a un seul transcrit). La protéine du PBEF est composée de 473 acides aminés et elle est sécrétée par plusieurs types de tissus : le foie, les muscles, le cœur, le placenta, les poumons, les reins, la moelle osseuse et les lymphocytes activés [Samal et al. 1994].

En 2000, il a été observé que le PBEF était impliqué dans le développement physiologique des membranes fœtales [Nement et al. 2000]. Un an plus tard, cette étude a été confirmée par le fait que le PBEF était exprimé dans les membranes fœtales (expériences sur des lignées cellulaires épithéliales amniotiques) [Orgnjanovic et al. 2001]. Cette même équipe a pu décrire la structure du gène PBEF. Celui-là comprend 11 exons et 10 introns (environ 34 kilobases) et a plusieurs sites de fixation pour des facteurs de transcription (glucocorticoïdes...).

En 2005, Fukurama et al. se sont intéressés à la recherche des adipokines produites préférentiellement par le tissu adipeux viscéral et parmi les transcrits révélés, ils ont identifié le transcrit qui correspondait au PBEF [Fukuhara et al. 2005]. Ils ont ensuite trouvé une association des taux circulants du PBEF avec la quantité de masse grasse viscérale mais pas avec la quantité de masse grasse sous-cutanée. Ils ont ensuite observé que le PBEF avait une fonction biologique concernant le métabolisme du glucose. En effet, ils ont constaté que chez la souris, l'injection de PBEF diminue les taux de glucose plasmatique, en concluant qu'il a des effets similaires à l'insuline. Ils ont ainsi prolongé leurs expériences dans ce sens et ils ont trouvé que le PBEF se fixe sur le récepteur de l'insuline mais active d'autres signaux intracellulaires que l'insuline. Ces résultats ont révolutionné l'opinion sur les rôles et le

fonctionnement de cette molécule. Ils lui ont donné alors, le nom de visfatine en considérant que cette molécule fait partie de la famille des adipokines.

Cette molécule a été alors considérée au départ comme une cytokine (PBEF), et plus tard comme une adipokine (visfatine). Il a été en plus suggéré qu'elle a des activités enzymatiques. Il a été trouvé aussi que cette molécule est un nicotinamide phosphoribosyltransferase, un enzyme impliqué dans la biosynthèse de nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) [Rongvaux et al. 2002 ; Van et al. 2005]. Ainsi, les noms PBEF, visfatine et nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) lui appartiennent mais son nom officiel est NAMPT.

Seulement récemment, sa structure protéique a été caractérisée [Kim MK et al. 2006].

Tandis que la caractérisation et les rôles de la visfatine ont bien évolué, plusieurs éléments, tels que ses caractéristiques moléculaires et chimiques restent à décrire [Korner et al. 2007].

#### *II.2.2.2 Sources de la visfatine*

La visfatine est une molécule ubiquitaire. Samal et al. ont trouvé qu'elle est exprimée par plusieurs organes et Fukurama et al. ont observé qu'elle est également produite par le tissu adipeux. Elle a été aussi trouvée exprimée dans les membranes fœtales. Il a été aussi démontré qu'elle est induite dans les neutrophiles par la cytokine IL-1 $\beta$  et qu'elle fonctionne comme un inhibiteur de l'apoptose de ces cellules à la réponse des *stimuli* inflammatoires [Jia et al. 2004].

#### *II.2.2.3 Régulation de la visfatine*

Quelques études ont examiné la régulation de l'expression de la visfatine. Lorsque Ognjanovic et al. ont étudié l'expression de la visfatine dans des lignées cellulaires épithéliales amniotiques, ils ont trouvé que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , et l'IL-6 augmentent significativement l'expression de la visfatine. Lorsqu'il a été trouvé que la visfatine est exprimée par le tissu adipeux et qu'elle a des effets similaires à l'insuline, une étude sur des adipocytes 3T3-L1, traités avec des hormones qui altèrent la sensibilité à l'insuline, a démontré que l'expression de la visfatine est inhibée par TNF- $\alpha$ , et par l'hormone de croissance et induite par le glucocorticoïde dexaméthasone [Kralisch et al. 2005a] et par l'IL-6 [Kralisch et al. 2005b].

Enfin, il est intéressant de noter que très récemment, une étude sur des cellules du tissu adipeux viscéral, incubées avec le TNF- $\alpha$ , a constaté une augmentation de l'expression de la visfatine [Hector et al. 2007].

#### *II.2.2.4 Visfatine et inflammation*

Comme elle a été au départ considérée comme une cytokine, la recherche pour décrire ses rôles a été essentiellement orientée vers son implication dans le système immunitaire et l'inflammation. Comme déjà dit, cette molécule est exprimée par les leucocytes circulants activés, et par les neutrophiles, où elle joue un rôle protecteur de l'apoptose de ces cellules [Jia et al. 2004] et induit la maturation des lymphocytes B. Il a été suggéré qu'elle puisse être un bio-marqueur pour l'inflammation pulmonaire aiguë [Ye et al. 2005]. Cette molécule semble avoir des propriétés pro-inflammatoires multiples et il est proposé qu'elle soit impliquée dans plusieurs mécanismes de la régulation du système immunitaire [Moschen et al. 2007]. Par exemple, l'incubation des leucocytes humains avec de la visfatine recombinante active ces cellules et induit la production des cytokines. Une revue récente récapitule les travaux de recherche effectués sur la visfatine et ses rôles dans l'inflammation [Luk et al. 2008]. Ils soulignent que des taux élevés de visfatine circulante sont observés dans le cas d'une multitude de maladies inflammatoires. Elle peut induire l'expression du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6 et de l'IL-1 $\beta$ . Il y a une augmentation de sa production dans des maladies inflammatoires aiguës et chroniques, telles que la septicémie, l'arthrose rhumatoïde, l'infarctus du myocarde....

#### *II.2.2.5 Implication de la visfatine dans l'obésité, le SM et le diabète*

Un autre champ de recherche sur la visfatine a commencé d'être exploré depuis la découverte de sa production par le tissu adipeux et la corrélation de ses taux circulants avec la masse grasse. Des études ont été réalisées sur sa relation avec l'adiposité [Berndt et al. 2005 ; Chen et al. 2006 ; Pagano et al. 2006 ; Wang et al. 2007], les tissus adipeux sous-cutané et viscéral [Berndt et al. 2005 ; Pagano et al. 2006 ; Wang et al. 2007], l'IR [Chen et al. 2006 ; Dogru et al. 2007 ; Pagano et al. 2006 ; Wang et al. 2007] et l'inflammation [Manco et al. 2007 ; Varma et al. 2007]. Pourtant, les résultats obtenus sont assez contradictoires. Ceci pourrait éventuellement s'expliquer par le fait que cette molécule soit produite par plusieurs tissus, ce qui signifie que la visfatine circulante n'est pas directement liée avec la quantité de tissu adipeux, puisque celui-ci n'est pas la seule source de la molécule.

D'autre part, toutes les corrélations trouvées entre la visfatine circulante et l'obésité, ainsi que le fait qu'elle se fixe sur le récepteur de l'insuline, qu'elle régule la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$  [Revollo et al. 2007] et que ces taux circulants, comme démontré récemment, sont associés avec la HDL-C [Smith et al. 2006 ; Wang et al. 2007], supportent l'hypothèse

que la visfatine a des propriétés dans l'obésité et les facteurs du SM, même si nous ne savons que très peu de choses sur ses propriétés.

## **CHAPITRE 3 – POPULATIONS ET METHODES**

# **I. Populations**

## **I.1 La cohorte STANISLAS**

### *I.1.1 Description générale*

La cohorte STANISLAS (Suivi Temporaire Annuel Non Invasif de la Santé des Lorrains Assurés Sociaux) est une étude familiale débutée en 1993 au Centre de Médecine Préventive de Vandoeuvre-lès-Nancy avec pour objectif principal de départ, l'étude du rôle et de la contribution de facteurs génétiques et environnementaux sur les facteurs de risque cardiovasculaire [Siest et al. 1998 ; Visvikis-Siest et Siest 2008]. C'est une étude à caractère longitudinal sur dix ans, où des familles de Meurthe-et-Moselle et des Vosges ont été invitées par la Caisse primaire d'assurance maladie à venir passer un examen de santé tous les cinq ans. Lors du recrutement initial ( $t_0$ , 1993-1995), les critères d'inclusion étaient les suivants : familles d'origine française (2 générations nées en France), supposées saines, exemptes de maladies aiguës et /ou chroniques et comprenant deux parents accompagnés d'au moins deux enfants biologiques de plus de 6 ans. Le premier point du recrutement a été composé de 1006 familles (4295 sujets). Lors de la deuxième visite ( $t_1$ , 1998-2000), 75% des familles sont revenues (750 familles). La troisième visite ( $t_2$ , 2003-2005) a vu un retour de 375 familles. Chaque participant ou le parent ou tuteur légal (pour les mineurs) a donné son consentement éclairé pour sa participation, et cette étude a été approuvée par le comité local d'éthique de Nancy.

Le recueil des données est réalisé par un personnel qualifié :

- des médecins cardiologues : échographies cardiaques
- des médecins du Centre de Médecine Préventive (CMP) : établissement du développement pubertaire
- des infirmières du CMP : mesure de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque, du tour de taille, du tour de hanches, de l'épaisseur des plis cutanés, ostéodensitométrie
- des opératrices du CMP : poids, taille, impédance

La collection des données a été réalisée au même centre avec des protocoles et procédures standardisés et contrôlés par un programme de Contrôle Qualité.

### *1.1.2 Questionnaires - Mode de vie*

Certaines données telles que les habitudes de vie sont collectées dans des questionnaires standardisés. Lors de l'examen de santé, il a été proposé aux participants de la cohorte STANISLAS de répondre à différents questionnaires qui varient selon l'âge de l'individu (enfant, adolescent, adulte).

Les questionnaires concernent par exemple les **antécédents cardiovasculaires familiaux** (coronaropathie, obésité, hyperlipidémie, hypertension artérielle, diabète), la **prise de médicaments** (répertoriés par classe médicamenteuse), le système digestif, le système circulatoire, le système respiratoire, l'appareil uro-génital, le système locomoteur, la peau et le système sensoriel ou encore l'équilibre général de l'individu (sommeil, anxiété, nervosité, vie sexuelle, psychisme..). Un questionnaire recense les **loisirs et l'activité physique** du participant. Selon les réponses, il a été établi une activité sédentaire, une activité physique modérée peu exigeante et une activité physique exigeante (codifiés par 1, 2, 3 respectivement). Un autre questionnaire renseigne sur les **boissons consommées** par le participant (quantité et fréquence journalière) : eau, vin, bière et cidre, café et thé, lait, autres boissons non alcoolisées, apéritifs, digestifs. A partir de ces réponses, un logiciel interne au CMP a permis de calculer la quantité d'alcool consommée par jour.

Un autre questionnaire concerne la **consommation de tabac**. Il est demandé au participant s'il est fumeur, ex-fumeur ou non fumeur. Dans le cas des fumeurs et ex-fumeurs, le nombre de cigarettes fumées par jour et le nombre d'années de tabagisme ont été enregistrés.

Concernant les enfants, il existe un questionnaire spécialisé (croissance, poids, taille...).

Pour les questionnaires mentionnés, il s'agit d'auto-questionnaires ou d'interrogations par du personnel qualifié.

### *1.1.3 Données anthropométriques et cliniques*

Différents paramètres ont été mesurés : le poids, la taille, le tour de taille et le tour de hanches. Les individus ont été habillés légèrement et sans chaussures, debout pour les mesures de la taille et du poids. Le **poids** a été enregistré à partir de balances électroniques (avec une précision de 200g). La **taille** a été mesurée avec une précision de 0.1 cm par des toises.

Le **tour de taille** et le **tour de hanches** ont été mesurés avec un mètre-ruban avec une précision de 0.1 cm, le sujet étant en position debout, en expiration douce et légèrement habillé.

A partir de ces paramètres, ont pu être calculés deux indices morphométriques importants : l'**IMC** et le **rapport taille/hanches**. L'IMC est calculé grâce à la formule de Quetelet :

$$\text{IMC} = \text{poids (kg)} / [\text{taille (m)}]^2$$

Pour minimiser les erreurs, toutes les mesures ont été réalisées par des infirmières habilitées et la fiabilité des appareils utilisés pour ces mesures a été périodiquement contrôlée tout au long de la période d'étude.

La mesure de la **pression artérielle** a été faite sur le bras gauche avec un sphygmomanomètre (tensiomètre à mercure) dans des conditions standards, après cinq minutes de repos, en position couchée. La valeur enregistrée a été la moyenne de trois mesures répétées.

En ce qui concerne les adolescents, les médecins ont examiné les différents stades de leur maturation pubertaire selon la classification de Tanner 1962. La puberté a été cotée du stade I (pré-pubère) au stade V (stade adulte). Les stades de Tanner sont donc la somme de deux scores allant chacun de 1 à 5. Pour les filles, les scores sont additionnés pour le développement des seins et de la pilosité pubienne et pour les garçons, pour le développement des organes génitaux externes et de la pilosité pubienne. Dans les deux cas, le score maximum est de 10 et correspond au stade adulte.

#### *1.1.4 Impédance bioélectrique*

La résistance totale du corps a été mesurée (dans une sous-population) à l'aide de l'analyseur d'impédance BIA-101 (RJL Systems, Detroit, MI, USA). Les mesures ont été réalisées à jeun, sans activité physique préalable, après avoir uriné et après une position couchée pendant 10 minutes. Les électrodes ont été placées sur la face externe/dorsale de la main droite et en regard des jonctions metacarpophalangiennes et metatarsophalangiennes. Les mesures ont été réalisées entre 8.00 et 8.30 et entre 12.00 et 12.30 a.m. Toutes les mesures ont été prises en charge par la même personne qualifiée. Les équations établies par Segal et al [Segal et al. 1988] ont été utilisées pour calculer la masse maigre chez les hommes et les femmes. La masse grasse a été estimée par la formule suivante :

$$\text{Masse grasse (kg)} = \text{Poids (kg)} - \text{masse maigre (kg)}$$

#### *1.1.5 Prélèvements sanguins*

##### 1<sup>ière</sup>, 2<sup>ième</sup> et 3<sup>ième</sup> visite

Le prélèvement sanguin a été effectué au niveau d'une veine antécubitale des sujets en position allongée, à jeun depuis 12 heures. Quatre tubes de type Vacutainer® (Becton Dickinson, Grenoble, France) ont été prélevés :

- 1 tube sérum de 5ml (dosages biochimiques de base)
- 1 tube sérum de 10ml (analyses spéciales et biobanques)
- 1 tube EDTA de 5ml (dosages biochimiques de base)
- 1 tube EDTA de 10ml (analyses spéciales, biobanques et ADN)

Les tubes secs, avec gel séparateur de sérum, ont été centrifugés à 1000g pendant 10 minutes à température ambiante. Le sérum, à partir du tube sérum de 10ml a été stocké sous forme de paillettes dans l'azote liquide à -196°C pour des dosages ultérieurs.

Les tubes EDTA ont été centrifugés à 1000g pendant 10min à température ambiante. Le buffy coat (pour l'extraction ultérieure de l'ADN) a été prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur, fractionné en paillettes et congelé à -196°C. Le plasma a été également conservé à -196°C sous forme de paillettes.

### 3<sup>ème</sup> visite

Au 3<sup>ème</sup> recrutement, 3 types de prélèvements supplémentaires ont été effectués :

- 2 tubes EDTA [biobanque ARN des globules blancs mononucléaires (PBMCs-Peripheral Mononuclear Blood Cells)]
- 2 tubes héparinate de sodium (biobanque protéines des PBMCs)
- 1 tube Paxgène (biobanque ARN du sang total)

Les tubes EDTA ont été utilisés pour séparer les PBMCs du sang total par la technique du Ficoll (Ficollpaque<sup>TM</sup> plus, Amersham Biosciences, Orsay, France). Les PBMCs ont été stockés à -80°C dans le tampon de lyse RNA Instapure (Eurogentec, Angers, France) pour l'extraction ultérieure des ARN totaux.

Les tubes héparinate de sodium ont été utilisés pour séparer les PBMCs du sang total par la technique du Ficoll. Les protéines des PBMCs sont extraites et stockées à -80°C.

#### *1.1.6 Dosages biologiques*

Les concentrations sériques du **cholestérol total**, du **glucose**, de l'**acide urique**, des **triglycérides** et l'activité enzymatique de la **GGT**, de la **PAL**, de l'**ASAT** et de l'**ALAT** sont

déterminées enzymatiquement grâce à un automate AU 640 (Olympus Merck, Darmstadt, Allemagne).

La concentration sérique en **HDL-C** a été mesurée sur un automate COBAS-Mira analyser (Roche Diagnostics, Bâle, Suisse) après précipitation des lipoprotéines contenant l'ApoB (chylomicrons, VLDL et LDL) par phosphotungstate et chlorure de magnésium (méthode PTA). Le HDL-C a été mesuré dans le surnageant par la même technique enzymatique que le cholestérol total.

Les concentrations en **LDL-C** ont été calculées à partir de la formule de [Friedewald et al. 1972]. Ce calcul n'est possible que si les triglycérides sont inférieurs à 4g/l et en l'absence de chylomicrons.

Formule de Friedewald :

En g/l  $LDL-C = (\text{cholestérol total}) - (\text{HDL-C}) - TG/5$

En mmol/l  $LDL-C = (\text{cholestérol total}) - (\text{HDL-C}) - TG/2,18$

Les concentrations sériques en **ApoAI**, en **ApoB**, en **haptoglobine**, en **orosomucoïde** et en **CRP** ont été dosées par immunonéphélométrie sur un automate Behring Nephelometer Analyser II ou BNII (Dade Behring, Marburg, Allemagne).

Les concentrations en **ApoCIII** et en **ApoE** ont été mesurées par immunoturbidimétrie sur un automate COBAS-Mira (Roche Diagnostics, Bâle, Suisse).

Les concentrations sériques en **insuline** (mesurées dans une sous-population) ont été dosées grâce à un kit de dosage d'immuno-enzymologie microparticulaire (Microparticular Enzymatic ImmunoAssay ou MEIA) sur un automate IMx (Abbott laboratories, Abbott Park, IL, USA).

Les concentrations plasmatiques de la **leptine** (mesurées dans une sous-population) ont été mesurées par la technique RIA (Linco Research, Saint Charles, MO, USA). Les mesures de la leptine ont été effectuées dans l'équipe INSERM, U695 à Paris, dirigée par le Docteur Fumeron Frédéric.

### *1.1.7 Numération des globules blancs*

Le nombre de globules blancs a été mesuré sur MAXIM Analyseur (Beckman Coulter).

### *1.1.8 Extraction de l'ADN*

L'ADN a été extrait par la méthode de 'salting out' [Miller et al. 1988], à partir du buffy coat congelé à -196°C. Le principe consiste à traiter uniquement le lysat cellulaire, obtenu par

action d'une protéinase (la protéinase K), combinée à celle du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) qui conduisent à la digestion des membranes et des protéines et à l'inactivation des nucléases, puis par une solution saline de NaCl, dont l'objectif est d'éliminer les protéines dégradées par précipitation sélective. L'ADN extrait est ensuite solubilisé dans un tampon TE (Tris-EDTA).

## **I.2 Les sous-populations étudiées de la cohorte STANISLAS**

Les différentes études ont été effectuées sur des sous-échantillons de la cohorte STANISLAS. Dans toutes les études, les individus atteints de maladies aiguës ou chroniques au 2<sup>ième</sup> ou au 3<sup>ième</sup> point du recrutement ont été exclus. En règle générale, les participants sous hypolipémiants, anti-hypertenseurs, anti-inflammatoires ou anti-diabétiques étaient exclus, sauf si le traitement n'avait pas d'influence sur les résultats (afin d'avoir un maximum d'individus). Des critères additionnels d'exclusion ont été ajoutés : maigreur extrême ( $IMC < 17 \text{ kg/m}^2$ ), obésité aggravée (obésité classe III:  $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ) définies par WHO [1995], abus d'alcool (consommation  $\geq 120 \text{ g/jour}$ ), activités des enzymes hépatiques ( $ASAT \geq 120 \text{ U/L}$ ,  $ALAT$  ou  $GGT \geq 200 \text{ U/L}$ ), inflammation aiguë (orosomucoïde  $\geq 2.5 \text{ g/L}$ , haptoglobine  $\geq 3.5 \text{ g/L}$ ,  $CRP \geq 15 \text{ mg/L}$ ), dyslipidémie sévère (cholestérol ou  $TGL \geq 10 \text{ mmol/L}$ ), hyperglycémie ou diabète (glucose  $\geq 8 \text{ mmol/L}$  ou consommation des médicaments anti-diabétiques), hypertension sévère [pression artérielle systolique (PAS)  $\geq 185 \text{ mm Hg}$  ou pression artérielle diastolique (PAD)  $\geq 120 \text{ mm Hg}$ ].

Les caractéristiques des populations étudiées se résument dans les Tableaux 1, 2, 3

## Tableau 1. Résumés des caractéristiques des sous-populations utilisées

<b>Objectifs</b>	Etudier l'influence d'augmentation de l'IMC sur les altérations des facteurs du SM au fil du temps (5 ans)	Etudier les associations éventuelles de la leptine circulante avec les facteurs du SM
<b>Type d'étude</b>	Analyse de données, statistiques, longitudinale	Analyse de données, statistiques, transversale
<b>Population d'origine</b>	Cohorte STANISLAS	Cohorte STANISLAS
<b>Echantillon (s) de la population étudiée</b>	1099 adultes âgés 30-64 ans (544 hommes et 555 femmes)	384 adultes âgés de 30-64 ans (192 hommes et 192 femmes)
<b>Visites</b>	1 <sup>ière</sup> et 2 <sup>ième</sup>	1 <sup>ière</sup>
<b>Critères de sélection de la sous-population</b>	-Non-atteints de maladies chroniques/aiguës -Pas de valeurs extrêmes des facteurs du SM (IMC, pression artérielle, profil lipidique....)	-Non-atteints de maladies chroniques/aiguës -Pas de valeurs extrêmes des facteurs du SM (IMC, pression artérielle, profil lipidique....)
<b>Données cliniques</b>	Sexe, âge, poids, IMC, tour de taille, rapport taille sur hanches, PAS, PAD	Sexe, âge, poids, IMC, masse grasse totale, masse maigre, tour de taille, rapport taille sur hanches, PAS, PAD
<b>Données biologiques</b>	Triglycérides, cholestérol total, HDL-C, ApoB, ApoAI, ApoE, glucose, acide urique, CRP, haptoglobine, orsomucoïde, AST, ALT, GGT, PAL, globules blancs	Leptine, triglycérides, cholestérol total, HDL-C, ApoB, ApoAI, ApoE, glucose, acide urique, CRP, haptoglobine, orsomucoïde, AST, ALT, GGT, globules blancs
<b>Données environnementales</b>	Consommation d'alcool, de tabac, de médicaments et activité physique	Consommation d'alcool et de tabac
<b>No publication</b>	No1	No2

## Tableau 2. Résumés des caractéristiques des sous-populations utilisées (suite)

<b>Objectifs</b>	Etudier le rôle des SNPs rs1421085 et rs17817449 du gène FTO dans l'évolution de l'IMC au fil du temps (5 ans)	Etudier dans les PBMCs l'expression des gènes participants à des voies métaboliques des MCV chez des individus avec ou sans facteurs de risque pour les MCV (obésité, hypertension)
<b>Type d'étude</b>	Génotypages, longitudinale	Transcriptomique (puce 'faite-maison'), transversale
<b>Population d'origine</b>	Cohorte STANISLAS	Cohorte STANISLAS
<b>Echantillon (s) de la population étudiée</b>	391 adultes âgés de 30-64 ans et 430 enfants et adolescents âgés de 5-20 ans	20 adultes âgés de 30-64 ans (11 hommes et 9 femmes)  7 non-hypertendus/non-obèses, 3 hypertendus, 6 obèses et 4 hypertendus/obèses
<b>Visites</b>	1 <sup>ière</sup> et 2 <sup>ième</sup>	3 <sup>ième</sup>
<b>Critères de sélection de la sous-population</b>	-Non-atteints de maladies chroniques/aiguës -Pas d'obésité sévère	-Non-atteints de maladies chroniques/aiguës -Pas de médicaments
<b>Données cliniques</b>	Sexe, âge, poids, IMC	Sexe, âge, taille, poids, IMC, PAS, PAD
<b>Données biologiques</b>	-	Cholestérol total, HDL-C, glucose
<b>Données environnementales</b>	-	Consommation d'alcool et de tabac
<b>No publication</b>	No3	No4

### Tableau 3. Résumés des caractéristiques des sous-populations utilisées (suite)

<b>Objectifs</b>	Etudier dans les PBMCs l'expression de la leptine et ses relations avec les facteurs de risque des MCV tels que la pression artérielle et l'IMC	Etudier dans les PBMCs l'expression de la visfatine et du TNF $\alpha$ et ses relations avec les facteurs de risque des MCV tels que la pression artérielle et l'IMC
<b>Type d'étude</b>	Transcriptomique (RT-PCR quantitative), transversale	Transcriptomique (RT-PCR quantitative), transversale
<b>Population d'origine</b>	Cohorte STANISLAS	Cohorte STANISLAS
<b>Echantillon (s) de la population étudiée</b>	83 adultes âgés de 30-64 ans (42 hommes et 41 femmes)	83 adultes âgés de 30-64 ans (42 hommes et 41 femmes)
<b>Visites</b>	3 <sup>ième</sup>	3 <sup>ième</sup>
<b>Critères de sélection de la sous-population</b>	-Non-atteints de maladies chroniques/aiguës -Pas d'obésité sévère	-Non-atteints de maladies chroniques/aiguës -Pas d'obésité sévère
<b>Données cliniques</b>	Sexe, âge, poids, rapport taille/hanches, IMC, PAS, PAD	Sexe, âge, taille, poids, rapport taille/hanches, IMC, PAS, PAD
<b>Données biologiques</b>	Cholestérol total, HDL-C, LDL-C, triglycérides, glucose, CRP, nombre de globules blancs, nombre de globules rouges, nombre de lymphocytes circulants, lymphocytes %	Cholestérol total, HDL-C, LDL-C, triglycérides, glucose, CRP, nombre de globules blancs, nombre de globules rouges, nombre de lymphocytes circulants, lymphocytes %
<b>Données environnementales</b>	Consommation d'alcool et de tabac	Consommation d'alcool et de tabac
<b>No publication</b>	No5	No6

## II. Méthodes

### II.1 Etudes en transcriptomique

#### II.1.1 Extraction des ARN totaux

Pour les études en transcriptomique, nous avons à notre disposition la banque de PBMCs du 3<sup>ème</sup> point de recrutement de la cohorte STANISLAS. Les échantillons sont conservés à -80°C dans le tampon de lyse Instapure Eurogentec et aliquotés à  $2 \times 10^6$  cellules/ml. L'ARN total est extrait à l'aide de l'automate MagNa Pure (Roche Diagnostics). Cet appareil permet l'extraction automatique des acides nucléiques (32 échantillons/~2h), à partir de cellules du sang, des cellules en culture ou du sang total en utilisant un kit spécifique (MagNA Pure LC RNA Isolation Kit-High Performance). Ce kit peut être utilisé avec 3 protocoles distincts correspondant au matériel biologique utilisé (RNA HP Blood, RNA HP Cells, RNA HP Blood External Lysis). Nous avons utilisé le protocole External Lysis pour extraire les ARN totaux des culots lymphocytaires. Les étapes de cette extraction sont décrites ci-dessous (Figure 7).

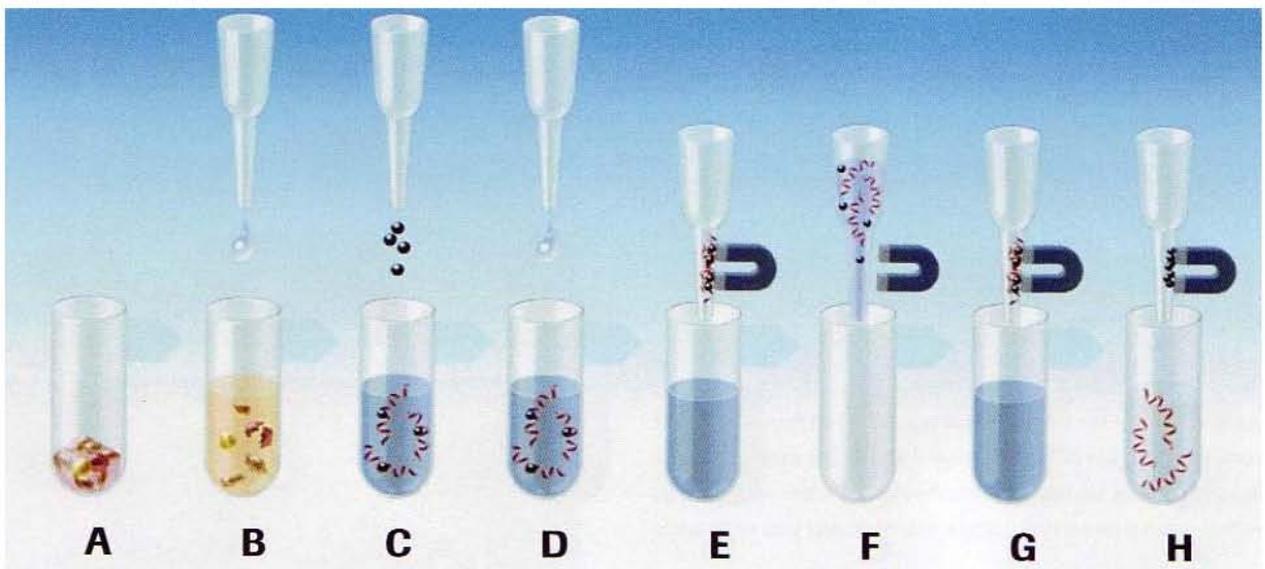


Figure 7. Les étapes de l'extraction de l'ARN

Les échantillons conservés, sont décongelés et la lyse cellulaire est achevée après ajout de tampon de lyse Roche (échantillon 200µl + ajout de 520µl de tampon de lyse) permettant la libération des ARN totaux, tout en protégeant l'ARN de la dégradation par les RNases. Les échantillons sont ensuite déposés dans les puits du support de l'appareil (nous réalisons l'extraction des ARN totaux par 8 échantillons).

- A. La première étape consiste à ajouter le tampon de lyse qui permet la lyse cellulaire. L'ajout de protéinase K digère les protéines cellulaires.
- B. Des billes magnétiques (silice) sont ajoutées dans la solution et l'ARN se fixe à leur surface.
- C. L'étape suivante est l'incubation avec une DNase qui dégrade les ADN contaminants, conduisant à l'obtention d'une solution d'ARN purifié.
- D. Le complexe (ARN et billes) est isolé et séparé de la solution (produits de lyse cellulaire, produits de dégradation protéique, produits de dégradation de l'ADN etc) à l'aide d'un aimant.
- E. Des lavages successifs complètent la purification.
- F. A la fin, le complexe est séparé du tampon de lavage à l'aide de l'aimant.
- G. L'ARN est séparé des billes magnétiques grâce au tampon d'élution (élution dans 100µl).

Pour assurer la meilleure dégradation possible de l'ADN, nous avons doublé la concentration de la DNase.

Ensuite, un dosage à l'aide du spectrophotomètre Specord 205 (Analytic Jena, Wembley, United Kingdom) est réalisé, pour connaître la concentration en ARN totaux de nos échantillons et la qualité des ARN (spectre de l'échantillon et rapport A260/280).

### *II.1.2 Puce faite 'maison'*

La technique 'microarrays' repose sur une technologie de miniaturisation du procédé puisque la matrice est de la taille d'une lame de microscope et peut contenir jusqu'à 100.000 gènes. L'échantillon à étudier est hybridé sur cette matrice. Appliquée à l'ARN, on peut analyser le niveau d'expression de milliers de gènes connus ou non : c'est l'étude du transcriptome. On obtient donc un profil moléculaire d'un état physiologique ou pathologique donné.

L'approche de cette technologie s'effectue selon deux stratégies. La première consiste à utiliser une puce regroupant le plus grand nombre possible de gènes. L'intérêt est de mettre en évidence les gènes suspectés et/ou inconnus impliqués dans une pathologie définie. Or, le coût et la multiplication des résultats à interpréter ont conduit à la création de puces à façon. Cette stratégie a été notre approche.

La réalisation de la puce faite 'maison' a été effectuée par l'industriel MWG (spotting des oligonucléotides). La préparation des échantillons depuis l'extraction jusqu'au dépôt sur la lame a été effectuée au sein de notre laboratoire. La lecture a ensuite été confiée à MWG. Les 5 grandes étapes de préparation sont décrites ci-dessous :

1. Synthèse d'ADN double brin
2. Transcription T7
3. Fragmentation des ARNa-Cy anti-sens
4. Purification des ARNa-Cy anti-sens fragmentés
5. Hybridation sur la puce

La lecture et l'analyse des lames permettra de savoir si certains gènes sont ainsi surexprimés, sous exprimés, ou invariants par rapport au contrôle permettant d'identifier les gènes d'intérêt au niveau des lymphocytes.

Les détails techniques ne sont pas cités ici, car cette expérience ne fait pas partie de cette thèse.

### *II.1.3 RT-PCR quantitative absolue en temps réel*

#### *II.1.3.1 Reverse Transcription (RT)*

La technique de transcription inverse (reverse transcription-RT) est la synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN. La synthèse d'ADNc est catalysée par les transcriptases inverses, des enzymes capables d'utiliser comme matrice l'ARN.

Nous avons choisi le 'QuantiTect®Reverse Transcription Kit' (Qiagen, Courtaboeuf, France). La réaction se fait en deux étapes : élimination de l'ADN génomique et RT. Pour la première étape, l'ARN est mis dans le tampon 'gDNA Wipeout Buffer' pendant 2 minutes à 42°C. Ensuite sont ajoutés : 1) la 'Quantiscript Reverse Transcriptase' (contenant un mélange de deux transcriptases : 'Omniscript' et 'Sensiscript' et un inhibiteur de RNases), 2) le tampon de la transcriptase, 3) le mix de RT (contenant un mélange d'oligo-dT et de 'random primers'). Ce mélange est d'abord incubé pendant 30 minutes à 42°C, puis 3 minutes à 95°C pour dénaturer les enzymes.

#### *II.1.3.2 Préparation de la sous-banque d'ADNc*

Après la RT, les échantillons (200µl) sont purifiés à l'aide du kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) et de la centrifugeuse Eppendorf Centrifuge 5414 D. A la fin de la purification, nous avons un tube d'ADNc de 200µl/individu. L'étape de purification sert à permettre le dosage des ADNc, les amener à une concentration standard et constituer ainsi la sous-banque d'ADNc qui offre l'avantage de quantifier un nombre important de gènes (16 gènes). Après l'obtention des ADNc purifiés, nous homogénéisons le contenu du tube (vortex) et nous prélevons 10µl pour le dosage au spectrophotomètre. La concentration obtenue est ensuite diluée à 5ng/µl (dans le tampon d'élution EB) qui correspond à la concentration standard.

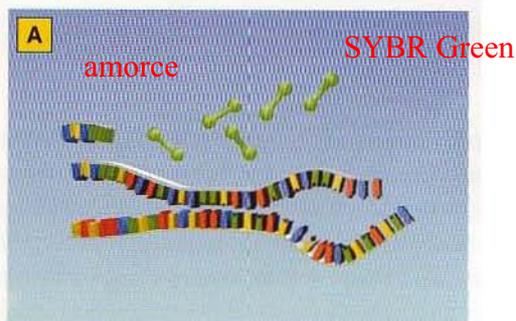
Tous les échantillons sont aliquotés à 12 µl : 5µl/échantillon pour la PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel x 2 (duplicata) + 2µl de marge. Les échantillons d'ADNc sont enfin congelés à -20°C et sont prêts à être utilisés pour quantifier les gènes de nos études.

#### *II.1.3.3 Principe de la quantification absolue*

La réaction d'amplification de la séquence ADNc cible suit les mêmes étapes qu'une PCR classique, c'est-à-dire dénaturation, hybridation, élongation. A la différence d'une PCR classique, la PCR en temps réel utilise une sonde fluorescente qui permet la quantification et la caractérisation de l'amplicon formé en temps réel (Figures 3A, 3B, 3C, 3D). Cette

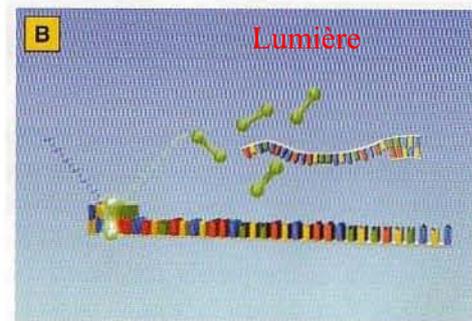
technique permet de faire une quantification relative de gènes d'intérêt dans des échantillons donnés par rapport à un gène de référence non régulé. Il permet aussi de faire une quantification absolue (détermination en nombre de copies) par rapport à une courbe standard. En regard des autres techniques de biologie moléculaire classiquement utilisées pour étudier l'expression des gènes (PCR classique, Northern-Blot), la PCR en temps réel ne nécessite que quelques ng d'ADNc comme matrice. Elle est rapide (~2h30/32 échantillons), sensible, reproductible et la quantification est précise. De plus, les résultats peuvent être visualisés en temps réel pendant la PCR, 32 échantillons peuvent être traités simultanément (dans des capillaires de petit volume) et la courbe de fusion permet de vérifier la pureté de l'amplicon formé et sa spécificité.

Dans notre laboratoire, l'appareil utilisé pour la PCR en temps réel est le Light Cycler (Roche Molecular System). Cet appareil permet l'amplification de 32 échantillons simultanément et utilise comme fluorophore le SYBR Green. A chaque cycle de PCR, chaque capillaire passe devant le système optique et la fluorescence est lue. Le SYBR Green est un fluorophore capable de se lier à l'ADN double brin. En solution, il n'est pas fluorescent lorsqu'il est sous forme libre, alors qu'il émet une fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN. Il est très stable (seulement 6% de son activité est perdue). Le microspectrofluorimètre couplé au thermocycleur permet de lire cette fluorescence (Figure 8).



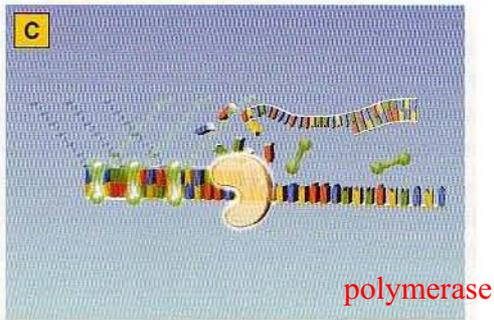
**Figure 8A. Phase de dénaturation.**

Au début de l'amplification, le mélange réactionnel contient de l'ADN dénaturé, les amorces et le fluorophore non lié



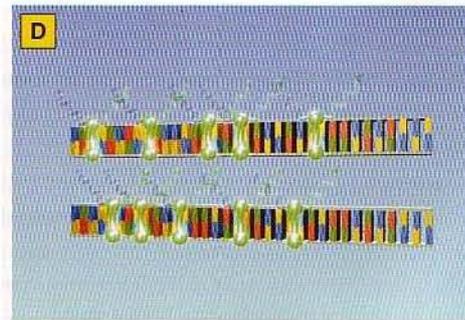
**Figure 8B. Phase d'hybridation.**

Après le couplage des amorces, le fluorophore se lie à l'ADN double brin. La liaison se traduit par une augmentation de la fluorescence



**Figure 8C. Phase d'élongation.**

Pendant l'étape d'élongation, le nombre des molécules de fluorophore lié à l'ADN synthétisé, augmente ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence. La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle.



**Figure 8D. Phase d'élongation finale.**

A la fin de la phase d'élongation, tout l'ADN est sous forme double brin. La quantité maximale de fluorophore est liée à l'ADN

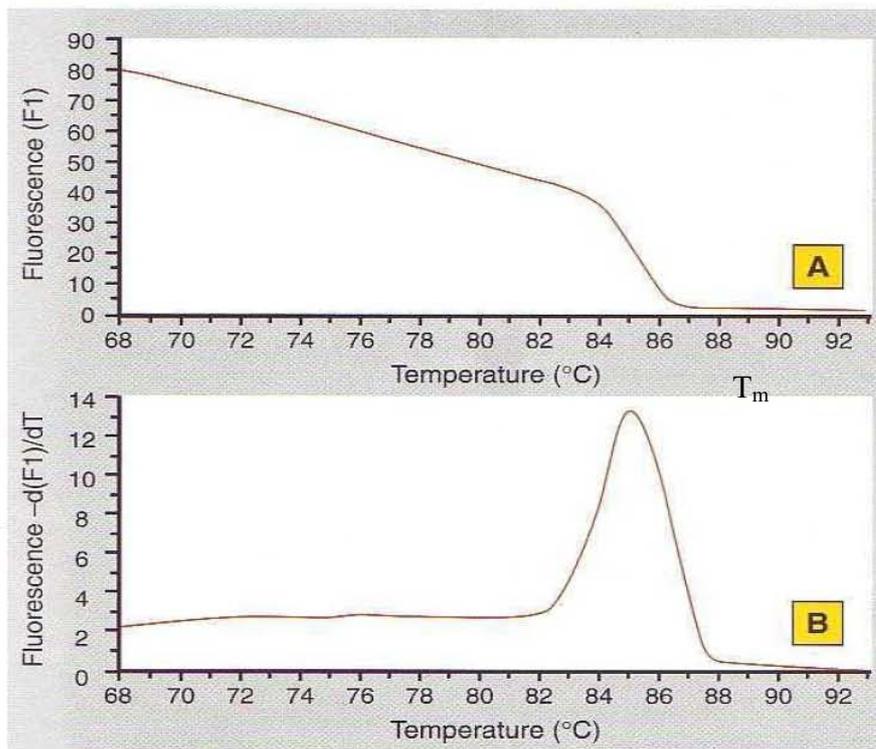
Le kit de choix pour le Light Cycler est le Kit LightCycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I. Le mix contient tous les réactifs principaux d'une PCR classique (dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Taq Polymerase, le tampon de l'enzyme) et le fluorophore SYBR Green. Les paramètres à optimiser pour mettre au point la PCR sont ainsi réduits. Cependant, la phase de préparation du mix doit être faite avec précautions (volumes utilisés très petits, risque de contamination).

Le protocole du mix est défini par le fournisseur en ce qui concerne le volume du MasterMix (4µl) et de l'échantillon d'ADNc (5µl). Le volume final étant 20µl, il reste au manipulateur d'optimiser la quantité d'amorces (volume pour amorce sens, anti-sens).

Chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion (T<sub>m</sub>) spécifique, définie comme étant la température à partir de laquelle 50% de l'ADN est sous forme double brin et 50% sous forme simple brin. Après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95°C pour dénaturer l'ADN double brin, puis elle est abaissée à la température d'hybridation ce qui provoque la reformation d'ADN double brin. La température est ensuite élevée lentement à 95°C. La fluorescence est lue en continu pendant cette remontée en température (Figure 9A) :

- Le SYBR Green est fluorescent tant qu'il est lié à l'ADN double brin

- Quand la température augmente, l'ADN double brin se dissocie, ce qui entraîne la libération du SYBR Green dans le milieu et une diminution progressive de la fluorescence
- Lorsque 50% de l'ADN double brin est dissocié, la fluorescence chute ensuite brutalement par dissociation totale des brins. La température atteinte correspond à la température de fusion du produit synthétisé, ce qui se traduit par un pic spécifique sur l'écran (Figure 9B).



**Figure 9A. Fluorescence en fonction de la température**

**Figure 9B. Courbe de fusion où on observe le pic spécifique qui correspond au  $T_m$  du fragment**

#### II.1.3.4 Choix des amorces

Le choix des amorces est fait à l'aide du logiciel Primer Premier de Biosoft (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Pour cela, il suffit de préciser la séquence d'ADN qu'on veut amplifier. La recherche des amorces peut se faire de manière automatique ou manuelle. Il faut ensuite déterminer les critères souhaités pour les amorces. Pour le choix des amorces destinées à la PCR en temps réel, les caractéristiques principales sont : 1) longueur de 15-30 nucléotides, 2) 40-60% de GC, 3) % de GC proche pour les deux amorces, 4) taille du fragment de 150-300pb, 5)  $T_m$  des amorces proche et 6) des amorces qui ne se trouvent pas à proximité de la queue polyA de l'ARNm (sinon, on a une amplification non-spécifique). Le

logiciel nous renseigne également au niveau des structures secondaires qui peuvent exister pour chaque couple (dimères, épingles à cheveux).

La satisfaction de ces critères facilite la mise au point de la PCR en temps réel.

Les amorces pour plusieurs gènes ont été ainsi choisies, telles que :

Molécules d'inflammation : TNF- $\alpha$ , IL-6

Adipokines : visfatine, leptine

Molécules d'adhésion : ICAM-1

Gènes de ménage : RPL13A, GAPDH

La mise au point d'une PCR en temps réel pour un gène est vérifiée par deux points :

1. Une courbe de fusion avec un pic (qui correspond au  $T_m$  spécifique du fragment)
2. Une seule bande qui correspond au nombre de pb du fragment, après dépôt du produit de PCR sur gel d'agarose à 2%

Les conditions de la PCR optimisées apparaissent dans le Tableau 4 qui suit :

**Tableau 4. Conditions de PCR en temps réel**

Gène	Concentration d'amorces	Amorce	Séquence	Hybridation	Extension	No de cycles
RPL13A	1.25 $\mu$ M	Sens	5' GGTCTGAGCCCAATAAAG 3'	54°C 12 sec	72°C 8 sec	35
		Antisens	5' CACAATTCTCCGAGTGC 3'			
GAPDH	0.5 $\mu$ M	Sens	5' ACGGATTTGGTCGTATTGGG 3'	60°C 5 sec	72°C 9 sec	35
		Antisens	5' CGCTCCTGGAAGATGGTGAT 3'			
ICAM-1	0.5 $\mu$ M	Sens	5' CCCCAGGTATGAGATTG 3'	54°C 5 sec	72°C 15 sec	35
		Antisens	5' TACCCCAGGAGAAGATTCC 3'			
TNF- $\alpha$	0.75 $\mu$ M	Sens	5' TCTACTTTGGGATCATTGCC 3'	60°C 10 sec	72°C 7 sec	40
		Antisens	5' GTGGTGGTCTTGTGCTTA 3'			
IL-6	1 $\mu$ M	Sens	5' TACCCCAGGAGAAGATTCC 3'	60°C 5 sec	72°C 8 sec	40
		Antisens	5' GCCATCTTTGGAAGGTCAG 3'			
LEPTINE	0.5 $\mu$ M	Sens	5' GTGCGGATTCTTGTGG 3'	60°C 10 sec	72°C 6 sec	40
		Antisens	5' GACTTTCTGTTTGGAGGA 3'			
VISFATINE	0.5 $\mu$ M	Sens	5' TGTGGTCAGCGATAGC 3'	62°C 10 sec	72°C 8 sec	40
		Antisens	5' AAGATAAGGTGGCAGC 3'			

Les courbes de fusion pour nos gènes d'intérêt, sont les suivantes (Figures 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, 10F, 10G)

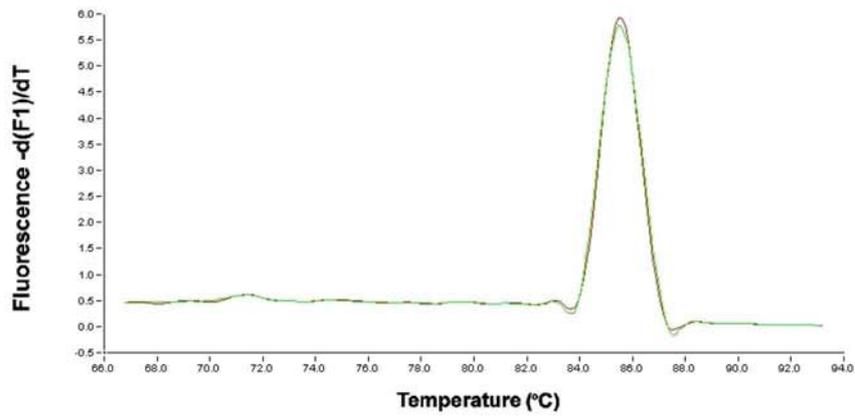


Figure 10A. Mise au point du gène GAPDH.

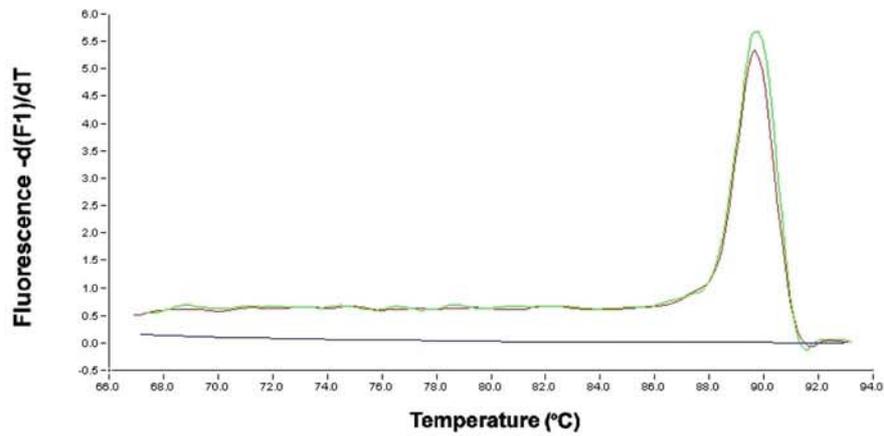


Figure 10B. Mise au point du gène RPL13A.

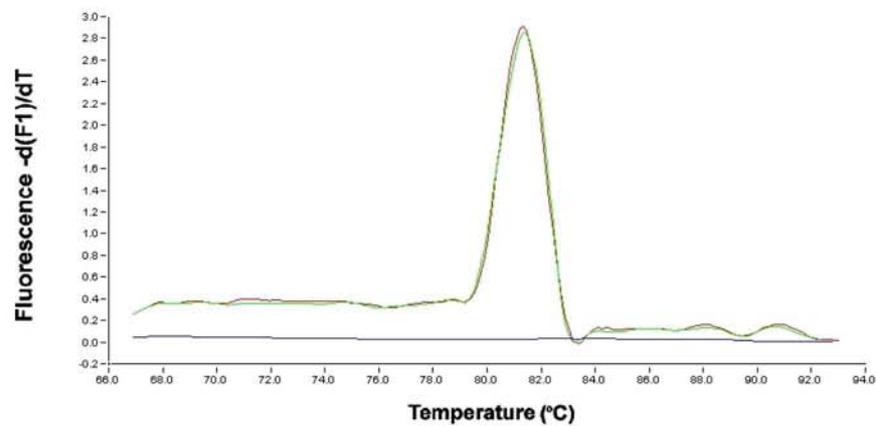


Figure 10C. Mise au point du gène visfatine.

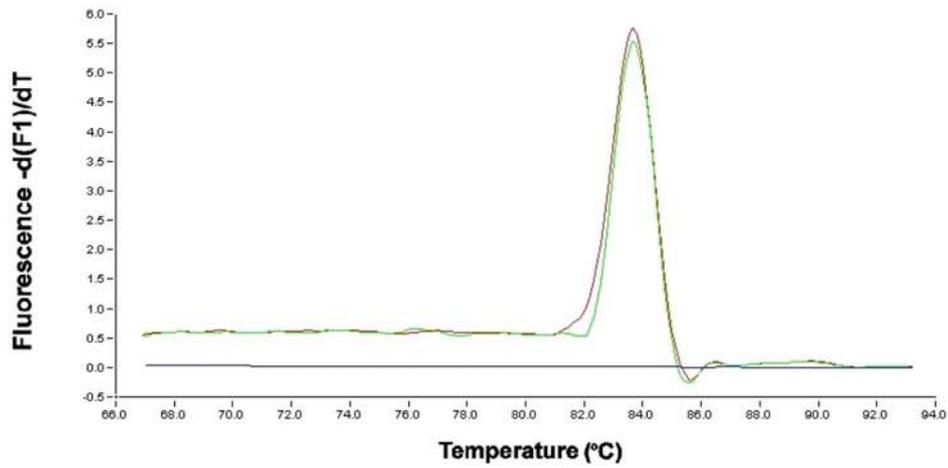


Figure 10D. Mise au point du gène leptine.

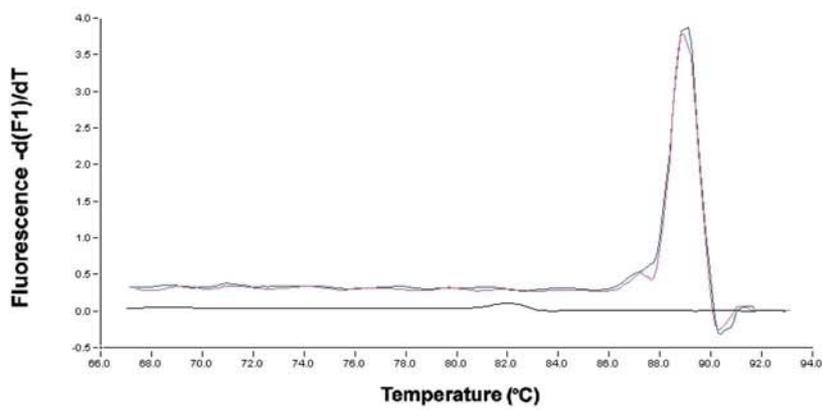


Figure 10E. Mise au point du gène ICAM-1.

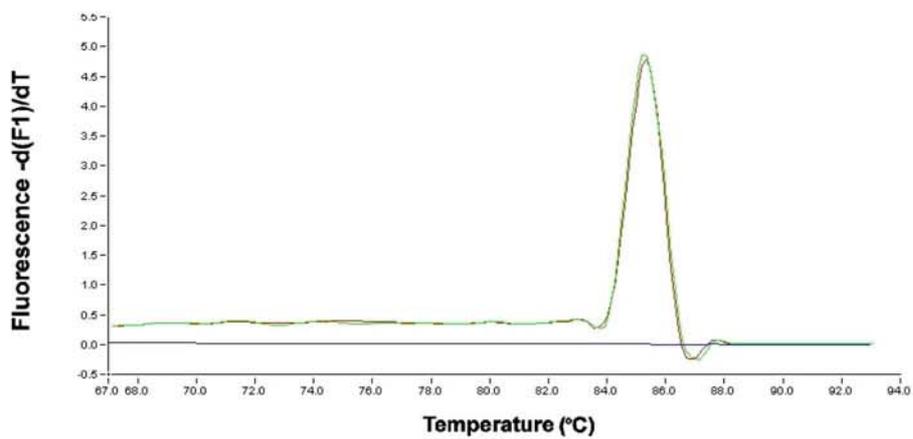
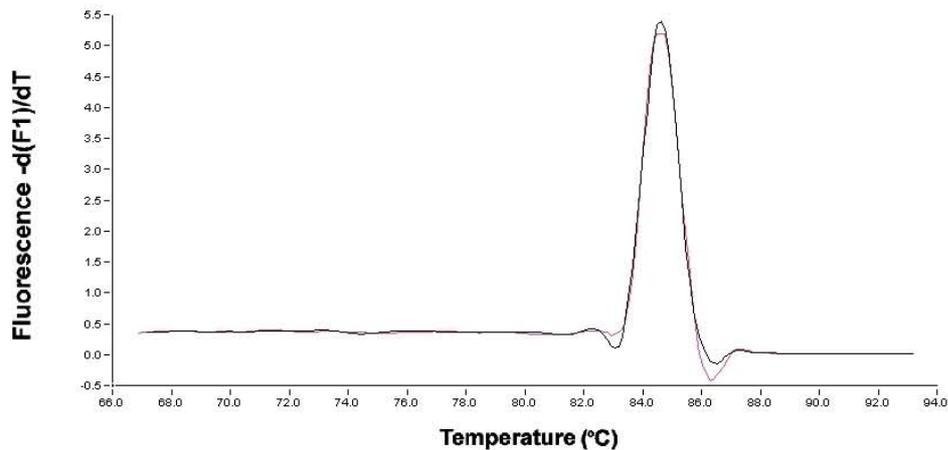


Figure 10F. Mise au point du gène TNF- $\alpha$ .



**Figure 10G. Mise au point du gène IL-6.**

#### *II.1.3.5 Préparation de la gamme étalon*

Une fois la PCR mise au point, nous utilisons un produit de PCR pour la préparation de la gamme étalon pour chaque gène d'intérêt. Ce produit est purifié avec le kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). La quantification des fragments est ensuite faite par spectrophotométrie. La formule pour calculer le nombre de copies dans le tube mère est la suivante :

Nombre de copies par  $\mu\text{l}$  =  $6 \times 10^{23}$  molécules (copies/mol) x concentration (g/ $\mu\text{l}$ ) / masse moléculaire (g/mol)

1 mol =  $6 \times 10^{23}$  molécules (copies)

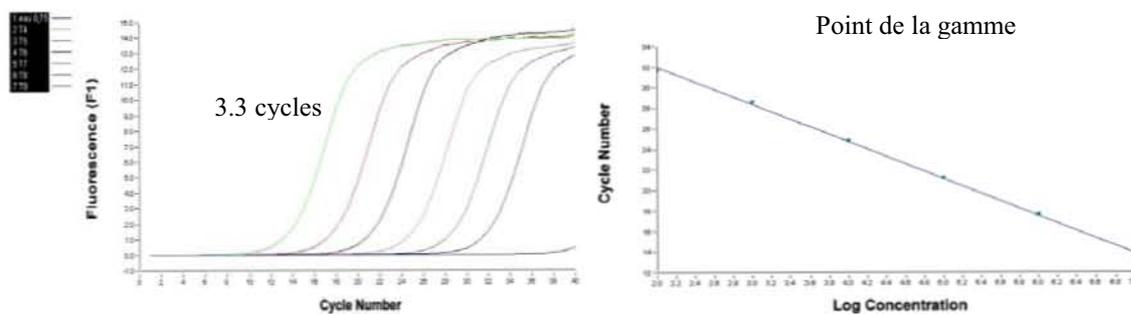
Masse moléculaire (g/mol) = nombre de paire de bases x 660 daltons

1 D.O. = 50ng/ $\mu\text{l}$   $\rightarrow$  multiplier la D.O. de la dilution par le facteur de dilution

Ensuite, nous réalisons des dilutions au  $10^{\text{ième}}$  (chaque dilution au  $10^{\text{ième}}$  correspond à une différence de 3.3 cycles) en cascade dans le tampon d'élution EB du kit de purification, pour constituer la gamme. Pour vérifier la qualité de la gamme, une amplification de chaque point de gamme, par PCR en temps réel, est effectuée (Figure 11A). Idéalement, un intervalle de 3.3 cycles, correspond à une efficacité de PCR de 100%. Plus l'efficacité s'approche 100%, plus nous nous rapprochons d'une quantification fiable du nombre de copies des échantillons de concentration inconnue. L'efficacité est calculée à partir de la pente (Efficacité =  $10^{-1/\text{pente}}$ ), la pente étant calculée par l'appareil. Un autre indicateur, l'erreur, est également estimé par

l'appareil et nous donne une idée de la qualité de la gamme (idéalement, tous les points se trouvent sur la droite, avec une erreur de zéro) (Figure 11B).

Puisque pour la quantification absolue, nous nous basons sur la gamme pour quantifier nos échantillons d'intérêt, il faut également définir la fourchette des dilutions de la gamme étalon, en fonction des taux d'expression de notre gène d'intérêt dans le tissu d'intérêt à étudier (si l'expression d'un gène dans un échantillon dépasse la fourchette de la gamme, nous ne pouvons pas le quantifier). Une fois la qualité de la gamme testée et les points de la gamme à utiliser définis, chaque point de la gamme est aliquoté et congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour être utilisés dans chaque quantification ultérieure.



**Figure 11A. Amplification des points de la gamme**

**Figure 11B. Courbe des points de la gamme**

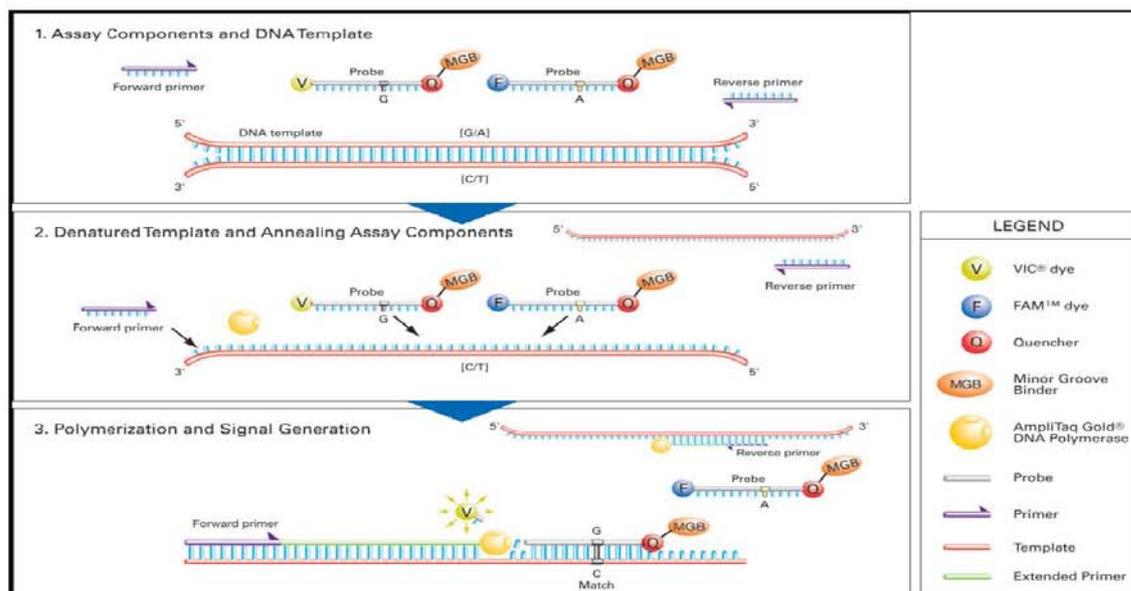
#### *II.1.3.6 Quantification absolue*

L'étape ultime consiste à amplifier simultanément une quantité inconnue d'ADNc du gène d'intérêt avec les différents points de la gamme pour lesquels le nombre de copies est connu. L'appareil calcule ensuite le nombre de copies correspondant au fragment du gène d'intérêt. Chaque échantillon est amplifié en duplicata (pour contrôler les intra-variations, c'est-à-dire, les variations dues aux manipulations) et dans chaque 'run' de PCR, un échantillon de concentration connue est utilisé (pour contrôler les inter-variations, c'est-à-dire, les variations dues à la PCR).

## II.2 Genotypages

Le génotypage des échantillons de la cohorte STANISLAS a été effectué à l'Institut Pasteur de Lille dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe CNRS 8090-Institut de Biologie, dirigée par le Professeur Froguel Philippe. Cette équipe est une plateforme de génotypage, ayant l'équipement nécessaire pour réaliser des manipulations à grande échelle. Les échantillons d'ADN ont été amenés à la concentration de 100ng/μL. Toute la procédure de préparation des échantillons a été prise en charge par l'automate Beckman Biomek NX (Beckman Coulter, Paris, France) et avec des réactifs du kit TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, Calif. USA). Les amorces de PCR ainsi que les sondes TaqMan ont été choisies avec Primer Express et optimisés en fonction du protocole créé par le fabricant. La PCR a été réalisée avec un protocole standardisé. Le protocole a consisté en les étapes suivantes : dénaturation : 95°C pendant 15 sec et hybridation - élongation : 60°C pendant 1.30 minute. La lecture des SNPs a été effectuée par l'instrument '7900HT Fast Real-Time PCR System' (Applied Biosystems, Foster City, Calif. USA).

Les sondes TaqMan® incorporent la molécule 'minor groove binder' (MGB) qui permet l'optimisation de l'étape d'hybridation, en offrant une meilleure stabilité du complexe sonde - ADN. Cette stabilisation permet l'utilisation des sondes d'une petite taille, de l'ordre de 13 bases. Les sondes MGB incluent une molécule 'non fluorescent quencher' (NFQ) qui améliore le ratio signal/bruit de fond et par conséquent, augmente la sensibilité du génotypage (Figure 12).



**Figure 12. Discrimination allélique par hybridation sélective des sondes TaqMan®MGB.**

Globalement, les étapes principales du génotypage sont les suivantes (Figure 13)



**Figure 13. Etapes du génotypage par la technologie TaqMan® SNP Genotyping Assays.**

### III. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SAS version 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Pour l'étude longitudinale, les valeurs sanguines des molécules mesurées, ont été ajustées sur l'effet de la variabilité mensuelle, pour éliminer l'effet des variations saisonnières et analytiques. Pour chaque variable, les taux ont été ajustés sur les moyennes tronquées mensuelles, obtenues par une population sélectionnée d'hommes supposés sains, âgés de 20-40 ans qui a suivi l'examen de santé simultanément à la population incluse dans la cohorte STANISLAS.

Les valeurs des TGL, de la CRP, des enzymes ASAT, ALAT et GGT, l'ApoE, la leptine et la masse grasse ont été transformées en  $\log_{10}$  pour atteindre une distribution normale.

Dans notre étude sur les associations des SNPs du gène FTO avec l'IMC, nous avons utilisé le z-score. La formule utilisée pour calculer le z-score est la suivante :

$$z_{\text{IMC}} = (\text{IMC}/\text{median})^L - 1 / L * \text{écart-type}$$

L étant le coefficient d'aplatissement

La population de référence utilisée est citée dans l'article Rolland-Cachera et al. 1991

Ceci permet de prendre en compte les variations de l'IMC en fonction de l'âge et du sexe.

#### III.1 Etudes individuelles

##### *III.1.1 Etudes d'associations phénotypiques*

###### *III.1.1.1 Tests non paramétriques*

Nous avons appliqué les tests non paramétriques Mann-Whitney et Kruskal-Wallis qui utilisent des valeurs non transformées. Le test Mann-Whitney est appliqué dans le cas d'un effectif relativement faible (par exemple, pour les 82 individus dont nous avons étudié l'expression génique). Le test de Kruskal-Wallis est un test alternatif, pour des variables quantitatives qui n'ont pas une distribution normale (il peut être plus fiable qu'un test paramétrique qui utilise des valeurs transformées).

### *III.1.1.2 Comparaison de moyennes et pourcentages*

Nous avons appliqué les tests paramétriques ANOVA et test de tendance qui utilisent des valeurs transformées. L'ANOVA (Analysis of variance - analyse de variance) examine s'il y a des différences significatives entre deux groupes pour une variable (par exemple l'expression de la visfatine entre les hommes et les femmes ou les différences des paramètres anthropométriques ou des valeurs sanguines des facteurs associés au SM entre les hommes et les femmes). Ce test compare les moyennes de deux ou plusieurs groupes et est utilisé pour des variables quantitatives. Le test de tendance est souvent utilisé pour l'analyse des données catégorisées et teste l'hypothèse qu'il existe un sens dans l'association étudiée, contrairement à un test ANOVA (par exemple les changements de l'IMC en relation avec les altérations des facteurs associés au SM, où nous avons considéré que l'IMC augmente pour tous les groupes d'IMC).

Nous avons également utilisé le test chi-2 qui est appliqué pour des variables qualitatives telles que la prise de médicaments et l'activité physique.

### *III.1.1.3 Coefficient de corrélation et régression multiple*

Pour évaluer les associations entre deux variables ainsi que le sens de l'association, nous avons calculé le coefficient de corrélation de Pearson ( $r$ ) (par exemple entre des variables continues telles que l'âge et le sexe avec l'expression de la leptine et le TNF $\alpha$ ). Ce test, contrairement à ANOVA utilise les valeurs propres des sujets (nuages de points).

Pour évaluer les associations entre deux variables en tenant compte d'une autre variable, nous avons calculé le coefficient de corrélation partielle (par exemple les associations des facteurs associés au SM avec la masse grasse, la leptine ou le rapport taille/hanches chez les hommes et chez les femmes).

Nous avons également appliqué l'analyse de régression multiple. Cette analyse est un type de modélisation, où nous prédéfinissons des variables dépendantes et des variables indépendantes. Dans ce modèle, les variables indépendantes expliquent une part de variance de la variable dépendante [par exemple la part de variance des facteurs associés au SM (variables dépendantes) expliquée par la masse grasse totale, la leptine et le rapport taille/hanches (variables indépendantes)]. Dans ce type de modèle, si les variables dépendantes présentent une forte colinéarité entre elles, le modèle ne peut pas estimer les coefficients de régression correctement. Dans ce cas, ce sont les résidus ajustés qui sont les variables dépendantes. Nous avons suivi cette stratégie dans l'étude des associations de la

leptine circulante avec les facteurs associés au SM. Plus précisément, puisque la leptine et le rapport taille/hanches sont fortement liés à la masse grasse, nous avons calculé les résidus de la leptine et du rapport taille/hanches ajustés sur la masse grasse.

#### *III.1.1.4 Test d'interaction du sexe*

Afin de tester les différences entre les deux sexes, en ce qui concerne les coefficients de régression, un test d'interaction a été utilisé.

#### *III.1.1.5 'Generalized Estimating Equation' (GEE)*

Quant aux études individuelles des sujets d'une cohorte familiale, il y a le risque de surestimation de certaines associations, puisque les sujets sont liés (au niveau génétique et environnement partagé). Ainsi, il faut dissocier les sujets et une bonne stratégie qui est appliquée pour les données corrélées est la 'Generalized Estimating Equation' (GEE). Un exemple sur l'utilisation de cette stratégie est dans l'étude de l'effet des SNPs du gène FTO sur l'IMC. Cette étude a inclus des enfants qui sont éventuellement issus de la même famille et l'application de GEE a permis de dissocier ces enfants.

### *III.1.2 Etudes d'associations génotypiques*

#### *III.1.2.1 Equilibre de Hardy-Weinberg*

Pour chaque étude génétique, le premier test à réaliser est celui de l'équilibre de Hardy Weinberg. L'équilibre de Hardy-Weinberg est le modèle théorique central de la génétique des populations. La notion d'équilibre dans le modèle de Hardy-Weinberg est soumise aux hypothèses/conditions suivantes :

- La population est panmictique [les couples se forment au hasard (panmixie), et leurs gamètes se rencontrent au hasard (pangamie)].
- La population est "infinie" (très grande: pour minimiser les variations d'échantillonnage).
- Il ne doit y avoir ni sélection, ni mutation, ni migration (pas de perte/gain d'allèle).
- Les générations successives sont discrètes (pas de croisement entre générations différentes).

Dans ces conditions, la diversité génétique de la population se maintient et doit tendre vers un équilibre stable de la distribution génotypique.

Pour vérifier si la population est en équilibre de Hardy-Weinberg, il faut calculer les fréquences génotypiques à partir des fréquences alléliques. Ainsi : soient A et a deux allèles d'un même locus, tels que q est la fréquence de l'allèle A et 1-q la fréquence de l'allèle a. Les fréquences des génotypes en équilibre de Hardy Weinberg sont :

$$q^2 = \text{fréquence du génotype AA}$$

$$2q(1-q) = \text{fréquence du génotype Aa}$$

$$(1-q)^2 = \text{fréquence du génotype aa}$$

### III.1.2.2 Déséquilibre de liaison

Si, à une génération donnée, l'association aléatoire des allèles n'est pas réalisée lors de la formation des gamètes, certains haplotypes présenteront des fréquences supérieures, ou inférieures, à celles attendues à l'équilibre. La population n'est donc pas à l'état d'équilibre. Pour l'haplotype A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> on peut alors écrire :

$$X_{11} = x_1y_1 + D,$$

où D est une valeur relative qui représente le déséquilibre d'association gamétique (dit aussi, mais de façon moins correcte, déséquilibre de liaison ou "*linkage disequilibrium*"). Les fréquences des autres haplotypes seront modifiées avec la même valeur absolue. En effet, si la fréquence d'association des allèles est modifiée, les fréquences alléliques, elles, ne le sont pas, car la population est toujours régie par le principe de Hardy-Weinberg. La somme des fréquences des haplotypes A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> et A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> par exemple, qui regroupent tous les allèles A<sub>1</sub>, doit être égale à x<sub>1</sub>. Ceci implique que la fréquence des haplotypes A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> soit :

$$X_{12} = x_1y_2 - D.$$

Dans ces conditions, D est différent de zéro et la population est effectivement en déséquilibre d'association gamétique. Les fréquences gamétiques réelles, fonctions des fréquences à l'équilibre et de D, s'écrivent :

$$X_{11} = x_1y_1 + D$$

$$X_{12} = x_1y_2 - D$$

$$X_{21} = x_2y_1 - D$$

$$X_{22} = x_2y_2 + D$$

L'hypothèse T<sub>0</sub> étant que les deux polymorphismes ne sont pas en déséquilibre de liaison et donc qu'il existe 4 haplotypes possibles (pour les polymorphismes dialléliques) dont les

fréquences théoriques dépendent uniquement des fréquences alléliques des polymorphismes correspondants.

### *III.1.2.3 Modèles génétiques*

En génétique, plusieurs modèles existent concernant l'effet d'un allèle sur un certain phénotype. Chaque modèle émet une hypothèse et globalement, les hypothèses et modèles existants sont les suivants :

- Modèle dominant :  $aa$  vs  $Aa + AA$
- Modèle récessif :  $aa + Aa$  vs  $AA$
- Modèle additif qui attribue : 0, 1, 2  $aa$ ,  $Aa$  et  $AA$  respectivement
- Modèle des comparaisons catégoriques : comparaisons catégoriques de  $aa$  vs  $Aa$  vs  $AA$

$a$  étant l'allèle sauvage et  $A$  l'allèle muté

Ainsi, nous pouvons à l'aide de ces modèles, préciser l'effet génétique sur un phénotype (par exemple le modèle additif pour l'effet des SNPs du gène *FTO* sur l'IMC).

## **III.2 Analyse en composantes principales ('Factor Analysis')**

Cette méthode multifactorielle permet d'obtenir des représentations graphiques qui constituent le meilleur résumé possible de l'information contenue dans un grand tableau de données. La méthode d'analyse en composantes principales (ACP) est une bonne méthode pour étudier les données multidimensionnelles pour voir s'il y a des liens entre les variables qui nous intéressent. Nous avons appliqué cette méthode pour les études où nous avons eu un grand ensemble de variables à étudier ; ceci est le cas des facteurs associés au SM. Cette méthode permet de réduire le nombre de variables au départ, en regroupant ces variables dans des composantes principales (en anglais 'clusters') en fonction des corrélations existant entre ces variables. Ainsi, ils se forment des groupes de variables contenant les variables les plus liées entre elles. Au départ, l'ensemble des variables se présente sur une matrice (matrice des

corrélations). A partir de cette matrice seront créés des nuages (composantes principales) de variables en fonction de leurs corrélations. Cette matrice permet de calculer la proportion de variance partagée entre deux ou plusieurs variables (en anglais 'communality estimates'). Ensuite, les composantes principales sont transformées à l'aide de la rotation 'variance maximizing - varimax' (méthode de rotation orthogonale) pour l'interprétation des composantes principales et pour assurer l'indépendance entre elles. Chaque variable classée dans une composante principale, porte une valeur de 'saturation' (en anglais 'factor loading') qui correspond au coefficient de corrélation de Pearson entre cette variable et la composante principale. La 'valeur propre' (en anglais 'eigenvalue') est la somme des carrés des corrélations entre chaque variable de départ avec le composant principal et représente la proportion de variance expliquée par la composante principale. La part de variance expliquée d'une composante principale consiste en la somme des proportions de variance partagée entre les variables.

Il faut noter que le choix du nombre des composantes principales à retenir pour expliquer la variance totale est arbitraire. Ainsi, comme critère, nous pouvons utiliser la 'valeur propre' supérieure à 1, le pourcentage de variance, le Scree test... Nous avons utilisé le pourcentage de variance totale (environ 100%).

Enfin, le calcul des scores factoriels (en anglais 'factor scores') sert pour les analyses ultérieures concernant les composantes principales et permet de situer la position d'un sujet sur une composante principale. Le score factoriel correspond à la somme pondérée des valeurs des variables pour chaque individu par la 'saturation' de chaque variable. Ce score permet de recalculer les valeurs brutes des variables, après la création des composantes principales.

## **CHAPITRE 4 – RESULTATS ET DISCUSSION**

## **I. Etude des facteurs de risque cardiovasculaire associés au SM dans la cohorte STANISLAS**

L'étude d'individus qui ne sont pas atteints de MCV, de diabète ou d'une obésité sévère, mais qui, pour autant, ont un ou plusieurs facteurs du SM, contrairement aux études cas-contrôles, pourrait apporter de nouvelles connaissances, quant aux sujets en bonne santé relative. En plus, l'étude simultanée d'un panel de facteurs de risques CV classiques et également nouvellement décrits dans la littérature comme étant liés au SM, permettrait de confirmer les études de la littérature et d'approfondir en même temps les facteurs qui sont peu étudiés jusqu'à présent ainsi que de mettre en évidence de nouvelles relations entre eux.

L'intérêt que nous avons porté à l'étude du SM a été facilité par la disponibilité et la nature de données associées à cet état pré-pathologique dans la cohorte STANISLAS.

Nos hypothèses ont pu être justifiées par les résultats fructueux obtenus.

## **I.1 Influence des variations au cours du temps de l'IMC sur les modifications des facteurs du SM (Publication No1).**

### *I.1.1 Pourquoi cette étude ?*

L'obésité a une place centrale dans le développement du SM. Le progrès de la compréhension du SM a pu attribuer une importance, non à l'obésité, mais plutôt à l'adiposité et à l'accumulation et la distribution de la masse grasse [Despres et Lemieux 2006]. Cette distribution est dépendante, au moins partiellement, du sexe. Or, plus l'IMC augmente, plus les hommes et les femmes tendent à avoir la même répartition [Schreiner et al. 1996]. Ainsi, pour l'étude des sujets de poids normal, en surpoids ou ayant une obésité modeste, il faut tenir compte du sexe.

Les individus appartenant à cette fourchette d'IMC ( $17\text{kg/m}^2 \leq \text{IMC} < 40\text{kg/m}^2$ ), ce qui est le cas pour la plupart des individus de la cohorte STANISLAS, peuvent développer une hypertension, un profil lipidique à risque, des taux sanguins de glucose élevés ou une résistance à l'insuline, sans pour autant manifester du diabète ou des MCV. Cependant, ces facteurs constituent les facteurs dits classiques du SM et exposent ces individus à un certain risque accentué. A ces paramètres viennent récemment s'en ajouter de nouveaux, tels que les bio-marqueurs de l'inflammation (le plus étudié étant la CRP), l'acide urique et les enzymes hépatiques.

Bien que ces facteurs aient été étudiés en relation avec l'IMC et avec ses variations [Czernichow et al. 2002 ; Eberle et al. 1991 ; Gossain et al. 1997 ; Hillier et al. 2006 ; Kawamoto et al. 2006 ; Lee et al. 2001a ; Lee et al. 2007 ; Nakanishi et al. 2001 ; Rainwater et al. 2000 ; Reinehr et al. 2005 ; Ridker et al. 2003 ; Sjoström et al. 2001], il n'existe pas d'étude proposant de tenir compte simultanément de l'ensemble de ces paramètres.

Les questions qui se posent dans ce contexte sont les suivantes :

Quelles sont les relations entre les changements au cours du temps des facteurs classiques et nouveaux liés au SM, ainsi que les associations de ces changements avec l'évolution de l'IMC?

Est-ce que ces associations sont différentes entre les hommes et les femmes, non-atteints d'une obésité aggravée ?

Pour répondre précisément à ces questions, il a fallu réaliser une étude longitudinale (intervalle de 5 ans entre le  $t_0$  et le  $t_1$ ), en excluant les individus souffrant d'une obésité sévère (obésité classe III :  $\text{BMI} \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ) et en stratifiant par sexe la population étudiée.

La répartition des caractéristiques et des variables liées au SM au point  $t_0$  de l'échantillon des 1099 sujets adultes, stratifiée par sexe, et par groupe d'évolution d'IMC, est figurée dans l'Annexe 1.

### *1.1.2 Associations entre l'évolution de l'IMC et les facteurs liés au SM*

Le Tableau 5 représente les associations entre les modifications des facteurs du SM et l'évolution de l'IMC. L'évolution de l'IMC a été associée aux changements des autres caractéristiques anthropométriques (poids, rapport tour de taille/hanches, tour de taille) chez les hommes et chez les femmes ( $P \leq 0.001$ ), ainsi que à la consommation de cigarettes (augmentation de l'IMC liée à une diminution de consommation). L'augmentation de l'IMC a été également associée dans les deux sexes à une aggravation des valeurs suivantes : PAS et PAD, taux sériques des TGL, taux du cholestérol total, de l'HDL-C, taux sanguins des Apo B et E, de l'acide urique et de l'orosomucoïde, nombre de globules blancs circulants et activité enzymatique de la GGT. Chez les hommes uniquement, nous avons pu observer une association significative entre l'évolution de l'IMC et les taux sanguins de l'ApoA1 et également l'activité enzymatique des ASAT, ALAT. Chez les femmes par contre, l'évolution de l'IMC a été liée aux modifications de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL, alkaline phosphatase-ALP) et de la concentration sanguine de la CRP et de l'haptoglobine. Les interactions avec le sexe ont été significatives pour les paramètres suivants : TGL, ApoE, haptoglobine, orosomucoïde, ASAT, ALAT, GGT et PAL. Ces résultats montrent des associations entre l'évolution de l'IMC et des variantes liées au SM, en fonction du sexe.

### *1.1.3 Matrice de corrélations entre les changements des variables*

La matrice des corrélations (Annexe 2) présente un ensemble de données toutes comparables entre elles (changements des paramètres du SM, des paramètres anthropométriques IMC, tour de taille, ratio taille/hanches). Nous pouvons constater, des associations positives fortes ( $P \leq 0.001$ ) entre les variations des caractéristiques anthropométriques (IMC, tour de taille, ratio taille/hanches).

### *1.1.4 Analyse en composantes principales*

L'analyse en composantes principales a identifié 5 composantes principales avec une part de variance expliquée  $>10\%$  (40.8%, 21.8%, 19.9%, 13.2%, 11.5%). Ces facteurs regroupent les

variables qui changent de la même manière entre  $t_0$  et  $t_1$ : 1) 'lipides à risque' incluant ApoB, cholestérol total, TGL, acide urique et GGT, 2) 'enzymes hépatiques' incluant ALAT, ASAT et GGT, 3) 'inflammation' incluant orosomucoïde, haptoglobine, CRP, PAL et globules blancs, 4) 'lipides de protection' incluant HDL-C, ApoAI et 5) 'pression artérielle' incluant PAS, PAD et glucose. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 6. Il faut noter que les paramètres anthropométriques, tour de taille et rapport taille/hanches, sont exclus de l'analyse en composantes principales pour des raisons de colinéarité entre elles et avec l'IMC qui pourraient fausser les analyses statistiques.

#### *1.1.5 Associations entre les 5 clusters et l'évolution de l'IMC*

Enfin nous avons analysé les associations éventuelles entre les 5 composantes principales obtenues et l'évolution de l'IMC. Le Tableau 7 montre que l'évolution de l'IMC a été significativement associée ( $P \leq 0.001$ ) avec les composantes principales 'lipides à risque' et 'pression artérielle' chez les hommes et les femmes, avec les composantes principales 'lipides de protection' et 'enzymes hépatiques' ( $P \leq 0.001$ ) chez les hommes seulement et avec 'l'inflammation' ( $P \leq 0.001$ ) exclusivement chez les femmes. Les interactions du sexe ont été significatives pour les composantes principales 'inflammation' et 'enzymes hépatiques' ( $P \leq 0.001$ ).

**Tableau 5. Caractéristiques et facteurs du SM par catégorie d'évolution de l'IMC en 5 ans.**

	Hommes				Femmes				P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>		Interaction Sexe/IMC P <sup>3</sup>
	0 à 1 kg/m <sup>2</sup>		1 à 2 kg/m <sup>2</sup>		0 à 1 kg/m <sup>2</sup>		1 à 2 kg/m <sup>2</sup>					
	<0 kg/m <sup>2</sup> n=121	0 à 1 kg/m <sup>2</sup> n=198	1 à 2 kg/m <sup>2</sup> n=145	>2 kg/m <sup>2</sup> n=80	<0 kg/m <sup>2</sup> n=125	0 à 1 kg/m <sup>2</sup> n=182	1 à 2 kg/m <sup>2</sup> n=123	>2 kg/m <sup>2</sup> n=125				
ΔPoids (kg)	-2.2±2.3	1.4±1.0	4.2±1.2	8.8±3.3	-2.8±3.3	1.2±0.9	3.6±0.9	8.0±3.1	≤0.001	≤0.001	0.636	
ΔIMC (kg/m <sup>2</sup> )	-0.7±0.7	0.5±0.3	1.4±0.3	2.9±1.0	-1.1±1.2	0.5±0.3	1.4±0.3	3.1±1.1	≤0.001	≤0.001	≤0.001	
ΔRapport tour de taille/hanches	0.00±0.04	0.02±0.04	0.03±0.04	0.05±0.05	0.00±0.04	0.02±0.04	0.02±0.04	0.04±0.05	≤0.001	≤0.001	0.047	
ΔTour de taille (cm)	-2.0±3.5	1.3±3.2	4.3±2.9	8.3±4.6	-2.8±3.9	1.4±3.2	2.9±3.1	7.1±4.2	≤0.001	≤0.001	0.175	
ΔConsommation d'alcool (g/jour)	-0.3±17.5	-0.7±17.4	-0.8±14.9	-0.6±16.3	0.3±4.9	0.6±6.5	0.6±6.8	1.8±9.2	0.857	0.119	0.452	
ΔConsommation de cigarettes (cig/jour)	0.9±5.9	-0.1±3.2	-0.2±5.8	-4.0±9.6	0.5±3.2	-0.0±4.1	-0.2±2.8	-1.5±6.8	≤0.001	≤0.001	0.023	
ΔActivité physique (unité arbitraire)	0.0±0.5	-0.1±0.6	-0.1±0.6	-0.2±0.5	0.0±0.5	0.0±0.4	-0.1±0.3	-0.1±0.5	0.076	0.046	0.766	
ΔPAS (mmHg)	-1.5±10.9	0.7±11.7	0.5±10.7	4.6±13.7	-3.4±10.9	0.3±12.5	2.5±12.2	3.8±12.1	≤0.001	≤0.001	0.545	
ΔPAD (mmHg)	-2.6±9.9	0.6±11.3	-2.2±10.2	3.7±12.0	-3.6±10.8	-1.1±11.1	0.8±11.5	2.8±11.1	0.002	≤0.001	0.387	
ΔTGL (mmol/L)	-0.18±0.67	0.01±0.72	0.21±0.77	0.32±1.08	-0.09±0.39	-0.01±0.37	0.04±0.32	0.21±0.52	≤0.001	≤0.001	0.019	
ΔCholestérol (mmol/L)	-0.22±0.91	0.01±0.77	0.19±0.82	0.25±0.81	-0.13±0.74	0.05±0.69	0.15±0.72	0.39±0.80	≤0.001	≤0.001	0.809	
ΔApoB (g/L)	-0.10±0.21	-0.04±0.18	0.01±0.21	0.03±0.19	-0.08±0.15	-0.04±0.15	-0.01±0.17	0.05±0.18	≤0.001	≤0.001	0.537	
ΔApoA1 (g/L)	0.03±0.16	0.01±0.18	-0.03±0.18	-0.03±0.20	0.01±0.22	-0.01±0.22	-0.01±0.22	-0.00±0.27	0.009	0.430	0.208	
ΔHDL-C (mmol/L)	0.07±0.24	0.03±0.25	-0.03±0.28	-0.06±0.28	0.09±0.33	0.05±0.29	0.03±0.30	-0.02±0.37	≤0.001	0.001	0.635	
ΔApoE (mg/L)	-2.1±10.2	0.8±8.3	3.0±10.5	4.7±12.8	1.1±8.8	2.5±8.4	1.9±7.0	3.3±8.3	≤0.001	0.040	0.002	
ΔGlucose (mmol/L)	0.04±0.53	0.18±0.56	0.11±0.63	0.19±0.56	0.06±0.54	0.08±0.52	0.08±0.50	0.20±0.55	0.087	0.265	0.660	
ΔHs-CRP (mg/L)	-0.16±1.59	-0.02±1.87	0.12±1.57	-0.13±1.97	-0.38±1.53	0.09±2.00	0.13±1.83	0.28±2.52	0.237	≤0.001	0.219	
ΔOrosomucoïde (g/L)	-0.03±0.12	-0.00±0.15	0.01±0.15	0.01±0.17	-0.04±0.14	0.03±0.16	0.01±0.14	0.08±0.18	0.013	≤0.001	0.002	
ΔActivité ASAT (U/L)	-1.7±9.6	1.8±9.7	1.3±8.9	4.9±10.1	1.1±8.1	0.1±6.7	1.2±8.4	2.6±7.8	≤0.001	0.237	0.003	
ΔActivité ALAT (U/L)	-7.3±15.9	1.5±14.1	2.7±15.2	13.6±23.0	-0.6±15.7	-0.7±12.3	0.5±17.5	3.6±14.5	≤0.001	0.062	≤0.001	
ΔActivité GGT (U/L)	-2.1±15.8	4.7±16.5	6.3±16.6	16.0±21.6	-0.6±9.3	0.5±6.8	2.2±10.1	6.2±17.6	≤0.001	≤0.001	≤0.001	
ΔActivité PAL (U/L)	0.11±11.0	2.4±10.0	1.6±10.7	2.8±9.4	2.2±9.9	3.4±10.1	6.0±11.3	9.0±12.7	0.088	≤0.001	0.011	
ΔGlobules blancs (10 <sup>9</sup> /L)	-0.16±1.62	-0.09±1.50	0.09±1.53	-0.09±1.75	-0.04±1.60	-0.03±1.63	0.21±1.46	-0.03±1.68	0.021	0.038	0.782	

<sup>1</sup>P valeur pour les hommes et <sup>2</sup>P valeur pour les femmes, différences entre les 4 groups: test de tendance <sup>3</sup>P test d'interaction avec le sexe pour les catégories d'évolution de l'IMC  
Ajustement sur les taux des variables du SM, l'âge, l'IMC, la consommation d'alcool et de cigarettes au point t<sub>0</sub>, et sur les changements de 5 ans de la consommation d'alcool et de cigarettes (les co-variables poids, IMC, tour de taille, alcool, tabac et activité physique ne sont pas ajustés)

**Tableau 6. ‘Saturation’ des changements en 5 ans des variables associées au SM sur les 5 composantes principales chez les hommes et les femmes.**

	Composantes principales				
	Lipides à risque	Enzymes hépatiques	Inflammation	Lipides de protection	Pression artérielle
ΔApoB	0.841				
ΔCholestérol	0.839			0.296	
ΔApoE	0.605				
ΔTGL	0.553			-0.204	
ΔAcide urique	0.275				
ΔActivité ALAT		0.871			
ΔActivité ASAT		0.796			
ΔActivité GGT	0.255	0.546			
ΔOrosomucoïde			0.709		
ΔHaptoglobine			0.705		
ΔHs-CRP			0.531		
ΔActivité PAL			0.392		
ΔGlobules blancs			0.296		
ΔHDL-C				0.759	
ΔApoAI				0.694	
ΔPAD					0.722
ΔPAS					0.709
ΔGlucose					0.239
Variance expliquée (%)	40.8	21.8	19.9	13.2	11.5

Ajustement sur l'âge, le sexe et sur les valeurs au t<sub>0</sub> avant les analyses (rotation ‘varimax’).

Les ‘saturations’ d’une valeur <0.20 ou > - 0.20 ne sont pas présentées

**Tableau 7. Les scores factoriels des 5 composantes principales par catégorie d'évolution de l'IMC sur 5 ans chez les hommes et les femmes.**

Scores factoriels	Hommes					Femmes				Interaction Sexe/IMC <sup>3</sup>	
	0 à 1 kg/m <sup>2</sup>		1 à 2 kg/m <sup>2</sup>		>2 kg/m <sup>2</sup>		P <sup>1</sup>		P <sup>2</sup>		
	n=121	n=198	n=145	n=80	n=125	n=182	n=123	n=125	n=123		n=125
Lipides à risque	-0.37±1.01 <sup>4</sup>	-0.11±0.95	0.20±1.00	0.47±1.17	≤0.001	-0.27±0.73	-0.06±0.65	0.02±0.81	0.34±0.89	≤0.001	0.095
Enzymes hépatiques	-0.44±0.63	-0.03±0.90	0.07±0.86	0.62±1.34	≤0.001	0.01±0.85	-0.10±0.55	0.00±1.06	0.14±0.93	0.207	≤0.001
Inflammation	-0.06±0.74	-0.01±0.90	0.08±0.82	-0.04±0.78	0.242	-0.31±0.66	-0.05±0.85	0.00±0.75	0.39±0.95	≤0.001	≤0.001
Lipides de protection	0.15±0.74	0.07±0.76	-0.13±0.80	-0.18±0.80	≤0.001	0.02±0.87	0.04±0.81	0.03±0.84	-0.11±1.04	0.134	0.070
Pression artérielle	-0.18±0.79	0.01±0.80	-0.07±0.75	0.39±0.85	≤0.001	-0.30±0.74	-0.05±0.74	0.09±0.81	0.29±0.80	≤0.001	0.381

<sup>1</sup>P valeur pour les hommes et <sup>2</sup>P valeur pour les femmes, différences entre les 4 groupes: test de tendance

<sup>3</sup>P test d'interaction avec le sexe pour les catégories d'évolution de l'IMC

<sup>4</sup>Moyennes arithmétiques ± SD

Ajustement sur l'âge, l'IMC, la consommation d'alcool et de cigarettes au point t<sub>0</sub>, et sur les changements en 5 ans de la consommation d'alcool et de cigarettes

### *1.1.6 Points forts de l'étude*

Il est important de souligner trois points qui ont permis d'obtenir des résultats fiables et de répondre avec exactitude à nos objectifs.

Premièrement, le choix de la population et des critères d'exclusion. Tout d'abord, la nature de la cohorte STANISLAS permet une certaine homogénéité de la sous-population à étudier, en terme de maladies (absence de MCV, diabète, cancer) et de provenance des individus (origine française). En plus, nous nous sommes limités à des adultes (30-64 ans), non-affectés d'une obésité sévère ( $IMC \geq 40\text{kg/m}^2$ ) et qui n'avaient pas des valeurs de variables du SM extrêmes : abus d'alcool (consommation  $\geq 120\text{g/jour}$ ), activité des enzymes hépatiques anormale ( $ASAT \geq 120\text{U/L}$ ,  $ALAT$  et  $GGT \geq 200\text{U/L}$ ), dyslipidémie sévère (cholestérol totale ou  $TGL \geq 10\text{mmol/L}$ ), hyperglycémie (glucose  $\geq 8\text{mmol/L}$ ), hypertension sévère ( $PAS \geq 185\text{mmHg}$ ,  $PAD \geq 120\text{mmHg}$ ), inflammation aigue (orosomucoïde  $\geq 2.5\text{g/L}$ , haptoglobine  $\geq 3.5\text{g/L}$ ,  $hs\text{-CRP} \geq 15\text{mg/L}$ ).

Deuxièmement, les ajustements utilisés pour éviter les biais dus aux différences autres que biologiques entre les hommes et les femmes. L'échantillon choisi représente une répartition égale selon le sexe (544 hommes et 555 femmes). La population a été stratifiée par sexe et nous avons testé les interactions du sexe. Pour les associations étudiées, un ajustement sur l'âge, l'IMC, les consommations d'alcool et de cigarettes à  $t_0$  et également sur les changements de consommation d'alcool et de cigarettes a été effectué. Or, cet ajustement ne tient pas compte des différences entre les hommes et les femmes telles que le comportement vis-à-vis de l'alcool (les hommes consomment toujours plus que les femmes) et l'état hormonale (ménopause). Ainsi, nous avons appliqué un autre ajustement pour assurer la fiabilité de nos résultats. En effet, après l'application des critères d'exclusion tels que la consommation d'aspirine, des hypolipémiants, des contraceptifs oraux, la thérapie hormonale, la ménopause et la consommation de tabac ( $>5$  cigarettes/jour), les résultats concernant les 5 clusters n'ont pas été modifiés. En ce qui concerne l'exclusion des individus consommant  $>24\text{g/jour}$  d'alcool, l'association entre l'évolution de l'IMC et les 'lipides de protection' est restée significative ( $P=0.05$ ) et n'a influencé, ni les associations des 4 autres facteurs avec l'évolution de l'IMC, ni la significativité des interactions du sexe.

Enfin, la variabilité analytique à court et long terme a été réduite et/ou prise en compte au mieux avant les analyses statistiques. Les concentrations sériques des variables ont été ajustées quant à l'effet de la variabilité mensuelle pour éliminer l'effet des variations analytiques et saisonnières. Il faut aussi noter que les mesures de tous les paramètres pour les

deux visites ont été réalisées dans le même centre de santé et dans le même laboratoire, avec des procédures standardisées et dans des conditions de Contrôle de Qualité.

#### *1.1.7 Originalité de l'étude*

Cette étude longitudinale a pu contribuer à : 1) la confirmation globale des relations antérieurement décrites par la littérature entre l'évolution de l'IMC et les facteurs liés au SM (pression artérielle, profil lipidique, CRP, les enzymes hépatiques ASAT, ALAT et GGT et l'acide urique) chez les hommes et/ou chez les femmes, grâce au caractère synthétique du design de notre travail, en terme de nombres de composantes principales testés simultanément, 2) l'identification de 5 composantes principales ('lipides à risque', 'enzymes hépatiques', 'inflammation', 'lipides de protection' et 'pression artérielle') basée sur le 'pattern' de changement des variables métaboliques du SM pour éviter le problème soulevé par des comparaisons multiples et 3) la mise en évidence des associations entre les modifications des variables du SM et de l'IMC dépendant du sexe ; associations également observées pour les clusters.

Contrairement aux études utilisant des composantes principales pour contribuer à l'avancement de la recherche sur le SM au niveau diagnostique ou prédictif, nous nous sommes focalisés sur l'impact de l'augmentation de l'IMC sur les variables du SM à court terme.

#### *1.1.8 Associations communes entre les hommes et les femmes*

Un nombre considérable d'études confirme nos résultats concernant les associations communes dans les deux sexes entre l'aggravation de l'obésité et les changements de la pression artérielle et du profil lipidique [Czenichow et al. 2002 ; Eberle et al. 1991 ; Lee et al. 2001b ; Sjostrom et al. 2001 ; Wing et al. 1992], de l'activité enzymatique de l'enzyme GGT [Lee et al. 2001a] et de l'acide urique [Nakanishi et al. 2001]. Pour les taux sanguins de glucose, comme dans notre étude, des travaux antérieurs n'ont pas pu trouver de relation avec l'évolution de l'IMC [Rainwater et al. 2000].

#### *1.1.9 Associations en fonction du sexe*

L'évolution de l'IMC a été préférentiellement associée avec l'enzyme PAL et les marqueurs d'inflammation (CRP, haptoglobine, orosomucoïde et le cluster 'inflammation') chez les femmes, et avec les enzymes hépatiques (ALAT, ASAT et le cluster 'enzymes hépatiques') chez les hommes.

Il a été déjà démontré que l'IMC et l'obésité sont liés à l'inflammation mais peu de connaissances existent sur leurs relations au cours du temps. Pour détailler, une association positive entre la perte de poids et les taux sanguins de la CRP a été démontrée dans une population de femmes [Heilbronn et al. 2001], ainsi qu'une augmentation des taux de CRP avec l'augmentation de l'IMC, toujours chez les femmes [Pieroni et al. 2003]. Il est intéressant de signaler que les associations de l'adiposité avec les concentrations de la CRP sont plus fortes chez les femmes que chez les hommes [Lakoski et al. 2006; Thorand et al. 2006]. Nos résultats suggèrent une augmentation de l'inflammation chez les femmes comparée aux hommes pour les mêmes changements de l'IMC. Ceci propose un impact plus délétère chez les femmes que chez les hommes pour la même prise de poids.

Une explication plausible pourrait être donnée par l'adipokine leptine, molécule non seulement associée à l'obésité mais aux processus inflammatoires [Otero et al. 2006]. En effet, il a été récemment montré que la leptine est associée avec les concentrations de la CRP, indépendamment de l'obésité chez les femmes et pas chez les hommes [Abdullah et al. 2007]. Cette adipokine contribue d'une manière directe ou indirecte à la production de la CRP et par conséquent, les associations des changements de la concentration de la CRP et de l'IMC en fonction du sexe pourraient être dues, au moins partiellement à la leptine.

En revanche, en ce qui concerne les associations entre les changements de l'IMC et les marqueurs d'inflammation, haptoglobine et orosomucoïde, une seule étude a démontré des associations positives [Engstrom et al. 2003b] mais leurs relations avec l'obésité restent à clarifier.

Enfin, la relation de l'aggravation de l'IMC avec les changements de l'enzyme PAL chez les femmes pourrait être expliquée par le fait que les paramètres biochimiques du métabolisme osseux (parmi eux le PAL) sont associés avec les altérations de l'IMC et cette association est influencée par le statut hormonal [Papakitsou et al. 2004].

Au sujet des enzymes hépatiques ALAT, ASAT, GGT, très peu de travaux de recherche se sont focalisés sur les changements de l'ensemble de ces enzymes avec l'évolution de l'IMC. Une étude longitudinale [Lee et al. 2001a] et une transversale [Burns et al. 1996] concernant des populations d'hommes, démontrent des associations confirmant nos résultats. Le point commun de ces études, qui est également partagé par la notre, consiste dans le fait de tenir compte de l'effet de la consommation de l'alcool qui augmente l'activité des enzymes hépatiques dans le sang. Comme constaté dans ces études, l'IMC est le facteur principal pour

les changements de l'activité des enzymes, puisque après ajustement sur la consommation d'alcool, les associations restent significatives.

Les associations spécifiques au sexe que nous avons observées pourraient être essentiellement attribuées aux différences des caractéristiques anatomiques/physiologiques entre les hommes et les femmes. La masse grasse intra-abdominale est étroitement liée au foie au niveau anatomique et physiologique. La contribution de l'adiposité et de l'obésité au développement de la stéatose hépatique non-alcoolique est de plus en plus supportée par des études récentes et cette stéatose est au moins en partie détectée par une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques [Adams et Angulo 2005]. Chez les hommes, la masse grasse intra-abdominale est liée d'une façon non-linéaire avec le poids, l'IMC, et le tour de taille lorsque ces indices sont à des niveaux relativement bas. Cette relation devient linéaire seulement à des niveaux plus élevés d'obésité ou la distribution de la masse grasse est plus uniforme dans le corps. En revanche, chez les femmes, cette relation reste linéaire pour les niveaux normaux et élevés de l'IMC, résultat d'un profil de distribution de la masse grasse généralisée/périphérique [Schreiner et al. 1996]. Ainsi, nous pourrions supposer qu'une prise de poids égale, chez des individus non-atteints d'une obésité sévère, conduit à une accumulation sur des sites différents, de la masse grasse entre les deux sexes. Par conséquent, la tendance à accumuler de la masse grasse sur les sites intra-abdominaux pourrait affecter le métabolisme du foie et l'activité des enzymes hépatiques. Chez les femmes, la tendance à accumuler de la graisse d'une manière plus homogène pourrait entraîner une inflammation généralisée.

#### *1.1.10 Remarques sur les composantes principales*

Comme expliqué auparavant, nous avons regroupé en composantes principales les facteurs du SM qui changent de la même manière au cours du temps et non pas les facteurs qui sont liés entre eux. Il est intéressant de noter que les paramètres du profil lipidique qui sont très souvent associés changent de la même manière et se retrouvent dans la composante principale 'lipides à risque'. Le regroupement dans la même composante principale des marqueurs de l'inflammation et des globules blancs est en accord avec des études qui ont démontré des associations significatives entre eux [Lao et al. 2008]. Le cas de la composante principale 'lipides à risque' qui inclut les variables du profil lipidique, l'acide urique et la GGT est similaire [Onat et al. 2006].

### *1.1.11 Quelques réflexions sur cette étude*

Tout en reconnaissant la valeur des résultats obtenus, nous voudrions commenter une limite toujours rencontrée dans les études longitudinales. Un pourcentage plus ou moins élevé de sujets participant au  $t_0$  n'assiste pas au deuxième point et ceci pourrait conduire à une diminution de la puissance statistique due aux différences des caractéristiques au  $t_0$  entre les individus qui ont participé au deuxième point et ceux qui n'ont pas participé. Les hommes 'en perte de vue' dans notre population avaient des valeurs moyennes plus élevées au premier point comparées à celles des hommes pour lesquels nous avons eu un suivi. Ceci suggère une sous-estimation de l'effet des facteurs du SM. Cependant, l'échantillon que nous avons étudié a été suffisant pour démontrer des associations statistiquement significatives.

En dehors des associations précédemment décrites sur l'évolution de l'IMC et des variables du SM, nous avons pu, dans cette étude, en démontrer de nouvelles, dépendantes du sexe. Les relations entre l'augmentation de l'IMC et les enzymes hépatiques chez les hommes et l'inflammation chez les femmes, sont en plus confirmées par l'analyse en composantes principales. Nos résultats soulignent l'importance du sexe dans les mécanismes biologiques de la pré-pathologie du SM et, les composantes principales décrites offrent une nouvelle optique pour étudier les altérations d'un ensemble de facteurs du SM, entraînées par la prise de poids et essentiellement influencées par le sexe.

## **I.2 Relations de la leptine circulante avec les facteurs du SM en tenant compte des indices classiques de l'obésité (masse grasse, rapport tour de taille/hanches) (Publication No2)**

### *I.2.1 La nécessité de cette étude*

Comme argumenté auparavant, les mêmes changements de l'IMC pour les deux sexes entraînent des altérations de certaines différentes variables du SM, probablement à cause d'une répartition différentielle de la masse grasse entre les hommes et les femmes. La considération d'un effet de cette répartition repose d'une part sur des données épidémiologiques et d'autre part sur des études des mécanismes biologiques. En effet, pour une masse grasse totale donnée, les individus ayant une accumulation sélective au niveau intra-abdominal sont plus exposés au risque de développer un SM [Despres et Lemieux 2006]. Par ailleurs, l'accumulation de graisse au niveau du foie altère le métabolisme des acides gras ainsi que la sécrétion des adipokines [Rector et al. 2008].

La leptine est l'adipokine la plus étudiée en relation avec le SM, mais les relations démontrées concernent plutôt des associations via l'obésité avec le SM. A notre connaissance, il n'existe pas d'étude démontrant une association directe de cette molécule avec le SM (en ajustant sur des marqueurs précis de la masse grasse). Ceci provient du fait que la leptine a une forte colinéarité avec l'IMC et la masse grasse. Or, nous ne savons pas jusqu'à quel degré d'adiposité cette liaison est linéaire et ceci sous-entend que la leptine pourrait avoir un impact sur des mécanismes biologiques, sans nécessairement qu'un individu soit obèse.

Une seule étude très minutieuse [Abdullah et al. 2007] a pu montrer une association entre la leptine circulante et la CRP, association influencée par le sexe et indépendante de l'obésité, en stratifiant la population par sexe et en appliquant plusieurs ajustements sur un nombre d'indices de l'obésité (IMC, masse grasse totale, ratio tour de taille/hanches).

Comme discuté précédemment dans notre étude des changements de l'IMC, et en tenant compte des résultats de cette étude, nous avons formulé l'hypothèse suivante : la leptine pourrait expliquer, au moins partiellement, les associations observées (entre l'adiposité et l'inflammation chez les femmes et entre l'adiposité et les enzymes hépatiques, lipides de protection chez les hommes) en fonction du sexe, au moins en ce qui concerne la CRP et l'inflammation.

La suite logique de ces réflexions a été de se poser cette question :

Est-ce que la leptine pourrait être associée aux autres facteurs liés au SM, indépendamment de l'obésité et en fonction du sexe ?

Pour aboutir à des résultats judicieux, nous avons appliqué une stratégie basée principalement sur le choix d'une population sans sujets atteints de diabète, de MCV ou d'une obésité sévère, qui a été stratifiée par sexe et pour laquelle nous disposons de mesures précises de l'obésité abdominale (ratio tour de taille/hanches) et globale (masse grasse totale).

L'Annexe 3 montre les caractéristiques ainsi que les variables du SM de la population de 384 individus étudiés, stratifiées par sexe. Toutes les caractéristiques étaient disponibles pour le total des 384 individus, à l'exception des mesures de la CRP, l'haptoglobine et l'orosomucoïde (disponibles pour 157 hommes et 157 femmes). Dans notre population, en ce qui concerne les caractéristiques anthropométriques, les hommes avaient des valeurs plus élevées de poids, de masse maigre, d'IMC, de tour de taille, de rapport taille/hanches alors que les femmes avaient des pourcentages de masse grasse plus élevés. En revanche, ils n'avaient pas de différences significatives au niveau de la masse grasse totale. En plus, les hommes consommaient plus d'alcool et de tabac.

#### *1.2.2 Associations entre la masse grasse totale, le rapport taille/hanches et la leptine avec les facteurs du SM chez les hommes et les femmes*

L'Annexe 4 montre les corrélations entre la masse grasse totale, le rapport tour de taille/hanches et la leptine avec les facteurs du SM chez les hommes et les femmes. Les valeurs ont été ajustées sur l'âge et les consommations d'alcool et de tabac. La masse grasse totale est associée avec la plupart des facteurs du SM chez les hommes et les femmes (sauf pour le cholestérol total et les enzymes hépatiques ASAT, GGT chez les femmes).

La leptine a été également associée avec la plupart des facteurs (sauf pour l'ApoAI chez les deux sexes, et la GGT chez les femmes).

Evidemment, les paramètres 'masse grasse totale', 'ratio taille/hanches' et 'leptine' ont une colinéarité très forte. Pour cette raison, nous avons tenu compte de cette colinéarité pour pouvoir décrire les associations de chaque paramètre indépendamment des autres.

#### *1.2.3 Associations de la leptine avec les facteurs du SM, indépendamment de la masse grasse totale et en fonction du sexe.*

Sur le Tableau 8, sont présentées les associations de la leptine et du rapport taille/hanches avec les facteurs du SM, en enlevant l'effet de la masse grasse totale. Ainsi, toutes les associations de la masse grasse totale démontrées à l'annexe 4 restent les mêmes. En revanche, nous observons des associations de la leptine en fonction du sexe. Pour détailler, la

leptine est associée avec les concentrations des TGL, du cholestérol total, de l'ApoB, de l'acide urique et de l'haptoglobine, et l'activité des enzymes hépatiques ASAT, ALAT et GGT seulement chez les hommes et avec les concentrations de l'ApoAI, de l'HDL et de la CRP uniquement chez les femmes. Les interactions du sexe ont été significatives pour les TGL, le cholestérol total, l'ApoB, l'HDL-C, l'acide urique, les enzymes ALAT et GGT et à la limite de la significativité pour l'ApoAI et l'enzyme ASAT.

**Tableau 8. Associations entre les variables associées au SM et la masse grasse totale, la concentration de la leptine circulante, le rapport taille/hanches par analyse de régression multiple dépendantes du sexe.**

	Hommes		Femmes		Interaction sexe <i>P</i>
	<i>P</i>	R <sup>2</sup> Partiel	<i>P</i>	R <sup>2</sup> Partiel	
PAS					
Masse grasse totale	≤0.001	0.106	≤0.001	0.084	0.651
Rapport taille/hanches	0.306	0.005	0.943	0.001	0.526
Concentration leptine	0.502	0.002	0.348	0.004	0.904
PAD					
Masse grasse totale	≤0.001	0.125	0.013	0.030	0.099
Rapport taille/hanches	0.584	0.001	0.973	0.001	0.757
Concentration leptine	0.062	0.016	0.482	0.002	0.373
TGL					
Masse grasse totale	≤0.001	0.140	≤0.001	0.082	0.053
Rapport taille/hanches	0.001	0.045	0.470	0.005	0.051
Concentration leptine	0.002	0.041	0.283	0.006	0.046
Cholestérol					
Masse grasse totale	0.022	0.025	0.056	0.019	0.519
Rapport taille/hanches	0.421	0.003	0.402	0.004	0.278
Concentration leptine	≤0.001	0.073	0.216	0.008	0.013
ApoB					
Masse grasse totale	≤0.001	0.054	0.001	0.054	0.484
Rapport taille/hanches	0.167	0.009	0.230	0.007	0.666
Concentration leptine	≤0.001	0.049	0.469	0.003	0.020
ApoAI					
Masse grasse totale	0.018	0.028	≤0.001	0.075	0.442
Rapport taille/hanches	0.250	0.007	≤0.001	0.062	0.107
Concentration leptine	0.735	0.001	0.007	0.031	0.096
HDL-C					
Masse grasse totale	≤0.001	0.100	≤0.001	0.100	0.674
Rapport taille/hanches	0.020	0.025	≤0.001	0.093	0.252
Concentration leptine	0.400	0.003	0.039	0.017	0.029
Glucose					

Masse grasse totale	0.031	0.023	≤0.001	0.074	0.623
Rapport taille/hanches	0.643	0.001	0.014	0.028	0.184
Concentration leptine	0.163	0.009	0.214	0.007	0.708
Acide urique					
Masse grasse totale	≤0.001	0.270	≤0.001	0.147	≤0.001
Rapport taille/hanches	0.069	0.011	0.881	0.001	0.288
Concentration leptine	≤0.001	0.053	0.888	0.001	≤0.001
Activité ASAT					
Masse grasse totale	≤0.001	0.070	0.067	0.018	0.097
Rapport taille/hanches	0.587	0.001	0.130	0.012	0.122
Concentration leptine	0.004	0.040	0.395	0.004	0.064
Activité ALAT					
Masse grasse totale	≤0.011	0.255	≤0.001	0.079	≤0.001
Rapport taille/hanches	0.007	0.026	0.855	0.001	0.056
Concentration leptine	≤0.001	0.048	0.569	0.002	0.007
Activité GGT					
Masse grasse totale	≤0.001	0.232	0.142	0.011	≤0.001
Rapport taille/hanches	0.002	0.031	0.301	0.005	0.311
Concentration leptine	≤0.001	0.053	0.626	0.001	0.007
Hs-CRP					
Masse grasse totale	≤0.001	0.089	≤0.001	0.139	0.549
Rapport taille/hanches	0.153	0.011	0.028	0.026	0.052
Concentration leptine	0.119	0.013	0.041	0.023	0.429
Haptoglobine					
Masse grasse totale	0.013	0.031	≤0.001	0.066	0.810
Rapport taille/hanches	0.881	0.001	0.051	0.022	0.279
Concentration leptine	0.041	0.020	0.742	0.001	0.265
Orosomucoïde					
Masse grasse totale	≤0.001	0.137	≤0.001	0.222	0.683
Rapport taille/hanches	0.068	0.002	≤0.001	0.069	0.132
Concentration leptine	0.842	0.001	0.350	0.004	0.690

<sup>1</sup>P valeur pour les hommes et <sup>2</sup>P valeur pour les femmes

<sup>3</sup>P test d'interaction avec le sexe

Ajustement sur l'âge, et les consommations d'alcool et de cigarettes

Les valeurs de la leptine et du rapport taille/hanches ont été ajustées sur les valeurs en log10 de la masse grasse totale

Les valeurs pour la masse grasse, la leptine, les TGL, les enzymes ASAT, ALAT, GGT et la Hs-CRP ont été transformées en log10 avant les analyses

Pour la Hs-CRP, l'haptoglobine et l'orosomucoïde, les données sont disponibles pour seulement 157 hommes et 157 femmes

#### *1.2.4 Points forts de l'étude*

Les points forts de notre étude sont les suivants :

- a) la prise en compte d'un nombre considérable de facteurs communs et nouveaux du SM.
- b) l'ajustement des associations de la leptine sur des mesures précises de la masse grasse abdominale (rapport taille/hanches) et totale (masse grasse totale par impédance bioélectrique), en tenant compte de la colinéarité entre eux.
- c) la sélection d'une sous-population, relativement homogène, de sujets supposés sains, sans sujets atteints d'une obésité aggravée, n'ayant pas de différences significatives au niveau de la masse grasse totale entre les deux sexes, avec une consommation d'alcool et de tabac modérée, et sans manifestations biologiques des maladies inflammatoires ou hépatiques.
- d) la stratification des analyses par sexe et l'application d'un test sur la significativité des différences trouvées entre les hommes et les femmes.

#### *1.2.5 Particularité et résultats principaux de l'étude*

Cette étude est la première, à notre connaissance, qui ait regardé les associations de la leptine circulante avec un ensemble de facteurs, dits classiques et nouveaux, du SM, indépendamment de l'adiposité totale et abdominale, et en fonction du sexe, en appliquant un test des interactions en fonction sexe.

Nous avons : 1) confirmé l'association de la leptine avec la CRP démontrée par Abdullah et al [Abdullah et al. 2007], 2) démontré des associations de la leptine avec des facteurs du SM principalement métabolisés par le foie (TGL, cholestérol total, ApoB, acide urique et enzymes hépatiques ASAT, ALAT et GGT) chez les hommes et avec l'inflammation (CRP) chez les femmes et 3) décrit l'absence des relations entre la leptine et la pression artérielle, le glucose et l'orosomucoïde dans les deux sexes.

#### *1.2.6 Comment expliquer les associations trouvées spécifiques au sexe ?*

##### *1) Différences au niveau anatomique, physiologique*

Comme nous l'avons montré dans l'article sur l'évolution de l'IMC, pour une obésité modeste ( $IMC < 40 \text{ kg/m}^2$ ), la masse grasse intra-abdominale est associée d'une façon non-linéaire avec les indices de poids, IMC et tour de taille chez les hommes, contrairement aux femmes chez lesquelles cette association reste toujours linéaire [Schreiner et al. 1996]. Dans notre population, tout individu d'une obésité extrême est exclu et les hommes et les femmes n'ont

pas de différences significatives de masse grasse totale. Dans cette fourchette d'IMC (poids normal à obésité modeste), les hommes ont plus tendance à accumuler de la masse grasse dans la région abdominale, très proche du foie. Ceci n'est pas forcément reflété par les mesures de la masse grasse totale ou du ratio taille/hanches. Cette accumulation de graisse encourage le développement d'une stéatose hépatique. En effet, l'épaississement (dû à l'accumulation) de la masse grasse mésentérique, mesuré avec précision par la technique des ultrasons chez des sujets non-obèses, a été proposé comme un déterminant indépendant de l'IMC pour la stéatose hépatique [Liu et al. 2006]. La stéatose hépatique, présente souvent chez des individus en surpoids ou d'une obésité modeste, conduit à une augmentation modeste des enzymes ASAT, ALAT et dans une moindre mesure de l'enzyme GGT. Cet état physiopathologique influence le métabolisme lipidique et entraîne l'activation d'un certain nombre d'adipokines [Rector et al. 2008]. Par ailleurs, dans une étude composée d'individus avec une marge d'IMC restreinte entre les normaux et les obèses  $<40\text{kg/m}^2$ , une association positive entre la leptine circulante et la stéatose hépatique, a été trouvée chez les hommes et non pas chez les femmes, après ajustement sur la composition corporelle (masse grasse, masse maigre) [Valtuna et al. 2005]. En se basant sur ces données, nous pourrions éventuellement expliquer les associations décrites, de la leptine en fonction du sexe, avec les lipides, les enzymes hépatiques et l'acide urique, après avoir supprimé l'effet de masse grasse totale et du rapport taille/hanches.

Ces associations de la leptine sont encore plus supportées par les données existantes dans la littérature décrivant l'implication de cette adipokine dans le métabolisme du foie. Il a été démontré que la leptine agit sur l'expression des gènes du foie [Barzilai et al. 1997]. En ce qui concerne les lipides chez l'animal, la leptine joue un rôle dans le métabolisme des TGL du foie [Huang et al. 2006] et le 'turnover' de l'apolipoprotéine HDL [Silver et al. 1999]. Chez l'homme, une association a été trouvée entre la leptine et les variables du métabolisme du cholestérol [Hallikainen et al. 2007]. En effet, la leptine réprime le gène codant pour l'enzyme Desaturase-1 Stearoyl-CoA, impliquée dans la synthèse des TGL et des VLDL dans le foie [Cohen et Friedman 2004]. Il a été également montré que l'acide urique est associé avec la leptine, suggérant que cette adipokine pourrait agir directement sur la modulation des taux sanguins de l'acide urique ou inversement que l'acide urique pourrait moduler les taux circulants de la leptine, par des mécanismes non dépendants de l'obésité [Fruehwald-Schultes et al. 1999]. En plus, une autre étude sur des hommes supposés sains a proposé que l'acide urique influence les taux circulants de la leptine indépendamment de l'IMC [Ogura et al. 2000].

### *2) Différences au niveau des adipocytes*

Les cellules adipeuses des régions portale (comparé à la non-portale) et intra-abdominale, des sujets non-obèses, sont plus volumineuses et disposent d'une activité lipolytique plus élevée chez les hommes que chez les femmes [Rebuffe-Scrive et al. 1989]. Les hommes à obésité modeste présentent une activité métabolique plus élevée au niveau des cellules adipeuses et pourraient ainsi avoir une plus grande sensibilité à la production des hormones (comparés aux femmes) telles que la leptine, malgré les taux circulants plus élevés de cette adipokine chez les femmes que chez les hommes [Saad et al. 1997]. En revanche, ces différences entre hommes et femmes sont absentes chez les sujets à obésité sévère [Rebuffe-Scrive et al. 1990]. Les observations décrites auparavant soulignent l'importance de tenir compte du degré d'obésité ainsi que du sexe dans le cas de l'étude de l'obésité en relation avec les dysfonctionnements métaboliques. Ces observations pourraient, au moins partiellement expliquer les associations en fonction du sexe que nous avons trouvées dans notre population avec une marge d'IMC bien définie.

### *3) Différences au niveau hormonal*

Il est déjà établi que le sexe est un facteur majeur pour les taux plasmatiques de la leptine et que les femmes ont des taux plus élevés comparé à ceux des hommes, pour une même quantité de masse grasse totale [Saad et al. 1997]. Les hormones stéroïdes sexuelles ont des effets directs sur les cellules du tissu adipeux : a) *via* leurs récepteurs qui régulent l'expression de certains gènes ; parmi eux la leptine et b) par leur implication dans la prolifération et différenciation des pré-adipocytes. De cette manière, le sexe est un déterminant pour la répartition de la masse grasse chez les hommes et les femmes [Mayes et Watson 2004].

#### *1.2.7 Quelques commentaires*

Les associations que nous avons trouvées entre la leptine et les lipides, les enzymes hépatiques et l'acide urique chez les hommes, ne sont pas dues aux facteurs tels que la consommation de tabac et d'alcool (qui sont plus élevées chez les hommes), car nous avons tenu compte de ces facteurs (ajustement sur alcool et tabac pour les analyses statistiques).

Concernant l'absence de relations de la leptine avec la pression artérielle et le glucose, nous pourrions supposer qu'une association existe seulement dans le cas d'une hypertension sévère ou d'une intolérance au glucose, et non pas dans notre population pour laquelle les valeurs extrêmes de la pression artérielle, ainsi que du glucose circulant ont été exclues.

### *1.2.8 Limite de l'étude*

La limite principale de cette étude consiste dans le nombre limité de sujets dans l'échantillon utilisé (192 dans chaque groupe). Par conséquent, ces résultats doivent être interprétés avec prudence. Cependant, cet effectif permet la détection d'un  $R^2$  de 0.04 ( $R=0.02$ ) avec une puissance statistique de 81% pour un niveau de significativité de 0.05.

En conclusion, nous avons étudié les associations éventuelles de la leptine avec les facteurs liés au SM dans une population supposée saine, sans une obésité extrême et avec une masse grasse similaire pour les deux sexes. D'une part, la leptine a été préférentiellement associée avec des facteurs principalement métabolisés par le foie chez les hommes, suggérant que cette hormone pourrait être impliquée dans la stéatose hépatique non diagnostiquée. D'autre part, la leptine a été associée avec un marqueur d'inflammation, la CRP, chez les femmes. Les résultats observés, soulignent l'importance de cette adipokine dans le métabolisme des facteurs du SM et l'intérêt particulier d'étudier la pré-pathologie du SM en tenant compte du sexe.

## II. FTO, nouveau gène impliqué dans l'obésité

### II.1 Effets des polymorphismes du gène FTO sur les changements de l'IMC chez les enfants dans la Cohorte STANISLAS (Publication No3)

#### II.1.1 *Quelle est l'intérêt de réaliser cette étude ?*

Toujours dans le contexte de l'obésité, un gène très récemment découvert, le FTO, a attiré notre attention. Très peu d'études existent sur ce nouveau gène. Des associations de certains SNPs de FTO avec un IMC élevé ou une obésité ont été mis en évidence chez les enfants et les adultes [Dina et al. 2007; Frayling et al. 2007], ainsi qu'avec les indices de l'obésité (IMC, tour de taille et poids) [Scuteri et al. 2007]. Les SNPs ayant des associations décrites ci-avant sont les suivants : rs9939609, rs9930506, rs17817449 et rs1421085. Ces SNPs sont en déséquilibre de liaison.

Grâce au caractère longitudinal de la cohorte STANISLAS et à une certaine homogénéité provenant de l'absence d'une obésité sévère et des maladies graves, telles que le diabète et les MCV, nous nous sommes intéressés à l'étude de deux SNPs du gène FTO (rs17817449 et rs1421085), en se servant d'un sous-échantillon de cette cohorte.

Jusqu'à présent, les études réalisées en relation avec le FTO sont transversales. Ainsi, nous avons voulu regarder l'effet de ce gène au fil du temps, ainsi que les différences potentielles de cet effet en fonction de l'âge.

Pour cette raison, nous avons étudié deux SNPs du gène FTO en relation avec une prise de poids à court terme, chez des adultes et des enfants.

Le sous-échantillon consiste en 391 adultes (30-54 ans) et en 430 enfants et adolescents (5-20 ans). La fréquence allélique des SNPs rs17817449 et rs1421085 étudiés est 0.421 et 0.412 respectivement.

#### II.1.2 *Associations trouvées chez les enfants et adolescents*

Après ajustement sur l'âge, le sexe et le Z-score de l'IMC au point  $t_0$ , nous avons testé différents modèles (modèle récessif, modèle dominant, modèle de comparaisons catégoriques et modèle additif) le modèle additif étant le plus adapté. Chez les enfants et les adolescents, les valeurs moyennes des changements sur 5 ans du Z-score de l'IMC ont été significativement élevées pour les porteurs de l'allèle 'G' pour le SNP rs17817449 (p pour le modèle additif = 0.049) et pour les porteurs de l'allèle 'C' pour le SNP rs1421085 (p pour le modèle additif = 0.033). Les moyennes $\pm$ SD ont été  $-0.049\pm 0.054$ ,  $0.027\pm 0.041$  et

0.126±0.072 pour les génotypes TT, GT et GG respectivement et l'effet additif estimé a été 0.085 par allèle, pour le SNP rs17817449. Les moyennes±SD ont été -0.050±0.055, 0.020±0.042 et 0.134±0.063 pour les génotypes TT, CT et CC respectivement et l'effet additif estimé a été 0.088 par allèle, pour le SNP rs1421085. En ce qui concerne les adultes, les associations des deux polymorphismes avec les changements sur 5 ans du Z-score de l'IMC n'ont pas été significatives (p = 0.823 et 0.538 respectivement). Tous ces résultats se trouvent détaillés dans le Tableau 9.

**Tableau 9. Evolution sur 5 ans du Z-score de l'IMC en relation avec les polymorphismes rs17817449 et rs1421085 du gène FTO.**

<b>rs17817449 SNP</b>	TT	GT	GG	ANOVA	
Nombre de sujets	276	414	131	Effet additif	P <sup>1</sup> Additif
IMC Z-score au point t <sub>0</sub>	0.097±0.072 <sup>2</sup>	0.142±0.055	0.177±0.107		0.514
IMC Z-score au point t <sub>1</sub>	0.121±0.077	0.204±0.056	0.302±0.094		0.142
Différence de IMC Z-score					
Total	0.017±0.037	0.064±0.028	0.132±0.045		0.054
Adultes	0.101±0.034	0.107±0.028	0.111±0.043	0.006	0.823
Enfants et adolescents	-0.049±0.054	0.027±0.041	0.126±0.072	0.085	0.049

<b>rs1421085 SNP</b>	TT	CT	CC	ANOVA	
Nombre de sujets	268	414	139	Effet additif	P <sup>1</sup> Additif
IMC Z-score au point t <sub>0</sub>	0.096±0.073	0.131±0.055	0.209±0.109		0.408
IMC Z-score au point t <sub>1</sub>	0.117±0.079	0.190±0.056	0.341±0.096		0.091
Différence de IMC Z-score					
Total	0.015±0.038	0.059±0.028	0.146±0.042		0.028
Adultes	0.095±0.033	0.104±0.028	0.131±0.044	0.016	0.538
Enfants et adolescents	-0.050±0.055	0.020±0.042	0.134±0.063	0.088	0.033

<sup>1</sup>P ANOVA

<sup>2</sup>Moyennes arithmétiques±SD

Les valeurs du Z-score de l'IMC au point t<sub>0</sub> et t<sub>1</sub> ont été ajustées sur l'âge et le sexe

Les valeurs de l'évolution du Z-score de l'IMC ont été ajustées sur l'âge, le sexe et sur les valeurs du Z-score de l'IMC au point t<sub>0</sub>

### *II.1.3 Nouveaux éléments apportés par cette étude*

Les SNPs choisis pour la présente étude sont ceux utilisés par Dina et al [Dina et al. 2007]. Scuteri et al [Scuteri et al. 2007] ont démontré une association du SNP rs9930506 avec l'IMC d'une façon prospective et Frayling et al [Frayling et al. 2007] ont pu montrer un risque élevé de développement de l'obésité chez des enfants et adultes, porteurs du SNP rs9939609.

Notre étude apporte de nouveaux éléments concernant les relations des variants du gène FTO avec l'évolution de l'IMC au cours du temps. L'effet de deux variants du FTO, chez des sujets sans obésité sévère ou morbide, suggère une implication de ce gène dans les mécanismes physiologiques régulant l'IMC.

Les associations significatives détectées seulement chez les enfants et adolescents pourraient suggérer que l'impact du gène FTO dépend de l'âge. Le FTO serait probablement impliqué dans des mécanismes physiologiques pendant la puberté et qui ne persisteraient pas dans la vie adulte. En plus, les facteurs environnementaux changent avec l'âge et ceci masque éventuellement l'effet des marqueurs génétiques, et dans notre cas, l'effet du FTO.

Il est à noter que l'absence de relations chez les adultes pourrait être expliquée par la taille de l'échantillon exploité.

### III. Aspects techniques

#### III.1 Réflexions sur la stratégie en transcriptomique dans la cohorte STANISLAS

La constitution d'une banque d'échantillons biologiques de bonne qualité suppose une maîtrise des variations dues à une multitude de paramètres, tels que la durée de préparation des échantillons, les méthodes/techniques utilisés pour cette préparation, les conditions de stockage e.t.c. De nombreuses études ont déjà déterminé les points cruciaux pour la constitution des bio-banques des échantillons de plasma/sérum et d'ADN. Or, l'avancement des connaissances scientifiques a créé le besoin de s'intéresser à d'autres types de ressources biologiques, tels que les PBMCs et à d'autres types de molécules, tel que l'ARNm. Puisque ces types de banques sont récemment conçus, l'amélioration des conditions pour assurer leur qualité est en cours de développement.

C'est ainsi que des tests de faisabilité ont été réalisés pour la banque de PBMCs de la cohorte STANISLAS [Marteau et al. 2005a]. Cette démarche assure la qualité des ARN des PBMCs et par conséquent, établit les bases, pour obtenir des résultats de qualité en transcriptomique.

Bien que ces bases soient essentielles et que la quantification de l'ARNm d'un gène soit une technique permettant une haute précision (contrairement aux techniques semi-quantitatives), il existe une toute autre problématique concernant ce sujet. Cette problématique gravite autour de quelques points cruciaux : 1) extraction de l'ARN total, 2) contamination par l'ADN génomique, 3) reverse transcription (RT), 4) PCR en temps réel, 5) normalisation des résultats[Bustin 2002] et chacun de ces points soulève certaines réflexions.

Ici, nous allons présenter brièvement les décisions prises après différents tests appliqués au niveau de l'extraction et de l'élimination des contaminants mais nous allons, en revanche, insister sur la PCR en temps réel et la normalisation des résultats.

##### *III.1.1 Extraction des ARN totaux et contamination par ADN génomique*

Cette étape a été réalisée à l'aide d'un automate (MagNA Pure, Roche) qui a été choisi au départ, en vue d'extraire des ARN en grande échelle, dans l'objectif de travailler avec les échantillons de la Cohorte STANISLAS. L'extraction d'ARN est faite, habituellement, manuellement (extraction par rétention des ARN sur une membrane-kits d'extraction). La technologie des robots qui simplifient le travail du chercheur par une procédure automatisée, permet d'éviter les erreurs provenant de la personne qui manipule. Le principal avantage de cet appareil consiste en la reproductibilité des expériences. En plus, l'appareil dont nous nous sommes servis comprend une étape de traitement des extraits avec une DNase (pour dégrader

l'ADN génomique résiduel, éventuel), contrairement à la stratégie d'extraction manuelle, où le traitement doit se faire à la suite de l'extraction.

Cependant, l'appareil que nous utilisons est un système fermé, mettant ainsi des barrières quant à l'optimisation des paramètres. Il est vrai qu'en théorie, chaque appareil assure les meilleurs résultats, mais en vérité, il faut toujours valider son efficacité. Pour ces raisons, nous avons réalisé des tests de comparaison des différents kits et protocoles (établis par le fournisseur), pour enfin, choisir la meilleure combinaison de kit-protocole.

En ce qui concerne les contaminations par ADN génomique (dégradation incomplète par l'enzyme), nous avons assuré son élimination par deux façons : 1) traitement par l'automate, et 2) utilisation d'un kit de RT qui intègre une étape de dégradation de l'ADN génomique.

Pour éviter également toutes les autres contaminations (RNases, ADN d'origine bactérienne e.t.c.), nous avons établi un protocole de manipulations (endroit des manipulations, utilisation d'une hotte, utilisation de pipettes réservées pour l'ARN, manipulations par la même personne e.t.c.) bien strict.

Il faut noter que, malgré les précautions, nous nous servons de contrôles à chaque expérience pour détecter les éventuelles contaminations qui pourraient influencer la qualité des résultats.

### *III.1.2 PCR quantitative absolue*

La PCR quantitative est actuellement la technique la plus sensible pour mesurer l'expression d'un gène. C'est pour cette raison qu'elle a été notre technique de choix pour les études transcriptomique des PBMCs dans la cohorte STANISLAS. Plus précisément, nous avons appliqué la PCR quantitative absolue qui mesure les ARNm, non pas par rapport à un gène de ménage mais en se basant sur une gamme étalon d'échantillons de concentration connue. L'approche 'absolue', contrairement à l'approche 'relative' mesure le nombre de copies, au lieu de donner un ratio (gène d'intérêt/gène de ménage). Elle est plus laborieuse, puisqu'elle demande de constituer une 'gamme étalon' de référence. Quoique la PCR quantitative relative soit plus simple à réaliser, elle est plutôt limitée aux études : 1) de gènes d'une forte expression et 2) de cas/contrôle. Aucune de ces deux caractéristiques n'est le cas de la cohorte STANISLAS. En ayant comme objectif de quantifier des gènes jamais étudiés auparavant dans les PBMCs, nous ne savions pas quel était le niveau de leur expression. Ainsi, pour des gènes de faible expression, la PCR absolue permet de mesurer avec une plus grande précision et de tenir compte des variations analytiques. En effet, ce dernier point est résolu pour la PCR relative, puisque d'une part, les variations analytiques ne peuvent pas fausser les résultats

quant à une forte expression et d'autre part, l'utilisation des ratios permet d'éliminer les variations dues aux paramètres autres que les paramètres biologiques.

Globalement, notre stratégie a consisté en la création d'une 'gamme étalon' refaite pour chaque expérience-'run' ou enregistrée dans l'appareil, en l'utilisation de duplicatas par échantillon et à l'utilisation d'un contrôle interne. En ce qui concerne la 'gamme étalon', nul choix est idéal. Quant à une série d' expériences-'run', pour que les résultats soient comparables, il faut se focaliser sur les variations entre 'runs' (inter-variations). Refaire pour chaque 'run' une gamme introduit forcément des erreurs, puisqu'un manipulateur ne pourra jamais reproduire exactement la même gamme étalon. Ainsi, l'enregistrement d'une gamme qui sert pour tous les 'runs' simplifie énormément la procédure en matière de temps et de reproductibilité. Comme complément à cette approche, nous avons utilisé un contrôle interne (le même échantillon d'une concentration connue) dans chaque 'run' pour avoir une idée des variations analytiques de la PCR. Dans notre cas, les variations ont été calculées à une moyenne de 0.4%, donc considérées comme insignifiantes. Les duplicatas ont été utilisés pour calculer les intra-variations, c'est-à-dire, les variations dans le même 'run' et nous avons obtenu des moyennes à 0.5%. Il est à noter que les expériences de PCR ne sont pas comparables aux expériences de mesure des protéines, puisqu'il s'agit dans le deuxième cas de molécules d'une complexité structurelle et d'une diversité de propriétés qui influencent significativement la reproductibilité des résultats. En plus, pour la PCR quantitative, il n'existe pas vraiment de contrôles internes, autrement dit, de molécules étrangères à la nature de l'ARN qui serviraient à estimer les variations analytiques.

### *III.1.3 Normalisation*

On entend par normalisation, l'approche qui a pour but de diminuer le plus possible les biais provenant des différentes sources de variabilité qui sont habituellement de deux natures ; la variabilité inhérente au matériel biologique, la variabilité due à l'efficacité et à la reproductibilité des appareils et protocoles de manipulation.

La normalisation peut intervenir à plusieurs étapes de la procédure : 1) volume/taille du tissu, 2) quantité d'ARN total et 3) gènes de ménage [Huggett et al. 2005]. Dans un premier temps, la normalisation au niveau du matériel biologique de départ (PBMCs) peut se traduire par l'utilisation du même nombre de cellules. En effet, pour la banque de la cohorte STANISLAS nous avons déterminé un nombre idéal de cellules PBMCs avant le stockage des échantillons. Ainsi, 2 millions de cellules sont stockés par tube, et ceci offre une certaine homogénéité, en ce qui concerne le matériel biologique de départ. Ensuite, la quantification de l'ARN total

après l'extraction nous donne une idée des variations quantitatives qui pourraient par la suite influencer le rendement de la reverse transcription. Ainsi, l'obtention d'ARN totaux de concentrations similaires est un élément d'une certaine importance pour éviter les biais. Pour la cohorte STANISLAS, nous avons examiné ce point et nous avons obtenu des concentrations d'ARN d'une marge assez restreinte (5-25ng/ $\mu$ L).

En ce qui concerne les gènes de ménage qui offrent une solution dite facile pour normaliser les résultats, nous avons quelques objections basées sur la littérature [Sturzenbaum and Kille 2001] et également sur nos propres expériences. Il est intéressant de rappeler que les gènes de ménage ont été des outils adaptés pour les techniques non ou semi-quantitatives grâce à leurs forts niveaux d'expression. Ces techniques se focalisaient à des résultats d'une nature plutôt qualitative. Pourtant, leur utilisation persiste pour les techniques de transcriptomique purement quantitatives. Le problème est que, pour qu'un gène de ménage puisse être adapté pour ces expériences, il doit répondre à des exigences différentes que celles des techniques qualitatives. Comme la PCR quantitative est précise, le gène de ménage doit varier beaucoup moins que le gène d'intérêt. Or, ceci est très rarement le cas. En effet, lorsque nous avons testé les gènes de ménage GAPDH et RPL13A (ribosomal), nous avons obtenu des variations qui ne permettaient pas de se servir de ces gènes pour normaliser les résultats. En plus, la forte expression d'un gène pour qu'il soit qualifié de gène de référence n'est pas une exigence pour la PCR quantitative ; au contraire, pour un gène faiblement exprimé dans un tissu, un gène de ménage doit être dans la même échelle d'expression. Le problème du choix du gène de ménage est assez compliqué et demande une grande prudence, puisqu'il peut altérer les résultats au lieu de les normaliser. Pourtant, la plupart des chercheurs ne fournissent pas de preuves de validation de leurs gènes de ménage dans leurs publications. Idéalement, il faut trouver un gène de ménage dont l'expression ne varie pas dans le type de cellules étudiées et qui ne soit pas influencé par les conditions des expériences (par exemple traitement). Un travail intéressant d'une équipe à ce sujet, a consisté en la description de gènes de ménage appropriés par tissu et au calcul d'une sorte de moyenne (moyenne géométrique) des gènes de ménage les plus stables par tissu [Vandesompele et al. 2002]. Les auteurs suggèrent que non seulement il est nécessaire de chercher des gènes de référence spécifiques à un tissu mais qu'en plus, il n'existe pas un seul gène qui pourrait être suffisamment stable pour servir de gène de ménage. Ceci dit, chaque laboratoire doit valider des gènes de ménage. Dans notre laboratoire, les deux gènes cités auparavant ont été testés par PCR quantitative mais nous avons déjà examiné plusieurs d'entre eux dans une étude de puce faite antérieurement (GAPDH, EEF1A1, B2M, RPL13A) (Publication No4).

La meilleure alternative pour la normalisation de la RT-PCR est l'utilisation d'une molécule 'artificielle' incorporée dans l'échantillon après l'extraction des ARN totaux [Huggett et al. 2005]. Cette molécule permet de suivre les étapes de reverse transcription et de PCR quantitative mais sa fabrication est assez laborieuse. En plus, elle ne tient pas compte de l'étape d'extraction.

Puisque nous ne nous sommes pas servi des gènes de ménage pour les raisons citées auparavant et que nous avons réalisé une PCR quantitative absolue, nous avons pensé à une étape supplémentaire de normalisation au niveau de l'ADNc. Pour que nos résultats soient comparables entre individus, nous avons ajusté tous les échantillons à la même concentration d'ADNc. Ici, il est à souligner que nous étions obligés de choisir la concentration la plus faible d'ADNc pour que nous puissions ramener tous les échantillons à la même concentration (5ng/μL). Ceci, pourrait éventuellement soulever des questions quant à l'impact de la faible quantité de l'ADNc sur l'expression de certains gènes qui ne s'expriment pas fortement dans les PBMCs (ce point est discuté dans le chapitre concernant l'expression de la leptine).

En conclusion, nous avons testé plusieurs points importants de la problématique touchant le sujet de la quantification des ARNm et nous avons essayé de trouver les solutions les plus adaptées pour notre propre cohorte, sans pour autant faire abstraction des données et des essais décrits dans la littérature. Cette optimisation demande du temps mais elle assure au maximum la validité de nos résultats.

## IV. Etude des PBMCs en transcriptomique

En dehors des études épidémiologiques se focalisant sur les polymorphismes, il existe un autre domaine de grand intérêt, toujours en épidémiologie, à découvrir : l'expression génique. Décrire le profil d'expression de gènes en pré-pathologie, dans des tissus spécifiques, est une approche relativement nouvelle et très prometteuse, puisqu'elle peut être complémentaire des approches classiques existantes.

En se focalisant sur les facteurs liés au SM et aux MCV, l'obésité et l'hypertension, nous pourrions proposer une multitude de tissus à exploiter. Dans le cas de l'inflammation, à l'exception du plasma, les cellules mononuclées circulantes (PBMCs-Peripheral Blood Mononuclear Cells), sont les cellules le plus facilement accessibles pour les études épidémiologiques de grande taille. En effet, les PBMCs sont les cellules les plus représentatives de l'inflammation [Hansson 2005; Libby 2006], état étroitement lié à l'obésité [Trayhurn et Wood 2004] et l'hypertension [Li et Chen 2005].

Etant donné les avantages de ce tissu, pour pouvoir étudier les gènes d'intérêt avec des approches qualitatives et également quantitatives, la constitution d'une banque de PBMCs a été la stratégie choisie pour la cohorte STANISLAS. La constitution d'une telle banque demande des considérations majeures sur les variations analytiques concernant la collecte du sang, les manipulations, ainsi que les conditions et la durée du stockage [Debey et al. 2004]. La banque de PBMCs de la cohorte STANISLAS a été constituée sur la base de ces réflexions et assure les conditions qui permettent la fiabilité des résultats obtenus [Marteau et al. 2005a]. L'ensemble de ces éléments ont été pour nous la motivation principale pour nous investir dans le projet suivant qui est basé sur l'hypothèse que : les PBMCs pourraient représenter un modèle pour étudier les facteurs de risque du SM et des MCV dans le contexte de l'inflammation.

## **IV.1 Les PBMCs comme modèle pour étudier l'obésité et l'hypertension dans le contexte de l'inflammation (Publication No4).**

### *IV.1.1 L'inflammation comme processus central et les PBMCs comme tissu-cible pour les facteurs de risque des MCV*

L'athérosclérose est un état complexe qui implique différents mécanismes biologiques : rétention des lipides, oxydation des LDL et stress oxydant en général, contrôle de l'expression de gènes liés au métabolisme lipidique par des facteurs de transcription et des récepteurs nucléaires, adhésion cellulaire, coagulation, contraintes de cisaillement liées au flux sanguin et à la régulation de la pression artérielle, prolifération cellulaire et apoptose et probablement infection microbienne.

Pour chacune de ces voies métaboliques, des relations avec l'inflammation ont été démontrées. En effet, certains marqueurs sanguins d'inflammation sont associés avec la pression artérielle chez des individus supposés sains, suggérant l'inflammation comme un marqueur de la pression artérielle élevée [Abramson et al. 2006]. D'autres études proposent que les leucocytes répondent aux changements des taux lipidiques plasmatiques par la régulation d'un réseau de gènes, incluant ceux impliqués dans le métabolisme des acides gras [Ma et al. 2007]. L'importance de l'inflammation dans l'état pro-thrombotique a été récemment soulignée [Afshar-Kharghan et Thiagarajan 2006] et des relations entre le stress oxydant et l'inflammation ont été constatées [Kotur-Stevuljevic et al. 2007]. Dans tout le processus d'athérosclérose, des récepteurs nucléaires répondent au stress oxydant et à l'inflammation par la régulation de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation et le métabolisme lipidique [Pascual et Glass 2006; Puddu et al. 2005]. Toutes les données citées auparavant, suggèrent l'inflammation comme mécanisme central dans un réseau d'interactions.

La majorité des études, ayant pour objectif l'identification de marqueurs spécifiques d'une maladie, se focalise sur les protéines circulantes (plasmatiques/sériques). Pourtant, les concentrations plasmatiques/sériques correspondent à un pool de molécules provenant de différents types de tissus et reflètent par conséquent, d'une façon globale, l'état physiopathologique de l'individu. En effet, les taux sanguins de molécules ne reflètent pas leur production spécifique par leurs tissus-source [Jason et al. 2001], au moins dans le cas de cytokines. Un état sous-clinique déjà installé, n'est éventuellement pas mis en évidence par la mesure des protéines circulantes. Ainsi, les PBMCs pourraient être une source alternative d'informations sur un état physiopathologique et servir comme tissu-cible à étudier.

Ainsi, les hypothèses de notre étude étaient les suivantes :

Pourrait-on proposer les PBMCs comme un modèle spécifique et informatif pour étudier les relations/interactions entre les différentes voies métaboliques liées aux MCV dans le contexte de l'inflammation ?

Est-ce que les variations d'expression dans les PBMCs pourraient différencier les individus avec ou sans facteurs de risque (obésité, hypertension) des MCV ?

#### *IV.1.2 Stratégie suivie*

Pour vérifier nos hypothèses, nous avons appliqué une approche intégrative de gène-candidat des MCV, en étudiant dans les PBMCs, l'expression de plusieurs gènes (182 gènes) faisant partie de 10 voies métaboliques principales (régulation de la pression artérielle, adhésion cellulaire, coagulation, stress oxydant, métabolisme des lipides, métabolisme du glucose et obésité, facteurs de croissance cellulaire, enzymes du métabolisme des médicaments, facteurs de transcription, défense immunitaire), chez 20 individus non-atteints de MCV, mais ayant au moins un facteur de risque (obésité, hypertension).

Les caractéristiques des 20 sujets choisis pour cette étude sont illustrées dans l'Annexe 5 et la répartition des 182 gènes classés par voie métabolique apparaît dans l'Annexe 6. Le choix des gènes se base sur la littérature existante et également sur notre propre expérience dans le domaine génétique des MCV [Cheng et al. 1999; Gibbons et al. 2004; Li et Chen 2005; Marteau et al. 2005b; Pallaud et al. 2001b; Pallaud et al. 2001a; Visvikis-Siest et Marteau 2006].

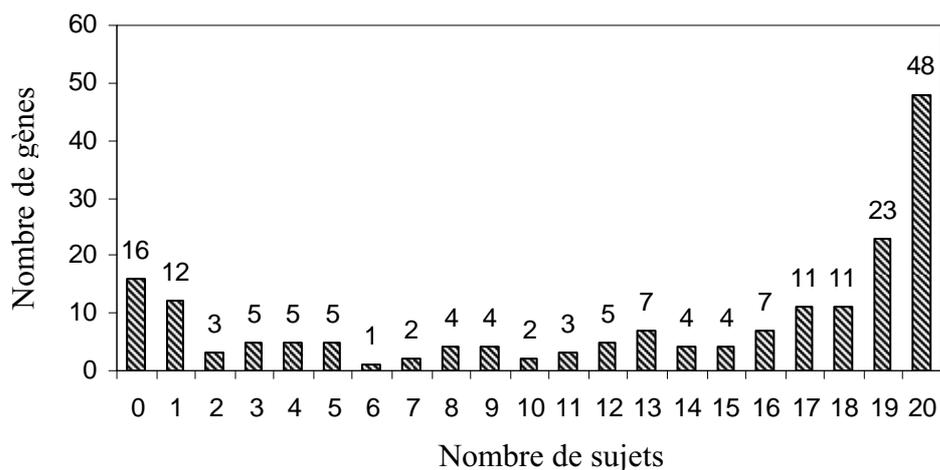
#### *IV.1.3 Intérêt des PBMCs dans les MCV*

A notre connaissance, la plupart des gènes étudiés ici n'ont jamais été étudiés auparavant dans les PBMCs. Bien que le domaine des MCV soit continuellement supplémenté par des données démontrant l'implication de l'inflammation dans ces maladies, les PBMCs ne sont pas suffisamment étudiés dans cette optique. Un nombre relativement faible d'études en transcriptomique a utilisé les PBMCs [Chon et al. 2004; Lampe et al. 2004; Moore et al. 2005; Wibaut-Berlaimont et al. 2005]. Or, ces études suggèrent les PBMCs comme un tissu reflétant l'exposition aux facteurs environnementaux ou aux pathologies installées (infarctus, hypertension).

Dans la logique de considérer les PBMCs comme un tissu sensible aux changements dans l'organisme (par l'expression de gènes qui est une mesure sensible à l'environnement et à la fonction cellulaire), en tenant compte du fait que les taux plasmatiques de protéines ne sont pas toujours la source d'information la plus spécifique pour tout état pathologique et surtout physiopathologique [Jason et al. 2001], et en se basant sur les résultats que nous avons obtenus, nous proposons les PBMCs comme un tissu-cible intéressant pour étudier les MCV. Nous tenons à ajouter que quelques études [Eady et al. 2005; Radich et al. 2004; Whitney et al. 2003] ont déjà choisi d'étudier les PBMCs chez des individus supposés sains et dans le contexte que ce tissu peut 'témoigner' des changements même physiologiques dans l'organisme. Or, elles se sont focalisées sur les variations physiologiques d'expression en fonction du sous-type cellulaire, du sexe et de l'âge, ainsi que sur les variations analytiques dues aux manipulations et au stockage des PBMCs.

#### *IV.1.4 Distribution globale de l'expression des 182 gènes*

Parmi les 182 gènes, 166 ont été exprimés avec une significativité élevée ( $p < 0.01$ , en considérant comme exprimé un gène pour lequel nous détectons l'ARNm au moins chez un individu). La Figure 14 décrit la distribution de l'expression des gènes et donne le nombre de gènes exprimés en relation avec le nombre d'individus.



No de sujets	No de gènes
20	ACE, ADRA2B, ADRB3, ALOX15, APOA4, APOB, APOCIV, BDKRB2, CAPN10, CCL2, CD14, CLCNKB, CXCL12, CYBA, CYP11B2, CYP1A1, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP2J2, CYP4A11, CYP4F2, DEFA3, EGF, F7, GNB3, GSTP1, GYS1, ICAM1, IL4R, ITGA2, LPA, LTA, MMP3, MTHFR, NOS2A, NOS3, NPR1, PDGFA, PHGDH, PNMT, POMC, PTGS1, SAH, SCNN1A, SCNN1G, TNFRSF1B, VEGF
19	ADD1, ADD2, AGT, AGTR1, APOA1, AVPR1A, CBS, CLU, CSF2, CTLA4, CYP2A6, CYP2E1, F5, FPRL1, GGT1, GNAS, LCAT, LIPE, LPL, NPR2, NR1H2, PTGIS, TNF
18	CD36, CYP2C18, F2, FGB, HMOX1, KLK1, MEF2A, NR1H3, PTGS2, RGS2, SCNN1B
17	ARNT, ATP1A2, FPR1, GSTT1, HSD11B1, IL1A, IL6, KYNU, LEP, SGK, VDR
16	AHR, ARTS-1, GPD2, IL18, RENBP, SELL, TCF7
15	ADRA2A, CAMP, CCR3, INSR
14	C3, LIPC, NPR3, PON2
13	ADRB1, APOD, LDLR, LMNA, MPO, NR1H3, VCAM1
12	ALOX12, EDN1, EDNRA, PLTP, TGFB1
11	APOCII, EDN2, PPARG
10	GPD1, SELP
9	ALOX5, IL13, IL5RA, SCARB2
8	C5, CCR2, CCR7, NR3C1
7	LEPR, NR1H2
6	DEFA4
5	APOA2, CHRM1, IL1B, SERPINE1, UCP1
4	CETP, CYBB, GCGR, GSTM1, HSD11B2
3	APOH, CCR5, IL2, IL8, ITGB3
2	APOCI, PDGFB, SCGB1A1
1	ADRB2, APOE, CASR, HSD3B1, IGF1, IL10, IL9, LTC4S, MS4A2, MTP, PON1, PPARA
0	AGTR2, APOCIII, ATP1B1, CCL11, CYP3A4, CYP3A5, EDNRB, FABP2, IL4, NPPA, NR1H4, PLA2G1B, REN, SCARB1, SELE, VLDLR

**Figure 14. Distribution de l'expression des gènes dans les PBMCs des 20 individus étudiés.**

Le graphique montre les gènes exprimés par nombre d'individus. Pour un nombre total de 182 gènes, 166 ont été exprimés ( $P < 0.001$ ).

#### *IV.1.5 Distribution par voie métabolique*

En ce qui concerne les gènes faisant partie des voies métaboliques définies, uniquement 5 gènes (*AGTR2*, *REN*, *EDNRB*, *ATP1B1*, *NPPA*) entre les 51 impliqués dans la régulation de la pression artérielle n'ont pas été exprimés. Les gènes de la voie de coagulation et de prothrombose (n=7), de stress oxydant (n=11), de défense immunitaire (n=10) et les facteurs de croissance cellulaire (n=7) ont été exprimés. Quant aux 10 gènes de l'adhésion cellulaire, seul celui de la *SELE* n'a pas été détectable. Les principales enzymes du métabolisme du médicament ont été exprimées, à l'exception de 2 cytochromes P450 (*CYP3A4*, *CYP3A5*). Pour les gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, de l'obésité et des lipides, parmi les 36 choisis, 5 n'ont pas été trouvés (*APOC3*, *PLA2G1B*, *FABP2*, *SCARB1*, *VLDLR*) et concernant les facteurs de transcription, *NR1H4* était le seul non-exprimé parmi 13 gènes. Enfin, pour les chemokines et cytokines, parmi les 24 sélectionnées, 2 n'ont pas été détectées (*IL4*, *CCL11*).

La majorité des gènes du système rénine-angiotensine ont été trouvés exprimés. L'ARNm de l'enzyme de conversion de l'angiotensine a été déjà détecté dans les PBMCs humains [Costerousse et al. 1993], comme dans notre étude. Notamment, les gènes de récepteurs adrénergiques, de bradykinine et d'endotheline ont été exprimés. Il a été démontré que les récepteurs beta-adrénergiques jouent un rôle éventuel intermédiaire pour les effets des catécholamines sur la production de cytokines par les PBMCs [Wahle et al. 2005]. Comme suggéré par Horiguchi et al. [Horiguchi et al. 1998], les lymphocytes pourraient servir comme modèle pour étudier la régulation du sodium, puisque le 'sodium channel non-voltage-gated protein 1' est bien exprimé dans les lymphocytes.

L'expression de la majorité des gènes du métabolisme lipidique dans les PBMCs chez des individus supposés sains de notre étude, pourrait suggérer l'utilité de ce tissu pour étudier la dyslipidémie.

La leptine est une hormone avec des rôles variés dans l'inflammation. Elle induit la production de multiples cytokines par les PBMCs via ses récepteurs [La Cava and Matarese 2004]. Pourtant, sa production par les PBMCs n'a jamais été démontrée. La présence de l'ARNm de la leptine et de son récepteur dans les PBMCs renforce l'hypothèse d'implication de cette adipokine dans l'inflammation, cette molécule pouvant avoir des propriétés sur la prolifération et la survie des lymphocytes.

La métalloprotéinase 3 de matrice a été bien exprimée dans les PBMCs de notre population et ces résultats sont en accord avec une étude précédente, suggérant que ce type de cellules

pourrait être impliqué dans le remodelage de la matrice extracellulaire par leur capacité à produire des métalloprotéinases [Di Girolamo et al. 1998].

Les gènes de stress oxydant ont été également représentés dans les PBMCs. Par exemple, trois glutathione-S-transferases ont été exprimées et l'expression de ces gènes est élevée dans l'état d'inflammation [Aitken et al. 2006]. L'utilité de PBMCs comme un modèle plus approprié que le sérum ou le fluide cérébrospinal pour étudier les glutathione-S-transferases a été déjà démontrée [Kuzma et al. 2006].

Toutes les interleukines pro-inflammatoires ont été exprimées dans des PBMCs non-activés de notre étude. Cependant, certaines interleukines (anti- et pro- inflammatoires) ont été faiblement exprimées pour un petit nombre d'individus. Par exemple, IL-9 et IL-10 ont été trouvées seulement chez un individu, IL-2 et IL-8 chez deux et IL-4 n'a pas été détecté.

Enfin, il est intéressant de noter que certains gènes ont été trouvés exprimés pour la première fois dans les PBMCs ; plus précisément le facteur de coagulation VII, l'APOA4, le récepteur aryl hydrocarbon et quelques cytochromes P450.

#### *IV.1.6 Taux d'expression de l'ARNm*

Parmi les 166 gènes exprimés, montrés sur l'Annexe 7, la majorité présentait des taux d'expression suffisamment élevés pour étudier leur profil d'expression d'une façon quantitative.

#### *IV.1.7 Validation des microarrays par RT-PCR quantitative*

Nous avons choisi 4 gènes impliqués dans l'inflammation et l'adhésion cellulaire (*TNF*, *IL6*, *ICAMI*, *SELL*) qui ont été exprimés par un nombre significatif d'individus (au moins 16 individus), pour valider les résultats des puces.

Ces gènes ont été considérés comme exprimés dans le cas d'une amplification spécifique (courbe de fusion). Le calcul des pourcentages de la présence de chacun d'entre eux a été en concordance avec les résultats obtenus par les microarrays.

En plus, nous nous sommes servis d'un plus grand échantillon (83 sujets) pour confirmer nos résultats et pour réaliser une première étape de quantification des 4 gènes. La variabilité interindividuelle est de 50.2 à 112.0% (50.2%, 59.0%, 59.1%, 112.0% pour *ICAMI*, *IL6*, *SELL*, *TNF* respectivement). L'efficacité de la RT-PCR quantitative est >95% et les coefficients de variations analytiques ont été estimés à : 0.4% pour intra-série (duplicata) et 0.5% pour inter-série (sujet-contrôle).

Ces résultats sont illustrés dans le Tableau 10

**Tableau 10. Pourcentage de présence des 4 gènes étudiés.**

Gène	Etude micro-array sur 20 sujets supposés sains	Etude PCR quantitative sur 20 sujets supposés sains	Etude PCR quantitative sur 83 sujets supposés sains
ICAM1	100.0% (20/20) <sup>1</sup>	100% (20/20)	100% (83/83)
TNF $\alpha$	95.0% (19/20)	100% (20/20)	100% (83/83)
L-SEL	80.0% (16/20)	95.0% (19/20)	98.8% (82/83)
IL6	85.0% (17/20)	85.0% (17/20)	95.0% (79/83)

<sup>1</sup>Nombre d'individus exprimant les gènes étudiés

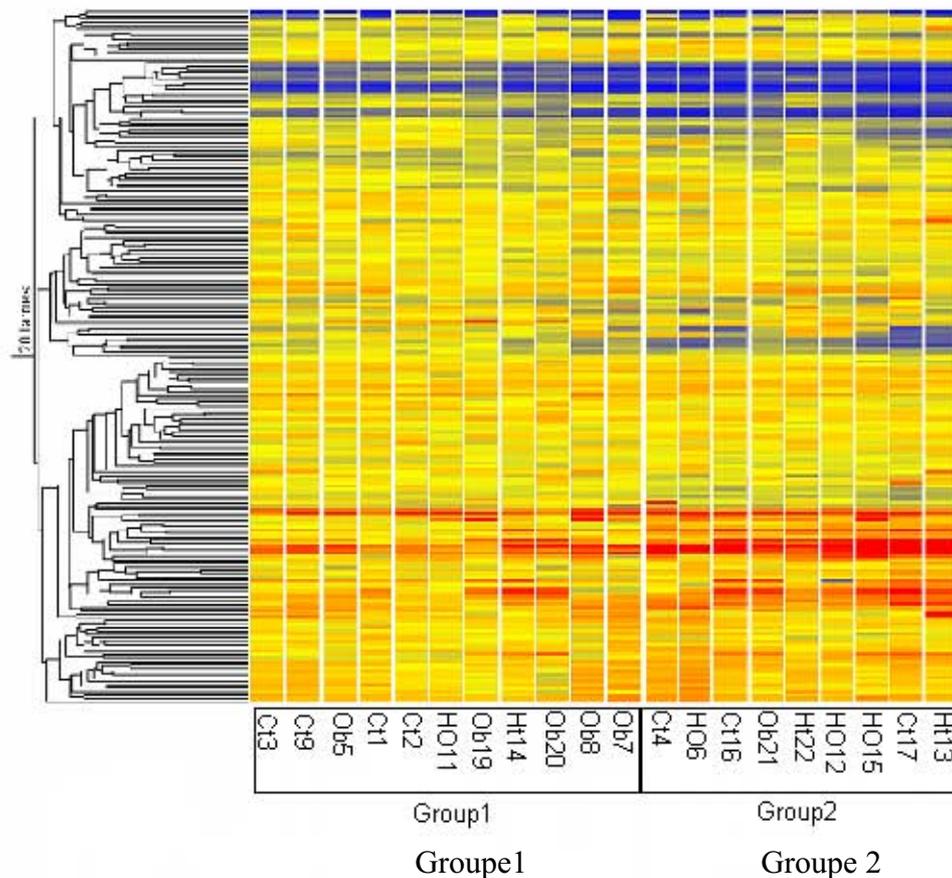
#### IV.1.8 Discrimination des individus en fonction des facteurs de risque

L'application d'une analyse de cluster non-supervisée des résultats de micro-arrays a distingué deux clusters (Figure 15) pour la population étudiée (7 individus sans facteurs de risque de MCV, 3 hypertendus, 6 obèses et 4 hypertendus-obèses). Le premier groupe semble être composé principalement par des obèses ou sans facteurs de risque, alors que le deuxième est composé par des sujets hypertendus/obèses-hypertendus). Nous avons ensuite recherché les gènes responsables pour cette répartition et nous avons identifié 15 gènes : *MS4A2*, *ARNT*, *KLK1*, *DEFA3*, *HSD11B2*, *TGFB1*, *C3*, *NR1H2*, *LEPR*, *UCP*, *F5*, *IL1A*, *RGS2*, *EDN2*, *HSD3B1*.

Les gènes mis en évidence, font partie des voies métaboliques suivantes : régulation de la pression artérielle (*RGS2*, *EDN2*, *KLK1*, *HSD3B1*, *HSD11B2*), obésité (*LEPR*, *UCPI*), inflammation (*IL1A*, *TGFB1*), facteurs de transcription (*ARNT*, *NR1H2*), défense immunitaire (*MS4A2*, *DEFA3*, *C3*) et coagulation (*F5*).

Dans un effort d'expliquer ces résultats, nous supposons que *NR1H2* (facteur de transcription) pourrait moduler la pression artérielle *via* un effet sur ces 5 gènes. Notamment, il a été démontré que *NR1H2* a un effet sur un autre gène impliqué dans la pression artérielle, la rénine [Morello et al. 2005]. En plus, le récepteur de la leptine, ainsi que le *UCPI* sont probablement activés par *NR1H2*, puisqu'il semble que ce dernier soit impliqué dans le métabolisme énergétique par l'intermédiaire de l'*UCPI* [Steffensen et al. 2004]. Il est important de souligner qu'un *locus* de susceptibilité pour l'obésité est situé au chromosome 19q où se trouve également *NR1H2* [Bell et al. 2004]. Enfin, le récepteur de la leptine pourrait influencer les processus immunitaires par la régulation de l'activation de PBMCs et par la production des molécules d'inflammation [La Cava et Matarese 2004]. Tous ces éléments

renforcent les relations de l'obésité avec l'hypertension et suggèrent que l'inflammation pourrait être un mécanisme liant ces deux états pathologiques.



**Figure 15. Analyse de cluster non-supervisée de l'expression de gènes dans les PBMCs des 20 individus.**

Les valeurs représentent les ratios intensité de l'ARNm du gène/intensité de l'ARN de référence (pour normaliser les résultats). La zone en bleu distingue les individus en groupes. Ct : contrôle, O : obèse, Ht: hypertendu, HO: hypertendu/obèse

#### IV.1.9 Originalité de l'étude

Cette étude introduit une nouvelle approche dans le domaine des MCV et particulièrement dans l'étude de leurs facteurs de risque. Elle est la première à cibler l'inflammation et son tissu représentant, les PBMCs, en se focalisant sur un nombre considérable de gènes-candidats faisant partie des principales voies métaboliques des MCV.

Un deuxième point à souligner est l'étude des individus (pour les microarrays et les RT-PCR quantitative) non-atteints de MCV ou d'autres maladies inflammatoires, avec des critères

d'exclusion tels que la consommation de médicaments, de cigarettes, ainsi qu'une consommation d'alcool élevée (>32g/jour) qui pourraient influencer l'expression de gènes dans les PBMCs. D'autres critères d'exclusion concernant l'obésité et l'hypertension sévère, ainsi que les valeurs extrêmes de glucose, cholestérol et HDL ont été appliqués. La prise en compte de tous ces critères, a permis d'étudier l'obésité et l'hypertension à l'état physiologique, avant qu'une obésité/hypertension sévères s'installent.

#### *IV.1.10 Intérêt pour la compréhension de la pré-pathologie des MCV*

Dans la présente étude, la plupart des gènes ont été exprimés avec des taux mesurables pour quantifier leur expression. Toutes les voies métaboliques ont été représentées, et la quantification de l'ARNm de certains gènes dans un plus grand échantillon a révélé des variations biologiques intéressantes. Tous ces éléments supportent l'étude de l'inflammation *via* les PBMCs, ouvrent de nouvelles perspectives pour les études de sujets supposés sains (physiologie) et offrent une base pour des études ultérieures sur la pathologie des MCV.

L'étude des variations physiologiques de l'expression de gènes sert à :

- a) déterminer les variations interindividuelles, biologiques de l'expression
- b) expliquer ces variations par des facteurs autres que ceux provenant de l'état pathologique (constitutionnels, environnementaux, génétiques)
- c) comparer ces variations avec les variations obtenues dans l'état pathologique

En se basant sur l'hypothèse que le développement des MCV implique un réseau complexe d'interactions et de relations entre plusieurs systèmes biologiques et voies métaboliques, nous avons essayé de rassembler un grand nombre de gènes liés aux MCV ou à leurs facteurs de risque, tels que l'obésité et l'hypertension. Nos résultats démontrent l'intérêt d'utiliser les PBMCs comme modèle d'étude des MCV, dans le contexte d'inflammation et d'étudier ce tissu pour révéler des différences de profil d'expression dans l'état pre-pathologique (obésité, hypertension).

## **IV.2 Expression de la leptine dans les PBMCs et relations avec la pression artérielle (Publication No5).**

### *IV.2.1 Pourquoi étudier la leptine dans les PBMCs ?*

Comme démontré dans l'étude citée précédemment, la leptine a été pour la première fois trouvée exprimée dans les PBMCs non-stimulés d'individus relativement sains. En plus, le récepteur de la leptine a été parmi les gènes qui distinguaient les obèses des obèses/hypertendus et des hypertendus, suggérant un rôle spécifique de cette adipokine dans l'inflammation en relation avec les facteurs de risque de MCV.

Outre ses relations avec l'obésité, la leptine est considérée de plus en plus comme une hormone avec de multiples rôles physiologiques et diverses implications dans des états pathologiques tels que les maladies inflammatoires [Bernotiene et al. 2006; La Cava et Matarese 2004; Otero et al. 2006]. La leptine agit de façon variée dans les PBMCs [Sanchez-Margalet et al. 2003]. Des études *in vitro* ont déjà décrit que le traitement des PBMCs avec la leptine induit une réponse inflammatoire et également l'expression de ses récepteurs dans les PBMCs [Zarkesh-Esfahani et al. 2001]. Par ailleurs, la leptine est produite par des cellules immunitaires, suggérant des propriétés de cette adipokine dans les mécanismes d'inflammation par des actions para- ou autocrines [La Cava et Matarese 2004].

La production de la leptine par les lymphocytes a été déjà décrite mais seulement dans des cas particuliers. Plus précisément, chez un modèle animal avec une maladie auto-immune (encephalomyelitis), la leptine a été démontrée produite par les T lymphocytes et les auteurs ont proposé un rôle de cette molécule dans la prolifération [Sanna et al. 2003] cellulaire par une voie autocrine. Une deuxième étude, chez l'homme cette fois-ci, a détecté l'ARNm de la leptine dans les PBMCs des sujets ayant une hépatite chronique de nature virale [Stefanou et al. 2006].

Dans ce contexte, nous nous sommes posés la question de savoir si la leptine dans les PBMCs a des relations spécifiques avec les facteurs de risque des MCV, comme l'obésité et l'hypertension.

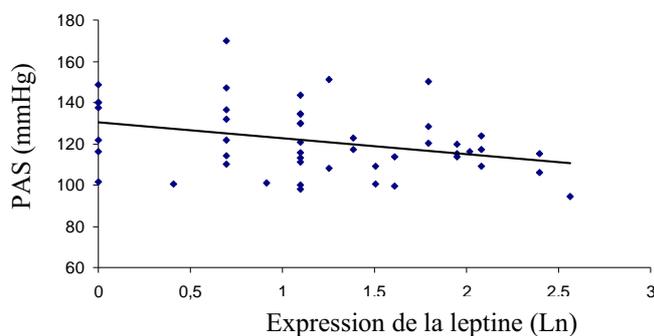
Les caractéristiques des sujets étudiés sont décrites dans l'Annexe 8. L'échantillon à étudier consiste en 83 sujets (les mêmes choisis pour la RT-PCR quantitative dans l'étude des PBMCs).

#### IV.2.2 Expression de la leptine dans les PBMCs

Comme dans l'étude des puces, l'ARNm de la leptine a été détecté chez des individus supposés sains. La présence de la leptine dans un échantillon élargi (comparé aux 20 individus des puces) avec une technique plus précise (RT-PCR quantitative), confirme de nouveau l'expression de ce gène par les PBMCs (courbe de fusion spécifique à la leptine). Cependant, la leptine n'a pas pu être détectée pour la totalité des individus (48 sur 83 sujets). En même temps, il est important de signaler que quelques points techniques du protocole utilisé pourraient être à l'origine de l'absence de l'ARNm pour une partie des individus analysés.

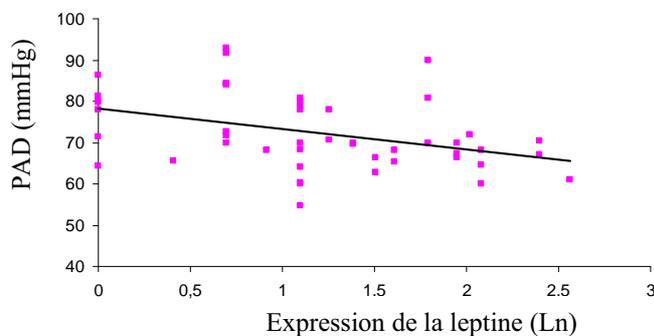
#### IV.2.3 Associations avec la PAD et la PAS

Pour les sujets qui ont exprimé la leptine, une association significative négative a été trouvée avec la PAS ( $P=0.03$ ) et PAD ( $P=0.003$ ). En ce qui concerne l'IMC, le glucose, le profil lipidique et les marqueurs d'inflammation (CRP, nombre de lymphocytes circulants) nous n'avons pas trouvé de relations. Les résultats figurent ci-dessous (Figures 16 et 17).



**Figure16. Analyse de régression linéaire pour les associations entre l'expression de la leptine dans les PBMCs et la PAS.**

La valeur de la leptine a été transformée en ln avant les analyses



**Figure 17. Analyse de régression linéaire pour les associations entre l'expression de la leptine dans les PBMCs et la PAD.**

La valeur de la leptine a été transformée en ln avant les analyses

Dans un but de vérifier et de mieux expliquer les associations trouvées, nous avons appliqué un modèle de régression multiple avec pour variables indépendantes les PAD et PAS (Tableau 11 et 12). Les valeurs ont été ajustées pour les variables âge, sexe et consommation de tabac. La leptine a pu expliquer 11% de la variation de la PAS ( $P=0.007$ ) et 11% également de la variation de la PAD ( $P=0.003$ ). Après l'introduction de l'IMC dans le modèle, le pourcentage expliqué était 9% et 10% pour la PAS et la PAD respectivement.

Variable indépendante	Modèle A			Modèle B		
	$\beta^1$ (se) <sup>2</sup>	<i>P</i>	R <sup>2</sup> <sup>3</sup>	$\beta$ (se)	<i>P</i>	R <sup>2</sup>
Intercept	13.1 (27.8)	<i>ns</i> <sup>4</sup>		-14.3 (28.4)	<i>ns</i>	
Hommes vs femmes	5.4 (4.1)	<i>ns</i>	6.30%	1.5 (4.2)	<i>ns</i>	6.30%
Age	2.3 (0.6)	<0.001	20.72%	2.1 (0.5)	<0.001	20.72%
Fumeurs	-6.2 (6.3)	<i>ns</i>	2.07%	-4.8 (6.0)	<i>ns</i>	2.07%
Ex-fumeurs	-6.1 (4.3)	<i>ns</i>	1.12%	-7.5 (4.2)	<i>ns</i>	1.12%
IMC	-	-	-	1.3 (0.5)	0.02	9.72%
Leptine	-8.1 (2.9)	0.0075	11.03%	-7.2 (2.8)	0.012	8.59%
R <sup>2</sup> total			41.2%			48.5%

**Tableau 11. Analyse de régression multiple entre PAS (variable dépendante) et sexe, âge, tabac et expression de la leptine dans les PBMCs (modèle A) et IMC (modèle B) (variables indépendantes).**

<sup>1</sup>coefficient de régression

<sup>2</sup>erreur standard

<sup>3</sup>coefficient de détermination

<sup>4</sup>non significatif ( $P>0.05$ )

**Tableau 12. Analyse de régression multiple entre PAD (variable dépendante) et sexe, âge, tabac et expression de la leptine dans les PBMCs (modèle A) et IMC (modèle B) (variables indépendantes).**

Variable Indépendante	Modèle A			Modèle B		
	$\beta^1$ (se) <sup>2</sup>	<i>P</i>	R <sup>2</sup> <sup>3</sup>	$\beta$ (se)	<i>P</i>	R <sup>2</sup>
Intercept	16.7 (14.0)	<i>ns</i> <sup>4</sup>		13.3 (14.9)	<i>ns</i>	
Hommes vs femmes	4.3 (2.0)	0.0389	11.02%	3.6 (2.2)	<i>ns</i>	11.02%
Age	1.1 (0.3)	<0.001	18.35%	1.0 (0.3)	<0.001	18.35%
Fumeurs	-5.7 (3.1)	<i>ns</i>	8.36%	-5.4 (3.1)	<i>ns</i>	8.36%
Ex-fumeurs	0.1 (2.1)	<i>ns</i>	0.47%	-0.1 (2.2)	<i>ns</i>	0.47%
IMC	-	-	-	0.2 (0.3)	<i>ns</i>	1.59%
Leptine	-4.4 (1.4)	0.0039	11.24%	-4.2 (1.4)	0.0058	10.32%
R <sup>2</sup> total			49.5%			50.1%

<sup>1</sup>coefficient de régression

<sup>2</sup>erreur standard

<sup>3</sup>coefficient de détermination

<sup>4</sup> non significatif ( $P>0.05$ )

La présence de la leptine dans les PBMCs des individus non-atteints de MCV ou de maladies inflammatoires et les relations trouvées avec la pression artérielle, suggèrent un rôle éventuel de cette adipokine dans la pré-pathologie de l'hypertension, via l'inflammation. Ces résultats vont dans la même direction que ceux trouvés dans notre étude en transcriptomique, où le récepteur de la leptine fait partie des gènes discriminant des individus avec hypertension.

Quelques études existent sur les relations de la leptine avec la pression artérielle [Beltowski 2006]. Des études ont démontré des associations de la leptine circulante avec l'hypertension primaire [Agata et al. 1997], ainsi que des associations avec la pression artérielle indépendamment de l'adiposité chez des individus normo- ou hypertendus [Kazumi et al. 1999; Narkiewicz et al. 1999; Schutte et al. 2005].

Contrairement aux associations positives décrites jusqu'à aujourd'hui, nous avons observé des associations négatives dans notre étude avec la PAS et la PAD. Ceci pourrait s'expliquer par deux facteurs. Premièrement, le fait que cette relation a été observée chez des individus supposés sains et par conséquent, dans des conditions physiologiques qui peuvent se modifier dans un état pathologique. Deuxièmement, nous avons étudié un type cellulaire spécifique et non pas le plasma. Cette relation reflète probablement un mécanisme régulateur spécifique aux PBMCs.

Quelques études existent sur les rôles spécifiques de la leptine dans la fonction vasculaire. Son récepteur a été trouvé dans les cellules endothéliales et la leptine peut moduler un nombre

de processus physiologiques comme l'angiogenèse, la formation de neo-intima et le stress oxydant de l'endothélium [Rahmouni et Haynes 2005]. Puisque les PBMCs sont impliqués dans l'inflammation liée à l'athérosclérose [Stoll et Bendszus 2006], et que des études mécanistiques ont démontré des actions importantes de la leptine sur la fonction vasculaire, la production de cette adipokine par les PBMCs pourrait faire partie de ce réseau de mécanismes.

Globalement, notre étude est la première qui prend en compte l'inflammation, en utilisant les PBMCs dans la relation entre la leptine et la pression artérielle.

#### *IV.2.4 Quelques réflexions sur l'expression de la leptine dans les PBMCs*

Les taux faibles de l'expression de la leptine, ainsi que l'absence de son ARNm chez certains individus ne pourraient pas être le fruit du hasard, puisque la leptine a été aussi détectée dans les PBMCs de notre étude 'puces'. Quelques explications pourraient être proposées.

L'étude des gènes dans les PBMCs non-induits des individus supposés sains, représente l'état physiologique, les gènes ayant des taux basiques d'expression faible. Très souvent, ces gènes sont induits lors de l'installation de la maladie. En parlant des PBMCs, ces cellules pourraient servir comme sentinelles d'une pathologie ou des variations environnementales. Le 'principe de sentinelle' est basé sur le fait que ces cellules partagent 80% d'expression des gènes avec n'importe quel tissu, les proposant ainsi comme un bio-senseur [Liew et al. 2006].

Il y a aussi un aspect technique à discuter. Le protocole que nous avons mis au point pour l'étude des PBMCs de la banque de la cohorte STANISLAS présente quelques particularités. Après avoir réalisé des tests sur plusieurs gènes de ménage pour pouvoir effectuer les PCR quantitatives, nous n'avons pas réussi à en choisir un qui soit suffisamment invariant. Ainsi, pour pouvoir comparer l'expression entre les échantillons, nous avons choisi de les ramener tous à la même concentration d'ADNc. Or, nous étions obligés de sélectionner une concentration minimale, permettant d'inclure dans les études des échantillons avec des concentrations faibles d'ADNc ; cette concentration n'étant peut-être pas suffisante pour la leptine, ceci pourrait être à l'origine des taux faibles d'expression trouvés pour cette molécule..

Pour conclure, nous avons pu confirmer la présence de la leptine et également quantifier cette adipokine dans les PBMCs. Nos résultats ouvrent de nouvelles pistes pour étudier les associations des adipokines avec la pression artérielle sous l'angle de l'inflammation.

Cependant, ces résultats sont préliminaires et demandent des études complémentaires, sur des individus d'une pression artérielle élevée.

### **IV.3 Expression de la visfatine dans les PBMCs et relations avec l'IMC et le TNF- $\alpha$ (Publication No6)**

#### *IV.3.1 Nouvelle adipokine : la visfatine*

Nos résultats préliminaires sur la leptine renforcent l'hypothèse de l'existence d'un réseau d'interactions entre les adipokines et l'inflammation. A l'exception des adipokines, ayant comme source principale le tissu adipeux, une autre molécule, considérée aussi comme adipokine [Fukuhara et al. 2005], présente un intérêt particulier. La visfatine a été trouvée pour la première fois, non pas dans les adipocytes mais, dans des PBMCs activés [Samal et al. 1994]. Cette molécule a des rôles dans les mécanismes d'inflammation, et les cellules du système immunitaire [Jia et al. 2004; Ognjanovic et al. 2001; Ye et al. 2005].

Jusqu'à présent, les propriétés physiologiques de cette adipokine sont peu connues. En plus, il n'est pas clair si la source principale de cette molécule est le tissu adipeux, et malgré sa présence dans les PBMCs activés *in vitro*, aucune recherche n'a été réalisée pour mettre en évidence son expression par les PBMCs non-induits chez l'homme, et ensuite quantifier son expression et l'étudier en relation avec l'inflammation.

Pour explorer cette nouvelle piste de recherche, nous avons choisi une population supposée saine et nous avons étudié l'expression de la visfatine, et de deux cytokines (TNF- $\alpha$  et IL-6) en relation avec l'IMC dans les PBMCs.

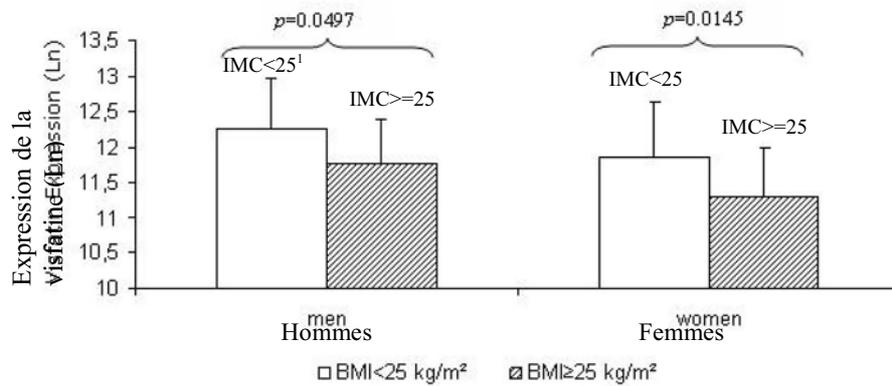
Les caractéristiques cliniques des 83 individus étudiés (les mêmes que pour l'étude sur la leptine) se présentent dans l'Annexe 8. La population est homogène en terme d'âge et de marge d'IMC (pas d'obésité sévère).

#### *IV.3.2 Expression de la visfatine et du TNF $\alpha$ dans les PBMCs*

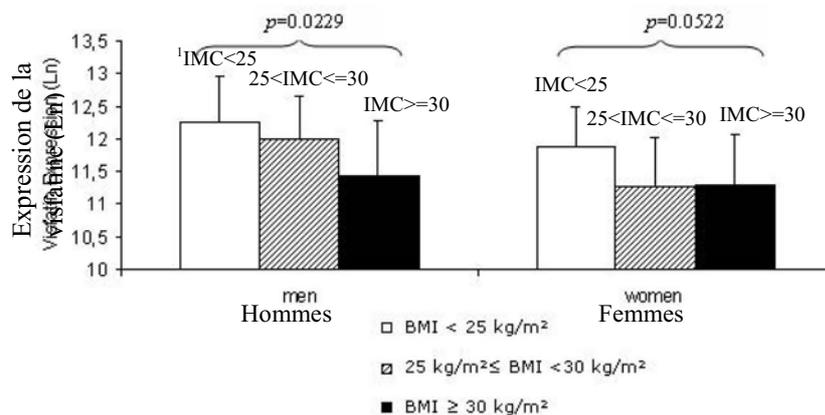
La visfatine a été bien exprimée dans les PBMCs. Nous n'avons pas trouvé d'association de la molécule avec le poids, le ratio taille/hanches, le glucose, le profil lipidique, ou avec des marqueurs d'inflammation tels que la CRP, les globules blancs circulants et le nombre et pourcentage de lymphocytes. En revanche, l'expression de l'adipokine a été associée négativement avec l'IMC ( $r=-0.21$ ,  $P=0.05$ ).

Lorsque nous avons séparé les sujets en normaux et en surpoids/obèses, nous avons observé la même association pour les hommes ( $P=0.05$ ) et pour les femmes ( $P=0.01$ ) (Figure 18). Cette association est restée significative après une séparation ultérieure des sujets en trois groupes

(normaux, en surpoids, obèses) pour les hommes ( $P=0.02$ ) et pour les femmes ( $P=0.05$ ) (Figure 19).



**Figure 18. Expression de la visfatine dans les PBMCs des individus normaux ( $\text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$ ) et en surpoids/obèses ( $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) chez les hommes et les femmes.**  
 Les valeurs sont des moyennes arithmétiques  $\pm$  SD  
 La valeur de la visfatine a été transformée en ln avant les analyses  
 $\text{kg/m}^2$



**Figure 19. Expression de la visfatine dans les PBMCs pour trois groupes d'IMC chez les hommes et les femmes: normaux ( $\text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$ ), en surpoids ( $25 \text{ kg/m}^2 \leq \text{IMC} < 30 \text{ kg/m}^2$ ), obèses ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ).**

Les valeurs sont des moyennes arithmétiques  $\pm$  SD  
 La valeur de la visfatine a été transformée en ln avant les analyses

<sup>1</sup>kg/m<sup>2</sup>

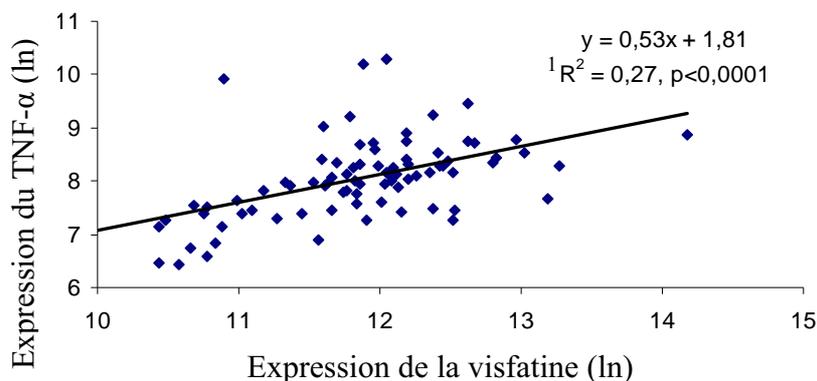
L'ARNm du TNF- $\alpha$  était associé négativement avec l'IMC ( $P=0.04$ ). Lors de la séparation des individus en trois groupes (normaux, en surpoids, obèses), l'association n'était plus significative.

Nous avons également trouvé une association positive entre le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 ( $P=0.05$ ).

#### IV.3.3 Associations de la visfatine avec le TNF- $\alpha$

Les taux d'expression de la visfatine et du TNF- $\alpha$  ont été très significativement associés ( $r^2=0.27$ ,  $p<0.0001$ ) (Figure 20).

Nous avons réalisé une analyse de régression multiple pour observer l'influence de la visfatine et du TNF- $\alpha$  sur l'IMC, en tenant compte de l'âge, du sexe, de la consommation de tabac et de la concentration de CRP circulante (variables indépendantes). Deux modèles statistiques ont été testés à cause de la colinéarité entre visfatine et TNF- $\alpha$ . Visfatine et TNF- $\alpha$  ont été significativement associés à l'IMC ( $p=0.001$ ,  $p=0.017$  respectivement). L'expression des deux molécules a pu expliquer 6.9% et 6.1% respectivement de la variabilité de l'IMC, pourcentages de même ordre que ceux pour la CRP dans le modèle (6.2%). Les modèles apparaissent dans le Tableau 13. Après ajustement de la visfatine sur la CRP, les associations avec l'IMC sont restées inchangées.



**Figure 20. Analyse de régression linéaire entre l'expression de la visfatine et du TNF- $\alpha$  dans les PBMCs.**

<sup>1</sup>coefficient of détermination

**Tableau 13. Analyse de régression multiple entre l'IMC (variable dépendante) et le sexe, l'âge, le tabac, la CRP et l'expression de la visfatine (modèle A) et du TNF- $\alpha$  (modèle B) (variables indépendantes) dans les PBMCs.**

Variable indépendante	Modèle A			Modèle B		
	$\beta^1$ (se) <sup>2</sup>	<i>P</i>	R <sup>2</sup> <sup>3</sup>	$\beta$ (se)	<i>P</i>	R <sup>2</sup>
Intercept	40.5 (9.0)	<0.001		28.9 (7.6)	<0.001	
Hommes vs femmes	2.62 (0.84)	0.002	9.6%	2.15 (0.85)	0.013	9.0%
Age	0.17 (0.12)	<i>ns</i> <sup>4</sup>	1.8%	0.16 (0.12)	<i>ns</i>	1.9%
Fumeurs	-0.83 (1.44)	<i>ns</i>	1.9%	-0.93 (1.49)	<i>ns</i>	1.9%
Ex-fumeurs	0.77 (0.87)	<i>ns</i>	1.6%	1.31 (0.89)	<i>ns</i>	1.9%
CRP	0.40 (0.16)	0.013	6.2%	0.26 (0.15)	0.091	2.3%
Visfatine	-1.95 (0.59)	0.001	6.9%	-	-	-
TNF- $\alpha$	-	-	-	-1.37 (0.56)	0.017	6.1%
R <sup>2</sup> Total			28.0%			23.1%

<sup>1</sup>coefficient de régression

<sup>2</sup>erreur standard

<sup>3</sup>coefficient de détermination

<sup>4</sup> non significatif ( $p > 0.05$ )

#### IV.3.4 Visfatine et inflammation de faible niveau

Deux éléments de la présente étude soutiennent l'implication de la visfatine dans l'inflammation : 1) son expression dans les PBMCs chez des individus supposés sains et 2) les associations trouvées avec l'expression du TNF- $\alpha$  dans ce même type de cellules.

La présence de cette molécule dans les PBMCs qui n'étaient ni activés par induction *in vitro* ni exposés à des conditions dites d'inflammation ou de micro-inflammation, suggère un rôle physiologique/physiopathologique de cette adipokine. En effet, les sujets étudiés ne souffrent pas de maladies inflammatoires aiguës ou chroniques et les taux circulants des deux marqueurs d'inflammation classiques, confirment l'absence d'aucune manifestation clinique d'inflammation.

La forte association de la visfatine avec le TNF- $\alpha$ , trouvée pour la première fois dans ce tissu, a été déjà démontrée pour d'autres types de cellules. Une étude utilisant une ligne cellulaire épithéliale d'origine amniotique, a observé que TNF- $\alpha$  et IL-6 induisent l'expression de la visfatine [Ognjanovic et al. 2001]. Chez des adipocytes en culture, le traitement avec TNF- $\alpha$  a réprimé l'expression de la visfatine d'une manière dépendante de la dose et de la durée de l'exposition au traitement [Kralisch et al. 2005a]. Toujours dans les adipocytes *in vitro*, une régulation négative de la visfatine par l'IL-6 a été mise en évidence [Kralisch et al. 2005b]. En ce qui concerne les PBMCs humains, il a été récemment montré que le traitement de ces

cellules avec de la visfatine recombinante, induit la production des cytokines TNF- $\alpha$  et IL-6 par les PBMCs et agit sur les fonctions des cellules immunitaires par des actions multiples [Moschen et al. 2007]. Dans la même logique, l'association entre la visfatine et le TNF- $\alpha$ , pourrait refléter une action directe de la visfatine sur la production du TNF- $\alpha$  par les PBMCs. Cependant, des études mécanistiques supplémentaires sont nécessaires pour mettre en évidence la causalité de cette association.

On peut noter que nous n'avons pas pu trouver une relation entre la visfatine et la cytokine IL-6, suggérant ainsi aucun effet direct de cette adipokine sur l'IL-6, contrairement à l'étude citée auparavant [Moschen et al. 2007]. Ceci n'est pas surprenant si on considère que les cytokines TNF- $\alpha$  et l'IL-6 ont des propriétés différentes. La production par exemple dans le tissu adipeux du TNF- $\alpha$  est associée avec des mécanismes inflammatoires autocrines/paracrines, alors que celle de l'IL-6 l'est avec des propriétés endocrines [Ronti et al. 2006] et le cas pourrait être similaire pour les PBMCs.

#### *IV.3.5 Visfatine et adiposité*

Concernant la nature négative de l'association de la visfatine avec l'IMC, elle pourrait être à l'origine d'un mécanisme 'feedback loop', c'est-à-dire d'un mécanisme qui compense la production et les actions de la visfatine par les autres tissus dans le cas de l'obésité (rôle protecteur). Notre étude n'est pas la seule à décrire une telle relation. Deux études ont démontré une association négative de l'ARNm de la visfatine par le tissu adipeux sous-cutané avec l'IMC et l'obésité [Pagano et al. 2006; Varma et al. 2007].

Quant à l'étude de la visfatine avec l'adiposité (représentée par l'IMC) dans le contexte de l'inflammation, une seule étude a proposé un rôle anti-inflammatoire de la visfatine dans le tissu adipeux, puisque l'ARNm de la visfatine dans ce tissu a été trouvé négativement corrélé avec le TNF- $\alpha$  circulant [Varma et al. 2007].

#### *IV.3.6 TNF- $\alpha$ et adiposité*

Nous avons trouvé une relation négative entre le TNF- $\alpha$  et l'IMC. D'une part, les taux circulants de cette cytokine, ainsi que ses taux d'expression dans les PBMCs ont été trouvés positivement associés avec l'obésité [Ghanim et al. 2004], ce qui renforce l'hypothèse que l'inflammation est liée à l'obésité par la production de molécules pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ . D'autre part, l'expression du TNF- $\alpha$  et sa concentration protéique dans les PBMCs, et également sa concentration circulante ont été toutes les deux associées avec l'obésité dans une deuxième étude [O'Rourke et al. 2006], supposant que cette association est

expliquée par un rôle compensatoire de cette cytokine comme réponse à l'expression élevée de la molécule dans d'autres tissus dans le cas de l'obésité.

#### *IV.3.7 CRP vs visfatine et TNF- $\alpha$*

La CRP circulante est un marqueur de l'inflammation globale et non pas spécifique à un état pathologique, et par conséquent elle a été associée avec l'inflammation liée à l'obésité [Visser et al. 1999]. Dans notre modèle de régression multiple, les expressions de la visfatine et du TNF- $\alpha$  dans les PBMCs ainsi que les taux circulants de CRP, ont pu expliquer une part similaire de la variation de l'IMC et ceci soulève une attribution non-négligeable de ces molécules (visfatine, TNF- $\alpha$ ) comparée à celle de ce marqueur classique (CRP).

#### *IV.3.8 Autres approches (tissu adipeux, plasma) pour l'étude de la visfatine en relation avec l'inflammation et l'obésité*

Depuis la considération de la visfatine en tant qu'adipokine, la plupart des travaux scientifiques se sont focalisés sur son étude dans le tissu adipeux et dans le plasma qui est la source classique d'extraction d'informations sur un état pathologique ou physiopathologique.

Le Tableau 14 récapitule ces résultats qui sont plutôt contradictoires.

La discordance des résultats est d'une origine multiple. Tout d'abord, l'hétérogénéité des populations choisies, en terme de : 1) nombre d'échantillons, 2) différentes pathologies, 3) degré d'obésité.

Quant au tissu adipeux, il est relativement hétérogène (adipocytes, macrophages..) et difficile d'accès. En plus, les propriétés de sécrétion et par conséquent les rôles et fonctions biologiques sont très dépendants des sites de répartition de la masse grasse [Fain et al. 2004].

Le plasma est facilement accessible mais il n'apporte pas toujours des informations spécifiques comme dans le cas de l'étude d'un tissu, d'autant plus que la visfatine a plusieurs sites de production (foie, muscles, cellules du système immunitaire...)[Samal et al. 1994].

Nous ne pourrions sûrement pas dire que l'approche des PBMCs est la meilleure par rapport au plasma et au tissu adipeux, puisque toute approche apporte des éléments intéressants. Toutefois, en utilisant les PBMCs nous dépassons les problèmes dus à l'accessibilité du tissu et à l'hétérogénéité, tout en gagnant en spécificité.

En conclusion, la présente étude est la première à étudier l'expression de la visfatine dans les PBMCs de sujets supposés sains. Son expression dans ce type de cellules, ainsi que ses associations avec l'expression du TNF $\alpha$  et avec l'IMC suggèrent une implication de cette

adipokine dans les mécanismes de l'inflammation de faible niveau liée à l'adiposité. La quantification de la visfatine révèle une autre source pour cette molécule et pourrait apporter de nouveaux éléments pour mieux comprendre l'état physiopathologique d'obésité.

**Tableau 14. Etudes sur les relations de la visfatine avec l'obésité/inflammation chez l'homme.**

But de l'étude	Population	Type d'échantillon	Résultats principaux	Référence
Rôle de la VF <sup>1</sup> dans l'obésité (première étude sur la VF et le tissu adipeux)	2 femmes supposées saines 101 sujets supposés sains	TAS <sup>2</sup> , TAV <sup>3</sup> plasma	VF préférentiellement produite par TAV + corrélation entre plasma VF et masse grasse viscérale	Fukuhara A <i>et al.</i> Science, 2005
Relations entre plasma, TAS, TAV ARNm VF et caractéristiques anthropométriques/paramètres métaboliques	189 individus avec une grande marge aux niveaux IMC, sensibilité à l'insuline et tolérance au glucose	plasma, TAS, TAV	+ corrélation de plasma VF avec TAV ARNm VF et IMC - corrélation entre plasma VF et TAS ARNm VF Pas de différence entre TAS vs TAV ARNm VF + corrélation entre TAV ARNm VF et IMC Pas de corrélation entre TAS ARNm VF et IMC	Berndt J. <i>et al.</i> Diabetes, 2005
Comparaison entre l'ARNm VF du TAS, TAV et plasma VF des sujets obèses et non-obèses	30 non-obèses/39 obèses (sous-groupe 9 non-obèses/12 obèses) 7 non-obèses/8 obèses	plasma (TAS) TAS, TAV	- corrélation entre plasma et TAS ARNm VF avec IMC et obésité  + corrélation entre TAV ARNm VF et obésité, IMC Pas de différence au niveau expression de VF dans le TAS chez les non-obèses et obèses	Pagano C. <i>et al.</i> J Clin Endocrinol Metab, 2006
Etude d'association du VF avec l'IMC, l'inflammation et la sensibilité à l'insuline	15 sujets obèses 75 sujets supposés sains	TAS, TAV TAS, plasma	Taux d'ARNm VF TAS et TAV similaires + corrélation entre TAV ARNm VF et IMC - corrélation entre TAS ARNm VF et IMC  - corrélation entre TAS ARNm VF et TNF- $\alpha$ circulant Pas de corrélation entre VF plasmatique et IMC	Varma V. <i>et al.</i> J Clin Endocrinol Metab, 2006
Observer les altérations de VF plasmatique après une perte de poids chez des obèses	31 sujets d'une obésité morbide/14 sujets non-obèses	plasma	+ corrélation entre plasma VF et obésité Diminution des taux plasmatiques VF après une perte de poids	Haider DG. <i>et al.</i> J Clin Endocrinol Metab, 2006
Evaluer les changements des taux des adipokines pro-inflammatoires après une perte de poids importante	10 femmes obèses	plasma	VF plasmatique diminue avec la perte de poids mais pas d'une façon uniforme	Manco M. <i>et al.</i> J Clin Endocrinol Metab, 2006
Etudier les associations entre VF plasmatique et paramètres anthropométriques	241 sujets avec diabète de type 2, intolérable au glucose, tolérance au glucose normale (Chinois)	plasma	- corrélation entre VF plasmatique et IMC chez les hommes	Jian WX. <i>Et al.</i> Diabet Med, 2006
Etudier les associations entre VF plasmatique et obésité	21 femmes obèses/16 non-obèses	plasma	+ corrélation entre VF plasmatique et obésité chez les femmes	Zahorska-Markiewicz <i>et al.</i> Metabolism, 2007

<sup>1</sup>visfatine; <sup>2</sup>tissu adipeux sous-cutané; <sup>3</sup>tissu adipeux viscéral

## **CHAPITRE 5 – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

## **I. Conclusions**

Durant ce travail de recherche, nous nous sommes intéressés à l'étude de la physiopathologie du SM en relation avec deux adipokines et avec l'inflammation. Le champ d'étude de ce syndrome est très vaste, et nous ne pourrions pas prétendre donner toutes les réponses aux questions qui se posent. Cependant, nous avons ciblé un domaine, celui de la pré-pathologie, relativement peu étudié et mal connu. Mais qu'entendons-nous par le terme 'pré-pathologie' ? L'étude de l'état pré-pathologique peut-elle avoir une utilité épidémiologique et/ou clinique ? La pré-pathologie est l'étape dite intermédiaire/de transition entre l'état sain et l'installation de la pathologie. C'est-à-dire que, dans cet état se trouvent, les individus ayant un ou plusieurs facteurs du syndrome métabolique, mais pas les individus avec des facteurs aggravés (obésité sévère, hypertension sévère...). Cet état caractérise une grande part de la population générale et justifie l'intérêt de l'étudier.

Nos résultats rapportent des points importants concernant le SM.

Premièrement, le rôle du sexe. Nous avons observé que, une prise de poids modeste, est associée avec des facteurs du SM différents chez les hommes et chez les femmes. De la même manière, la leptine circulante est associée différemment avec les facteurs du SM chez les hommes et les femmes. Nous pourrions ainsi dire que les différences hormonales selon le sexe semblent avoir un rôle majeur dans l'évolution des facteurs du SM et devraient être étudiées plus minutieusement. D'après ces résultats, il est nécessaire de bien décrire l'influence du sexe dans les études épidémiologiques. Autrement dit, il est indispensable d'étudier séparément les hommes et les femmes.

Deuxièmement, le rôle de la leptine. Est-elle une adipokine ou une hormone ? Plusieurs études ont qualifié cette molécule comme étant une hormone et nos résultats semblent être en accord avec ce point de vue. Les associations de la leptine avec plusieurs facteurs du SM, confirment encore une fois, la pluralité de ses actions. Nos observations ouvrent de nouvelles voies pour l'exploitation des activités de cette hormone.

Troisièmement, le rôle central de l'inflammation dans les facteurs du SM. L'expression de la leptine et de la visfatine par les PBMCs et leurs associations avec l'IMC et la pression artérielle, démontrent que le rôle du système immunitaire, par le contrôle des mécanismes d'inflammation, mérite d'être approfondi dans la physiopathologie du SM.

Nous considérons avoir renforcé nos connaissances dans la physiopathologie du SM. Nos études, qui doivent être complétées et élargies à d'autres populations, mettent en évidence de nouveaux éléments de la physiopathologie du SM.

## II. Perspectives

Nos études pourraient servir comme base et point de départ pour des études ultérieures que nous mettons en perspective :

### A. A court terme :

- ✓ Etudier la ressemblance familiale des facteurs du SM et l'évolution de cette ressemblance au fil du temps (5 ans) dans la cohorte STANISLAS pour décrire les parts de la génétique et de l'environnement.
- ✓ Etudier les associations de la leptine circulante avec les facteurs du SM mais en construisant des 'clusters' (comme pour l'étude sur l'évolution de l'IMC) pour observer éventuellement des groupes de facteurs et des mécanismes liés à la leptine.
- ✓ Elargir l'échantillon d'étude de l'expression de la leptine et de la visfatine dans les PBMCs et mesurer également leurs protéines dans les PBMCs ainsi que les taux circulants de ces adipokines pour avoir une image plus complète de leurs actions et de l'importance des PBMCs en tant que source de ces molécules.

### B. A long terme :

- ✓ Etudier la physiopathologie du SM et la réalité des différences hormonales entre hommes et femmes dans d'autres populations similaires à la cohorte STANISLAS (populations supposées saines). Ceci permettrait de confirmer nos résultats.
- ✓ Etudier les facteurs du SM chez des individus se trouvant dans des quantiles plus élevés d'IMC (obésité sévère) pour voir si les associations avec les facteurs du SM en particulier en fonction du sexe, changent selon le degré d'obésité.
- ✓ Etudier les associations de la leptine circulante avec les facteurs du SM mais en mesurant la masse grasse viscérale avec des méthodes très précises telles que la résonance magnétique nucléaire pour confirmer nos hypothèses suggérant une importance de la distribution tissulaire de la masse grasse.

## **BIBLIOGRAPHIE**

Abdullah SM, Khera A, Leonard D et al. Sex differences in the association between leptin and CRP: results from the Dallas Heart Study. *Atherosclerosis*. 2007;195:404-410.

Abramson JL, Lewis C, Murrain NV et al. Relation of C-reactive protein and tumor necrosis factor-alpha to ambulatory blood pressure variability in healthy adults. *Am J Cardiol*. 2006;98:649-652.

Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med*. 2005;22:1129-1133.

Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR et al. Diabetic dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17:238-246.

Afshar-Kharghan V, Thiagarajan P. Leukocyte adhesion and thrombosis. *Curr Opin Hematol*. 2006;13:34-39.

Agata J, Masuda A, Takada M et al. High plasma immunoreactive leptin level in essential hypertension. *Am J Hypertens*. 1997;10:1171-1174.

Aitken AE, Richardson TA, Morgan ET. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:123-149.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366:1059-1062.

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

Albrink MJ, Meigs JW. The relationship between serum triglycerides and skinfold thickness in obese subjects. *Ann N Y Acad Sci*. 1965;131:673-683.

Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S et al. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab*. 2008;34:2-11.

Arner P. Resistin: yet another adipokine tells us that men are not mice. *Diabetologia*. 2005;48:2203-2205.

Arora S. Leptin and its metabolic interactions - an update. *Diabetes Obes Metab*. 2008.

Astrup A, Finer N. Redefining type 2 diabetes: 'diabesity' or 'obesity dependent diabetes mellitus'? *Obes Rev*. 2000;1:57-59.

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

- Banerji MA, Buckley MC, Chaiken RL et al. Liver fat, serum triglycerides and visceral adipose tissue in insulin-sensitive and insulin-resistant black men with NIDDM. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1995;19:846-850.
- Barzilai N, Wang J, Massilon D et al. Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J Clin Invest.* 1997;100:3105-3110.
- Bell CG, Benzinou M, Siddiq A et al. Genome-wide linkage analysis for severe obesity in french caucasians finds significant susceptibility locus on chromosome 19q. *Diabetes.* 2004;53:1857-1865.
- Beltowski J. Role of leptin in blood pressure regulation and arterial hypertension. *J Hypertens.* 2006;24:789-801.
- Berndt J, Kloting N, Kralisch S et al. Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes.* 2005;54:2911-2916.
- Bernotiene E, Palmer G, Gabay C. The role of leptin in innate and adaptive immune responses. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:217.
- Brinton EA, Eisenberg S, Breslow JL. Increased apo A-I and apo A-II fractional catabolic rate in patients with low high density lipoprotein-cholesterol levels with or without hypertriglyceridemia. *J Clin Invest.* 1991;87:536-544.
- Bruun JM, Pedersen SB, Kristensen K et al. Effects of pro-inflammatory cytokines and chemokines on leptin production in human adipose tissue in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;190:91-99.
- Bullo M, Garcia-Lorda P, Megias I et al. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes Res.* 2003;11:525-531.
- Burns CJ, Boswell JM, Olsen GW. Liver enzyme activity and body mass index. *J Occup Environ Med.* 1996;38:1248-1252.
- Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002;29:23-39.
- Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2004;33:351-75, table.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y et al. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995;269:546-549.
- Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR et al. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet.* 1996;348:159-161.
- Cervero A, Dominguez F, Horcajadas JA et al. The role of the leptin in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2006;18:297-303.

- Chen MP, Chung FM, Chang DM et al. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:295-299.
- Cheng S, Grow MA, Pallaud C et al. A multilocus genotyping assay for candidate markers of cardiovascular disease risk. *Genome Res.* 1999;9:936-949.
- Chon H, Gaillard CA, van der Meijden BB et al. Broadly altered gene expression in blood leukocytes in essential hypertension is absent during treatment. *Hypertension.* 2004;43:947-951.
- Chudek J, Wiecek A. Adipose tissue, inflammation and endothelial dysfunction. *Pharmacol Rep.* 2006;58 Suppl:81-88.
- Cinti S, Matteis RD, Pico C et al. Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24:789-793.
- Cinti S. The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006;16:569-574.
- Cleland SJ, Sattar N, Petrie JR et al. Endothelial dysfunction as a possible link between C-reactive protein levels and cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond).* 2000;98:531-535.
- Clement K, Viguerie N, Poitou C et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J.* 2004;18:1657-1669.
- Cohen P, Friedman JM. Leptin and the control of metabolism: role for stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1). *J Nutr.* 2004;134:2455S-2463S.
- Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia.* 1978;14:141-148.
- Considine RV, Considine EL, Williams CJ et al. Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. *J Clin Invest.* 1995;95:2986-2988.
- Correia ML, Rahmouni K. Role of leptin in the cardiovascular and endocrine complications of metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab.* 2006;8:603-610.
- Costerousse O, Allegrini J, Lopez M et al. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J.* 1993;290 ( Pt 1):33-40.
- Czernichow S, Mennen L, Bertrais S et al. Relationships between changes in weight and changes in cardiovascular risk factors in middle-aged French subjects: effect of dieting. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26:1138-1143.
- Debey S, Schoenbeck U, Hellmich M et al. Comparison of different isolation techniques prior gene expression profiling of blood derived cells: impact on physiological responses, on overall expression and the role of different cell types. *Pharmacogenomics J.* 2004;4:193-207.

DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 1991;14:173-194.

Despres J.P. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med*. 2006; 38:52-63.

Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006;444:881-887.

Despres JP, Moorjani S, Lupien PJ et al. Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis*. 1990;10:497-511.

Di Girolamo N, Tedla N, Lloyd A et al. Expression of matrix metalloproteinases by human plasma cells and B lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1998;28:1773-1784.

Dina C, Meyre D, Gallina S et al. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet*. 2007;39:724-726.

Dogru T, Sonmez A, Tasci I et al. Plasma visfatin levels in patients with newly diagnosed and untreated type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;76:24-29.

Dubuc GR, Phinney SD, Stern JS et al. Changes of serum leptin and endocrine and metabolic parameters after 7 days of energy restriction in men and women. *Metabolism*. 1998;47:429-434.

Eady JJ, Wortley GM, Wormstone YM et al. Variation in gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells from healthy volunteers. *Physiol Genomics*. 2005;22:402-411.

Eberle E, Doering A, Keil U. Weight change and change of total cholesterol and high-density-lipoprotein cholesterol. Results of the MONICA Augsburg cohort study. *Ann Epidemiol*. 1991;1:487-492.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005;365:1415-1428.

Eckel RH, Yost TJ, Jensen DR. Alterations in lipoprotein lipase in insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1995;19 Suppl 1:S16-S21.

Einhorn D, Reaven GM, Cobin RH et al. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocr Pract*. 2003;9:237-252.

Engstrom G, Hedblad B, Stavenow L et al. Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain. *Diabetes*. 2003b;52:2097-2101.

Engstrom G, Stavenow L, Hedblad B et al. Inflammation-sensitive plasma proteins and incidence of myocardial infarction in men with low cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003a;23:2247-2251.

Esch T, Stefano G. Proinflammation: a common denominator or initiator of different pathophysiological disease processes. *Med Sci Monit*. 2002;8:HY1-HY9.

Fain JN, Madan AK, Hiler ML et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004;145:2273-2282.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:911-919.

Fernandez-Quintela A, Churruga I, Portillo MP. The role of dietary fat in adipose tissue metabolism. *Public Health Nutr*. 2007;10:1126-1131.

Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R et al. Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med*. 1987;317:350-357.

Foufelle F, Ferre P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J*. 2002;366:377-391.

Franks PW, Brage S, Luan J et al. Leptin predicts a worsening of the features of the metabolic syndrome independently of obesity. *Obes Res*. 2005;13:1476-1484.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 2007;316:889-894.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18:499-502.

Frohlich M, Imhof A, Berg G et al. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes Care*. 2000;23:1835-1839.

Fruehwald-Schultes B, Peters A, Kern W et al. Serum leptin is associated with serum uric acid concentrations in humans. *Metabolism*. 1999;48:677-680.

Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 2005;307:426-430.

Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I et al. Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med*. 1999;38:202-206.

Gagliardi AC, Miname MH, Santos RD. Uric acid: A marker of increased cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2008.

Galassi A, Reynolds K, He J. Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *Am J Med*. 2006;119:812-819.

Gerhardt CC, Romero IA, Canello R et al. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;175:81-92.

- Gerstein HC. Glucose: a continuous risk factor for cardiovascular disease. *Diabet Med.* 1997;14 Suppl 3:S25-S31.
- Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D et al. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation.* 2004;110:1564-1571.
- Giacomello A, Di Sciascio N, Quarantino CP. Relation between serum triglyceride level, serum urate concentration, and fractional urate excretion. *Metabolism.* 1997;46:1085-1089.
- Gibbons GH, Liew CC, Goodarzi MO et al. Genetic markers: progress and potential for cardiovascular disease. *Circulation.* 2004;109:IV47-IV58.
- Gil A, Maria AC, Gil-Campos M et al. Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. *Br J Nutr.* 2007;98 Suppl 1:S121-S126.
- Girman CJ, Rhodes T, Mercuri M et al. The metabolic syndrome and risk of major coronary events in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) and the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS). *Am J Cardiol.* 2004;93:136-141.
- Gong DW, Bi S, Pratley RE et al. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem.* 1996;271:3971-3974.
- Gossain VV, Gunaga KP, Carella MJ et al. Apolipoproteins in obesity: effect of weight loss. *J Med.* 1997;28:251-264.
- Goto T, Onuma T, Takebe K et al. The influence of fatty liver on insulin clearance and insulin resistance in non-diabetic Japanese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1995;19:841-845.
- Groop L, Orho-Melander M. The dysmetabolic syndrome. *J Intern Med.* 2001;250:105-120.
- Grundey SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation.* 2004b;109:433-438.
- Grundey SM, Hansen B, Smith SC, Jr. et al. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Circulation.* 2004a;109:551-556.
- Haddad JJ, Saade NE, Safieh-Garabedian B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *J Neuroimmunol.* 2002;133:1-19.
- Haider DG, Schindler K, Schaller G et al. Increased plasma visfatin concentrations in morbidly obese subjects are reduced after gastric banding. *J Clin endocrinol Metab.* 2006;91:1578-1581.

- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 1995;269:543-546.
- Hallikainen M, Kolehmainen M, Schwab U et al. Serum adipokines are associated with cholesterol metabolism in the metabolic syndrome. *Clin Chim Acta*. 2007;383:126-132.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-1695.
- Hardie LJ, Guilhot N, Trayhurn P. Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm Metab Res*. 1996;28:685-689.
- Havel PJ. Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proc Nutr Soc*. 2000;59:359-371.
- Hector J, Schwarzloh B, Goehring J et al. TNF-alpha alters visfatin and adiponectin levels in human fat. *Horm Metab Res*. 2007;39:250-255.
- Hegele RA, Joy TR, Al Attar SA et al. Thematic review series: Adipocyte Biology. Lipodystrophies: windows on adipose biology and metabolism. *J Lipid Res*. 2007;48:1433-1444.
- Heilbronn LK, Noakes M, Clifton PM. Energy restriction and weight loss on very-low-fat diets reduce C-reactive protein concentrations in obese, healthy women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:968-970.
- Hellstrom L, Wahrenberg H, Hruska K et al. Mechanisms behind gender differences in circulating leptin levels. *J Intern Med*. 2000;247:457-462.
- Hillier TA, Fagot-Campagna A, Eschwege E et al. Weight change and changes in the metabolic syndrome as the French population moves towards overweight: the D.E.S.I.R. cohort. *Int J Epidemiol*. 2006;35:190-196.
- Horiguchi M, Kimura M, Skurnick J et al. Parameters of lymphocyte Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> regulation and blood pressure: the gender effect. *Hypertension*. 1998;32:869-874.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259:87-91.
- Hsieh CH, Pei D, Kuo SW et al. Correlation between white blood cell count and metabolic syndrome in adolescence. *Pediatr Int*. 2007;49:827-832.
- Huang W, Dedousis N, Bandi A et al. Liver triglyceride secretion and lipid oxidative metabolism are rapidly altered by leptin in vivo. *Endocrinology*. 2006;147:1480-1487.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*. 2005;6:279-284.
- Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered*. 1950;41:317-318.

- Isomaa B, Almgren P, Tuomi T et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001;24:683-689.
- Isse N, Ogawa Y, Tamura N et al. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J Biol Chem*. 1995;270:27728-27733.
- Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC et al. Comparison of serum and cell-specific cytokines in humans. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8:1097-1103.
- Jia SH, Li Y, Parodo J et al. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Clin Invest*. 2004;113:1318-1327.
- Jian WX, Luo TH, Zhang HJ et al. The visfatin gene is associated with glucose and lipid metabolism in a Chinese population. *Diabet Med*. 2006;23:967-973.
- Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med*. 1989;149:1514-1520.
- Kawamoto R, Tomita H, Oka Y et al. Relationship between serum uric acid concentration, metabolic syndrome and carotid atherosclerosis. *Intern Med*. 2006;45:605-614.
- Kazumi T, Kawaguchi A, Katoh J et al. Fasting insulin and leptin serum levels are associated with systolic blood pressure independent of percentage body fat and body mass index. *J Hypertens*. 1999;17:1451-1455.
- Kim JA, Choi YS, Hong JI et al. Association of metabolic syndrome with white blood cell subtype and red blood cells. *Endocr J*. 2006;53:133-139.
- Kim MK, Lee JH, Kim H et al. Crystal structure of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor 1/nicotinamide phosphoribosyltransferase, free and in complex with the anti-cancer agent FK-866. *J Mol Biol*. 2006;362:66-77.
- Klaus S, Keijer J. Gene expression profiling of adipose tissue: individual, depot-dependent, and sex-dependent variabilities. *Nutrition*. 2004;20:115-120.
- Korner A, Garten A, Bluher M et al. Molecular characteristics of serum visfatin and differential detection by immunoassays. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:4783-4791.
- Kotur-Stevuljevic J, Memon L, Stefanovic A et al. Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *Clin Biochem*. 2007;40:181-187.
- Kralisch S, Klein J, Lossner U et al. Hormonal regulation of the novel adipocytokine visfatin in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol*. 2005a;185:R1-R8.
- Kralisch S, Klein J, Lossner U et al. Interleukin-6 is a negative regulator of visfatin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005b;289:E586-E590.
- Kuzma M, Jamrozik Z, Baranczyk-Kuzma A. Activity and expression of glutathione S-transferase pi in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Chim Acta*. 2006;364:217-221.

Kylin E. Studien ueber das Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikaämiesyndrom. Zentralblatt fure Innere Medizin 1923, 44: 105-127.

La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:371-379.

Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*. 2002;288:2709-2716.

Lakoski SG, Cushman M, Criqui M et al. Gender and C-reactive protein: data from the Multiethnic Study of Atherosclerosis (MESA) cohort. *Am Heart J*. 2006;152:593-598.

Lampe JW, Stepaniants SB, Mao M et al. Signatures of environmental exposures using peripheral leukocyte gene expression: tobacco smoke. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13:445-453.

Lao XQ, Neil TG, Jiang C et al. White blood cell count and the metabolic syndrome in older Chinese: The Guangzhou Biobank Cohort Study. *Atherosclerosis*. 2008.

Lee DH, Ha MH, Christiani DC. Body weight, alcohol consumption and liver enzyme activity--a 4-year follow-up study. *Int J Epidemiol*. 2001;30:766-770.

Lee DS, Evans JC, Robins SJ et al. Gamma glutamyl transferase and metabolic syndrome, cardiovascular disease, and mortality risk: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:127-133.

Lee JS, Kawakubo K, Kobayashi Y et al. Effects of ten year body weight variability on cardiovascular risk factors in Japanese middle-aged men and women. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25:1063-1067.

Lee S, Janssen I, Ross R. Interindividual variation in abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue: influence of measurement site. *J Appl Physiol*. 2004;97:948-954.

Leiter LA. From hyperglycemia to the risk of cardiovascular disease. *Rev Cardiovasc Med*. 2006;7 Suppl 2:S3-S9.

Lemieux I, Pascot A, Prud'homme D et al. Elevated C-reactive protein: another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:961-967.

Lewis GF, Steiner G. Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin-resistant state. *Diabetes Care*. 1996;19:390-393.

Li JJ, Chen JL. Inflammation may be a bridge connecting hypertension and atherosclerosis. *Med Hypotheses*. 2005;64:925-929.

Liangpunsakul S, Chalasani N. Unexplained elevations in alanine aminotransferase in individuals with the metabolic syndrome: results from the third National Health and Nutrition Survey (NHANES III). *Am J Med Sci*. 2005;329:111-116.

- Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:456S-460S.
- Liew CC, Ma J, Tang HC et al. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med.* 2006;147:126-132.
- Lin KC, Tsao HM, Chen CH et al. Hypertension was the major risk factor leading to development of cardiovascular diseases among men with hyperuricemia. *J Rheumatol.* 2004;31:1152-1158.
- Liu KH, Chan YL, Chan JC et al. Mesenteric fat thickness as an independent determinant of fatty liver. *Int J Obes (Lond).* 2006;30:787-793.
- Lonnqvist F, Nordfors L, Jansson M et al. Leptin secretion from adipose tissue in women. Relationship to plasma levels and gene expression. *J Clin Invest.* 1997;99:2398-2404.
- Luk T, Malam Z, Marshall JC. Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity. *J Leukoc Biol.* 2008;83:804-816.
- Ma J, Dempsey AA, Stamatou D et al. Identifying leukocyte gene expression patterns associated with plasma lipid levels in human subjects. *Atherosclerosis.* 2007;191:63-72.
- Maffei M, Fei H, Lee GH et al. Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:6957-6960.
- Malik S, Wong ND, Franklin SS et al. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation.* 2004;110:1245-1250.
- Manco M, Fernandez-Real JM, Equitani F et al. Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:483-490.
- Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med.* 1999;130:671-680.
- Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology.* 2003;37:917-923.
- Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F et al. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16:421-427.
- Marteau JB, Mohr S, Pfister M et al. Collection and storage of human blood cells for mRNA expression profiling: a 15-month stability study. *Clin Chem.* 2005a;51:1250-1252.
- Marteau JB, Zaiou M, Siest G et al. Genetic determinants of blood pressure regulation. *J Hypertens.* 2005b;23:2127-2143.

- Matarese G, La Cava A, Sanna V et al. Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin? *Trends Immunol.* 2002;23:182-187.
- Mauriege P, Marette A, Atgie C et al. Regional variation in adipose tissue metabolism of severely obese premenopausal women. *J Lipid Res.* 1995;36:672-684.
- Mayes JS, Watson GH. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev.* 2004;5:197-216.
- McMillan KP, Kuk JL, Church TS et al. Independent associations between liver fat, visceral adipose tissue, and metabolic risk factors in men. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007;32:265-272.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM et al. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J.* 2005;149:33-45.
- Mittelman SD, van Citters GW, Kirkman EL et al. Extreme insulin resistance of the central adipose depot in vivo. *Diabetes.* 2002;51:755-761.
- Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998;22:1145-1158.
- Moore DF, Li H, Jeffries N et al. Using peripheral blood mononuclear cells to determine a gene expression profile of acute ischemic stroke: a pilot investigation. *Circulation.* 2005;111:212-221.
- Morello F, de Boer RA, Steffensen KR et al. Liver X receptors alpha and beta regulate renin expression in vivo. *J Clin Invest.* 2005;115:1913-1922.
- Moschen AR, Kaser A, Enrich B et al. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol.* 2007;178:1748-1758.
- Murakami T, Michelagnoli S, Longhi R et al. Triglycerides are major determinants of cholesterol esterification/transfer and HDL remodeling in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1819-1828.
- Nakanishi N, Yoshida H, Nakamura K et al. Predictors for development of hyperuricemia: an 8-year longitudinal study in middle-aged Japanese men. *Metabolism.* 2001;50:621-626.
- Narkiewicz K, Somers VK, Mos L et al. An independent relationship between plasma leptin and heart rate in untreated patients with essential hypertension. *J Hypertens.* 1999;17:245-249.
- NCEP-ATPIII. 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;285:2486-2497.

Nemeth E, Tashima LS, Yu Z et al. Fetal membrane distention: I. Differentially expressed genes regulated by acute distention in amniotic epithelial (WISH) cells. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182:50-59.

Ognjanovic S, Bao S, Yamamoto SY et al. Genomic organization of the gene coding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *J Mol Endocrinol.* 2001;26:107-117.

Ogura T, Matsuura K, Otsuka F et al. Serum leptin correlates with serum uric acid but not serum testosterone in non-obese male adolescents. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 2000;107:55-64.

Oh SY, Cho YK, Kang MS et al. The association between increased alanine aminotransferase activity and metabolic factors in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 2006;55:1604-1609.

Onat A, Uyarel H, Hergenc G et al. Serum uric acid is a determinant of metabolic syndrome in a population-based study. *Am J Hypertens.* 2006;19:1055-1062.

O'Rourke RW, Kay T, Lyle EA et al. Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity. *Clin Exp Immunol.* 2006;146:39-46.

Otero M, Lago R, Gomez R et al. Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45:944-950.

Pagano C, Pilon C, Olivieri M et al. Reduced plasma visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:3165-3170.

Pallaud C, Gueguen R, Sass C et al. Genetic influences on lipid metabolism trait variability within the Stanislas Cohort. *J Lipid Res.* 2001a;42:1879-1890.

Pallaud C, Sass C, Zannad F et al. APOC3, CETP, fibrinogen, and MTHFR are genetic determinants of carotid intima-media thickness in healthy men (the Stanislas cohort). *Clin Genet.* 2001b;59:316-324.

Papakitsou EF, Margioris AN, Dretakis KE et al. Body mass index (BMI) and parameters of bone formation and resorption in postmenopausal women. *Maturitas.* 2004;47:185-193.

Pascual G, Glass CK. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17:321-327.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 1995;269:540-543.

- Pieroni L, Bastard JP, Piton A et al. Interpretation of circulating C-reactive protein levels in adults: body mass index and gender are a must. *Diabetes Metab.* 2003;29:133-138.
- Pincock S. Paul Zimmet: fighting the "diabesity" pandemic. *Lancet.* 2006;368:1643.
- Power ML, Schulkin J. Sex differences in fat storage, fat metabolism, and the health risks from obesity: possible evolutionary origins. *Br J Nutr.* 2008;99:931-940.
- Puddu GM, Cravero E, Arnone G et al. Molecular aspects of atherogenesis: new insights and unsolved questions. *J Biomed Sci.* 2005;12:839-853.
- Radich JP, Mao M, Stepaniants S et al. Individual-specific variation of gene expression in peripheral blood leukocytes. *Genomics.* 2004;83:980-988.
- Rahmouni K, Haynes WG. Endothelial effects of leptin: implications in health and diseases. *Curr Diab Rep.* 2005;5:260-266.
- Rainwater DL, Mitchell BD, Comuzzie AG et al. Association among 5-year changes in weight, physical activity, and cardiovascular disease risk factors in Mexican Americans. *Am J Epidemiol.* 2000;152:974-982.
- Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988;37:1595-1607.
- Reaven GM. Insulin resistance/compensatory hyperinsulinemia, essential hypertension, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:2399-2403.
- Rebuffe-Scrive M, Anderson B, Olbe L et al. Metabolism of adipose tissue in intraabdominal depots in severely obese men and women. *Metabolism.* 1990;39:1021-1025.
- Rebuffe-Scrive M, Andersson B, Olbe L et al. Metabolism of adipose tissue in intraabdominal depots of nonobese men and women. *Metabolism.* 1989;38:453-458.
- Rector RS, Thyfault JP, Wei Y et al. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: An update. *World J Gastroenterol.* 2008;14:185-192.
- Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation.* 2003;108:1546-1551.
- Reinehr T, Stoffel-Wagner B, Roth CL et al. High-sensitive C-reactive protein, tumor necrosis factor alpha, and cardiovascular risk factors before and after weight loss in obese children. *Metabolism.* 2005;54:1155-1161.
- Rentsch J, Chiesi M. Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett.* 1996;379:55-59.
- Revollo JR, Korner A, Mills KF et al. Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab.* 2007;6:363-375.

- Ridker PM, Buring JE, Cook NR et al. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation*. 2003;107:391-397.
- Rolland-Cachera MF, Cole TJ, Sempe M et al. Body Mass Index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin.Nutr*. 1991; 45:13-21.
- Rongvaux A, Shea RJ, Mulks MH et al. Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur J Immunol*. 2002;32:3225-3234.
- Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64:355-365.
- Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X et al. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes*. 1998;47:699-713.
- Ruggiero C, Cherubini A, Ble A et al. Uric acid and inflammatory markers. *Eur Heart J*. 2006;27:1174-1181.
- Ryan MC, Wilson AM, Slavin J et al. Associations between liver histology and severity of the metabolic syndrome in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care*. 2005;28:1222-1224.
- Saad MF, Damani S, Gingerich RL et al. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:579-584.
- Sacks FM, Campos H. Clinical review 163: Cardiovascular endocrinology: Low-density lipoprotein size and cardiovascular disease: a reappraisal. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:4525-4532.
- Samal B, Sun Y, Stearns G et al. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol*. 1994;14:1431-1437.
- Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C, Santos-Alvarez J et al. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin Exp Immunol*. 2003;133:11-19.
- Sanna V, Di Giacomo A, La Cava A et al. Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. *J Clin Invest*. 2003;111:241-250.
- Scarpace PJ, Zhang Y. Elevated leptin: consequence or cause of obesity? *Front Biosci*. 2007;12:3531-3544.
- Schreiner PJ, Terry JG, Evans GW et al. Sex-specific associations of magnetic resonance imaging-derived intra-abdominal and subcutaneous fat areas with conventional anthropometric indices. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol*. 1996;144:335-345.

Schutte R, Huisman HW, Schutte AE et al. Leptin is independently associated with systolic blood pressure, pulse pressure and arterial compliance in hypertensive African women with increased adiposity: the POWIRS study. *J Hum Hypertens*. 2005;19:535-541.

Scuteri A, Sanna S, Chen WM et al. Genome-Wide Association Scan Shows Genetic Variants in the FTO Gene Are Associated with Obesity-Related Traits. *PLoS Genet*. 2007;3:e115.

Segal KR, Van Loan M, Fitzgerald PI et al. Lean body mass estimation by bioelectrical impedance analysis: a four-site cross-validation study. *Am J Clin Nutr*. 1988;47:7-14.

Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM et al. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:3023-3028.

Shanik MH, Xu Y, Skrha J et al. Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care*. 2008;31 Suppl 2:S262-S268.

Sicree R, Shaw JE, Zimmet PZ. The global burden of diabetes. *Diabetes Atlas*. 2<sup>nd</sup> edition. Brussels: International Diabetes Federation 2003, p. 15-71.

Siest G, Visvikis S, Herbeth B et al. Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. *Clin Chem Lab Med*. 1998;36:35-42.

Siiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr*. 1987;45:277-282.

Silver DL, Jiang XC, Tall AR. Increased high density lipoprotein (HDL), defective hepatic catabolism of ApoA-I and ApoA-II, and decreased ApoA-I mRNA in ob/ob mice. Possible role of leptin in stimulation of HDL turnover. *J Biol Chem*. 1999;274:4140-4146.

Singer G, Granger DN. Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. *Microcirculation*. 2007;14:375-387.

Sinha MK, Sturis J, Ohannesian J et al. Ultradian oscillations of leptin secretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;228:733-738.

Sjostrom CD, Peltonen M, Sjostrom L. Blood pressure and pulse pressure during long-term weight loss in the obese: the Swedish Obese Subjects (SOS) Intervention Study. *Obes Res*. 2001;9:188-195.

Smith J, Al Amri M, Sniderman A et al. Visfatin concentration in Asian Indians is correlated with high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A1. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;65:667-672.

Smith SR. The endocrinology of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1996;25:921-942.

- Sniderman AD, Faraj M. Apolipoprotein B, apolipoprotein A-I, insulin resistance and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol*. 2007;18:633-637.
- Stefanou N, Satra M, Papanikolaou V et al. Leptin receptor isoforms mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic viral hepatitis. *Exp Biol Med* (Maywood ). 2006;231:1653-1663.
- Steffensen KR, Neo SY, Stulnig TM et al. Genome-wide expression profiling; a panel of mouse tissues discloses novel biological functions of liver X receptors in adrenals. *J Mol Endocrinol*. 2004;33:609-622.
- Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke*. 2006;37:1923-1932.
- Sturzenbaum SR, Kille P. Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2001;130:281-289.
- Sutherland JP, McKinley B, Eckel RH. The metabolic syndrome and inflammation. *Metab Syndr Relat Disord*. 2004;2:82-104.
- Taghibiglou C, Rashid-Kolvear F, Van Iderstine SC et al. Hepatic very low density lipoprotein-ApoB overproduction is associated with attenuated hepatic insulin signaling and overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in a fructose-fed hamster model of insulin resistance. *J Biol Chem*. 2002;277:793-803.
- Takahashi S, Yamamoto T, Tsutsumi Z et al. Close correlation between visceral fat accumulation and uric acid metabolism in healthy men. *Metabolism*. 1997;46:1162-1165.
- Tanner JM. Growth of adolescents. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1962.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995;83:1263-1271.
- Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem*. 1997;272:6093-6096.
- Thorand B, Baumert J, Doring A et al. Sex differences in the relation of body composition to markers of inflammation. *Atherosclerosis*. 2006;184:216-224.
- Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:772-783.
- Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004;92:347-355.
- Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 1999;79:1-71.
- Ukkola O, Kesaniemi YA. Leptin and high-sensitivity C-reactive protein and their interaction in the metabolic syndrome in middle-aged subjects. *Metabolism*. 2007;56:1221-1227.

Vague J. Sexual differentiation, a factor affecting the forms of obesity. *Presse Med* 1947, 30: 339-340.

Valerio A, Ghisi V, Dossena M et al. Leptin increases axonal growth cone size in developing mouse cortical neurons by convergent signals inactivating glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem*. 2006;281:12950-12958.

Valtuna S, Numeroso F, Ardigo D et al. Relationship between leptin, insulin, body composition and liver steatosis in non-diabetic moderate drinkers with normal transaminase levels. *Eur J Endocrinol*. 2005;153:283-290.

van d, V, Nong Z, O'Neil C et al. Pre-B-cell colony-enhancing factor regulates NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity and promotes vascular smooth muscle cell maturation. *Circ Res*. 2005;97:25-34.

Van H, V, Reynisdottir S, Eriksson P et al. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes*. 1998;47:913-917.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3:RESEARCH0034.

Varma V, Yao-Borengasser A, Rasouli N et al. Human visfatin expression: relationship to insulin sensitivity, intramyocellular lipids, and inflammation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:666-672.

Verdecchia P, Schillaci G, Reboldi G et al. Relation between serum uric acid and risk of cardiovascular disease in essential hypertension. The PIUMA study. *Hypertension*. 2000;36:1072-1078.

Visser M, Bouter LM, McQuillan GM et al. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA*. 1999;282:2131-2135.

Visvikis-Siest S, Marteau JB. Genetic variants predisposing to cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17:139-151.

Visvikis-Siest S, Siest G. The STANISLAS Cohort: a 10-year follow-up of supposed healthy families. Gene-environment interactions, reference values and evaluation of biomarkers in prevention of cardiovascular diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2008; 46:733-747.

Wahle M, Neumann RP, Moritz F et al. Beta2-adrenergic receptors mediate the differential effects of catecholamines on cytokine production of PBMC. *J Interferon Cytokine Res*. 2005;25:384-394.

Wang P, Mariman E, Renes J et al. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol*. 2008;216:3-13.

- Wang P, van Greevenbroek MM, Bouwman FG et al. The circulating PBEF/NAMPT/visfatin level is associated with a beneficial blood lipid profile. *Pflugers Arch*. 2007;454:971-976.
- Wannamethee SG, Tchernova J, Whincup P et al. Plasma leptin: associations with metabolic, inflammatory and haemostatic risk factors for cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2007;191:418-426.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112:1796-1808.
- Welborn TA, Breckenridge A, Rubinstein AH et al. Serum-insulin in essential hypertension and in peripheral vascular disease. *Lancet*. 1966;1:1336-1337.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005;115:1111-1119.
- Whitney AR, Diehn M, Popper SJ et al. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:1896-1901.
- WHO consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part I. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. World Health Organisation, non-communicable disease surveillance. Technical report NCS/99-2 1999. W.H.O Geneva.
- WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1995, 854: 1-452.
- Wibaut-Berlaimont V, Randi AM, Mandryko V et al. Atorvastatin affects leukocyte gene expression in dyslipidemia patients: in vivo regulation of hemostasis, inflammation and apoptosis. *J Thromb Haemost*. 2005;3:677-685.
- Wiesner G, Morash BA, Ur E et al. Food restriction regulates adipose-specific cytokines in pituitary gland but not in hypothalamus. *J Endocrinol*. 2004;180:R1-R6.
- Wing RR, Jeffery RW, Burton LR et al. Change in waist-hip ratio with weight loss and its association with change in cardiovascular risk factors. *Am J Clin Nutr*. 1992;55:1086-1092.
- Yamada J, Tomiyama H, Yambe M et al. Elevated serum levels of alanine aminotransferase and gamma glutamyltransferase are markers of inflammation and oxidative stress independent of the metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2006;189:198-205.
- Yanai H, Tomono Y, Ito K et al. The underlying mechanisms for development of hypertension in the metabolic syndrome. *Nutr J*. 2008;7:10.
- Ye SQ, Simon BA, Maloney JP et al. Pre-B-cell colony-enhancing factor as a potential novel biomarker in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:361-370.

Yoo TW, Sung KC, Shin HS et al. Relationship between serum uric acid concentration and insulin resistance and metabolic syndrome. *Circ J*. 2005;69:928-933.

Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ et al. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:972-978.

Zahorska-Markewicz B, Olszanecka-Glinianowicz M, Janowska J et al. Serum concentration of visfatin in obese women. *Metabolism*. 2007 ; 56 :1131-1134.

Zambon A, Hokanson JE, Brown BG et al. Evidence for a new pathophysiological mechanism for coronary artery disease regression: hepatic lipase-mediated changes in LDL density. *Circulation*. 1999;99:1959-1964.

Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA et al. High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J Immunol*. 2001;167:4593-4599.

Zhang F, Basinski MB, Beals JM et al. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*. 1997;387:206-209.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372:425-432.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001;414:782-787.

## **ANNEXES**

## ANNEXE 1. Caractéristiques et variables associés au SM par catégorie d'évolution de l'IMC en 5 ans

	Hommes				Femmes				P <sup>2</sup>
	P <sup>1</sup>		P <sup>1</sup>		P <sup>1</sup>		P <sup>1</sup>		
	< 0 kg/m <sup>2</sup> n=121	0 to 1 kg/m <sup>2</sup> n=198	1 to 2 kg/m <sup>2</sup> n=145	> 2 kg/m <sup>2</sup> n=80	< 0 kg/m <sup>2</sup> n=125	0 to 1 kg/m <sup>2</sup> n=182	1 to 2 kg/m <sup>2</sup> n=123	> 2 kg/m <sup>2</sup> n=125	
Age (ans)	42.3±4.4 <sup>3</sup>	42.1±4.6	42.4±5.6	41.7±4.1	39.7±4.4	40.4±4.8	40.6±4.5	40.1±5.149	-
Poids (kg)	78.6±11.8	75.4±9.7	75.7±10.0	79.0±12.6	61.8±10.3	59.2±8.7	60.8±10.1	63.0±10.5	0.009
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25.7±3.4	24.8±2.7	25.1±2.9	26.2±3.4	23.7±3.5	22.7±3.1	23.4±3.9	24.6±4.01	≤0.001
Masse grasse (kg)	19.1 ± 6.9	17.1 ± 5.5	17.5 ± 5.6	19.8 ± 7.1	20.5 ± 6.8	18.7 ± 5.8	19.8 ± 7.1	21.8 ± 7.2	≤0.001
Masse grasse (%)	23.6 ± 5.6	22.2 ± 4.9	22.7 ± 4.7	24.4 ± 5.2	32.3 ± 5.3	30.9 ± 5.1	31.8 ± 5.8	33.8 ± 5.9	≤0.001
Rapport taille/hanches	0.91±0.06	0.89±0.06	0.89±0.06	0.92±0.06	0.76±0.05	0.76±0.05	0.76±0.05	0.78±0.06	0.010
Tour de taille (cm)	89.4±10.0	86.7±7.7	87.3±7.9	90.4±9.6	74.8±8.6	72.9±7.5	74.2±9.2	77.2±9.0	≤0.001
Consommation d'alcool (g/jour)	19.5±21.0	22.0±25.0	23.8±25.2	23.5±24.6	2.6±5.6	5.5±10.1	5.0±9.2	4.7±8.8	0.038
Consommation de cigarettes (cig/jour)	4.1±7.5	4.2±8.8	4.7±8.8	6.6±10.0	2.5±5.8	2.8±6.3	1.4±3.8	3.4±9.3	0.104
Activité physique (unite arbitraire)	1.5±0.6	1.6±0.6	1.5±0.6	1.4±0.5	1.2±0.5	1.1±0.4	1.1±0.4	1.1±0.4	0.792
<b>Consommation de médicaments (%)</b>									
Antihypertenseurs	3.3	1.0	5.5	3.8	1.6	0.5	3.3	0.8	0.238
Hypolipémiants	5.0	6.6	9.0	1.0	1.6	0.5	2.4	5.6	0.034
Thérapie hormonale	-	-	-	-	9.6	8.2	10.6	11.2	0.834
Contraceptives oraux	-	-	-	-	20.8	19.8	20.3	25.6	0.638
PAS (mmHg)	126.5±10.6	126.9±11.4	128.3±12.6	128.1±11.5	119.4±11.0	119.4±13.6	118.7±12.6	120.6±11.5	0.664
PAD (mmHg)	78.2±8.5	76.5±10.0	78.2±9.5	77.9±9.6	72.2±9.8	72.9±10.6	71.8±10.8	72.3±10.0	0.831
TGL (mmol/L) <sup>†</sup>	1.19 <sup>4</sup>	1.12	1.10	1.25	0.86	0.81	0.78	0.86	0.181
Cholestérol (mmol/L)	(0.68-2.10)	(0.68-1.86)	(0.70-1.74)	(0.72-2.19)	(0.58-1.28)	(0.54-1.22)	(0.48-1.25)	(0.56-1.30)	0.217
ApoB (g/L)	6.11±1.11	5.92±1.02	5.81±1.03	6.08±1.03	5.56±0.93	5.57±0.89	5.50±0.92	5.37±0.85	0.499
ApoA1 (g/L)	1.17±0.27	1.13±0.26	1.10±0.27	1.17±0.26	1.00±0.24	0.98±0.21	0.95±0.22	0.97±0.21	0.024
HDL-C (mmol/L)	1.53±0.24	1.55±0.21	1.56±0.24	1.58±0.24	1.65±0.26	1.73±0.26	1.72±0.26	1.66±0.27	0.005
ApoE (mg/L)	1.40 ± 0.37	1.41±0.33	1.43±0.37	1.43±0.35	1.66±0.42	1.76±0.41	1.80±0.41	1.64±0.41	0.694
Glucose (mmol/L)	39.3	37.6	38.6	39.4	35.8	35.0	36.4	35.6	0.445
Acide urique (µmol/L)	(28.7-53.7)	(28.8-49.1)	(29.2-51.1)	(29.4-53.0)	(27.5-46.6)	(26.9-45.6)	(27.5-48.2)	(26.1-48.4)	0.315
	5.18±0.48	5.04±0.47	5.16±0.45	5.22±0.45	4.90±0.45	4.84±0.37	4.89±0.41	4.85±0.40	
	326.0±69.1	306.6±61.1	312.2±64.2	319.1±76.4	234.1±49.0	227.7±43.4	225.2±46.7	234.1±51.6	

## ANNEXE 1 (SUITE)

Hs-CRP (mg/L)	0.88 (0.33-2.31)	0.81 (0.29-2.23)	0.94 (0.39-2.26)	1.00 (0.33-3.03)	0.311	0.84 (0.30-2.38)	0.90 (0.32-2.52)	0.86 (0.30-2.44)	1.14 (0.35-3.71)	0.090
Haptoglobine (g/L)	0.99±0.41	1.01±0.48	1.07±0.42	1.05±0.46	0.427	1.03±0.37	1.04±0.38	1.08±0.42	1.09±0.44	0.481
Orosomucoïde (g/L)	0.78±0.18	0.75±0.16	0.77±0.14	0.77±0.17	0.510	0.70±0.16	0.68±0.17	0.70±0.17	0.73±0.21	0.107
Activité ASAT (U/L)	23.0 (16.5-31.9)	22.3 (16.9-29.6)	23.3 (17.6-30.9)	22.2 (15.9-31.0)	0.483-	17.6 (13.6-22.8)	17.5 (13.4-22.8)	17.2 (13.3-22.2)	16.9 (13.3-21.5)	0.588
Activité ALAT (U/L)	30.4 (18.7-49.5)	27.9 (18.4-42.3)	30.1 (19.1-47.4)	29.4 (19.9-43.5)	0.256	18.7 (12.5-28.1)	17.2 (11.2-26.3)	18.1 (12.1-27.2)	17.3 (11.2-26.7)	0.292
Activité GGT (U/L)	29.2 (16.9-50.4)	27.2 (15.8-46.8)	28.8 (15.8-52.5)	30.5 (18.3-51.1)	0.405	16.0 (10.2-25.1)	15.5 (9.7-24.7)	15.9 (9.4-26.7)	16.4 (10.1-26.7)	0.753
Activité PAL (U/L)	68.7±16.7	66.4±17.2	67.6±17.6	65.2±17.2	0.458	55.1±14.3	55.4±15.2	54.6±14.4	56.1±14.0	0.874
Globules blancs (10 <sup>9</sup> /L)	6.76±1.922	6.75±1.89	6.84±1.74	6.86±1.92	0.954	6.96±1.86	6.94±1.84	6.65±1.73	7.37±1.71	0.019

<sup>1</sup>P valeur pour les hommes et <sup>2</sup>P valeur pour les femmes, différences entre les 4 groupes : ANOVA ou test de chi-2

<sup>3</sup>Moyennes arithmétiques ± SD

<sup>4</sup>Moyennes géométriques ± intervalle à 1 SD

Les valeurs pour l'ApoE, les TGL, les enzymes ASAT, ALAT, GGT et la Hs-CRP ont été transformées en log10 avant les analyses

**ANNEXE 2. Coefficient de corrélation partiel entre l'évolution en 5 ans des facteurs associés au SM chez les hommes et les femmes (matrice des corrélations).**

ΔPAS	1.000	0.637	0.119	0.089	0.128	0.051	-0.027	0.056	0.143	0.091	0.095	0.102	0.089	0.075	0.124	0.121	0.090	0.030
ΔPAD		1.000	0.117	0.112	0.153	0.013	-0.040	0.041	0.180	0.091	0.091	0.062	0.072	0.070	0.118	0.106	0.085	0.004
ΔTGL			1.000	0.334	0.404	-0.033	-0.228	0.528	0.063	0.187	0.124	0.152	0.180	0.050	0.150	0.240	0.126	0.136
ΔCholestérol				1.000	0.836	0.260	0.196	0.490	0.002	0.216	0.035	0.062	0.137	0.074	0.139	0.238	0.184	0.035
ΔApoB					1.000	0.102	-0.042	0.417	0.007	0.249	0.090	0.173	0.219	0.075	0.150	0.226	0.164	0.060
ΔApoAI						1.000	0.621	0.120	-0.036	-0.023	-0.044	-0.091	-0.082	0.064	-0.021	0.017	-0.065	-0.027
ΔHDL-C							1.000	0.086	-0.076	-0.074	-0.117	-0.178	-0.167	0.045	-0.036	-0.034	-0.035	-0.038
ΔApoE								1.000	-0.018	0.208	-0.003	0.122	0.236	0.117	0.195	0.236	0.154	0.070
ΔGlucose									1.000	0.040	0.032	0.027	0.029	0.009	0.075	0.067	0.098	-0.128
ΔAcide urique										1.000	0.131	0.092	0.180	0.068	0.124	0.193	0.039	0.011
ΔHs-CRP											1.000	0.433	0.374	0.029	0.049	0.098	0.185	0.203
ΔHaptoglobine												1.000	0.591	-0.050	0.007	0.111	0.267	0.196
ΔOrosomucoïde													1.000	0.040	0.112	0.172	0.377	0.203
ΔASAT														1.000	0.771	0.365	0.120	-0.068
ΔALAT															1.000	0.566	0.166	0.001
ΔGGT																1.000	0.281	0.057
ΔPAL																	1.000	0.079
ΔGlobules blancs																		1.000

Ajustement sur l'âge, le sexe et sur les valeurs au  $t_0$  avant les analyses

For n = 1099, le niveau de significativité de  $P=0.05$ , 0.01 et 0.001 sont atteints pour des coefficients de corrélation de 0.058, 0.076 et 0.097, respectivement

**ANNEXE 3. Caractéristiques et variables associées au SM dans la population de 384 individus étudiés, stratifiées par sexe.**

	Hommes n=192	Femmes n=192	<i>P</i> <sup>1</sup>
Age (ans)	42.2±4.8 <sup>2</sup>	39.9±4.3	≤0.001
Poids (kg)	77.3±10.9	62.2±11.1	≤0.001
Masse maigre (kg)	57.7±6.6	41.8±4.5	≤0.001
Masse grasse (kg)	18.8(14.0-25.1) <sup>3</sup>	19.1(13.6-26.8)	0.263
Masse grasse (%)	24.9±4.5	31.8±6.1	≤0.001
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25.5±3.0	24.1±4.4	≤0.001
Tour de taille (cm)	88.8±8.9	75.4±9.7	≤0.001
Rapport taille/hanches	0.906±0.064	0.762±0.059	≤0.001
Consommation d'alcool (g/jour)	24.9±26.9	4.4±8.3	≤0.001
Consommation de cigarettes (cig/jour)	4.7±8.1	2.7±6.5	0.006
Leptine (µg/L)	3.5(1.9-6.4)	9.7(4.7-20.1)	≤0.001
PAS (mmHg)	129±11	120±11	≤0.001
PAD (mmHg)	78±9	71±10	≤0.001
TGL (mmol/L)	1.21(0.72-2.04)	0.84(0.54-1.29)	≤0.001
Cholestérol (mmol/L)	5.98±1.10	5.35±0.92	≤0.001
ApoB (g/L)	1.15±0.26	0.95±0.22	≤0.001
ApoAI (g/L)	1.55±0.24	1.69±0.27	≤0.001
HDL-C (mmol/L)	1.38±0.38	1.67±0.39	≤0.001
Glucose (mmol/L)	5.25±0.49	4.93±0.41	≤0.001
Acide urique (µmol/L)	319±61	229±45	≤0.001
ASAT (U/L)	22.7(17.1-30.2)	16.7(12.9-21.6)	≤0.001
ALAT (U/L)	28.7(18.6-44.5)	17.8(12.1-26.3)	≤0.001
GGT (U/L)	30.0(17.5-51.3)	15.2(9.4-24.6)	≤0.001
Hs-CRP (mg/L)	0.94(0.32-2.75)	0.96(0.30-3.07)	0.880
Haptoglobine (g/L)	1.07±0.47	1.06±0.41	0.911
Orosomucoïde (g/L)	0.77±0.17	0.69±0.18	≤0.001

<sup>1</sup>*P* entre hommes et femmes: ANOVA ou test de chi-2

<sup>2</sup>Moyennes arithmétiques ± SD

<sup>3</sup>Moyennes géométriques ± intervalle à 1 SD

Les valeurs pour la masse grasse, la leptine, les TGL, les enzymes ASAT, ALAT, GGT et la Hs-CRP ont été transformées en log<sub>10</sub> avant les analyses

Pour la Hs-CRP, l'haptoglobine et l'orosomucoïde, les données sont disponibles pour seulement 157 hommes et 157 femmes

**ANNEXE 4. Coefficient de corrélation partiel entre les variables associées au SM et la masse grasse, la concentration de la leptine et le rapport taille/hanches chez les hommes et les femmes.**

	Masse grasse			Rapport taille/hanches			Leptine		
	Hommes		Interaction Sexe P <sup>1</sup>	Hommes		Interaction Sexe P <sup>1</sup>	Hommes		Interaction Sexe P <sup>1</sup>
	Femmes	Femmes	Femmes	Femmes	Femmes	Femmes	Femmes	Femmes	
PAS	0.337 <sup>2</sup>	0.296 <sup>2</sup>	0.336	0.262 <sup>2</sup>	0.156 <sup>3</sup>	0.462	0.281 <sup>2</sup>	0.278 <sup>2</sup>	0.677
PAD	0.366 <sup>2</sup>	0.189 <sup>3</sup>	0.040	0.249 <sup>2</sup>	0.089	0.254	0.356 <sup>2</sup>	0.174 <sup>3</sup>	0.058
TGL	0.354 <sup>2</sup>	0.297 <sup>2</sup>	0.043	0.400 <sup>2</sup>	0.189 <sup>3</sup>	0.193	0.409 <sup>2</sup>	0.275 <sup>2</sup>	0.005
Cholestérol	0.157 <sup>3</sup>	0.104	0.305	0.140	0.015	0.238	0.303 <sup>2</sup>	0.165 <sup>3</sup>	0.024
ApoB	0.222 <sup>4</sup>	0.191 <sup>4</sup>	0.242	0.216 <sup>4</sup>	0.197 <sup>4</sup>	0.598	0.330 <sup>2</sup>	0.220 <sup>4</sup>	0.030
ApoAI	-0.161 <sup>3</sup>	-0.277 <sup>4</sup>	0.520	-0.172 <sup>3</sup>	-0.367 <sup>2</sup>	0.029	-0.114	-0.105	0.739
HDL-C	-0.301 <sup>2</sup>	-0.323 <sup>2</sup>	0.572	-0.325 <sup>2</sup>	-0.443 <sup>2</sup>	0.209	-0.275 <sup>2</sup>	-0.167 <sup>3</sup>	0.124
Glucose	0.162 <sup>3</sup>	0.283 <sup>2</sup>	0.879	0.120	0.292 <sup>2</sup>	0.130	0.185 <sup>4</sup>	0.266 <sup>2</sup>	0.998
Acide urique	0.543 <sup>2</sup>	0.414 <sup>2</sup>	≤0.001	0.404 <sup>2</sup>	0.195 <sup>4</sup>	0.004	0.550 <sup>2</sup>	0.315 <sup>2</sup>	≤0.001
ASAT	0.283 <sup>2</sup>	0.134	0.028	0.187 <sup>4</sup>	-0.024	0.028	0.333 <sup>2</sup>	0.149 <sup>3</sup>	0.011
ALAT	0.507 <sup>2</sup>	0.277 <sup>2</sup>	≤0.001	0.435 <sup>2</sup>	0.134	0.002	0.528 <sup>2</sup>	0.249 <sup>2</sup>	≤0.001
GGT	0.500 <sup>2</sup>	0.127	≤0.001	0.447 <sup>2</sup>	0.120	0.002	0.535 <sup>2</sup>	0.107	≤0.001
Hs-CRP	0.331 <sup>2</sup>	0.382 <sup>2</sup>	0.926	0.099	0.324 <sup>2</sup>	0.058	0.320 <sup>2</sup>	0.400 <sup>2</sup>	0.414
Haptoglobine	0.213 <sup>4</sup>	0.269 <sup>2</sup>	0.849	0.103	0.270 <sup>2</sup>	0.243	0.256 <sup>4</sup>	0.225 <sup>4</sup>	0.546
Orosomucoïde	0.378 <sup>2</sup>	0.501 <sup>2</sup>	0.764	0.340 <sup>2</sup>	0.482 <sup>2</sup>	0.077	0.295 <sup>2</sup>	0.417 <sup>2</sup>	0.531

<sup>1</sup>P test d'interaction avec le sexe

<sup>2</sup>P≤0.001, <sup>3</sup>P≤0.05, <sup>4</sup>P≤0.01

Ajustement sur l'âge, la consommation d'alcool et de cigarettes

Les valeurs pour la masse grasse, la leptine, les TGL, les enzymes ASAT, ALAT, GGT et CRP ont été transformées en log10 avant les analyses

Pour la Hs-CRP, l'haptoglobine et l'orosomucoïde, les données sont disponibles pour seulement 157 hommes et 157 femmes

**ANNEXE 5. Caractéristiques des 20 individus sélectionnés pour l'analyse 'micro-array'.**

	Sexe	Age (ans)	Taille (cm)	Poids (Kg)	PAD (mmHg)	PAS (mmHg)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Tabac	Alcool	Cholestérol (mmol/L)	Glucose (mmol/L)	HDL-cholestérol (mmol/L)
<b>Non – hypertendus/obèses</b>	H <sup>1</sup>	43	172	72.2	69	129	24.40	N – F <sup>2</sup>	3 <sup>3</sup>	5.58	4.96	1.49
N=7	H F <sup>4</sup> F F H F	50 48 50 45 51 50	172.8 173 156.9 164.3 170 154.3	77.1 69.8 68 57.4 67.2 54.9	65 69 68 65 79 68	117 120 114 103 125 101	25.82 23.30 27.62 21.26 23.25 23.05	N – F N – F Ex – F <sup>5</sup> N – F N – F Ex – F	2 3 3 3 1 2	5.42 4.50 5.89 4.67 5.86 4.93	5.21 4.96 4.9 4.94 5.26 4.85	1.85 1.96 1.77 1.88 1.98 1.43
	moyenne	<b>48.1</b>	<b>166.1</b>	<b>66.6</b>	<b>69</b>	<b>115.6</b>	<b>24.10</b>	-	-	<b>5.26</b>	<b>5.01</b>	<b>1.76</b>
<b>Hypertendus</b>	F	46	168.5	75.8	83	148	26.70	N – F	4	4.82	5.16	2.17
N=3	H	46	177.9	79.9	78	140	25.24	Ex – F	1	5.3	4.91	1.97
	H	55	172	86.2	84	147	29.14	N – F	3	5.68	5.62	1.62
	moyenne	<b>47</b>	<b>172.8</b>	<b>80.6</b>	<b>81.6</b>	<b>145.0</b>	<b>27.02</b>	-	-	<b>5.26</b>	<b>5.23</b>	<b>1.92</b>
<b>Obèses</b>	F	51	168.6	90	74	124	31.66	N – F	3	5.7	5.6	1.14
N=6	H	52	171.6	94.9	70	130	32.23	Ex – F	2	5.54	6.35	1.13
	F	48	159.2	78.7	70	120	31.05	N – F	2	5.16	5.17	1.17
	F	49	168.4	107	66	133	37.73	N – F	2	6.1	6.09	1.22
	H	52	167.4	90.2	70	120	32.20	Ex – F	3	7.10	6.69	1.53
	F	50	151	68.6	70	122	30.10	Ex – F	2	6.3	5.65	2.09
	moyenne	<b>50.3</b>	<b>164.4</b>	<b>88.2</b>	<b>70</b>	<b>124.8</b>	<b>32.50</b>	-	-	<b>5.98</b>	<b>5.93</b>	<b>1.38</b>
<b>Hypertendus/Obèses</b>	H	52	177.8	110.1	85	140	34.83	Ex – F	2	6.5	6.04	1.7
N=4	H	50	161.5	78.4	89	145	30.06	Ex – F	2	5.45	6.3	1.3
	H	55	179.4	122	93	155	37.91	Ex – F	3	4.78	6.18	1.52
	H	52	181.6	99.7	80	140	30.23	N – F	2	5.13	6.76	1.35
	moyenne	<b>52.2</b>	<b>177.9</b>	<b>102.6</b>	<b>86.7</b>	<b>145</b>	<b>33.25</b>	-	-	<b>5.46</b>	<b>6.32</b>	<b>1.47</b>

<sup>1</sup>Homme

<sup>2</sup>Non - Fumeur

<sup>3</sup>Code alcool : 1 : tous les jours ; 2 : certains jours de la semaine ; 3 : plus rarement ; 4 : jamais

<sup>4</sup>Femme

<sup>5</sup>Ex - Fumeur

## ANNEXE 6. Classification des gènes étudiés en fonction des voies cardiovasculaires.

### Pression artérielle

#### Système rénine - angiotensine

<b>ACE<sup>1</sup></b>	NM_000789_1 <sup>2</sup>	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1, transcript variant ; ace <sup>3</sup>
<b>AGTR2</b>	NM_000686_1	angiotensin II receptor, type 2; agtr2
<b>KLK1</b>	NM_002257_1	kallikrein 1, renal/pancreas/salivary; klk1
<b>REN</b>	NM_000537_1	renin; ren
<b>RENBP</b>	NM_002910_1	renin binding protein; renbp
<b>BDKRB2</b>	NM_000623_1	bradykinin receptor B2; bdkrb2
<b>AGT</b>	NM_000029_1	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8); agt
<b>AGTR1</b>	NM_031850_1	angiotensin II receptor, type 1, transcript variant 4; agtr1

#### Récepteurs Adrénérgiques-cholinérgiques

<b>ADRA2A</b>	NM_000681_1	adrenergic, alpha-2A-, receptor; adra2a
<b>ADRA2B</b>	M34041_1	adrenergic, alpha-2B-, receptor; adra2b
<b>ADRB1</b>	NM_000684_1	adrenergic, beta-1-, receptor; adrb1
<b>ADRB2</b>	NM_000024_1	adrenergic, beta-2-, receptor, surface; adrb2
<b>ADRB3</b>	NM_000025_1	adrenergic, beta-3-, receptor; adrb3
<b>CHRM1</b>	NM_000738_1	cholinergic receptor, muscarinic 1; chrm1
<b>RGS2</b>	NM_002923_1	regulator of g-protein signaling 2, 24kDa; rgs2
<b>GNAS</b>	NM_000516_1	GNAS complex locus, transcript variant 1; gnas
<b>GNB3</b>	NM_002075_1	guanine nucleotide binding protein (g protein), beta polypeptide 3; gnb3

#### Système de sodium

<b>ADD1</b>	NM_014189_1	adducin 1 (alpha), transcript variant 2; add1
<b>ADD2</b>	NM_001617_1	adducin 2 (beta), transcript variant beta-1; add2
<b>SCNN1A</b>	NM_001038_1	sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha; scnn1a
<b>SCNN1B</b>	NM_000336_1	sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta (Liddle syndrome); scnn1b
<b>SCNN1G</b>	NM_001039_1	sodium channel nonvoltage-gated gamma; scnn1g

#### Transport

<b>ATP1A2</b>	NM_000702_1	atpase, na+/k+ transporting, alpha 2 (+) polypeptide; atp1a2
<b>ATP1B1</b>	NM_001677_1	atpase, na+/k+ transporting, beta 1 polypeptide, transcript variant 1; atp1b1

#### Métabolisme de l'acide Arachidonique

<b>ALOX12</b>	NM_000697_1	arachidonate 12-lipoxygenase; alox12
<b>ALOX15</b>	NM_001140_1	arachidonate 15-lipoxygenase; alox15
<b>ALOX5</b>	NM_000698_1	arachidonate 5-lipoxygenase; alox5
<b>LTC4S</b>	NM_000897_1	leukotriene C4 synthase, transcript variant 2; ltc4s
<b>PTGIS</b>	NM_000961_1	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase; ptgis
<b>PTGS1</b>	NM_000962_1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase), transcript variant 1; ptgs1
<b>PTGS2</b>	NM_000963_1	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase); ptgs2

#### Vasodilatation

<b>CLCNKB</b>	NM_000085_1	chloride channel Kb; clcnkb
<b>NPR1</b>	NM_000906_1	natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A (atriuretic peptide receptor A); npr1
<b>NPR2</b>	NM_000907_1	natriuretic peptide receptor B/guanylate cyclase B (atriuretic peptide receptor B), transcript variant 1; npr2
<b>NPPA</b>	AL021155_5 (NM_006172_1)	natriuretic peptide precursor A; nppa
<b>NPR3</b>	NM_000908_1	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atriuretic peptide receptor C); npr3
<b>NOS2A</b>	NM_000625_1	nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes), transcript variant 1; nos2a
<b>NOS3</b>	NM_000603_1	nitric oxide synthase 3 (endothelial cell); nos3

#### Vasoconstriction

<b>AVPR1A</b>	NM_000706_1	arginine vasopressin receptor 1; avpr1a
---------------	-------------	---

## ANNEXE 6 (suite)

<b>EDN1</b>	NM_001955_1	endothelin 1; edn1
<b>EDN2</b>	NM_001956_1	endothelin 2; edn2
<b>EDNRA</b>	NM_001957_1	endothelin receptor type A; ednra
<b>EDNRB</b>	NM_000115_1	endothelin receptor type B, isoform 1, transcript variant 1; ednrb
<b>KYNU</b>	NM_003937_1	<b>kynureninase</b> (L-kynurenine hydrolase), transcript variant 1; kynu
<b>PNMT</b>	NM_002686_1	phenylethanolamine N-methyltransferase ; pnmt
<b>ACSM3 (SAH)</b>	NM_005622_1	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3 (SA (rat hypertension-associated) homolog), isoform 1; acsm3

### Régulation des hormones

<b>HSD11B1</b>	NM_005525_1	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1, transcript variant 1; hsd11b1
<b>HSD11B2</b>	NM_000196_1	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2; hsd11b2
<b>HSD3B1</b>	NM_000862_1	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1; hsd3b1
<b>CASR</b>	NM_000388_1	calcium-sensing receptor (hypocalciuric hypercalcemia 1, severe neonatal hyperparathyroidism); casr
<b>SGK</b>	NM_005627_1	serum/glucocorticoid regulated kinase; sgk

## Coagulation

<b>F2</b>	NM_000506_1	coagulation factor II (thrombin); f2
<b>F5</b>	NM_000130_1	coagulation factor V (proaccelerin, labile factor); f5
<b>F7</b>	M13232_1-	coagulation factor VII (serum prothrombin conversion accelerator), transcript variant 1; f7
<b>FGB</b>	NM_005141_1	fibrinogen beta chain; fgb
<b>SERPINE1</b>	NM_000602_1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1; serpine1
<b>CBS</b>	NM_000071_1	cystathionine-beta-synthase; cbs
<b>MTHFR</b>	NM_005957_1	510-methylenetetrahydrofolate reductase NADPH; mthfr

## Adhésion cellulaire

<b>VCAM1</b>	NM_001078_1	vascular cell adhesion molecule 1, transcript variant 1; vcam1
<b>ICAM1</b>	NM_000201_1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor; icam1
<b>SELE</b>	NM_000450_1	selectin E (endothelial adhesion molecule 1) ; sele
<b>SELL</b>	NM_000655_1	selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1) ; sell
<b>SELP</b>	NM_003005_1	selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62); selp
<b>ITGA2</b>	NM_002203_1	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor); itga2
<b>ITGB3</b>	NM_000212_1	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61); itgb3
<b>CD36</b>	NM_000072_1	CD36 antigen (collagen type i receptor, thrombospondin receptor), transcript variant 3; cd36
<b>LMNA</b>	NM_005572_1	lamin A/C, transcript variant 1 ;lmna
<b>MMP3</b>	NM_002422_1	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase); mmp3

## Métabolisme des lipids, du glucose et obésité

### Glucose

<b>INSR</b>	NM_000208_1	insulin receptor; insr
<b>GYS1</b>	NM_002103_1	glycogen synthase 1 (muscle); gys1
<b>GPD1</b>	NM_005276_1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble); gpd1
<b>GPD2</b>	NM_000408_1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial); gpd2
<b>GCGR</b>	NM_000160_1	glucagon receptor; gcgr
<b>CAPN10</b>	NM_023083_1	calpain 10, transcript variant 1; capn10

### Lipides

<b>APOA1</b>	NM_000039_1	apolipoprotein A-I; apoa1
<b>APOA2</b>	NM_001643_1	apolipoprotein A-II; apoa2
<b>APOA4</b>	NM_000482_1	apolipoprotein A-IV; apoa4
<b>APOB</b>	NM_000384_1	apolipoprotein B (including Ag(x) antigen); apob

## ANNEXE 6 (suite)

<b>APOC1</b>	NM_001645_1	apolipoprotein C-I; apoc1
<b>APOC2</b>	M10612_1	apolipoprotein C-II; apoc2
<b>APOC3</b>	NM_000040_1	apolipoprotein C-III; apoc3
<b>APOC4</b>	NM_001646_1	apolipoprotein C-IV; apoc4
<b>APOD</b>	NM_001647_1	apolipoprotein D; apod
<b>APOE</b>	NM_000041_1	apolipoprotein E; apoe
<b>APOH</b>	NM_000042_1	apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I); apoh
<b>LDLR</b>	NM_000527_1	low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia); ldlr
<b>VLDLR</b>	NM_003383_1	very low density lipoprotein receptor, isoform a; vldlr
<b>LPL</b>	NM_000237_1	lipoprotein lipase; lpl
<b>LIPC</b>	NM_000236_1	lipase, hepatic; lipc
<b>LIPE</b>	NM_005357_1	lipase, hormone-sensitive; lipe
<b>FABP2</b>	NM_000134_1	fatty acid binding protein 2, intestinal; fabp2
<b>LPA</b>	NM_005577_1	lipoprotein, Lp(a); lpa
<b>PLA2G1B</b>	NM_000928_1	phospholipase A2, group IB (pancreas); pla2g1b
<b>PLTP</b>	NM_006227_1	phospholipid transfer protein, transcript variant 1; pltp
<b>MTP</b>	NM_000253_1	microsomal triglyceride transfer protein; mtp
<b>LCAT</b>	NM_000229_1	lecithin-cholesterol acyltransferase; lcat
<b>CETP</b>	NM_000078_1	cholesteryl ester transfer protein, plasma; cetp
<b>SCARB1</b>	NM_005505_1	scavenger receptor class B, member 1; cd36l1
<b>SCARB2</b>	NM_005506_1	scavenger receptor class B, member 2; cd36l2
<b>POMC</b>	NM_000939_1	proopiomelanocortin (adrenocorticotropin/ beta-lipotropin/ alpha-melanocyte stimulating
<b>UCP</b>	NM_021833_1	uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier) ; ucp1
<b>LEP</b>	NM_000230_1	leptin (obesity homolog, mouse); lep
<b>LEPR</b>	NM_002303_1	leptin receptor, isoform 1; lepr
<b>ARTS-1</b>	NM_016442_1	type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator; arts-1

## Inflammation (cytokines+chemokines)

<b>IL10</b>	NM_000572_1	interleukin 10; il10
<b>IL13</b>	NM_002188_1	interleukin 13; il13
<b>IL18</b>	NM_001562_1	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor); il18
<b>IL1A</b>	NM_000575_1	interleukin 1, alpha; il1a
<b>IL1B</b>	NM_000576_1	interleukin 1, beta; il1b
<b>IL2</b>	NM_000586_1	interleukin 2; il2
<b>IL4</b>	NM_000589_1	interleukin 4, transcript variant 1; il4
<b>IL4R</b>	NM_000418_1	interleukin 4 receptor, transcript variant 1; il4r
<b>IL5RA</b>	NM_000564_1	interleukin 5 receptor, alpha, transcript variant 1; il5ra
<b>IL6</b>	NM_000600_1	interleukin 6 (interferon, beta 2); il6
<b>IL8</b>	NM_000584_1	interleukin 8; il8
<b>IL9</b>	NM_000590_1	interleukin 9; il9
<b>TNFRSF1B</b>	NM_001066_1	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B; tnfrsf1b
<b>CCR2</b>	NM_000648_1	chemokine (c-c motif) receptor 2, transcript variant B; ccr2
<b>CCR3</b>	NM_001837_1	chemokine (c-c motif) receptor 3, transcript variant 1; ccr3
<b>CCR5</b>	NM_000579_1	chemokine (c-c motif) receptor 5; ccr5
<b>CCR7</b>	NM_001838_1	chemokine (c-c motif) receptor 7; ccr7
<b>CCL11</b>	NM_002986_1	chemokine (C-C motif) ligand 11; scya11
<b>CCL2</b>	NM_002982_1	chemokine (C-C motif) ligand 2; scya2
<b>CSF2</b>	NM_000758_1	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage); csf2
<b>TNF</b>	NM_000594_1	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2); tnf
<b>CXCL12</b>	NM_000609_1	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1), isoform beta; sdf1
<b>SCGB1A1</b>	NM_003357_1	secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin); scgb1a1
<b>LTA</b>	NM_000595_1	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1); lta

## Enzymes du métabolisme des médicaments

<b>CYP11B2</b>	NM_000498_1	cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2; cyp11b2
<b>CYP1A1</b>	NM_000499_1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1; cyp1a1
<b>CYP2A6</b>	NM_000762_1	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 6; cyp2a6

<b>CYP2C18</b>	L16876_1 (NM_000772_1)	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18; cyp2c18
<b>CYP2C19</b>	NM_000769_1	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19; cyp2c19

### ANNEXE 6 (suite)

<b>CYP2C9</b>	NM_000771_1	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9; cyp2c9
<b>CYP2D6</b>	NM_000106_1	cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6, transcript variant 1; cyp2d6
<b>CYP2E1</b>	AF182276_1 (NM_000773_1)	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1; cyp2e1
<b>CYP2J2</b>	NM_000775_1	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2; cyp2j2
<b>CYP3A4</b>	NM_017460_1-	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4; cyp3a4
<b>CYP3A5</b>	NM_000777_1	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5; cyp3a5
<b>CYP4A11</b>	NM_000778_1	cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11; cyp4a11
<b>CYP4F2</b>	AF221943_1 (NM_001082_1)	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 2; cyp4f2

### *Facteurs de transcription*

<b>AHR</b>	NM_001621_1	aryl hydrocarbon receptor; ahr
<b>ARNT</b>	NM_001668_1	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; arnt
<b>MEF2A</b>	NM_005587_1	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide A (myocyte enhancer factor 2A); mef2a
<b>NR1H2</b>	NM_007121_1	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2; nr1h2
<b>NR1H3</b>	NM_005693_1	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3; nr1h3
<b>NR1H4</b>	NM_005123_1	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4; nr1h4
<b>NR1I2</b>	NM_003889_1	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2, transcript variant 1; nr1i2
<b>NR1I3</b>	NM_005122_1	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3; nr1i3
<b>NR3C1</b>	NM_000176_1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor), transcript variant 5; nr3c1
<b>TCF7</b>	NM_003202_1	transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box), isoform 1; tcf7
<b>PPARA</b>	NM_005036_1	peroxisome proliferative activated receptor, alpha, transcript variant 5; ppara
<b>PPARG</b>	NM_015869_1	peroxisome proliferative activated receptor gamma, transcript variant 2; pparg
<b>VDR</b>	NM_000376_1	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor, transcript variant 1; vdr

### *Facteurs de croissance cellulaire*

<b>EGF</b>	NM_001963_1	epidermal growth factor (beta-urogastrone); egf
<b>PDGFA</b>	M19988_1-	platelet-derived growth factor alpha polypeptide, transcript variant 1; pdgfa
<b>PDGFB</b>	NM_033016_1	platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog), transcript variant 2; pdgfb
<b>IGF1</b>	NM_000618_1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) ; igf1
<b>VEGF</b>	NM_003376_1	vascular endothelial growth factor, transcript variant 2; vegf
<b>TGFB1</b>	NM_000660_1	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease); tgfb1
<b>CLU</b>	NM_001831_1	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J), isoform 1; clu

### *Stress oxydant*

<b>GGT1</b>	NM_013421_1	gamma glutamyl transferase 1, transcript variant 2; ggt1
<b>GSTM1</b>	NM_000561_1	glutathione S-transferase M1, transcript variant 1; gstm1
<b>GSTP1</b>	NM_000852_1	glutathione S-transferase pi; gstp1
<b>GSTT1</b>	NM_000853_1	glutathione S-transferase theta 1; gstt1
<b>PHGDH</b>	NM_006623_1	3-phosphoglycerate dehydrogenase; phgdh
<b>PON1</b>	NM_000446_1	paraoxonase 1; pon1
<b>PON2</b>	NM_000305_1	paraoxonase 2, transcript variant 1; pon2
<b>MPO</b>	NM_000250_1	myeloperoxidase; mpo
<b>HMOX1</b>	NM_002133_1	heme oxygenase (decycling) 1; hmox1
<b>CYBA</b>	NM_000101_1	cytochrome b-245, alpha polypeptide; cyba
<b>CYBB</b>	S67289_1 (NM_000397_1)	cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease); cybb

**ANNEXE 6 (suite)**  
***Défense immunitaire***

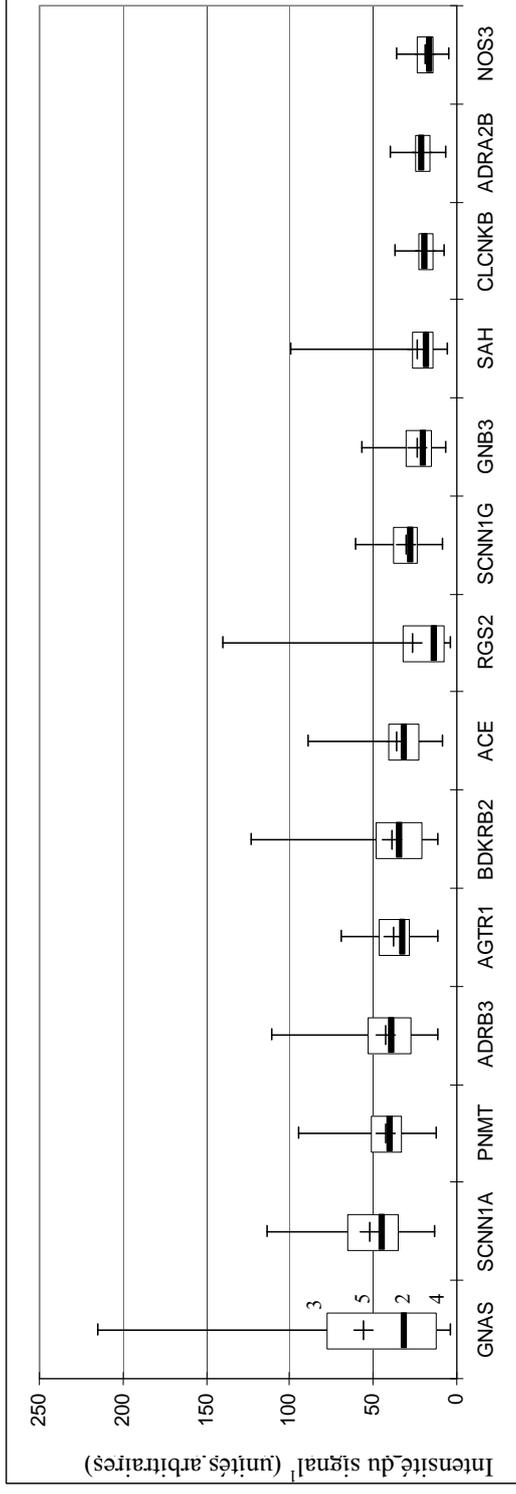
<b>DEFA3</b>	NM_005217_1	defensin, alpha 3, neutrophil-specific; defa3
<b>DEFA4</b>	NM_001925_1	defensin, alpha 4, corticostatin; defa4
<b>CAMP</b>	NM_004345_1	cathelicidin antimicrobial peptide; camp
<b>C3</b>	NM_000064_1	complement component 3; c3
<b>C5</b>	NM_001735_1	complement component 5; c5
<b>CD14</b>	NM_000591_1	Cd14 antigen; cd14
<b>CTLA4</b>	NM_005214_1	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, transcript variant 1; ctla4
<b>FPRL1</b>	NM_001462_1	formyl peptide receptor-like 1, transcript variant 1; fprl1
<b>FPR1</b>	NM_002029_1	formyl peptide receptor 1; fpr1
<b>MS4A2</b>	NM_000139_1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2 (Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; beta polypeptide); ms4a2

<sup>a</sup>Gène (HUGO)

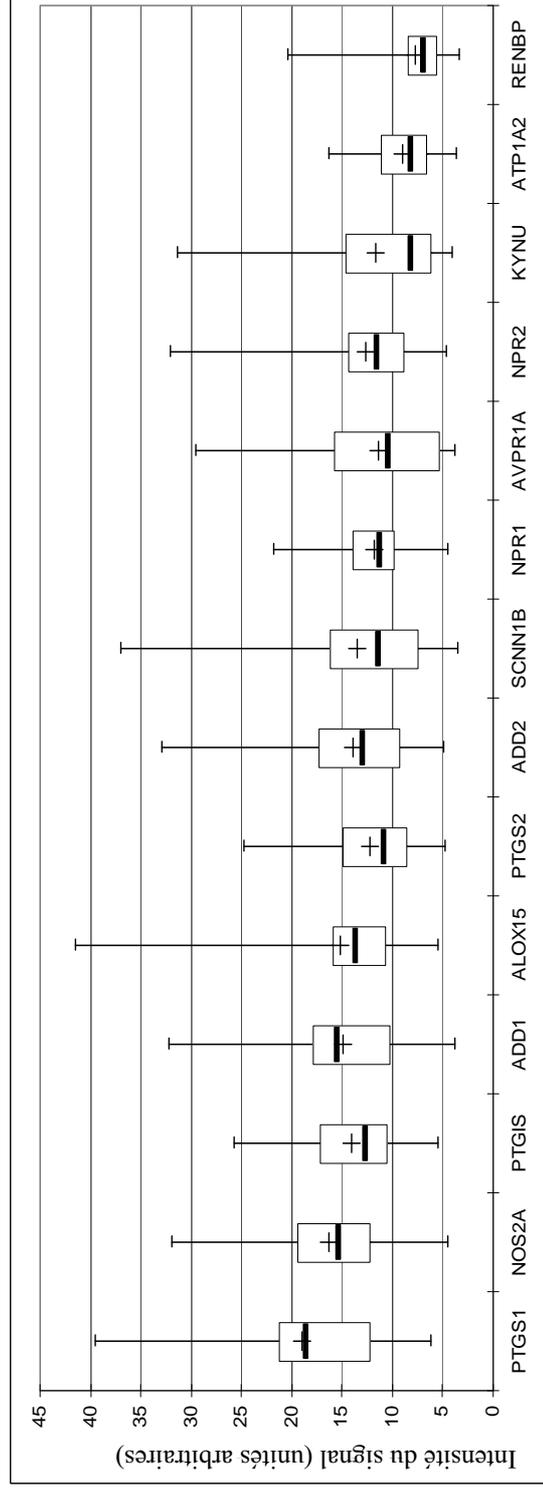
<sup>b</sup>RefSeq,

<sup>c</sup>description du gène

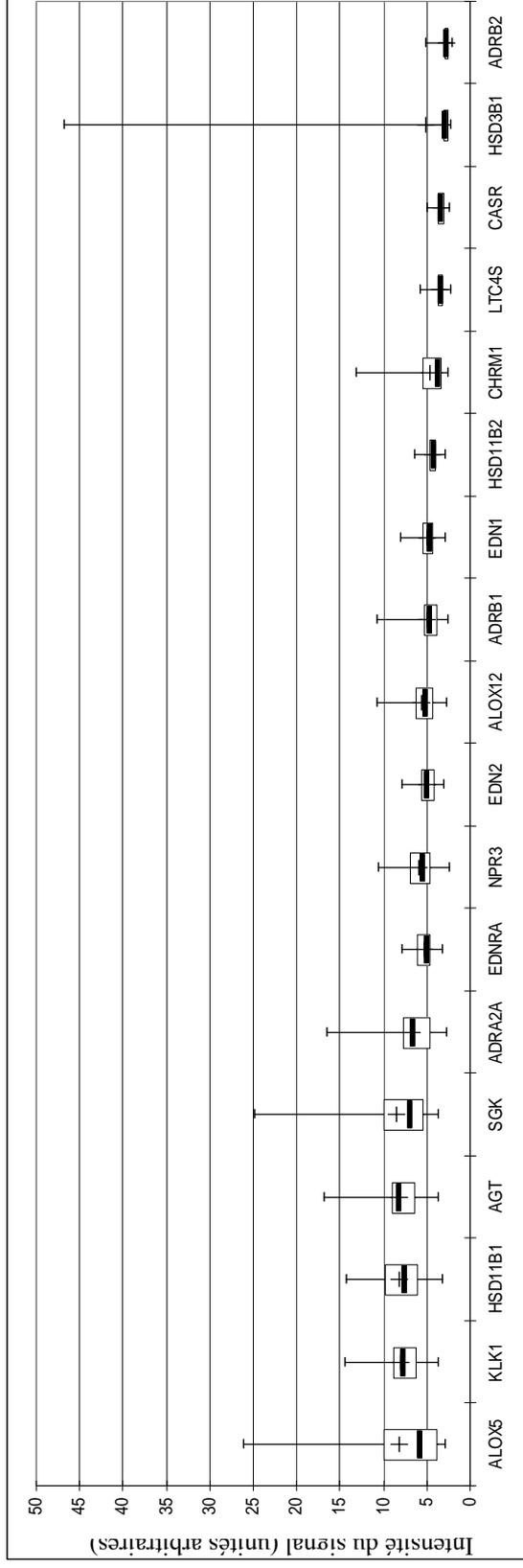
**ANNEXE 7. Taux d'expression des gènes par voie métabolique**  
**Pression artérielle**



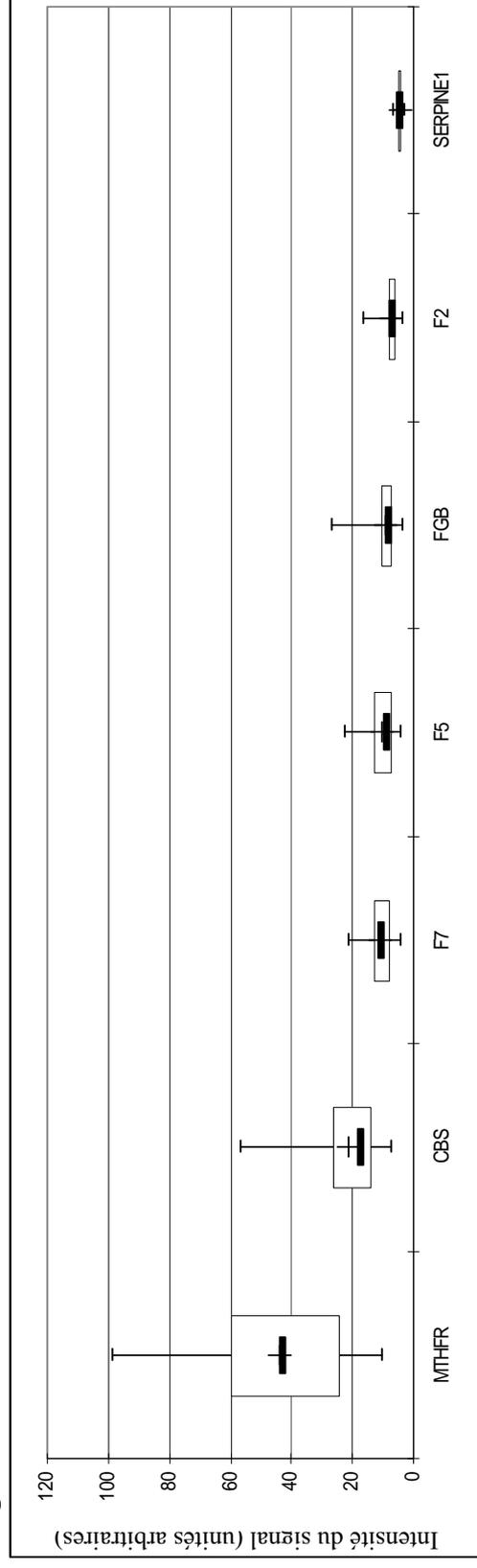
**Pression artérielle**



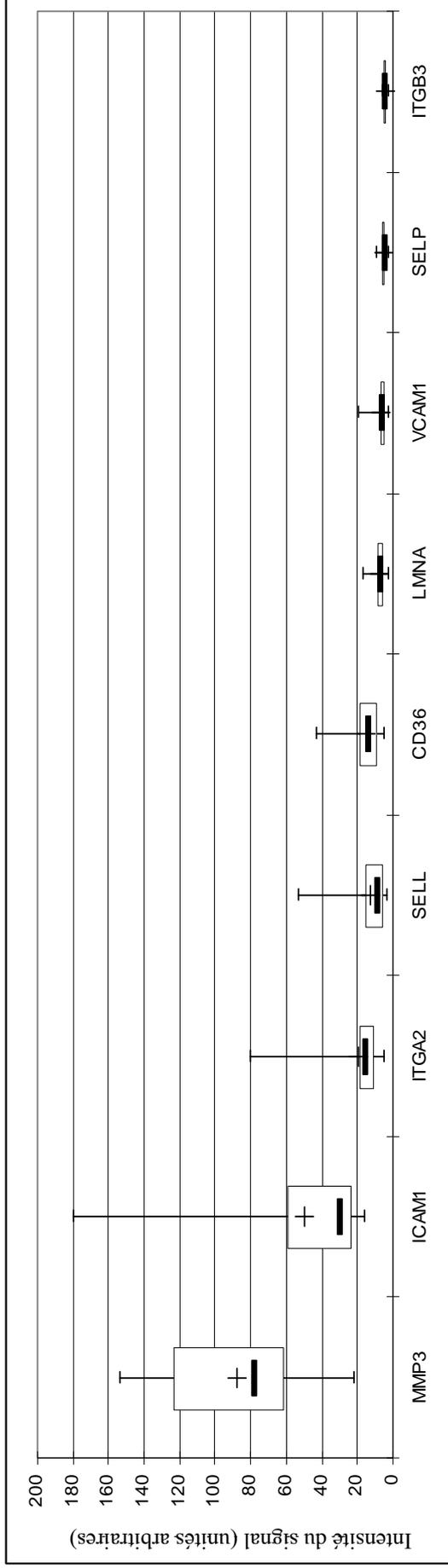
**ANNEXE 7 (suite)**  
**Pression artérielle**



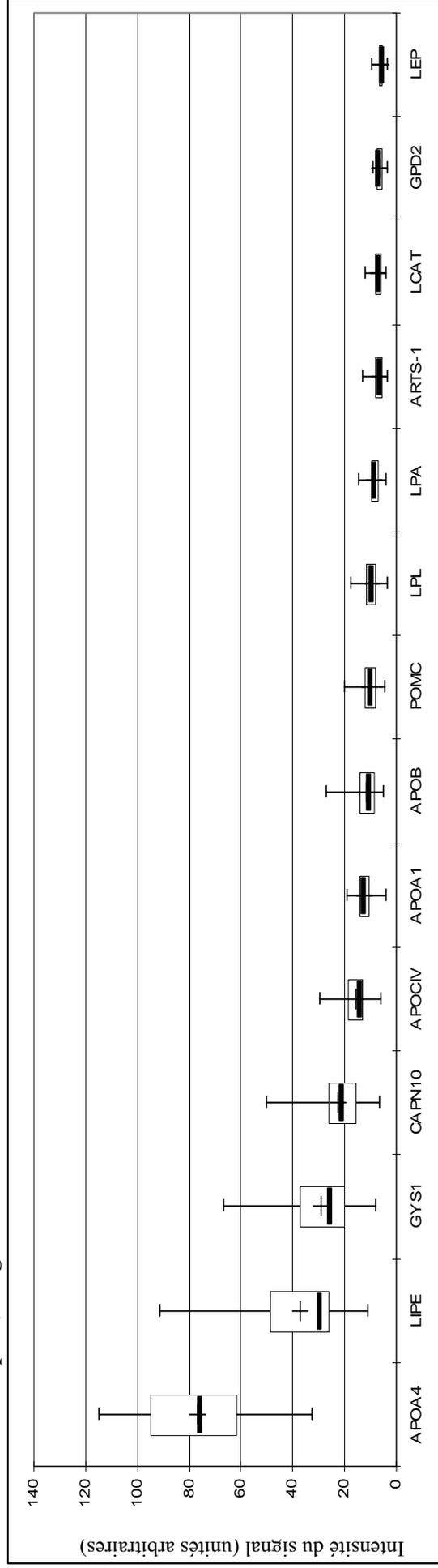
**Coagulation**



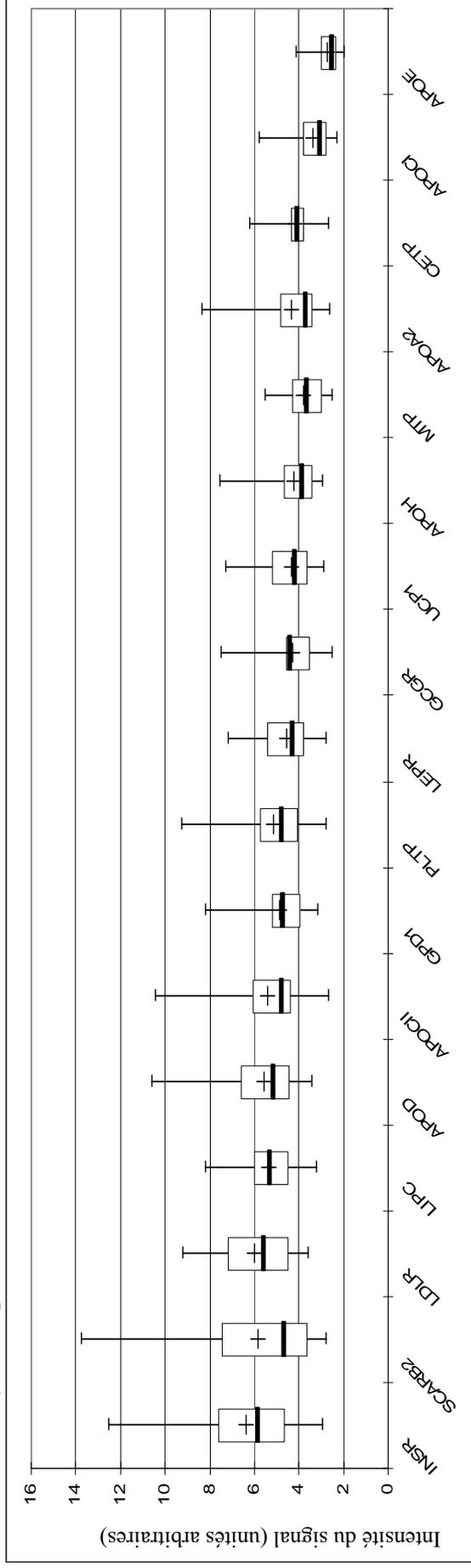
**ANNEXE 7 (suite)**  
**Adhésion cellulaire**



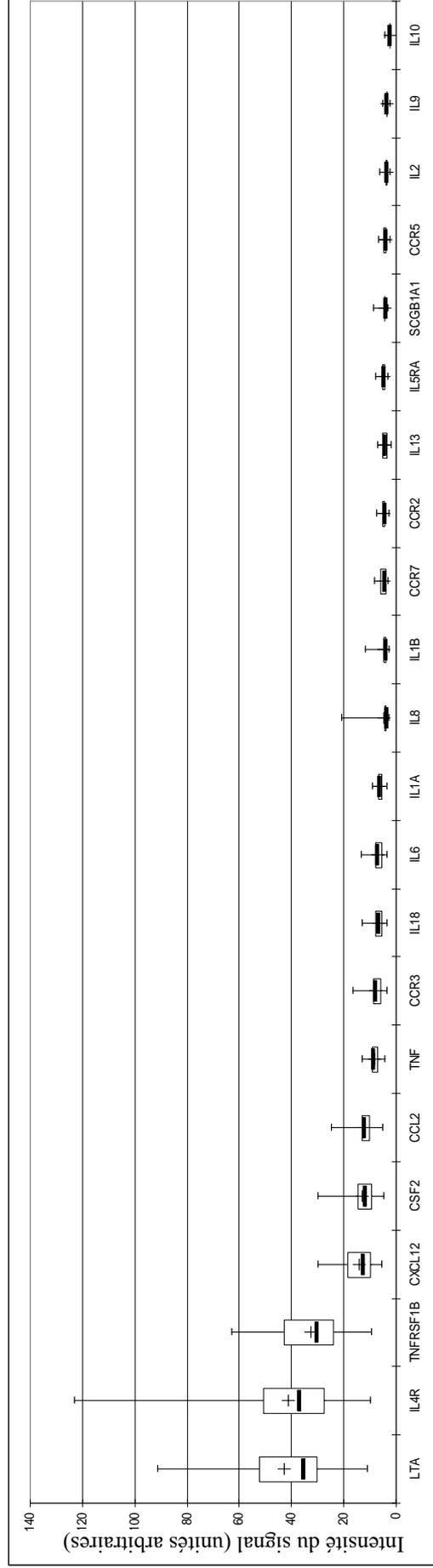
**Métabolisme des lipids, du glucose et obésité**



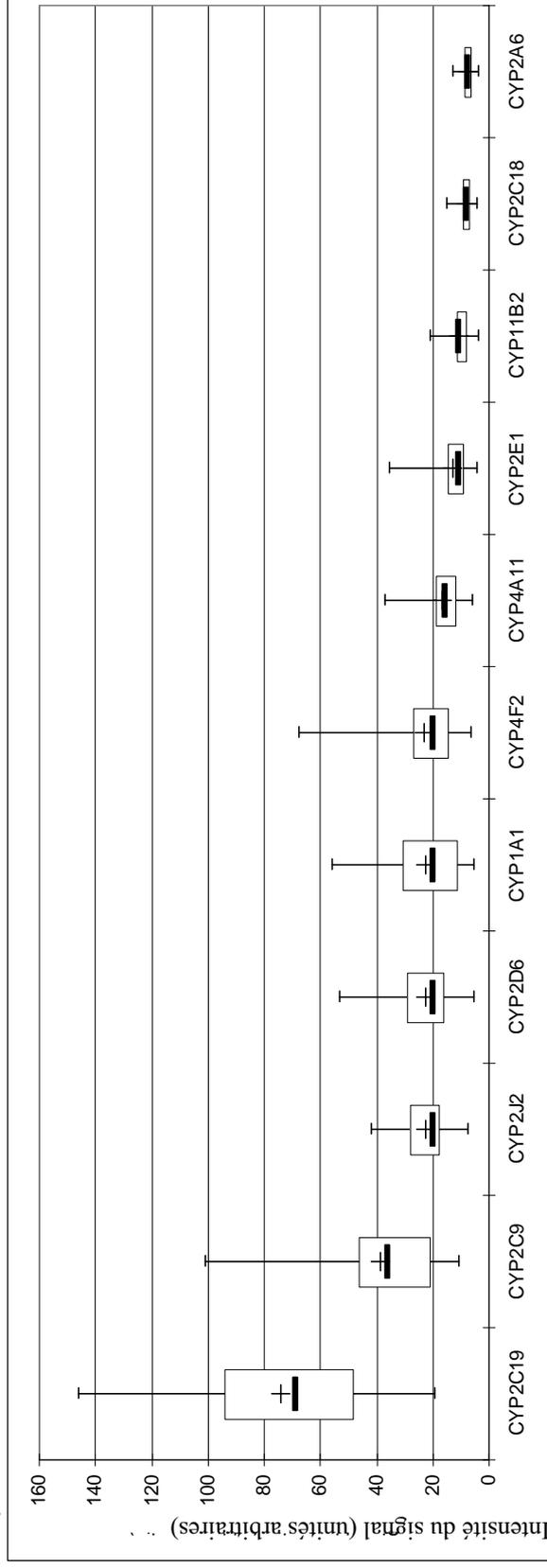
**ANNEXE 7 (suite)**  
**Glucose, obesity and lipid metabolism**



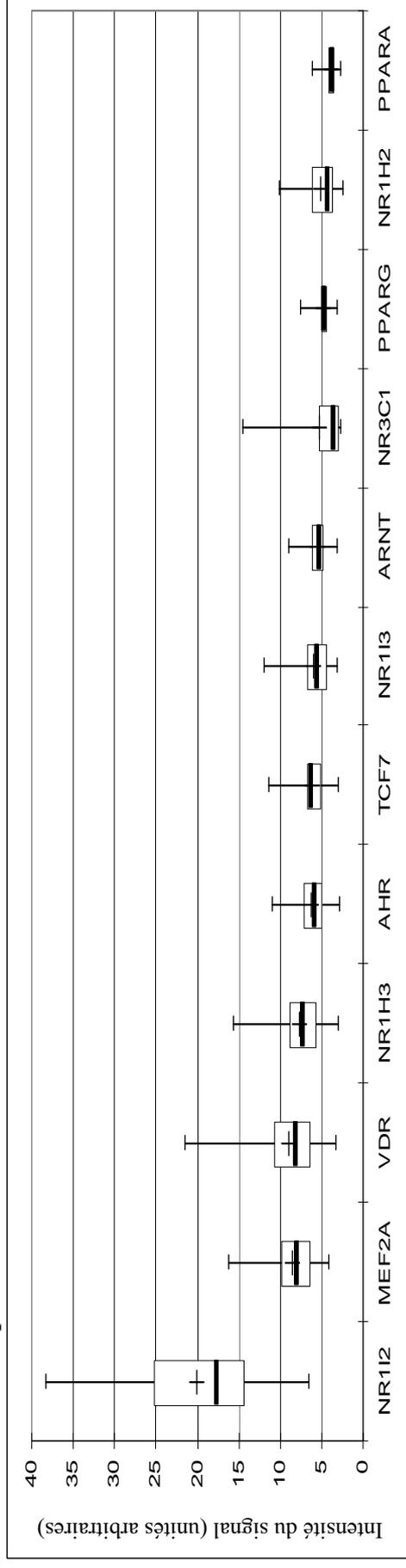
**Inflammation**



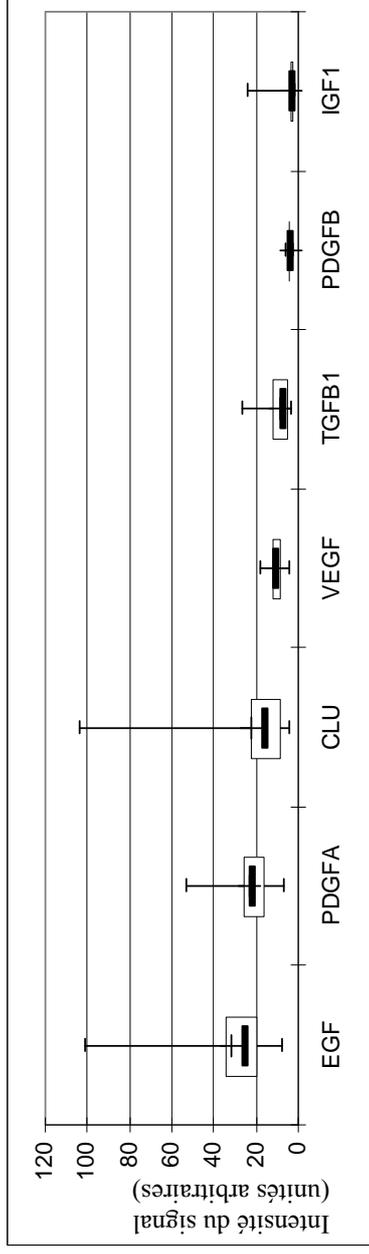
**ANNEXE 7 (suite)**  
**Enzymes du métabolisme des médicaments**



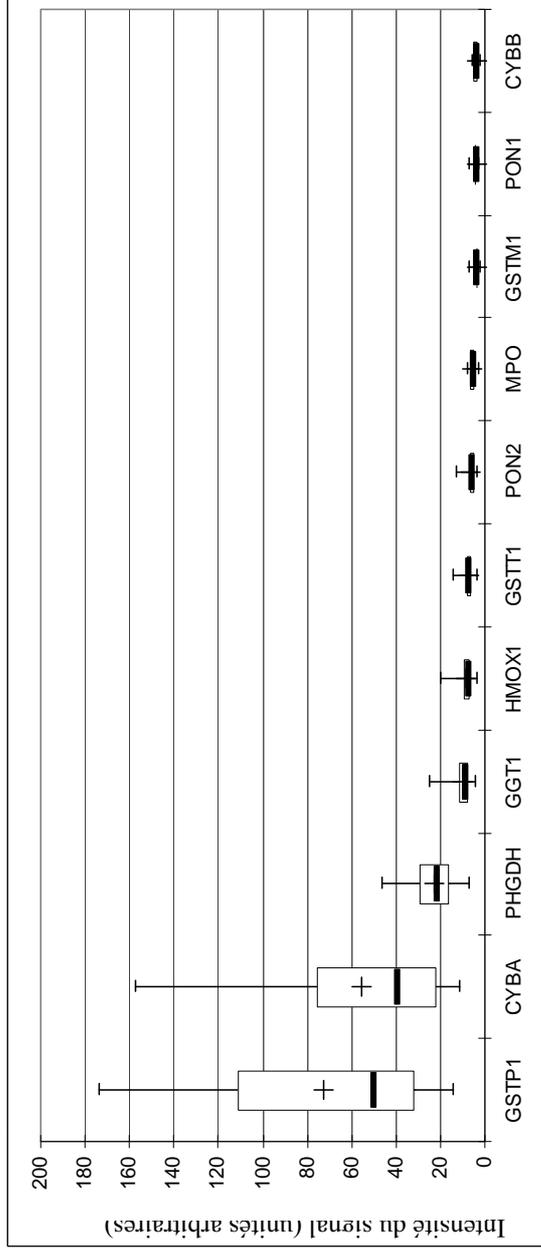
**Facteurs de transcription**



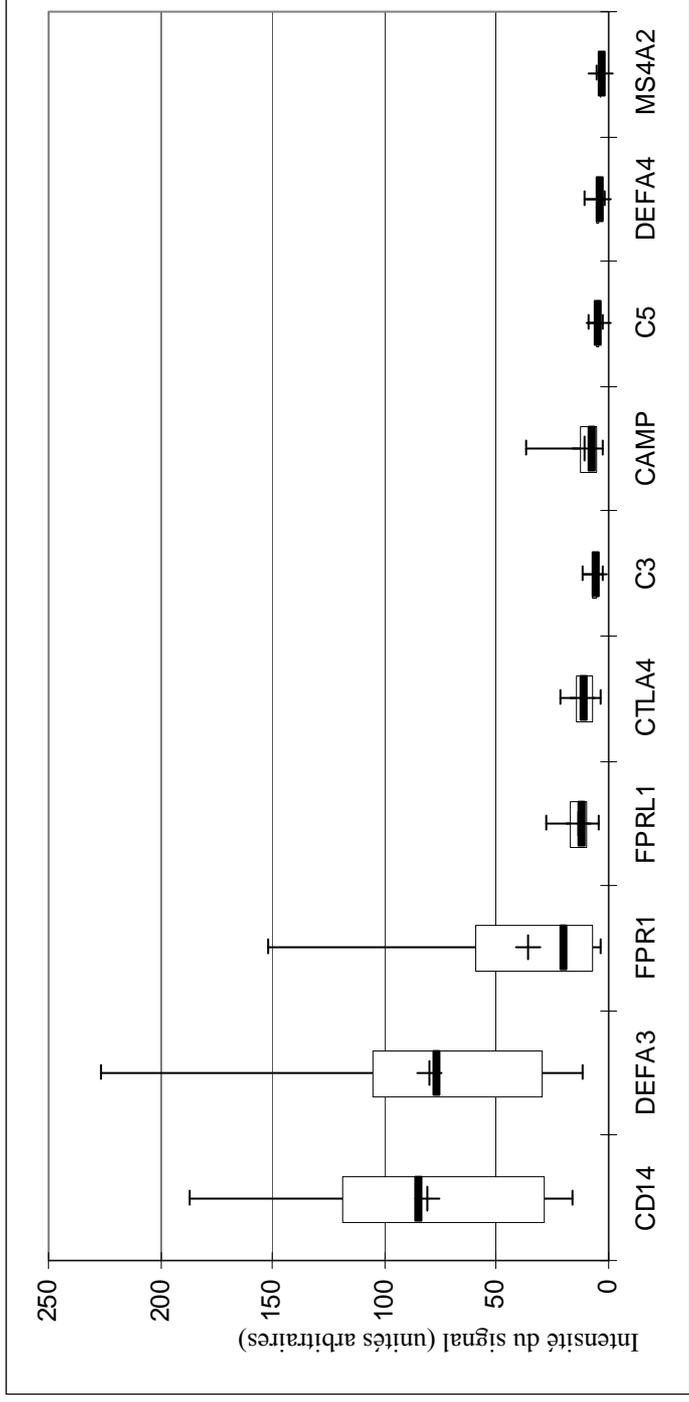
**ANNEXE 7 (suite)**  
**Facteurs de croissance cellulaire**



**Stress oxydant**



**ANNEXE 7 (suite)**  
**Défence immunitaire**



<sup>1</sup>intensité du gène spécifique/bruit de fond

<sup>2</sup>Median

<sup>3</sup>Valeur maximale

<sup>4</sup>Valeur minimale

<sup>5</sup>Moyenne

**ANNEXE 8. Caractéristiques de la population de 83 individus étudiés pour l'expression de la leptine et de la visfatine dans les PBMCs**

Variable	P <sup>1</sup>		
	Femmes	Hommes	
N	41	42	
Age (ans)	48.6±3.3 <sup>2</sup>	49.9±3.8	<i>ns</i> <sup>3</sup>
Poids (kg)	63.8±11.6	81.6±13.4	<0.001
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24.1±4	26.6±3.9	0.001
Rapport taille/hanches (cm)	0.77±0.06	0.89±0.06	<0.001
Glucose (mmol/L)	5.1±0.4	5.6±0.6	<0.001
PAS (mmHg)	118.2±17.0	127.4±11.4	0.015
PAD (mmHg)	67.6±8.4	75.5±8.4	<0.001
Cholestérol totale (mmol/L)	5.7±0.9	5.8±0.8	<i>ns</i>
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.8±0.5	1.9±0.3	<i>ns</i>
LDL (mmol/L)	3.4±0.8	3.6±0.8	<i>ns</i>
TGL (mmol/L)	1.0±0.5	1.2±0.6	0.032
Hs-CRP (mmol/L)	1.5±1.8	2.1±3.5	<i>ns</i>
Globules rouges (10 <sup>12</sup> /L)	4.5±0.4	4.9±0.4	<0.001
Globules blancs (10 <sup>9</sup> /L)	5.8±1.4	5.6±1.4	<i>ns</i>
Lymphocytes (10 <sup>9</sup> /L)	1.7±0.4	1.7±0.4	<i>ns</i>
Lymphocytes (%)	30.4	30.4	<i>ns</i>

<sup>1</sup>P entre hommes et femmes: Mann-Whitney test

<sup>2</sup>Moyennes arithmétiques ± SD

<sup>3</sup>non significatif ( $p>0.05$ )

## **PUBLICATIONS**

## LISTE DES PUBLICATIONS

1. Berrahmoune H., Herbeth B., Samara A., Marteau J-B., Siest G., Visvikis-Siest S. Five-year alterations in BMI are associated with clustering of changes in cardiovascular risk factors in a gender-dependant way: the Stanislas study. *Int J Obes*, 2008, 32: 1279-88.
2. Samara A., Herbeth B., Fumeron F., Berrahmoune H., Siest G., Visvikis-Siest S. Sex-dependent associations of serum leptin with variables related to Metabolic Syndrome in the Stanislas Cohort Study. *Accepté avec modifications à Obes Res*
3. Visvikis-Siest S., Samara A., Meyre D., Herbeth B., Froguel P. Significant relationships between FTO variants and 5-year BMI changes in children and adolescents of the Stanislas Cohort. *PLoS Genet*, 2008(15 Feb), response
4. Visvikis-Siest S., Marteau J-B., Samara A., Berrahmoune H., Marie B., Pfister M. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs): a possible model for studying cardiovascular biology systems. *Clin Chem Lab Med*, 2007, 45: 1154-68.
5. Samara A., Marie B., Pfister M., Visvikis-Siest S. Leptin expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) is related with blood pressure. *Clin Chim Acta*, 2008, 395: 47-50.
6. Samara A., Pfister M., Marie B., Visvikis-Siest S. Visfatin, low-grade inflammation and BMI. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008, 69 : 568-574.

## AUTRES PUBLICATIONS

7. Siest G., Jeannesson E., Marteau J-B., Samara A., Marie B., Pfister M., Visvikis-Siest S. Transcription factors and drug metabolizing enzymes genes expression in lymphocytes from human healthy subjects. *Drug Metab Disp*, 2008, 36: 182-9.
8. Siest G., Marteau J-B., Maumus S., Berrahmoune H., Jeannesson E., Samara A., Batt A-M., Visvikis-Siest S. Pharmacogenomics and cardiovascular drugs : need for integrated biological system with phenotypes and proteomic markers. *Eur J Pharmacol*, 2005, 527: 1-22.
9. Siest G., Marteau J-B., Maumus S., Berrahmoune H., Jeannesson E., Samara A., Batt A-M., Visvikis-Siest S. Pharmacogénomique et pharmacoprotéomique. Stratégie pour les médicaments cardio-vasculaires. *Ann Pharm Fr*, 2007, 65 : 203-10.

## Publication No1

### **Five-year alterations in BMI are associated with clustering of changes in cardiovascular risk factors in a gender-dependant way: the Stanislas study.**

Hind Berrahmoune, Bernard Herbeth, Anastasia Samara, Jean-Brice Marteau, Gérard Siest & Sophie Visvikis-Siest

Int J Obes, 2008, 32: 1279-88

L'objectif de la présente étude longitudinale a été de décrire les associations entre l'augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC) en 5 ans et les altérations des clusters des facteurs associés au syndrome métabolique (SM).

La population étudiée comprend 1099 adultes de la cohorte STANISLAS. Les individus ont été stratifiés en quatre catégories en fonction des changements de l'IMC en 5 ans [perte de poids ( $<0 \text{ kg/m}^2$ ), prise de poids ( $0 \text{ à } 1 \text{ kg/m}^2$ ,  $1 \text{ à } 2 \text{ kg/m}^2$  et  $>2 \text{ kg/m}^2$ )]. Les altérations d'un nombre de facteurs associés au SM, ainsi que leurs clusters, ont été comparées parmi les 4 groupes : indices anthropométriques, pression artérielle, profil lipidique, marqueurs d'inflammation, enzymes hépatiques, acide urique, et les 5 clusters extraits par analyse en composantes principales ('lipides à risque', 'enzymes hépatiques', 'inflammation', 'lipides de protection' et 'pression artérielle').

Nous avons constaté une forte association entre l'augmentation de l'IMC et les clusters 'lipides à risque' et 'pression artérielle' chez les hommes et chez les femmes ( $p \leq 0.001$ ). L'augmentation de l'IMC a été associée seulement chez les hommes avec les clusters 'enzymes hépatiques' et 'lipides de protection' ( $p \leq 0.001$ ) et seulement chez les femmes avec le cluster 'inflammation' ( $p \leq 0.001$ ). Les interactions avec le sexe ont été significatives pour l' 'inflammation' et les 'enzymes hépatiques'.

Nous avons trouvé dans notre population, une forte association linéaire entre l'augmentation de l'IMC et l'aggravation des facteurs associés au SM. En plus, l'identification de 5 clusters associés avec l'augmentation de l'IMC en fonction du sexe, conforte l'hypothèse que la prise de poids, et probablement l'obésité, entraîne des mécanismes métaboliques différents chez les hommes et chez les femmes.



## ORIGINAL ARTICLE

# Five-year alterations in BMI are associated with clustering of changes in cardiovascular risk factors in a gender-dependant way: the Stanislas study

H Berrahmoune<sup>1</sup>, B Herbeth<sup>1</sup>, A Samara<sup>1</sup>, J-B Marteau<sup>1</sup>, G Siest<sup>1,2</sup> and S Visvikis-Siest<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM, CIC 9501, Equipe Génétique Cardiovasculaire, Nancy, France and <sup>2</sup>Faculté de Pharmacie, Nancy Université, Nancy, France

**Objective:** The purpose of the present longitudinal study was to describe the associations between the 5-year changes in body mass index (BMI) and alterations in the clusters of metabolic syndrome (MS)-related factors.

**Methods:** The study population comprised 1099 middle-aged adults drawn from the Stanislas study. Individuals were stratified into four groups according to the 5-year changes in BMI (weight loss (<0 kg/m<sup>2</sup>), and weight gain (0–1, 1–2 and >2 kg/m<sup>2</sup>)). Changes in various MS-related variables and clusters were compared between groups: anthropometric indices, blood pressure, lipid and inflammatory markers, liver enzymes, uric acid and the five summary factors extracted by using factor analysis ('risk lipids', 'liver enzymes', 'inflammation', 'protective lipids' and 'blood pressure').

**Results:** There was a strong linear trend between increasing BMI and worsening of risk lipids and blood pressure factors for both men and women ( $P \leq 0.001$ ). In men only, liver enzymes and protective lipids factors were significantly related to the 5-year gain of BMI ( $P \leq 0.001$ ), whereas inflammation factor positively increased across the four BMI-change groups, in women only. Interaction terms for sex were statistically significant for inflammation and liver enzymes clusters.

**Conclusion:** In our population, there was a strong linear trend between increasing BMI and worsening of various MS-related variables. More interestingly, the identification of five factors associated with BMI changes dependent to gender, support the hypothesis that weight gain, and probably obesity, trigger metabolic mechanisms that differ between men and women.

*International Journal of Obesity* advance online publication, 8 July 2008; doi:10.1038/ijo.2008.94

**Keywords:** BMI; weight change; metabolic syndrome; inflammation; liver enzymes

## Introduction

According to the World Health Organization and the National Institute of Health, obesity is becoming one of the most important contributors to ill health<sup>1</sup> and excess body mass and adiposity are associated with poor health status and various chronic diseases.<sup>2</sup> It has been largely reported that the risk of death from cardiovascular diseases, cancer, or other diseases increases with the severity of obesity in both men and women in all age groups.<sup>3</sup> To investigate the association between body fat mass and adiposity excess on cardiovascular diseases, several population-based studies evaluated the relationships of changes in anthropometric parameters with the metabolic

syndrome (MS)-associated factors. Weight gain is accompanied by the early and more aggressive manifestations of well-recognized risk factors for atherosclerotic cardiovascular disease: blood pressure,<sup>4–7</sup> lipid profile,<sup>4,5,7–9</sup> blood glucose and insulin resistance,<sup>10</sup> inflammatory biomarkers such as high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP),<sup>11,12</sup> liver enzymes such as  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT)<sup>13</sup> and uric acid.<sup>14,15</sup> Conversely, weight loss improves cardiometabolic risk. However, no study has yet investigated simultaneously, in the same sample population, the relationships of body mass index (BMI) changes on a set of common and newly MS-related factors, by taking additionally gender into account.

Thus, in this study, we describe the associations between the 5-year changes in BMI and alterations in various MS-related factors in 1099 middle-aged adults stratified by sex. In addition, five summary clusters based on cardiometabolic factors and extracted by using factor analysis were analyzed according to short-term BMI changes.

Correspondence: Dr S Visvikis-Siest, INSERM-CIC 9501, Equipe Génétique Cardiovasculaire, 30 rue Lionnois, Nancy F-54000, France.  
E-mail: Sophie.Visvikis-Siest@nancy.inserm.fr  
Received 8 November 2007; revised 19 May 2008; accepted 26 May 2008

## Methods

### Subjects

This study is part of the Stanislas Family Study, a 10-year longitudinal follow-up study conducted since 1994 on 1006 families selected at the Center for Preventive Medicine of Vandoeuvre-lès-Nancy (east of France). In this study, we present data from a subsample of 1099 middle-aged adults (aged 30–64 years at entrance, 544 men and 555 women)<sup>16</sup> who had undergone health examinations in 1994–1995 (entrance) and in 1999–2000 (second checkup). In the two separated groups of men and women, individuals were unrelated to each other. Owing to the design of the Stanislas Family Study, subjects were of French origin and were free from acute or chronic diseases such as stroke, myocardial infarction or cancer. Additional exclusion criteria were used for avoiding potential effects on metabolic values and consequently on results of the factor analysis: moderate and severe thinness ( $\text{BMI} < 17 \text{ kg/m}^2$ ), severe obesity (class III obesity:  $\text{BMI} \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ),<sup>17</sup> alcohol abuse (consumption  $\geq 120 \text{ g day}^{-1}$ ), liver enzyme abnormalities (aspartate aminotransferase (ASAT)  $\geq 120 \text{ U l}^{-1}$ , alanine aminotransferase (ALAT) or GGT activities  $\geq 200 \text{ U l}^{-1}$ ), acute inflammation (serum orosomucoid  $\geq 2.5 \text{ g l}^{-1}$ , serum haptoglobin  $\geq 3.5 \text{ g l}^{-1}$ , serum hs-CRP  $\geq 15 \text{ mg l}^{-1}$ ), severe dyslipidemia (serum cholesterol or triglycerides concentrations  $\geq 10 \text{ mmol l}^{-1}$ ), hyperglycemia or diabetes (serum glucose  $\geq 8 \text{ mmol l}^{-1}$  or the use of antidiabetic agent), severe hypertension (systolic blood pressure  $\geq 185 \text{ mm Hg}$  or diastolic blood pressure  $\geq 120 \text{ mm Hg}$ ).

A total of 1653 individuals (about 50% women) participated in the baseline examination and had not missing values for all the above-mentioned variables. The response rate for the second checkup was 73% (1207 subjects). And finally, accounting for exclusion criteria used at entrance and at the second checkup, 1099 individuals were eligible for this study.

Women who attended the follow-up examination were similar to those who did not attend for all the characteristics, except for age: nonresponders were significantly younger than the others. Conversely, men who did not attend the second checkup had significant higher mean values for waist-to-hip ratio (WHR), cigarette consumption, fasting glucose, triglycerides, apolipoprotein E, uric acid, haptoglobin, orosomucoid, activities of ASAT, ALAT, alkaline phosphatase (ALP) and GGT, and white blood cells (WBC) count. Moreover, they were significantly younger than the responders.

Each subject gave written informed consent for participating in this study, which was approved by the 'Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Lorraine' (France). In addition, we certify that all applicable governmental regulations concerning the ethical use of human volunteers were followed during this research.

### Blood samples and data collection

Data were collected by using relevant questionnaires including information about lifestyle such as tobacco,

alcohol and drug consumption and personal medical history. Physical examinations and functional tests were performed and basic blood constituents were measured as described previously.<sup>18</sup>

Weight and height were measured while the participants were standing in light clothing without shoes. Weight was recorded with digital scales and recorded to the nearest 200 g. Height was measured to the nearest 0.1 cm by using wall-mounted stadiometers, while the subjects had the shoulders in a normal position. BMI was calculated as weight in kilograms divided by height in squared meters. To reduce error, all measurements were taken by trained nurses according to the standard procedures established by the Center for Preventive Medicine. Examination of the reliability of the measuring devices was performed periodically during all the study period.

Waist girth was measured at the narrowest level, and hip girth was measured at the maximum level over light clothing, by using an unstretched tape measure, without any pressure to body surface; measurements were recorded to the nearest 0.1 cm.

Physical activity was calculated by using the responses to two items (three choice questions) of the self-questionnaire of the Stanislas study about work activity and leisure time activity. Information was merged and expressed in three grades of activity: low = 1, moderate = 2 and high = 3.

Serum concentrations of fasting glucose, total cholesterol, triglycerides and activities of ASAT, ALAT, ALP and GGT were measured with commercially available kits on an AU5021 apparatus (all from Merck, Darmstadt, Germany) on fresh aliquots, and within 2 h. Serum apolipoproteins AI and B, hs-CRP, haptoglobin and orosomucoid were measured by immunonephelometry on a Behring Nephelometer Analyser (BN II, Dade-Behring, Marburg, Germany) with Behring reagents (Dade-Behring, Reuil-Malmaison, France) within 2 h after sampling. All the blood measurements at entrance and at the second checkup were performed in the same laboratory (Center for Preventive Medicine of Vandoeuvre les Nancy, France) and monitored by using the National Quality Control from France.

### Statistical analyses

Statistical analyses were performed by using the SAS software package version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Before statistical analyses, serum concentrations of the above mentioned variables were adjusted for the effect of between-month variability to remove the effect of both seasonal and analytical variations. Briefly, for each variable, levels were regressed on monthly truncated means obtained on selected healthy men aged 20–40 years attending the health checkup concurrently with the sample population of this study; the variable used being the sum: residual + crude mean of the overall sample.

As the distributions of triglycerides, apolipoprotein E, hs-CRP concentrations and ASAT, ALAT and GGT activities

exhibited a long-tailed positive skewness and kurtosis both at entrance and at the second checkup,  $\log_{10}$  transformation was used. Conversely, the 5-year changes for all variables had normal distributions. The Gaussian distribution was verified by using normal probability plots. For continuous variables at entrance, Kruskal-Wallis tests were performed for characteristic differences across the four groups of BMI changes (weight loss ( $<0\text{ kg/m}^2$ ), and weight gain (0–1, 1–2 and  $>2\text{ kg/m}^2$ ). The significance of differences among the groups for the categorical variables was analyzed by using the  $\chi^2$ -test when cells had expected counts greater than five. The 5-year changes in MS-related variables according to the four BMI change groups were tested by using the test for trend after the adjustment for variable level, age, BMI, alcohol and cigarette consumption at entrance, and the 5-year changes in alcohol and cigarette consumption. In addition, test for interaction between sex and BMI changes was performed. Associations between risk variables related to MS (biological variables and blood pressure) were determined by using Pearson correlation analysis in the whole group (men and women) after adjustment for age, sex and variable value at entrance.

Factor analysis was used to extract factors, followed by orthogonal (varimax) rotation to assist in the interpretation of the factors and to ensure that the factors were uncorrelated. Five-year changes of the following variables were included: serum triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol, apolipoproteins A1, B and E, fasting glucose, hs-CRP, orosomucoid and haptoglobin concentrations; ALAT, ASAT, ALP and GGT activities; WBC count; systolic and diastolic blood pressure. As the values for waist girth or WHR were significantly correlated with BMI, both at entrance and for the 5-year changes, these two anthropometric parameters were not included in factor analysis. Co-linearity between waist girth, WHR and BMI would give wrong results in the following statistical analysis. Variables were adjusted for age, sex and entrance value before analysis. Variables with factor loadings having absolute values of 0.20 or greater were used in interpreting the factors. Scores were computed for rotated factors as the sum of products of observed variables multiplied by their factor loading. Finally, these scores were analyzed according to the four categories of BMI changes. Statistical significance was taken at  $P \leq 0.05$ .

## Results

### Baseline characteristics by BMI change categories

Kruskal-Wallis test showed significant differences across the four categories of BMI changes (Table 1) for all baseline anthropometrical indices (BMI, weight, weight girth and WHR) in both men and women ( $P \leq 0.05$ ), for baseline alcohol consumption, HDL-cholesterol concentration and WBC count in women ( $P = 0.012$ ,  $P = 0.004$ , and  $P = 0.003$ , respectively) and apolipoprotein B and fasting glucose

concentration in men ( $P = 0.041$  and  $P = 0.004$ , respectively). These results required the adjustment for baseline characteristics before further analysis of changes in variables of interest.

### Five-year changes in MS-related variables by BMI change categories

Changes in anthropometrical parameters described in Table 2 were strongly associated with BMI gain in men and in women ( $P \leq 0.001$ ). Changes in cigarette consumption significantly differed across the four groups (decrease of cigarette number when BMI increased), whereas the changes in alcohol consumption and activity index did not. There was a strong significant linear trend with the increasing BMI and worsening of the following MS-related variables in both men and women: systolic and diastolic blood pressure; serum triglycerides, total cholesterol, HDL-cholesterol, apolipoprotein B, apolipoprotein E, uric acid and orosomucoid concentrations, GGT activity and WBC count. In addition, in men only, the same significant trend was observed for concentrations of apolipoproteins A1 and for ASAT and ALAT activities; whereas in women, the relationships were significant for ALP activity and serum concentrations of hs-CRP and haptoglobin. Interaction terms with sex were significant for triglycerides, apolipoprotein E, haptoglobin and orosomucoid concentrations and ASAT, ALAT, GGT and ALP activities.

### Correlation matrix for variable changes

Table 3 presents the correlation matrix for the changes of the various MS-related variables. Changes in anthropometrical parameters over 5 years were strongly correlated between them (BMI, WHR and waist girth;  $P \leq 0.001$ ) and with most of the MS-related variables (Table 3). Systolic blood pressure, diastolic blood pressure, apolipoprotein E and blood glucose were significantly related to BMI and waist girth, but not to WHR changes. WBC were significantly correlated with WHR and waist girth changes and not with BMI gain.

### Exploratory factor analysis

Principal component analysis identified five factors with proportion of the explained variance  $>10\%$  (40.8, 21.8, 19.9, 13.2 and 11.5%, for factor 1–5, respectively), that were retained for factor rotation. Factor loadings of the original variables with each factor after varimax rotation are shown in Table 4. The variables' changes over 5 years were loaded in each factor with a factor loading  $\geq 0.20$ . These factors were interpreted and named as (1) 'risk lipids', with positive loadings of apolipoprotein B, total cholesterol, apolipoprotein E, triglycerides, uric acid and GGT; (2) 'liver enzymes', represented by ALAT, ASAT and GGT; (3) 'inflammation', represented by orosomucoid, haptoglobin, hs-CRP, ALP and WBC; (4) 'protective lipids', represented by HDL-cholesterol,

**Table 1** Baseline characteristics and metabolic syndrome related variables by categories of the 5-year changes in BMI

	Men				Women				P <sup>a</sup>
	<0 kg/m <sup>2</sup>		1-2 kg/m <sup>2</sup>		0-1 kg/m <sup>2</sup>		1-2 kg/m <sup>2</sup>		
	n=121	n=198	n=145	n=80	n=125	n=182	n=123	n=125	
Age (years)	42.3±4.4	42.1±4.6	42.4±5.6	41.7±4.1	39.7±4.4	40.4±4.8	40.6±4.5	40.1±5.149	0.410
Weight (kg)	78.6±11.8	75.4±9.7	75.7±10.0	79.0±12.6	61.8±10.3	59.2±8.7	60.8±10.1	63.0±10.5	0.005
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.7±3.4	24.8±2.7	25.1±2.9	26.2±3.4	23.7±3.5	22.7±3.1	23.4±3.9	24.6±4.01	<0.001
WHR	0.91±0.06	0.89±0.06	0.89±0.06	0.92±0.06	0.76±0.05	0.76±0.05	0.76±0.05	0.78±0.06	0.017
Waist girth (cm)	89.4±10.0	86.7±7.7	87.3±7.9	90.4±9.6	74.8±8.6	72.9±7.5	74.2±9.2	77.2±9.0	<0.001
Alcohol consumption (g day <sup>-1</sup> )	19.5±21.0	22.0±25.0	23.8±25.2	23.5±24.6	2.6±5.6	5.5±10.1	5.0±9.2	4.7±8.8	0.012
Cigarette consumption (cigarette per day)	4.1±7.5	4.2±8.8	4.7±8.8	6.6±10.0	2.3±5.8	2.8±6.3	1.4±3.8	3.4±9.3	0.126
Physical activity (arbitrary unit)	1.5±0.6	1.6±0.6	1.5±0.6	1.4±0.5	1.2±0.5	1.1±0.4	1.1±0.4	1.1±0.4	0.631
Drug use (%)									
Antihypertensive	3.3	1.0	5.5	3.8	1.6	0.5	3.3	0.8	—
Lipid-lowering agent	5.0	6.6	9.0	1.0	1.6	0.5	2.4	5.6	—
Aspirin	2.5	1.5	2.7	1.2	0.0	0.0	1.6	1.6	—
Hormone replacement therapy	—	—	—	—	9.6	8.2	10.6	11.2	0.834
Oral contraceptive	—	—	—	—	20.8	19.8	20.3	25.6	0.638
SBP (mm Hg)	126.5±10.6	126.9±11.4	128.3±12.6	128.1±11.5	119.4±11.0	119.4±13.6	118.7±12.6	120.6±11.5	0.607
DBP (mm Hg)	78.2±8.5	76.5±10.0	78.2±9.5	77.9±9.6	72.2±9.8	72.9±10.6	71.8±10.8	72.3±10.0	0.894
Triglycerides (mmol l <sup>-1</sup> )	1.19 (0.68-2.10)	1.12 (0.68-1.86)	1.10 (0.70-1.74)	1.25 (0.72-2.19)	0.322 (0.16-0.58)	0.81 (0.54-1.22)	0.78 (0.48-1.25)	0.86 (0.56-1.30)	0.111
Cholesterol (mmol l <sup>-1</sup> )	6.11±1.11	5.92±1.02	5.81±1.01	6.08±1.03	5.56±0.93	5.57±0.89	5.50±0.92	5.37±0.85	0.178
Apolipoprotein B (g l <sup>-1</sup> )	1.17±0.27	1.13±0.26	1.10±0.27	1.17±0.26	0.91±0.24	0.91±0.21	0.95±0.22	0.97±0.21	0.742
Apolipoprotein A1 (g l <sup>-1</sup> )	1.53±0.24	1.55±0.21	1.56±0.24	1.58±0.24	1.65±0.26	1.73±0.26	1.72±0.26	1.66±0.27	0.063
HDL-cholesterol (mmol l <sup>-1</sup> )	1.40±0.37	1.41±0.33	1.43±0.37	1.43±0.35	1.66±0.42	1.76±0.41	1.80±0.41	1.64±0.41	0.004
Apolipoprotein E (mg l <sup>-1</sup> )	39.3 (28.7-53.7)	37.6 (28.8-49.1)	38.6 (29.2-51.1)	39.4 (29.4-53.0)	49.1 (35.8-66.6)	35.0 (26.9-45.6)	36.4 (27.5-48.2)	35.6 (26.1-48.4)	0.690
Fasting glucose (mmol l <sup>-1</sup> )	5.18±0.48	5.04±0.47	5.16±0.45	5.22±0.45	4.90±0.45	4.84±0.37	4.89±0.41	4.85±0.40	0.563
Uric acid (μmol l <sup>-1</sup> )	326.0±69.1	306.6±61.1	312.2±64.2	319.1±76.4	234.1±49.0	227.7±43.4	225.2±46.7	234.1±51.6	0.362
Hs-CRP (mg l <sup>-1</sup> )	0.88 (0.33-2.31)	0.81 (0.29-2.23)	0.94 (0.39-2.26)	1.00 (0.33-3.03)	0.292 (0.14-0.58)	0.90 (0.32-2.32)	0.86 (0.30-2.44)	1.14 (0.35-3.71)	0.135
Haptoglobin (g l <sup>-1</sup> )	0.99±0.41	1.01±0.48	1.07±0.42	1.05±0.46	0.329 (0.13-0.52)	1.03±0.37	1.08±0.42	1.09±0.44	0.597
Orooninocid (g l <sup>-1</sup> )	0.78±0.18	0.75±0.16	0.77±0.14	0.77±0.17	0.525 (0.37-0.66)	0.68±0.17	0.70±0.17	0.73±0.21	0.387
ASAT activity (U l <sup>-1</sup> )	23.0 (16.5-31.9)	22.3 (16.9-29.6)	23.3 (17.6-30.9)	22.2 (15.9-31.0)	45.9 (17.6-82.4)	17.6 (13.4-22.8)	17.2 (13.3-22.2)	16.9 (13.3-21.5)	0.534
ALAT activity (U l <sup>-1</sup> )	30.4 (18.7-49.5)	27.9 (18.4-42.3)	30.1 (19.1-47.4)	29.4 (19.9-43.5)	34.5 (18.7-60.3)	17.2 (11.2-26.3)	18.1 (12.1-27.2)	17.3 (11.2-26.7)	0.328
GGT activity (U l <sup>-1</sup> )	29.2 (16.9-50.4)	27.2 (15.8-46.8)	28.8 (15.8-52.5)	30.5 (18.3-51.1)	31.4 (16.0-52.2)	15.5 (9.7-24.7)	15.9 (9.4-26.7)	16.4 (10.1-26.7)	0.603
ALP activity (U l <sup>-1</sup> )	68.7±16.7	66.4±17.2	67.6±17.6	65.2±17.2	39.6 (25.1-54.1)	55.1±14.3	54.6±14.4	56.1±14.0	0.748
WBC (10 <sup>9</sup> l <sup>-1</sup> )	6.76±1.922	6.75±1.89	6.84±1.74	6.86±1.92	6.86±1.86	6.94±1.84	6.65±1.73	7.37±1.71	0.003

ALAT = alanine aminotransferase; ALP = alkaline phosphatase; ASAT = aspartate aminotransferase; BMI = body mass index; DBP = diastolic blood pressure; GGT =  $\gamma$ -glutamyl transferase; HDL = high-density lipoprotein; hs-CRP = high-sensitivity C-reactive protein; SBP = systolic blood pressure; WBC = white blood cells; WHR = waist-to-hip ratio. Values are arithmetic mean  $\pm$  s.d., geometric mean (range of 1 s.d.) or frequency. <sup>a</sup>P-value for men. <sup>b</sup>P-value for women, differences across the four groups: Kruskal-Wallis test or  $\chi^2$ -test when expected cell counts were  $>$  5.

**Table 2** The 5-year changes in metabolic syndrome-related variables by categories of the 5-year changes in BMI

	Men				Women				p <sup>b</sup>	Sex/BMI interaction <sup>c</sup>	
	0–1 kg/m <sup>2</sup>		1–2 kg/m <sup>2</sup>		0–1 kg/m <sup>2</sup>		1–2 kg/m <sup>2</sup>				
	n = 121	n = 198	n = 145	n = 80	n = 125	n = 182	n = 123	n = 125			
ΔWeight (kg)	-2.2 ± 2.3	1.4 ± 1.0	4.2 ± 1.2	8.8 ± 3.3	<0.001	-2.8 ± 3.3	1.2 ± 0.9	3.6 ± 0.9	8.0 ± 3.1	<0.001	0.636
ΔBMI (kg/m <sup>2</sup> )	-0.7 ± 0.7	0.5 ± 0.3	1.4 ± 0.3	2.9 ± 1.0	<0.001	-1.1 ± 1.2	0.5 ± 0.3	1.4 ± 0.3	3.1 ± 1.1	<0.001	<0.001
ΔWHR	0.00 ± 0.04	0.02 ± 0.04	0.03 ± 0.04	0.05 ± 0.05	<0.001	0.02 ± 0.04	0.02 ± 0.04	0.02 ± 0.04	0.04 ± 0.05	<0.001	0.047
ΔWaist girth (cm)	-2.0 ± 3.5	1.3 ± 3.2	4.3 ± 2.9	8.3 ± 4.6	<0.001	-2.8 ± 3.9	1.4 ± 3.2	2.9 ± 3.1	7.1 ± 4.2	<0.001	0.175
ΔAlcohol consumption (g day <sup>-1</sup> )	-0.3 ± 17.5	-0.7 ± 17.4	-0.8 ± 14.9	-0.8 ± 16.3	0.857	0.3 ± 4.9	0.6 ± 6.5	0.6 ± 6.8	1.8 ± 9.2	0.119	0.452
ΔCigarette consumption (cigarette day <sup>-1</sup> )	0.9 ± 5.9	-0.1 ± 3.2	-0.2 ± 5.8	-0.2 ± 9.6	<0.001	0.5 ± 3.2	-0.2 ± 4.1	-0.2 ± 2.8	-1.5 ± 6.8	<0.001	0.023
ΔPhysical activity (arbitrary units)	0.0 ± 0.5	-0.1 ± 0.6	-0.1 ± 0.6	-0.2 ± 0.5	0.076	0.0 ± 0.4	0.0 ± 0.4	-0.1 ± 0.3	-0.1 ± 0.5	0.046	0.766
ΔSBP (mmHg)	-1.5 ± 10.9	0.7 ± 11.7	0.5 ± 10.7	4.6 ± 13.7	<0.001	-3.4 ± 10.9	0.3 ± 12.5	2.5 ± 12.2	3.8 ± 12.1	<0.001	0.545
ΔDBP (mmHg)	-2.6 ± 9.9	0.6 ± 11.3	-2.2 ± 10.2	3.7 ± 12.0	0.002	-3.6 ± 10.8	-1.1 ± 11.1	0.8 ± 11.5	2.8 ± 11.1	<0.001	0.387
ΔTriglycerides (mmol l <sup>-1</sup> )	-0.18 ± 0.67	0.01 ± 0.72	0.21 ± 0.77	0.32 ± 1.08	<0.001	-0.09 ± 0.39	-0.01 ± 0.37	0.04 ± 0.32	0.21 ± 0.52	<0.001	0.019
ΔCholesterol (mmol l <sup>-1</sup> )	-0.22 ± 0.91	0.01 ± 0.77	0.19 ± 0.82	0.23 ± 0.81	<0.001	-0.13 ± 0.74	0.05 ± 0.69	0.15 ± 0.72	0.39 ± 0.80	<0.001	0.809
ΔLipoprotein B (g l <sup>-1</sup> )	-0.10 ± 0.21	-0.04 ± 0.18	0.01 ± 0.21	0.03 ± 0.19	<0.001	-0.08 ± 0.15	-0.04 ± 0.15	-0.01 ± 0.17	0.05 ± 0.18	<0.001	0.537
ΔLipoprotein A1 (g l <sup>-1</sup> )	0.03 ± 0.16	0.01 ± 0.18	-0.03 ± 0.18	-0.03 ± 0.20	0.009	0.01 ± 0.22	-0.01 ± 0.22	-0.01 ± 0.22	-0.00 ± 0.27	0.430	0.208
ΔLDL cholesterol (mmol l <sup>-1</sup> )	0.07 ± 0.24	0.03 ± 0.25	-0.03 ± 0.28	-0.06 ± 0.28	<0.001	0.09 ± 0.33	0.05 ± 0.29	0.03 ± 0.30	-0.02 ± 0.37	0.001	0.635
ΔLipoprotein I (mg l <sup>-1</sup> )	-2.1 ± 10.2	0.8 ± 8.3	3.0 ± 10.5	4.7 ± 12.8	<0.001	1.1 ± 8.8	2.5 ± 8.4	1.9 ± 7.0	3.3 ± 8.3	0.040	0.002
ΔFasting glucose (mmol l <sup>-1</sup> )	0.04 ± 0.53	0.18 ± 0.56	0.11 ± 0.63	0.19 ± 0.56	0.087	0.06 ± 0.54	0.08 ± 0.52	0.08 ± 0.50	0.20 ± 0.55	0.265	0.660
ΔUric acid (μmol l <sup>-1</sup> )	-9.4 ± 52.7	-2.2 ± 42.8	16.0 ± 50.7	25.2 ± 66.3	<0.001	-11.5 ± 36.7	-7.0 ± 35.8	3.9 ± 37.9	15.4 ± 44.7	<0.001	0.633
Δhs-CRP (mg l <sup>-1</sup> )	-0.16 ± 1.59	-0.02 ± 1.87	0.12 ± 1.57	-0.13 ± 1.97	0.092	-0.38 ± 1.53	0.09 ± 2.00	0.13 ± 1.83	0.28 ± 2.52	<0.001	0.067
ΔHaptoglobin (g l <sup>-1</sup> )	0.05 ± 0.27	0.05 ± 0.32	0.05 ± 0.30	0.00 ± 0.30	0.821	-0.01 ± 0.26	0.03 ± 0.27	0.07 ± 0.34	0.15 ± 0.40	<0.001	0.001
ΔOxotricinoid (g l <sup>-1</sup> )	-0.03 ± 0.12	-0.00 ± 0.15	0.01 ± 0.15	0.01 ± 0.17	0.013	-0.04 ± 0.14	0.03 ± 0.16	0.01 ± 0.14	0.08 ± 0.18	<0.001	0.002
ΔASAT activity (U l <sup>-1</sup> )	-1.7 ± 9.6	1.8 ± 9.7	1.3 ± 8.9	4.9 ± 10.1	<0.001	1.1 ± 8.1	0.1 ± 6.7	1.2 ± 8.4	2.6 ± 7.8	0.237	0.003
ΔALAT activity (U l <sup>-1</sup> )	-2.3 ± 15.9	1.5 ± 14.1	2.7 ± 15.2	13.6 ± 23.0	<0.001	-0.6 ± 15.7	-0.7 ± 12.3	0.5 ± 17.5	3.6 ± 14.5	0.062	<0.001
ΔGGT activity (U l <sup>-1</sup> )	-2.1 ± 15.8	4.7 ± 16.5	6.3 ± 16.6	16.0 ± 21.6	<0.001	-0.6 ± 9.3	0.5 ± 6.8	2.2 ± 10.1	6.2 ± 17.6	<0.001	<0.001
ΔALP activity (U l <sup>-1</sup> )	0.1 ± 11.0	2.4 ± 10.0	1.6 ± 10.7	2.8 ± 9.4	0.088	2.2 ± 9.9	3.4 ± 10.1	6.0 ± 11.3	9.0 ± 12.7	<0.001	0.011
ΔWBC (10 <sup>9</sup> l <sup>-1</sup> )	-0.16 ± 1.62	-0.09 ± 1.50	0.09 ± 1.53	-0.09 ± 1.75	0.021	-0.04 ± 1.60	-0.03 ± 1.63	0.21 ± 1.46	-0.03 ± 1.68	0.038	0.782

ALAT – alanine aminotransferase; ALP – alkaline phosphatase; ASAT – aspartate aminotransferase; BMI – body mass index; DBP – diastolic blood pressure; GGT – γ-glutamyl transferase; HDL – high-density lipoprotein; hs-CRP – high-sensitivity C-reactive protein; SBP – systolic blood pressure; WBC – white blood cells; WHR – waist-to-hip ratio. Values are arithmetic mean ± s.d. \*p-value for men, †p-value for women, differences across the four groups; test for trend by using the adjusted values for variable level, age, BMI, alcohol and cigarette consumption at entrance, and the 5-year change in alcohol and cigarette consumption except for weight, BMI, waist girth, alcohol, tobacco and activity. †p-test for the interaction between sex and categories of the BMI changes.

Table 3 Partial Pearson correlation coefficients between the 5-year changes of metabolic syndrome-related variables in men and women\*

	.delta.BMI	.delta.Waist	.delta.HbA1c	.delta.Triglycerides	.delta.Cholesterol	.delta.HDL-cholesterol	.delta.Apolipoprotein B	.delta.Apolipoprotein A1	.delta.Fasting glucose	.delta.Fasting insulin	.delta.Hs-CRP	.delta.MetS	.delta.MetS score	.delta.MetS components							
.delta.BMI	1.000	0.380	0.775	0.195	0.384	0.236	0.243	-0.050	-0.157	0.174	0.098	0.261	0.140	0.106	0.220	0.144	0.223	0.280	0.201	0.040	
.delta.Waist		1.000	0.653	0.047	0.048	0.139	0.135	-0.024	-0.157	0.053	0.018	0.150	0.123	0.083	0.154	0.080	0.178	0.203	0.090	0.113	
.delta.HbA1c			1.000	0.117	0.123	0.216	0.247	-0.062	-0.161	0.174	0.083	0.280	0.150	0.098	0.224	0.112	0.224	0.283	0.173	0.085	
.delta.Triglycerides				1.000	0.617	0.119	0.089	0.051	-0.027	0.056	0.143	0.091	0.095	0.102	0.089	0.075	0.124	0.121	0.090	0.050	
.delta.Cholesterol					1.000	0.117	0.112	0.013	-0.040	0.041	0.180	0.091	0.091	0.062	0.072	0.070	0.118	0.106	0.085	0.004	
.delta.HDL-cholesterol						1.000	0.334	-0.033	-0.228	0.328	0.063	0.187	0.124	0.152	0.180	0.050	0.130	0.240	0.126	0.136	
.delta.Apolipoprotein B							1.000	0.260	0.196	0.490	0.002	0.216	0.035	0.062	0.137	0.074	0.139	0.238	0.184	0.035	
.delta.Apolipoprotein A1								1.000	-0.042	0.417	0.007	0.249	0.090	0.173	0.219	0.075	0.130	0.226	0.164	0.060	
.delta.Fasting glucose									1.000	0.621	-0.036	-0.023	-0.044	-0.091	-0.082	0.064	-0.021	0.017	-0.063	-0.027	
.delta.Fasting insulin										1.000	0.086	-0.076	-0.074	-0.117	-0.178	0.045	-0.036	-0.014	-0.033	-0.038	
.delta.Hs-CRP											1.000	0.208	0.003	0.122	0.236	0.117	0.195	0.236	0.154	0.070	
.delta.MetS												1.000	0.040	0.027	0.029	0.009	0.075	0.067	0.098	-0.128	
.delta.MetS score													1.000	0.092	0.180	0.068	0.124	0.193	0.039	0.011	
.delta.MetS components														1.000	0.433	0.029	0.049	0.098	0.183	0.203	
.delta.ASAT															1.000	-0.030	0.007	0.111	0.267	0.196	
.delta.ASAT																1.000	0.040	0.112	0.172	0.377	0.203
.delta.ASAT																	1.000	0.771	0.365	0.320	0.068
.delta.ASAT																		1.000	0.366	0.166	0.001
.delta.ASAT																			1.000	0.281	0.057
.delta.ASAT																				1.000	0.079
.delta.ASAT																					1.000

ALAT – alanine aminotransferase; ALP – alkaline phosphatase; ASAT – aspartate aminotransferase; ASAT – aspartate aminotransferase; BMI – body mass index; DBP – diastolic blood pressure; GGT – gamma-glutamyl transferase; HDL – high-density lipoprotein; hs-CRP – high-sensitivity C-reactive protein; SBP – systolic blood pressure; WBC – white blood cells; WHR – waist-to-hip ratio. \*Variables were adjusted for age, sex and entrance value before the analysis. For n = 1099, minimum significant correlation coefficients at P = 0.05, 0.01 and 0.001 were 0.054, 0.076 and 0.097, respectively.

**Table 4** Factor loadings for the 5-year changes of metabolic syndrome-related variables in men and women<sup>a</sup>

	Factors				
	Risk lipids	Liver enzymes	Inflammation	Protective lipids	Blood pressure
ΔApolipoprotein B	0.841				
ΔCholesterol	0.839			0.296	
ΔApolipoprotein E	0.605				
ΔTriglycerides	0.553			-0.204	
ΔUric acid	0.275				
ΔALAT		0.871			
ΔASAT		0.796			
ΔGGT	0.255	0.546			
ΔOrosomucoid			0.709		
ΔHaptoglobin			0.705		
Δhs-CRP			0.531		
ΔALP			0.392		
ΔWBC			0.296		
ΔHDL cholesterol				0.759	
ΔApolipoprotein AI				0.694	
ΔDBP					0.722
ΔSBP					0.709
ΔFasting glucose					0.239
Explained Variance (%)	40.8	21.8	19.9	13.2	11.5

ALAT – alanine aminotransferase; ALP – alkaline phosphatase; ASAT – aspartate aminotransferase; DBP – diastolic blood pressure; GGT – γ-glutamyl transferase; HDL – high-density lipoprotein; hs-CRP – high-sensitivity C-reactive protein; SBP – systolic blood pressure; WBC – white blood cells. <sup>a</sup>Variables were adjusted for age, sex and entrance value before the analysis; varimax rotation were used. Factor loadings of less than 0.20 or more than +0.20 were not shown for simplicity.

apolipoprotein A1, cholesterol and triglycerides (negative value) and (5) ‘blood pressure’ with positive loadings of diastolic and systolic blood pressures and fasting glucose.

*The five factor scores by BMI change categories*

The association of factor scores across the four categories of the 5-year changes in BMI was assessed using the test for trend after the adjustment for age, BMI, alcohol and cigarette consumption at entrance, and the 5-year change in alcohol and cigarette consumption (Table 5). There was a strong linear trend between increasing BMI gain and worsening of risk lipids and blood pressure factors among men and women ( $P \leq 0.001$ ). In addition, in men only, liver enzymes and protective lipids factors were significantly related to the 5-year gain in BMI ( $P \leq 0.001$ ); whereas the inflammation factor positively increased across the four BMI-change groups, in women only. Interaction terms with sex were statistically significant for the factors inflammation and liver enzymes ( $P \leq 0.001$ ) and borderline significant for protective lipids ( $P = 0.07$ ).

Similar results were found for the five scores when analyses were successively restricted to individuals not taking the following drugs (lipid-lowering medications, aspirin, oral contraceptive or hormone replacement therapy), not having menopause, or smoking less than five cigarettes per day. However, later with alcohol consumption higher than 24 g per day (about 1/41 wine), differences across the four categories of the 5-year changes in BMI were less marked for protective lipids in men only:  $0.05 \pm 0.72$ ,  $0.04 \pm 0.68$ ,  $-0.18 \pm 0.79$  and  $-0.14 \pm 0.80$  ( $P = 0.05$ ). In addition, inter-

action term with sex in test for trend was no longer significant. For the scores risk lipids, liver enzymes, inflammation and blood pressure, exclusion of subjects consuming more than 24 g of alcohol per day did not modify our previous results shown in Table 5.

**Discussion**

In this study, we described in which way the 5-year changes in a sizeable number of MS-related variables are associated each other and how alterations in BMI are related with these changes. We not only confirmed but also extended previously reported works about the relationships between BMI gain and worsening of various MS-related variables in men and/or in women including blood pressure, lipid profile, inflammation markers, liver enzymes, uric acid and ALP activity. By using factor analysis in order to avoid the problem of multiple comparisons and redundancy of information, five summary factors based on the patterns of changes of the metabolic variables were identified: risk lipids, liver enzymes, inflammation, protective lipids and blood pressure. In addition, we showed a gender-dependent interaction between changes in BMI and MS-related clusters: liver enzymes and protective lipids factors were significantly associated with weight gain in men and inflammation in women, whereas risk lipids and blood pressure factors were related to weight gain in both men and women.

In contrast to previous investigations,<sup>19</sup> this survey was not designed to contribute to better diagnosis or prediction of the MS but to emphasize the impact of short-term changes

**Table 5** Average factor scores by categories of the 5-year changes in BMI in men and women

Factor scores	Men				Women				P <sup>b</sup>	Sex/BMI interaction <sup>c</sup>
	P <sup>a</sup>		P <sup>a</sup>		P <sup>a</sup>		P <sup>a</sup>			
	< 0 kg/m <sup>2</sup> n = 121	0-1 kg/m <sup>2</sup> n = 198	1-2 kg/m <sup>2</sup> n = 145	> 2 kg/m <sup>2</sup> n = 80	< 0 kg/m <sup>2</sup> n = 125	0-1 kg/m <sup>2</sup> n = 182	1-2 kg/m <sup>2</sup> n = 123	> 2 kg/m <sup>2</sup> n = 125		
Risk lipids	-0.37 ± 1.01	-0.11 ± 0.95	0.20 ± 1.00	0.47 ± 1.17	-0.27 ± 0.73	-0.06 ± 0.65	0.02 ± 0.81	0.34 ± 0.89	<0.001	0.095
Liver enzymes	-0.44 ± 0.63	-0.03 ± 0.90	0.07 ± 0.86	0.62 ± 1.34	0.01 ± 0.85	-0.10 ± 0.55	0.00 ± 1.06	0.14 ± 0.93	0.207	<0.001
Inflammation	-0.04 ± 0.74	-0.01 ± 0.90	0.08 ± 0.82	-0.04 ± 0.78	-0.31 ± 0.66	-0.03 ± 0.85	0.00 ± 0.75	0.39 ± 0.95	<0.001	<0.001
Protective lipids	0.15 ± 0.74	0.07 ± 0.76	-0.13 ± 0.80	-0.18 ± 0.80	0.02 ± 0.87	0.04 ± 0.81	0.03 ± 0.84	-0.11 ± 1.04	0.134	0.070
Blood pressure	-0.18 ± 0.79	0.01 ± 0.80	-0.07 ± 0.75	0.39 ± 0.85	-0.30 ± 0.74	-0.05 ± 0.74	0.09 ± 0.81	0.29 ± 0.80	<0.001	0.381

BMI – body mass index. Values are arithmetic mean ± s.d. <sup>a</sup>P-value for men. <sup>b</sup>P-value for women. <sup>c</sup>P-value for trend by using the adjusted values for age, BMI, alcohol and cigarette consumption at entrance and the 5-year change in the alcohol and cigarette consumption. <sup>d</sup>P-test for interaction between the sex and the categories of BMI changes.

in BMI, on various MS-related factors and their clusters. The major findings of factor analysis were the confirmation of previously reported metabolic summary factors from cross-sectional studies of nondiabetic healthy adults (risk and protective lipids, blood pressure and inflammation)<sup>19,20</sup> and the identification of a new summary factor (liver enzymes). Moreover, in agreement with previous studies, WBC aggregated with inflammation markers (inflammation cluster)<sup>21</sup> and uric acid and GGT activity with lipid levels of risk lipids cluster.<sup>22</sup>

When analyzing individual parameters or clusters taking the confounders into account, our results are in accordance with worldwide previous studies showing associations of blood pressure and lipid profile changes over time with changes in BMI for both sexes.<sup>4,6,8,23,24</sup> In addition, similarly to previous investigations, changes in GGT activity and uric acid concentrations<sup>15</sup> were significantly associated with BMI gain in both genders and no association was found with changes in fasting blood glucose levels.<sup>4,7</sup>

Conversely, BMI changes were associated with changes in ALP and in inflammatory markers (hs-CRP, haptoglobin, orosomucoid and summary cluster inflammation) in women only. A number of previous studies have underlined the differences between men and women for the associations between inflammation markers and body composition and/or weight alteration. For instance, positive correlations of adiposity with hs-CRP concentrations are often stronger in women than in men<sup>25-27</sup> and hs-CRP concentrations have been found reduced with weight loss in women.<sup>28</sup> Data related to other inflammatory markers are scarce; orosomucoid and haptoglobin concentrations have been shown to be associated with weight gain in a male population but without comparison with women.<sup>29</sup> The mechanisms acting for this sex-specific difference are not well understood but a possible explanation could be given by leptin. This adipokine plays important roles in regulating immune and inflammatory response<sup>30</sup> and recently Abdullah *et al.*<sup>31</sup> observed significant correlations between leptin and hs-CRP levels in women but not in men, independently of other measures of obesity.

Significant associations were previously observed in men between ASAT, ALAT and GGT activities and BMI by using cross-sectional<sup>23</sup> or longitudinal design,<sup>32</sup> after controlling for the effect of alcohol consumption as in our study. Moreover, in agreement with our data, BMI changes over time were related to simultaneous alterations of ALAT, ASAT and GGT activities.<sup>5</sup> However, no sex-dependent interaction was noticed in the literature as in our study. Likewise, no data exists on relationships between ALP activity and BMI change, our results observed in women only could be due to bone formation mechanism related to hormonal status.<sup>33</sup>

The gender-dependant associations, we found for inflammation and liver enzymes factors could be explained by gender-differences in adiposity. Intra-abdominal fat is closely connected anatomically and physiologically to the liver.<sup>34</sup> In men, it is related in a nonlinear way with weight, BMI, and

waist girth in normal weight individuals, whereas distribution of fat becomes more uniform across storage sites in obesity. Contrary to men, in women, this relationship is always linear in normal or higher BMI as a result of their generalized/peripheral fat patterning.<sup>35</sup> We can presume that equal weight gain, in nonexcessively obese men and women, could result in differential fat accumulation. Thus, a trend for intra-abdominal accumulation in men could affect liver metabolism and liver enzyme activity, whereas in women the trend for a more homogenous/generalized fat distribution could trigger inflammation, explaining at least partially, the sex-dependent relationship we evidenced.

The strengths of the current longitudinal study include the careful selection of the subsample of middle-aged adult, without chronic (cardiovascular diseases and diabetes) or acute disease, without morbid obesity and without extreme values concerning the MS-related variables. Furthermore, detailed information on lifestyle and metabolic factors were available and were used as confounding factors. Another strength is that the data collection at the two checkups was performed in the same center, by trained staff and according to standard procedures monitored by using a Quality Control program. In addition, seasonal and analytical variation variability was reduced and/or taken into account before statistical analyses.

This study is limited by the fact that our conclusions are valid for middle-aged adults living in the east France with similar characteristics and comparison with other investigations should take into account the characteristics of these French individuals. Another limitation is related to the usual problem of withdrawal in longitudinal surveys and differences at baseline between subjects attending only the first and both checkup visits. As we were not able to perform a recall for the subsample (or for a part of it) of nonresponders, no accurate estimation was available about the confounding effect on our results. Nevertheless, we can hypothesize that loss of individuals with higher MS-related factors (in particular in the group of men) has led to an underestimation of effects and to a subsequent reduction of statistical power.

In conclusion, our results show that short-term BMI gain is strongly associated with the worsening of various MS-related variables when analyzing them individually or after clustering. This association is significant for risk lipids and blood pressure factors for both men and women. Conversely, liver enzymes and protective lipids factors are significantly related to BMI gain in men only, whereas inflammation factor is associated with BMI gain in women only. This fact underlines the importance of gender in biological mechanisms involved in MS physiopathology.

## Acknowledgements

We thank the staff of the Centre de Médecine Préventive of Vandoeuvre-lès-Nancy (France) for their involvement in the

recruitment of the Stanislas cohort. We are indebted to the families of the Stanislas survey who made this study possible. The Stanislas cohort study is supported by the Caisse Nationale d'Assurance Maladies des Travailleurs Salariés (CNAM), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Région Lorraine, the Communauté Urbaine du Grand Nancy and the Nancy University.

## References

- 1 World Health Organization. *The World Health Report 1998: life in the 21st century*. World Health Organization: Geneva, 1998.
- 2 Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight in Adults. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. *Wmjf* 1998; **97**: 20–21, 24–25, 27–37.
- 3 Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath Jr CW. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of US adults. *N Engl J Med* 1999; **341**: 1097–1105.
- 4 Czernichow S, Mennen L, Bertrais S, Preziosi P, Hercberg S, Oppert JM. Relationships between changes in weight and changes in cardiovascular risk factors in middle-aged French subjects: effect of dieting. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; **26**: 1138–1143.
- 5 Lee DH, Ha MH, Christiani DC. Body weight, alcohol consumption and liver enzyme activity—a 4-year follow-up study. *Int J Epidemiol* 2001; **30**: 766–770.
- 6 Sjostrom CD, Peltonen M, Sjostrom L. Blood pressure and pulse pressure during long-term weight loss in the obese: the Swedish Obese Subjects (SOS) Intervention Study. *Obes Res* 2001; **9**: 188–195.
- 7 Rainwater DL, Mitchell BD, Comuzzie AG, VandeBerg JL, Stern MP, MacCluer JW. Association among 5-year changes in weight, physical activity, and cardiovascular disease risk factors in Mexican Americans. *Am J Epidemiol* 2000; **152**: 974–982.
- 8 Eberle E, Doering A, Keil U. Weight change and change of total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol. Results of the MONICA Augsburg cohort study. *Ann Epidemiol* 1991; **1**: 487–492.
- 9 Gossain VV, Gunaga KP, Carella MJ, Bennink M, Edminster RR, Rovner DR. Apolipoproteins in obesity: effect of weight loss. *J Med* 1997; **28**: 251–264.
- 10 Hillier TA, Fagot-Campagna A, Eschwege E, Vol S, Cailleau M, Balkau B. Weight change and changes in the metabolic syndrome as the French population moves towards overweight: the DESIR cohort. *Int J Epidemiol* 2006; **35**: 190–196.
- 11 Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 2003; **107**: 391–397.
- 12 Reinehr T, Stoffel-Wagner B, Roth CL, Andler W. High-sensitive C-reactive protein, tumor necrosis factor alpha, and cardiovascular risk factors before and after weight loss in obese children. *Metabolism* 2005; **54**: 1155–1161.
- 13 Lee DS, Evans JC, Robins SJ, Wilson PW, Albano I, Fox CS et al. Gamma glutamyl transferase and metabolic syndrome, cardiovascular disease, and mortality risk: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 127–133.
- 14 Kawamoto R, Tomita H, Oka Y, Ohtsuka N. Relationship between serum uric acid concentration, metabolic syndrome and carotid atherosclerosis. *Intern Med* 2006; **45**: 605–614.
- 15 Nakanishi N, Yoshida H, Nakamura K, Suzuki K, Tatara K. Predictors for development of hyperurkemia: an 8-year longitudinal study in middle-aged Japanese men. *Metabolism* 2001; **50**: 621–626.
- 16 Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Gueguen R, Vincent-Viry M, Sass C et al. Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions

- in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. *Clin Chem Lab Med* 1998; **36**: 35–42.
- 17 Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1995; **854**: 1–452.
  - 18 Ponthieux A, Herbeth B, Drosch S, Haddy N, Lambert D, Visvikis S. Biological determinants of serum ICAM-1, E-selectin, P-selectin and L-selectin levels in healthy subjects: the Stanislas study. *Atherosclerosis* 2004; **172**: 299–308.
  - 19 Sakkinen PA, Wahl P, Cushman M, Lewis MR, Tracy RP. Clustering of procoagulation, inflammation, and fibrinolysis variables with metabolic factors in insulin resistance syndrome. *Am J Epidemiol* 2000; **152**: 897–907.
  - 20 Lafortuna CL, Adorni F, Agosti F, Sartorio A. Factor analysis of metabolic syndrome components in obese women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008; **18**: 233–241.
  - 21 Lao XQ, Neil TG, Jiang C, Zhang W, Adab P, Lam TH et al. White blood cell count and the metabolic syndrome in older Chinese: The Guangzhou Biobank Cohort Study. *Atherosclerosis* 2008, in press.
  - 22 Onat A, Uyarel H, Hergenc G, Karabulut A, Albayrak S, Sari I et al. Serum uric acid is a determinant of metabolic syndrome in a population-based study. *Am J Hypertens* 2006; **19**: 1055–1062.
  - 23 Lee JS, Kawakubo K, Kobayashi Y, Mori K, Kasihara H, Tamura M. Effects of 10-year body weight variability on cardiovascular risk factors in Japanese middle-aged men and women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; **25**: 1063–1067.
  - 24 Wing RR, Jeffery RW, Burton LR, Thorson C, Kuller LH, Folsom AR. Change in waist-hip ratio with weight loss and its association with change in cardiovascular risk factors. *Am J Clin Nutr* 1992; **55**: 1086–1092.
  - 25 Pteroni L, Bastard JP, Piton A, Khalil L, Hainque B, Jardel C. Interpretation of circulating C-reactive protein levels in adults: body mass index and gender are a must. *Diabetes Metab* 2003; **29**: 133–138.
  - 26 Lakoski SG, Cushman M, Criqui M, Rundek T, Blumenthal RS, D'Agostino Jr RB et al. Gender and C-reactive protein: data from the Multiethnic Study of Atherosclerosis (MESA) cohort. *Am Heart J* 2006; **152**: 593–598.
  - 27 Thorand B, Baumert J, Doring A, Herder C, Kolb H, Rathmann W et al. Sex differences in the relation of body composition to markers of inflammation. *Atherosclerosis* 2006; **184**: 216–224.
  - 28 Heilbronn LK, Noakes M, Clifton PM. Energy restriction and weight loss on very-low-fat diets reduce C-reactive protein concentrations in obese, healthy women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**: 968–970.
  - 29 Engstrom G, Hedblad B, Stavenow L, Lind P, Janzon L, Lindgarde F. Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain. *Diabetes* 2003; **52**: 2097–2101.
  - 30 Otero M, Lago R, Gomez R, Dieguez C, Lago F, Gomez-Reino J et al. Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. *Rheumatology (Oxford)* 2006; **45**: 944–950.
  - 31 Abdullah SM, Khera A, Leonard D, Das SR, Canham RM, Kamath SA et al. Sex differences in the association between leptin and CRP: results from the Dallas Heart Study. *Atherosclerosis* 2007; **195**: 404–410.
  - 32 Burns CJ, Boswell JM, Olsen GW. Liver enzyme activity and body mass index. *J Occup Environ Med* 1996; **38**: 1248–1252.
  - 33 Papakitsou EE, Margioris AN, Dretakis KE, Trovas G, Zoras U, Lyritis G et al. Body mass index (BMI) and parameters of bone formation and resorption in postmenopausal women. *Menopause* 2004; **47**: 185–193.
  - 34 Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med* 2005; **22**: 1129–1133.
  - 35 Schreiner PJ, Terry JG, Evans GW, Hirson WH, Crouse III JR, Heiss G. Sex-specific associations of magnetic resonance imaging-derived intra-abdominal and subcutaneous fat areas with conventional anthropometric indices. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 1996; **144**: 335–345.

## Publication No2

### **Sex-dependent associations of leptin with Metabolic Syndrome related variables: the Stanislas Study**

Anastasia Samara, Bernard Herbeth, Roberte Aubert, Hind Berrahmoune, Frédéric Fumeron, Gérard Siest, Sophie Visvikis-Siest

Accepté avec modifications à Obes Res

Récemment, la leptine a été trouvée associée avec la protéine C-réactive (CRP) et cette association est indépendante de l'obésité mais dépendante du sexe. Ainsi, nous avons voulu regarder si la leptine est associée avec d'autres marqueurs d'inflammation et des variables associées au syndrome métabolique (SM) et si ces associations sont indépendantes des mesures anthropométriques mais dépendantes du sexe.

Chez 384 adultes supposés sains (192 hommes et 192 femmes) nous avons mesuré la masse grasse totale et le rapport taille/hanches, ainsi que la leptine circulante et 15 facteurs associés au SM : pression artérielle systolique et diastolique, triglycérides (TGL), cholestérol, HDL cholestérol (HDL-C), ApoAI, ApoB, glucose, acide urique, CRP, orosomucoïde, haptoglobine, et l'activité des enzymes hépatiques aspartate aminotransférase (ASAT), alanine aminotransférase (ALAT) et glutamyltransférase gamma (GGT).

Après ajustement sur l'âge, la consommation d'alcool et de tabac, le rapport taille/hanches, et la masse grasse totale, la leptine est associée avec les TGL, le cholestérol, l'ApoB, l'acide urique, l'haptoglobine et l'activité des enzymes hépatiques chez les hommes et l'HDL-C, l'ApoAI et la CRP chez les femmes. Le test d'interaction du sexe a été significatif pour le cholestérol, l'ApoB, l'HDL-C et les enzymes ALAT et GGT.

La leptine est donc associée avec plusieurs facteurs du SM indépendamment du rapport taille/hanches et de la masse grasse totale, et spécifique au sexe, dans une population de sujets supposés sains. Les associations trouvées pourraient refléter des différences liées au sexe au niveau des mécanismes d'inflammation et au niveau d'autres voies métaboliques associées au SM qui sont médiées au moins partiellement par la leptine dans les conditions pre-pathologiques.

**Sex-dependent associations of leptin with Metabolic Syndrome related variables: the Stanislas Study**

**Sex-related leptin relations to MS variables**

Anastasia Samara<sup>1,3</sup>, Bernard Herbeth<sup>1</sup>, Roberte Aubert<sup>2</sup>, Hind Berrahmoune<sup>1</sup>, Frédéric Fumeron<sup>2</sup>, Gérard Siest<sup>1,3</sup>, Sophie Visvikis-Siest<sup>1,\*</sup>

<sup>a</sup>INSERM, CIC 9501, "Cardiovascular Genetics" team, Nancy, F-54000

<sup>b</sup>INSERM, U695, University Denis Diderot Paris 7, Faculty Bichat, Paris, F-75018

<sup>c</sup>Nancy-University, Faculty of Pharmacy, Nancy, F-54000

**\*Correspondance to**

Dr Sophie Visvikis-Siest

INSERM CIC 9501

Équipe Inserm "Génétique Cardiovasculaire"

30 rue Lionnois, F-54000 Nancy, France

Phone: 33 3 83 68 21 84

Fax: 33 3 83 32 13 22

E-mail: [Sophie.Visvikis-Siest@nancy.inserm.fr](mailto:Sophie.Visvikis-Siest@nancy.inserm.fr)

No conflict of interest

## **ABSTRACT**

Recently, leptin has been found related to C-reactive protein (CRP) independently of adiposity, in a sex dependent manner. Here, we sought if leptin could be associated with other inflammatory markers and variables related to metabolic syndrome (MS), and if such associations were independent of anthropometry and differently according to sex.

In 384 healthy middle-aged adults (192 men and 192 women) total fat mass and waist-to-hip-ratio (WHR) measurements were performed additionally to measurements of serum leptin and of 15 MS-related parameters: systolic and diastolic blood pressure, triglycerides, cholesterol, HDL-cholesterol, apo AI and B, fasting glucose, uric acid, CRP, orosomucoid and haptoglobin levels and aspartate aminotransferase (ASAT), alanine aminotransferase (ALAT) and gamma-glutamyl transferase (GGT) activities.

After adjusting for age, alcohol and cigarette consumption, WHR and total fat mass, leptin was significantly associated with serum triglyceride, total cholesterol, apo B, uric acid and, haptoglobin concentration and liver enzyme activity only in men, and with apo AI, HDL-cholesterol and CRP only in women. Sex-interaction terms were significant for total cholesterol, apo B, HDL-cholesterol, uric acid, ALAT and GGT, and borderline significant for triglycerides, apo AI and ASAT.

Leptin is related to various MS factors independently to WHR and total fat mass, and in a specific to gender way, in a healthy population. These associations may reflect sex-related differences in inflammatory mechanisms and other MS-related metabolic pathways that may, at least partially, be mediated by leptin in pre-pathological conditions.

**Keywords:** leptin, metabolic syndrome-related variables, gender differences, total fat mass, waist to hip ratio

## **Introduction**

Selective excess of intra-abdominal/visceral adipose tissue, for any given amount of total fat mass, exposes in a substantially higher risk for developing insulin resistance and metabolic syndrome (MS) features(1). Accumulation of fat in liver triggers alterations on free-fatty acids metabolism and on the release of adipokines but their exact contribution to MS is unclear(2). However, some evidence exists on associations of leptin with MS and/or its related variables. In fact, in a prospective study, baseline leptin plasma levels were able to predict the development of glucose intolerance and insulin resistance, when controlling for body mass index (BMI), as well as the development of MS(3). As for MS-related factors, it was only recently demonstrated(4) an independent to obesity association of leptin with C-reactive protein (CRP) that was interestingly, dependent to gender. This is the only large-scaled population study in which analyses were stratified according to sex and where the association between leptin and CRP was adjusted on multiple obesity indices [BMI, waist-to-hip ratio (WHR), total fat mass].

In the same context, we aimed to test associations of leptin with the ensemble of common (blood pressure, fasting glucose, lipid profile), together with newly-characterized MS-related factors such as the inflammatory markers CRP(5), haptoglobin and orosomucoid(6), liver enzymes(2) and uric acid(7). For this purpose, we selected a sub-sample of population not suffering from diabetes, cardiovascular disease (CVD), or severe obesity that we stratified by sex and where specific to abdominal (WHR) and overall (total fat mass) measurements were undertaken.

## **Methods and procedures**

### *Population*

This work is part of the Stanislas Family Study, a 10-year longitudinal follow-up study conducted since 1994 on 1006 families selected at the Center for Preventive Medicine of Vandoeuvre-lès-Nancy (east of France)(8). In this article, we present data from a sub-sample of 384 adults aged 30-64 years (192 men and 192 women) who had undergone health examinations in 1994-95 including the measurement of both serum leptin and total fat mass by using bioelectrical impedance.

Due to the design of the Stanislas Family Study, subjects were of French origin and were free from acute or chronic diseases such as stroke, myocardial infarction and cancer. For this study, additional exclusion criteria were used because of their potential effects on metabolic values and consequently on results of regression analysis. Participants who were underweight (BMI < 17 kg/m<sup>2</sup>: moderate and severe thinness) or with class III obesity (BMI ≥ 40 kg/m<sup>2</sup>) were not included in this study. Individuals with extreme values were excluded: alcohol consumption ≥ 120 g/day, systolic blood pressure (SBP) ≥ 185 mm Hg, diastolic blood pressure (DBP) ≥ 120 mm Hg, aspartate aminotransferase (ASAT) ≥ 120 U/L, alanine aminotransferase (ALAT) or gamma-glutamyl transferase (GGT) activities ≥ 200 U/L, serum orosomucoid ≥ 2.5 g/L, serum haptoglobin concentrations ≥ 3.5 g/L, serum CRP ≥ 15 mg/L, serum cholesterol or triglyceride concentrations ≥ 10 mmol/L, serum glucose concentration ≥ 8 mmol/L or using antidiabetic agent.

Each subject gave written informed consent for participating in this study, which was approved by the "Comité Consultatif de Protection des Personnes qui se prêtent à une Recherche Biomédicale de Lorraine" (France).

#### *Bioelectrical Impedance Data*

Total body resistance was measured with a BIA-101 impedance analyzer (RJL Systems, Detroit, MI, USA). This battery-operated system passes a 50-kHz signal at a root mean square

current of 800 mA. Measurements were performed in a fasting state (at least 12 hr postprandial), without previous physical exercise, after the subject had urinated and had been staying in a clinical bed for 10 min. Feverish subjects were excluded. Patients rested in a supine position with arms and legs abducted. Electrodes were placed on the dorsal surfaces of the right hand and foot proximal to the metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints. Measurements were performed between 8.00 and 8.30 or between 12.00 and 12.30 a.m. All measurements were performed by the same trained observer(9). The equations provided by Segal and coworkers were used to compute fat free mass (FFM) (kg) in males and females. Fat mass (FM) (kg) was calculated as weight minus FFM.

#### Blood samples and data collection

Data were collected by using relevant questionnaires including, information about lifestyle such as tobacco, alcohol and drug consumption and personal medical history. Physical examinations and functional tests were performed and basic blood constituents were measured(8). Weight and height were measured while the participants were standing in light clothing without shoes. BMI was calculated as weight in kilograms divided by height in squared meters. Waist circumference (WC) was measured at the narrowest level, and hip circumference was measured at the maximum level over light clothing. WHR was calculated. Serum concentrations of fasting glucose, total cholesterol, triglycerides, and activities of ASAT, ALAT, and GGT were measured with commercially available kits on an AU5021 apparatus (all from Merck, Darmstadt, Germany) on fresh aliquots, and within 2 h. Serum apolipoproteins (apo) AI and B, hsCRP, haptoglobine and orosomuroid were measured by immunonephelometry on a Behring Nephelometer Analyser (BN II, Dade-Behring, Marburg, Germany) with Behring reagents (Reuil-Malmaison, France) within 2 h after sampling. Serum leptin concentrations were measured by RIA (Linco Research, Saint Charles, MO, USA).

### *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed using the SAS software package version 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Since the distributions of fat mass, and leptin, triglyceride, ASAT, ALAT, GGT, and CRP concentrations exhibited a long-tailed positive skewness and kurtosis,  $\log_{10}$  transformation was used. The Gaussian distribution was verified by using normal probability plots.

ANOVA was used to test differences between males and females for characteristics and MS-related variables. Pearson correlation coefficients were calculated to evaluate the association between MS-related variables and various characteristics including anthropometric measurements.

To determine the respective association of fat mass, WHR and leptin concentration with MS-related variables, linear regression analysis were used. For each variable, fat mass, WHR and leptin concentration were entered into the model simultaneously with age, and alcohol and cigarette consumption, as covariates. To reduce co-linearity of fat mass with WHR and leptin concentration, we computed residuals from linear regression analysis of leptin and WHR values on fat mass, separately in men and women. The resulting residuals were included in the models. For leptin, 'b' was determined by calculating the slope of a plot of a log leptin versus log total fat mass and was calculated to be 1.7197 for women and 1.5387 for men (log leptin =  $-1.2192 + 1.7197 \log \text{ total fat mass}$ ; log leptin =  $-1.4128 + 1.5387 \log \text{ total fat mass}$  for women and men respectively). For WHR, 'b' was determined by calculating the slope of a plot of WHR versus log total fat mass and was calculated to be 0.200 for women and 0.313 for men (WHR =  $0.505 + 0.200 \log \text{ total fat mass}$ ; WHR =  $0.506 + 0.313 \log \text{ total fat mass}$  for women and men respectively). In addition, interaction term with sex was tested. Statistical

significance was taken at  $P \leq 0.05$ . To detect a correlation coefficient of 0.20 ( $R^2 = 0.04$ ), a sample of 192 subjects will provide 81% power at the 0.05 level.

## **Results**

Characteristics of the 384 adults of the present study are described in table 1. All results were stratified by sex. Men had significantly higher age, weight, fat free mass, BMI, WC, WHR, alcohol and cigarette consumption, blood pressure, serum concentrations of triglycerides, cholesterol, apo B, glucose, uric acid, and orosomucoid and activity of ASAT, ALAT and GGT, compared to women. Conversely, women had significantly higher percentage of fat mass and higher serum apo AI, HDL-cholesterol and leptin concentrations. No significant sex difference was observed for total fat mass and for serum CRP and haptoglobin concentrations.

Table 2 shows correlation coefficients between fat mass and leptin with the metabolic parameters studied after adjustment for age, alcohol and cigarette consumption. Total fat mass was significantly associated with all the MS-related factors in men, while only total cholesterol concentration and activities of ASAT and GGT were not significantly correlated with total fat mass in women. The majority of correlation coefficients were positive, except for HDL-cholesterol and apo AI that were correlated in a negative way. Sex interactions were statistically significant for DBP, triglycerides, uric acid, as well as for the activity of the three liver enzymes tested.

Leptin was also significantly associated with most of the parameters tested for both sexes. No significant association was found for apo AI concentration (in both sexes) and for GGT activity (in women). All MS-related factors were positively correlated with leptin, except from HDL-cholesterol. Concerning sex interactions, they were significant for total cholesterol and apo B, additionally to liver enzyme activities, uric acid and triglycerides.

WHR was not significantly correlated with total cholesterol, fasting glucose, CRP and haptoglobin in men. In women, no significant associations were observed for DBP, total cholesterol, and activity of the liver enzymes (ASAT, ALAT and GGT). All other parameters were significantly correlated with WHR in a negative (apo AI, HDL-cholesterol in both sexes) or a positive way.

Multivariate analyses were then used to test the independent association between leptin concentration and the MS-related variables taking into account total fat mass and WHR and after prior adjustment for age, alcohol and tobacco consumption (table 3). Leptin and WHR were adjusted on total fat mass prior to inclusion in the multivariate analysis model because of the high degree of co-linearity with total fat mass.

Total fat mass was significantly associated with all MS-related factors both in women and men (except for total cholesterol, GGT and ASAT activities in women). In men, WHR was significantly related to triglycerides, HDL-cholesterol, ALAT and GGT activity. In women, significant associations were found for apo AI, HDL-cholesterol, fasting glucose, CRP and orosomucoid.

In men, when controlling for fat mass and WHR, leptin concentration remained significantly correlated with triglycerides, total cholesterol, apo B, uric acid, and haptoglobin concentrations, and with ASAT, ALAT, and GGT activities. Conversely, in women, leptin level was significantly associated to apo AI, HDL-cholesterol and CRP concentration. In addition, tests for sex-leptin interaction were statistically significant for triglycerides, total cholesterol, apo B, HDL-cholesterol, uric acid, ALAT, and GGT and borderline significant for apo AI, and ASAT.

## **Discussion**

Up to the present time no study is available regarding the specific associations of plasma leptin concentration with a set of MS-related factors including both common and newly-characterized markers, independently of abdominal (WHR) or overall adiposity (total fat mass), accounting for co-linearity between leptin and anthropometric characteristics, and including test for sex-interaction. In the present study, firstly, we confirmed the independent association of leptin with CRP specifically in women as demonstrated by Abdullah et al(4). Secondly, we showed that plasma leptin levels were associated with serum triglycerides, total cholesterol, apo B, uric acid and haptoglobin concentration and, with ALAT, ASAT and GGT activities only in men, and with apo AI, and HDL-cholesterol levels only in women. Sex-interaction terms were showed to be statistically significant for triglycerides, total cholesterol, apo B, HDL-cholesterol, uric acid, ALAT and GGT, and borderline significant for apo AI and ASAT. Thirdly, in this sample, systolic and diastolic blood pressure, fasting glucose and orosomuroid were not associated with leptin, neither in men nor in women.

The specific to gender associations we found could be essentially attributed to anatomical, physiological, secretory and hormonal parameters differing between men and women. In men, intra-abdominal fat is related in a nonlinear way with weight, BMI, WC when these indices are at relatively low levels and this relationship becomes linear only at higher levels of obesity when distribution of fat starts to become more uniform across storage sites. Contrary to men, in women, this relationship is always linear in normal or elevated BMI as a result of their generalized/peripheral fat patterning(10). As mentioned, we studied a population consisting of men and women with similar total fat mass that did not suffer from extreme obesity ( $BMI \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ). In this range of BMI, men accumulate preferentially fat in abdomen that is not reflected by total fat mass or detected by WHR measurements and develop fatty liver. Intra-abdominal fat is closely connected anatomically and physiologically to the liver. Indeed, mesenteric fat thickness measured by ultrasound in non-obese subjects was proposed as an

independent determinant for fatty liver(11). Fatty liver usually present in overweight or mildly obese subjects results in mild elevation of ASAT and ALAT and to a smaller extend of GGT. This physio-pathological state influences lipid metabolism and activates a number of adipokines(2). Furthermore, in a population of normal to mildly obese individuals there was found a positive relationship between leptin and liver steatosis after adjustment for body composition, for men but not for women(12). Given the above, we could probably explain the significant relations of leptin with lipids, liver enzymes and uric acid that persisted after adjustment for total fat mass and WHR in men but not in women.

Some evidence already exists on the involvement of leptin in liver metabolism that further support the associations we described. It has been demonstrated that leptin exerts complex effects on liver gene expression(13). As for lipids, some animal models have shown that leptin plays a role in liver triglyceride metabolism(14) and may act on HDL apolipoprotein turnover(15). In humans, it has been shown an association of leptin with variables of the cholesterol metabolism(16). In fact, leptin represses specifically the gene coding for Stearoyl-CoA Desaturase-1, an enzyme involved in the synthesis of triglycerides and VLDL in the liver(17). Uric acid and leptin have been found independently associated, suggesting that this hormone can probably act directly to modulate uric acid levels or that uric acid acts on mechanisms determining leptin levels that are not mediated by obesity(18). Another study on healthy male adolescents demonstrated that uric acid influences leptin levels independently of BMI(19).

Interestingly, physiological and secretory differences could additionally explain our results. Adipose cells of non-obese subjects reveal bigger adipocytes with higher lipolytic activity in portal (compared to non-portal), in intra-abdominal depots for men, compared to women(20). Mildly obese men show higher metabolic activity and may thus, have raised sensibility to or production of hormones as leptin, even though women have higher plasma levels of

leptin(21). These differences are not found in obese subjects(22). These observations suggest a consideration of the level of obesity and of gender when studying obesity in relation to metabolic disturbances. This could probably explain, at least partially, the significant associations we found in men but not in women, ranging from normal weight to moderate obesity.

It has already been demonstrated that gender is a major determinant of the plasma leptin levels and women have higher circulating leptin levels compared to men for similar total fat mass(21). Sex steroid hormones have direct effects on adipose tissue cells a) via their receptors that regulate by transcriptional control; among them leptin and b) by their involvement on preadipocyte proliferation and differentiation, determining in this way the fat distribution in men and women(23). A complex interlay between leptin and sex hormones seems to influence at least some of the MS-related parameters we tested.

We have to mention that the independent associations of lipids, liver enzymes and uric acid (predominantly metabolized by liver) found with leptin in men are unlikely due to factors as tobacco or alcohol consumption because these factors were taken into account prior analysis. Unfortunately, we were not able to explain the absence of an independent association of leptin with blood pressure, glucose levels. A probable link between them appears only in pathological states where hypertension and glucose intolerance are installed where leptin could have a compensatory to disease mechanisms role.

Since our study was done on a sub-sample of the Stanislas population, conclusions obtained from this investigation should be valid for middle-aged adults living in the east France with similar characteristics. An eventual comparison of our results with those of other similar studies should take into account the characteristics of these French individuals. The strengths of the present study consist in : a) studying simultaneously a considerable number of newly characterized additionally to common MS-related risk factors, b) adjusting associations of

leptin on precise to abdominal (WHR) and overall (total fat mass) adiposity measurements, taking into account co-linearity, c) selecting a relatively homogeneous sub-population of healthy subjects ranging from normal to mild obese, with no statistically significant difference in total fat mass between sexes, with moderate alcohol and cigarette consumption and without biological manifestations of liver and inflammatory diseases and d) stratifying analyses according to sex and testing for the statistical significance of the differential associations found (concerning leptin and MS-related factors between men and women). Conversely, the main limitation of our study is the relatively limited number of subjects (192 in each group) that allowed detecting a  $R^2$  of 0.04 ( $R=0.20$ ) with 81% of power at the 0.05 level. Lower  $R^2$  led to a reduction of statistical power (e.g. power of 70% for  $R^2 = 0.03$ ) and consequently should be interpreted with caution.

In the present study, we investigated the possible associations of leptin with MS-related factors in a relatively healthy population, without extreme obesity and with similar total fat mass distribution, accounting for both genders. On the one hand, leptin was preferentially related to factors predominantly metabolized by liver in men, suggesting that this hormone is involved in unrecognized fatty liver. On the other hand, leptin was preferentially associated to an important inflammatory marker, CRP. The above results underline the importance of this adipokine in MS-related factors metabolism and the particular interest of studying MS pathophysiology, by taking gender into consideration.

## **Acknowledgements**

We are deeply grateful for the cooperation of the families participating in the Stanislas Cohort. We acknowledge the management, reception, preclinical, laboratory and medical staff of the Center for Preventive Medicine of Vandoeuvre-lès-Nancy (France). The STANISLAS cohort study is supported by the Caisse Nationale d'Assurance Maladies des Travailleurs Salariés (CNAM), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Région Lorraine, the Communauté Urbaine du Grand Nancy and the Henri Poincaré University of Nancy I.

**Disclosure statement**

No conflict of interest

## References

- (1) Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006;444:881-887.
- (2) Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: An update. *World J Gastroenterol* 2008;14:185-192.
- (3) Franks PW, Brage S, Luan J, Ekelund U, Rahman M, Farooqi IS, Halsall I, O'Rahilly S, Wareham NJ. Leptin predicts a worsening of the features of the metabolic syndrome independently of obesity. *Obes Res* 2005;13:1476-1484.
- (4) Abdullah SM, Khera A, Leonard D, Das SR, Canham RM, Kamath SA, Vega GL, Grundy SM, McGuire DK, De Lemos JA. Sex differences in the association between leptin and CRP: Results from the Dallas Heart Study. *Atherosclerosis* 2006.
- (5) Rutter MK, Meigs JB, Sullivan LM, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and prediction of cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Circulation* 2004;110:380-385.
- (6) Engstrom G, Stavenow L, Hedblad B, Lind P, Tyden P, Janzon L, Lindgarde F. Inflammation-sensitive plasma proteins and incidence of myocardial infarction in men with low cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2247-2251.
- (7) Onat A, Uyarel H, Hergenc G, Karabulut A, Albayrak S, Sari I, Yazici M, Keles I. Serum uric acid is a determinant of metabolic syndrome in a population-based study. *Am J Hypertens* 2006;19:1055-1062.
- (8) Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Gueguen R, Vincent-Viry M, Sass C, Beaud B, Lecomte E, Steinmetz J, Locuty J, Chevrier P. Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:35-42.
- (9) Lecomte E, Herbeth B, Nicaud V, Rakotovafo R, Artur Y, Tiret L. Segregation analysis of fat mass and fat-free mass with age- and sex-dependent effects: the Stanislas Family Study. *Genet Epidemiol* 1997;14:51-62.
- (10) Schreiner PJ, Terry JG, Evans GW, Hinson WH, Crouse JR, III, Heiss G. Sex-specific associations of magnetic resonance imaging-derived intra-abdominal and subcutaneous fat areas with conventional anthropometric indices. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 1996;144:335-345.
- (11) Liu KH, Chan YL, Chan JC, Chan WB, Kong WL. Mesenteric fat thickness as an independent determinant of fatty liver. *Int J Obes (Lond)* 2006;30:787-793.
- (12) Valtuena S, Numeroso F, Ardigo D, Pedrazzoni M, Franzini L, Piatti PM, Monti L, Zavaroni I. Relationship between leptin, insulin, body composition and liver steatosis in non-diabetic moderate drinkers with normal transaminase levels. *Eur J Endocrinol* 2005;153:283-290.
- (13) Barzilai N, Wang J, Massillon D, Vuguin P, Hawkins M, Rossetti L. Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J Clin Invest* 1997;100:3105-3110.
- (14) Huang W, Dedousis N, Bandi A, Lopaschuk GD, O'Doherty RM. Liver triglyceride secretion and lipid oxidative metabolism are rapidly altered by leptin in vivo. *Endocrinology* 2006;147:1480-1487.

- (15) Silver DL, Jiang XC, Tall AR. Increased high density lipoprotein (HDL), defective hepatic catabolism of ApoA-I and ApoA-II, and decreased ApoA-I mRNA in ob/ob mice. Possible role of leptin in stimulation of HDL turnover. *J Biol Chem* 1999;274:4140-4146.
- (16) Hallikainen M, Kolehmainen M, Schwab U, Laaksonen DE, Niskanen L, Rauramaa R, Pihlajamaki J, Uusitupa M, Miettinen TA, Gylling H. Serum adipokines are associated with cholesterol metabolism in the metabolic syndrome. *Clin Chim Acta* 2007;383:126-132.
- (17) Cohen P, Friedman JM. Leptin and the control of metabolism: role for stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1). *J Nutr* 2004;134:2455S-2463S.
- (18) Fruehwald-Schultes B, Peters A, Kern W, Beyer J, Pfoetzner A. Serum leptin is associated with serum uric acid concentrations in humans. *Metabolism* 1999;48:677-680.
- (19) Ogura T, Matsuura K, Otsuka F, Imai A, Tsukamoto C, Mimura Y, Iwasaki Y, Tobe K. Serum leptin correlates with serum uric acid but not serum testosterone in non-obese male adolescents. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2000;107:55-64.
- (20) Rebuffe-Scrive M, Andersson B, Olbe L, Bjorntorp P. Metabolism of adipose tissue in intraabdominal depots of nonobese men and women. *Metabolism* 1989;38:453-458.
- (21) Saad MF, Damani S, Gingerich RL, Riad-Gabriel MG, Khan A, Boyadjian R, Jinagouda SD, el Tawil K, Rude RK, Kamdar V. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:579-584.
- (22) Rebuffe-Scrive M, Anderson B, Olbe L, Bjorntorp P. Metabolism of adipose tissue in intraabdominal depots in severely obese men and women. *Metabolism* 1990;39:1021-1025.
- (23) Mayes JS, Watson GH. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev* 2004;5:197-216.

Table 1 Characteristics and MS-related variables in the study population

	Males (n=192)	Females (n=192)	<i>P</i> <sup>a</sup>
Age, y	42.2 (4.8) <sup>b</sup>	39.9 (4.3)	≤0.001
Weight, kg	77.3 (10.9)	62.2 (11.1)	≤0.001
Fat free mass, kg	57.7 (6.6)	41.8 (4.5)	≤0.001
Fat mass, kg <sup>c</sup>	18.8 (14.0-25.1) <sup>d</sup>	19.1 (13.6-26.8)	0.263
Fat mass, %	24.9 (4.5)	31.8 (6.1)	≤0.001
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	25.5 (3.0)	24.1 (4.4)	≤0.001
Waist circumference, cm	88.8 (8.9)	75.4 (9.7)	≤0.001
Waist-to-hip ratio	0.906 (0.064)	0.762 (0.059)	≤0.001
Alcohol intake, g/day	24.9 (26.9)	4.4 (8.3)	≤0.001
Cigarettes consumption, cig/day	4.7 (8.1)	2.7 (6.5)	0.006
Leptin, μg/L <sup>c</sup>	3.5 (1.9-6.4)	9.7 (4.7-20.1)	≤0.001
Systolic blood pressure, mm Hg	129 (11)	120 (11)	≤0.001
Diastolic blood pressure, mm Hg	78 (9)	71 (10)	≤0.001
Triglycerides, mmol/L <sup>c</sup>	1.21 (0.72-2.04)	0.84 (0.54-1.29)	≤0.001
Cholesterol, mmol/L	5.98 (1.10)	5.35 (0.92)	≤0.001
Apolipoprotein B, g/L	1.15 (0.26)	0.95 (0.22)	≤0.001
Apolipoprotein AI, g/L	1.55 (0.24)	1.69 (0.27)	≤0.001
HDL-cholesterol, mmol/L	1.38 (0.38)	1.67 (0.39)	≤0.001
Glucose, mmol/L	5.25 (0.49)	4.93 (0.41)	≤0.001
Uric acid, μmol/L	319 (61)	229 (45)	≤0.001
Aspartate aminotransferase, U/L <sup>c</sup>	22.7 (17.1-30.2)	16.7 (12.9-21.6)	≤0.001
Alanine aminotransferase, U/L <sup>c</sup>	28.7 (18.6-44.5)	17.8 (12.1-26.3)	≤0.001
Gamma-glutamyl transferase, U/L <sup>c</sup>	30.0 (17.5-51.3)	15.2 (9.4-24.6)	≤0.001

C-reactive protein, mg/L <sup>c, e</sup>	0.94 (0.32-2.75)	0.96 (0.30-3.07)	0.880
Haptoglobin, g/L <sup>e</sup>	1.07 (0.47)	1.06 (0.41)	0.911
Orosomuroid, g/L <sup>e</sup>	0.77 (0.17)	0.69 (0.18)	≤0.001

HDL indicates high density lipoproteins.

<sup>a</sup>*P* between males and females: ANOVA or Chi-square test.

<sup>b</sup>Arithmetic mean (SD).

<sup>c</sup>Values were log 10 transformed prior analyses.

<sup>d</sup>Geometric mean (range of 1 SD).

<sup>e</sup>For C reactive protein, haptoglobin and orosomuroid, data were available for 157 males and 157 females.

Table 2 Partial correlation coefficients of MS-related variables with fat mass and leptin concentration in both males and females<sup>d</sup>

	Fat mass <sup>b</sup>				Waist-to-hip ratio				Leptin <sup>b</sup>			
	Males		Females		Males		Females		Males		Females	
		P-value for sex-interaction		P-value for sex-interaction		P-value for sex-interaction		P-value for sex-interaction		P-value for sex-interaction		P-value for sex-interaction
Systolic blood pressure	0.337 <sup>c</sup>	0.296 <sup>c</sup>	0.262 <sup>c</sup>	0.156 <sup>d</sup>	0.281 <sup>c</sup>	0.462	0.278 <sup>c</sup>	0.677				
Diastolic blood pressure	0.366 <sup>c</sup>	0.189 <sup>d</sup>	0.249 <sup>c</sup>	0.089	0.356 <sup>c</sup>	0.254	0.174 <sup>d</sup>	0.058				
Triglycerides <sup>b</sup>	0.354 <sup>c</sup>	0.297 <sup>c</sup>	0.400 <sup>c</sup>	0.189 <sup>d</sup>	0.409 <sup>c</sup>	0.193	0.275 <sup>c</sup>	0.005				
Cholesterol	0.157 <sup>d</sup>	0.104	0.140	0.015	0.303 <sup>c</sup>	0.238	0.165 <sup>d</sup>	0.024				
Apolipoprotein B	0.222 <sup>c</sup>	0.191 <sup>e</sup>	0.216 <sup>e</sup>	0.197 <sup>e</sup>	0.330 <sup>c</sup>	0.598	0.220 <sup>e</sup>	0.030				
Apolipoprotein AI	-0.161 <sup>d</sup>	-0.277 <sup>e</sup>	-0.172 <sup>d</sup>	-0.367 <sup>c</sup>	-0.114	0.029	-0.105	0.739				
HDL-cholesterol	-0.301 <sup>c</sup>	-0.323 <sup>c</sup>	-0.325 <sup>c</sup>	-0.443 <sup>c</sup>	-0.275 <sup>c</sup>	0.209	-0.167 <sup>d</sup>	0.124				
Fasting glucose	0.162 <sup>d</sup>	0.283 <sup>c</sup>	0.120	0.292 <sup>c</sup>	0.185 <sup>e</sup>	0.130	0.266 <sup>c</sup>	0.998				
Uric acid	0.543 <sup>c</sup>	0.414 <sup>c</sup>	0.404 <sup>c</sup>	0.195 <sup>e</sup>	0.550 <sup>c</sup>	0.004	0.315 <sup>c</sup>	≤0.001				
Aspartate aminotransferase <sup>b</sup>	0.283 <sup>c</sup>	0.134	0.187 <sup>e</sup>	-0.024	0.333 <sup>c</sup>	0.028	0.149 <sup>d</sup>	0.011				
Alanine aminotransferase <sup>b</sup>	0.507 <sup>c</sup>	0.277 <sup>c</sup>	0.435 <sup>c</sup>	0.134	0.528 <sup>c</sup>	0.002	0.249 <sup>c</sup>	≤0.001				
Gamma-glutamyl transferase <sup>b</sup>	0.500 <sup>c</sup>	0.127	0.447 <sup>c</sup>	0.120	0.535 <sup>c</sup>	0.002	0.107	≤0.001				
C-reactive protein <sup>b,f</sup>	0.331 <sup>c</sup>	0.382 <sup>c</sup>	0.099	0.324 <sup>c</sup>	0.320 <sup>c</sup>	0.058	0.400 <sup>c</sup>	0.414				

Haptoglobin <sup>f</sup>	0.213 <sup>e</sup>	0.269 <sup>c</sup>	0.849	0.103	0.270 <sup>c</sup>	0.243	0.256 <sup>e</sup>	0.225 <sup>e</sup>	0.546
Orosomucoïd <sup>f</sup>	0.378 <sup>c</sup>	0.501 <sup>c</sup>	0.764	0.340 <sup>c</sup>	0.482 <sup>c</sup>	0.077	0.295 <sup>c</sup>	0.417 <sup>c</sup>	0.531

---

HDL indicates high density lipoproteins.

<sup>a</sup>Partial correlation coefficient after adjustment for age, alcohol and cigarette consumption.

<sup>b</sup>Values were log 10 transformed prior analyses.

<sup>c</sup> $P \leq 0.001$ , <sup>d</sup> $P \leq 0.05$ , <sup>e</sup> $P \leq 0.01$

<sup>f</sup>For C reactive protein, haptoglobin and orosomucoïd, data were available for 157 males and 157 females.

Table 3 Associations of MS-related variables with total fat mass and serum leptin concentration in multivariate regression analysis according to sex<sup>a, b, c</sup>

	Males		Females		P-value for sex-interaction
	P-value	Partial R <sup>2</sup>	P-value	Partial R <sup>2</sup>	
Systolic blood pressure					
Total fat mass	≤0.001	0.106	≤0.001	0.084	0.651
Waist-to-hip ratio	0.306	0.005	0.943	0.001	0.526
Leptin concentration	0.502	0.002	0.348	0.004	0.904
Diastolic blood pressure					
Total fat mass	≤0.001	0.125	0.013	0.030	0.099
Waist-to-hip ratio	0.584	0.001	0.973	0.001	0.757
Leptin concentration	0.062	0.016	0.482	0.002	0.373
Triglycerides					
Total fat mass	≤0.001	0.140	≤0.001	0.082	0.053
Waist-to-hip ratio	0.001	0.045	0.470	0.005	0.051
Leptin concentration	0.002	0.041	0.283	0.006	0.046
Total cholesterol					
Total fat mass	0.022	0.025	0.056	0.019	0.519
Waist-to-hip ratio	0.421	0.003	0.402	0.004	0.278
Leptin concentration	≤0.001	0.073	0.216	0.008	0.013
Apolipoprotein B					
Total fat mass	≤0.001	0.054	0.001	0.054	0.484

Waist-to-hip ratio	0.167	0.009	0.230	0.007	0.666
Leptin concentration	≤0.001	0.049	0.469	0.003	0.020
Apolipoprotein AI					
Total fat mass	0.018	0.028	≤0.001	0.075	0.442
Waist-to-hip ratio	0.250	0.007	≤0.001	0.062	0.107
Leptin concentration	0.735	0.001	0.007	0.031	0.096
HDL-Cholesterol					
Total fat mass	≤0.001	0.100	≤0.001	0.100	0.674
Waist-to-hip ratio	0.020	0.025	≤0.001	0.093	0.252
Leptin concentration	0.400	0.003	0.039	0.017	0.029
Fasting glucose					
Total fat mass	0.031	0.023	≤0.001	0.074	0.623
Waist-to-hip ratio	0.643	0.001	0.014	0.028	0.184
Leptin concentration	0.163	0.009	0.214	0.007	0.708
Uric acid					
Total fat mass	≤0.001	0.270	≤0.001	0.147	≤0.001
Waist-to-hip ratio	0.069	0.011	0.881	0.001	0.288
Leptin concentration	≤0.001	0.053	0.888	0.001	≤0.001
Aspartate aminotransferase					
Total fat mass	≤0.001	0.070	0.067	0.018	0.097
Waist-to-hip ratio	0.587	0.001	0.130	0.012	0.122
Leptin concentration	0.004	0.040	0.395	0.004	0.064
Alanine aminotransferase					
Total fat mass	≤0.011	0.255	≤0.001	0.079	≤0.001

Waist-to-hip ratio	0.007	0.026	0.855	0.001	0.056
Leptin concentration	≤0.001	0.048	0.569	0.002	0.007
Gamma-glutamyl transferase					
Total fat mass	≤0.001	0.232	0.142	0.011	≤0.001
Waist-to-hip ratio	0.002	0.031	0.301	0.005	0.311
Leptin concentration	≤0.001	0.053	0.626	0.001	0.007
C-reactive protein <sup>d</sup>					
Total fat mass	≤0.001	0.089	≤0.001	0.139	0.549
Waist-to-hip ratio	0.153	0.011	0.028	0.026	0.052
Leptin concentration	0.119	0.013	0.041	0.023	0.429
Haptoglobin <sup>d</sup>					
Total fat mass	0.013	0.031	≤0.001	0.066	0.810
Waist-to-hip ratio	0.881	0.001	0.051	0.022	0.279
Leptin concentration	0.041	0.020	0.742	0.001	0.265
Orosomucoid <sup>d</sup>					
Total fat mass	≤0.001	0.137	≤0.001	0.222	0.683
Waist-to-hip ratio	0.068	0.002	≤0.001	0.069	0.132
Leptin concentration	0.842	0.001	0.350	0.004	0.690

---

HDL indicates high density lipoproteins.

<sup>a</sup>After adjustment for age, alcohol and cigarette consumption.

<sup>b</sup>Values for fat mass, leptin, triglycerides, ASAT, ALAT, GGT, and CRP were log 10 transformed prior analyses.

<sup>c</sup>Values of leptin concentration (log 10 transformed) and waist-to-hip ratio were adjusted for log 10 fat mass.

<sup>d</sup>For C reactive protein, haptoglobin and orosomuroid, data were available for 157 males and 157 females.

### Publication No3

## Letter : Significant relationships between FTO variants and 5-year BMI changes in children and adolescents of the Stanislas Cohort.

Sophie Visvikis-Siest, [Anastasia Samara](#), David Meyre, Bernard Herbeth, Phillippe Froguel

PLoS Genet, 2008(15 Feb), *open access*

Récemment, il a été démontré que certains polymorphismes du gène FTO sont associés avec l'indice de masse corporelle (IMC) et à l'obésité dans l'enfance et la vie adulte. Jusqu'à présent, les études réalisées en relation avec le FTO sont transversales. Ainsi, nous avons voulu regarder l'effet de ce gène au fil du temps, ainsi que les différences potentielles de cet effet en fonction de l'âge.

Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier l'évolution de l'IMC à court terme (5 ans) d'une sous-population de la cohorte STANISLAS, comprenant des enfants/adolescents (430 sujets 5-20 ans) et des adultes (391 sujets 30-54 ans), en relation avec les polymorphismes du gène FTO rs17817449 et rs1421085.

Chez les enfants et les adolescents, les valeurs moyennes des changements sur 5 ans du 'Z-score' de l'IMC ont été significativement élevées pour les porteurs de l'allèle 'G' pour le SNP rs17817449 ( $p$  pour le modèle additif = 0.049) et pour les porteurs de l'allèle 'C' pour le SNP rs1421085 ( $p$  pour le modèle additif = 0.033). Les moyennes $\pm$ SD ont été  $-0.049\pm 0.054$ ,  $0.027\pm 0.041$  et  $0.126\pm 0.072$  pour les génotypes TT, GT et GG respectivement, et l'effet additif estimé a été 0.085 par allèle pour le SNP rs17817449. Les moyennes $\pm$ SD ont été  $-0.050\pm 0.055$ ,  $0.020\pm 0.042$  et  $0.134\pm 0.063$  pour les génotypes TT, CT et CC respectivement, et l'effet additif estimé a été 0.088 par allèle pour le SNP rs1421085. En ce qui concerne les adultes, les associations des deux polymorphismes avec les changements sur 5 ans du 'Z-score' de l'IMC n'ont pas été significatives ( $p = 0.823$  et  $0.538$  respectivement).

L'effet de deux variants du FTO, chez des sujets sans obésité sévère ou morbide, suggère une implication de ce gène dans les mécanismes physiologiques régulant l'IMC. Les associations significatives détectées seulement chez les enfants et adolescents pourraient suggérer que l'impact du gène FTO dépend de l'âge. Le FTO serait probablement impliqué dans des mécanismes physiologiques pendant la puberté et qui ne persisteraient pas dans la vie adulte. En plus, les facteurs environnementaux changent avec l'âge, et ceci masque éventuellement l'effet des marqueurs génétiques, et dans notre cas, l'effet du FTO.

# Significant Relationships Between FTO Variants and 5-Year BMI Changes in Children and Adolescents of the Stanislas Cohort

Original Article [Genome-Wide Association Scan Shows Genetic Variants in the FTO Gene Are Associated with Obesity-Related Traits](#)

*Significant Relationships Between FTO Variants and 5-Year BMI Changes in Children and Adolescents of the Stanislas Cohort*

Posted by [PLoS Genetics](#) on 26 févr. 2008 at 13:58 GMT

Originally submitted as a Reader Response by Sophie Visvikis-Siest ([sophie.visvikis-siest@hancv.inserm.fr](mailto:sophie.visvikis-siest@hancv.inserm.fr)) on 14 February 2008 (additional authors: Anastasia Samara,

David Meyre, Bernard Herbeth, Philippe Froguel):

Recent studies have shown significant associations of SNPs in the FTO gene, with increased BMI and obesity in childhood and adult life [1,2], as well as with obesity traits (BMI, hip circumference and weight) [3]. Some SNPs were enhanced: rs9939609, rs9930506, rs17817449, and rs1421085 are all strongly associated within them, in high linkage disequilibrium. The above cited investigations, all based on cross-sectional studies, are the only existing ones providing some evidence on relationships between FTO and the prevalence of obesity. However, no longitudinal study provides further information on relationships between these gene polymorphisms and short-term weight gain and potential age-related differences.

Therefore, in a sub-sample of the STANISLAS cohort, including middle-aged adults (391 subjects aged 30 to 54 years) and children and adolescents (430 subjects aged 5 to 20 years), without extreme obesity, we tested the association of two SNPs: rs1421085 and rs17817449 (allelic frequency 0.421 and 0.412 respectively) with 5-year BMI changes. Variability of BMI with age and sex was controlled by using BMI Z-scores in analysis and FTO polymorphisms were determined by using the Applied Biosystems SNPlex™ Technology [1].

In children and adolescents, after adjustment for age, sex and BMI Z-score at entrance, means for five-year change in BMI Z-score were significantly higher in carriers of the "G" allele at rs17817449 ( $p$  for the additive model = 0.049) and in carriers of the "C" allele at rs1421085 ( $p$  for the additive model = 0.033). Means: the SEM (standard error of mean) were -0.049–0.054, 0.027–0.041 and 0.126–0.072, for TT, GT and GG genotype classes, respectively, and the estimated additive effect was 0.085 per allele [Generalized Estimating Equation (GEE) procedure] for rs17817449 and -0.050–0.055, 0.020–0.042 and 0.134–0.063, for TT, CT, and CC genotype classes, respectively, and the estimated additive effect was 0.088 per allele, for rs1421085. In adults, associations of these two polymorphisms with five-year change in BMI Z-score were not statistically significant ( $p=0.823$  and  $0.538$ , respectively).

In the present study, the alleles associated with increase in BMI are the same as those described by Dina et al [1] of the chosen SNPs. Scuteri et al [3] have shown associations for the rs9930506 FTO variant with BMI, in a prospective way and Fraying et al [2], in a cross-sectional study, estimated an increased risk for developing obesity in children and adult carriers of the rs9939609 FTO SNP. Our study provides new evidence on the relationships of FTO variants with evolution of BMI over time. The effect of the two FTO variants in subjects not suffering from severe or morbid obesity suggests an implication of this gene in physiological mechanisms regulating BMI.

As for the significant relationships we found in children/adolescents, some explanations could be given. FTO is eventually implicated in different physiological functions in puberty that do not persist in adult life, suggesting that the impact of FTO on BMI depends on age. Additionally, the environmental background is modified with age and that may mask an eventual effect of genetic parameters as those of FTO. Moreover, we must take into consideration the size of our population, which could probably explain the absence of relationships in the adult population.

## References

1. Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Korner A et al. (2007) Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 39: 724-726.
2. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM et al. (2007) A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316: 889-894.

3. Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G et al. (2007) Genome-Wide Association Scan Shows Genetic Variants in the FTO Gene Are Associated with Obesity-Related Traits. *PLoS Genet* 3: e115.

## **Publication No4**

### **Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs): a possible model for studying cardiovascular biology systems.**

Sophie Visvikis-Siest, Jean-Brice Marteau, Anastasia Samara, Hind Berrahmoune, Berangère Marie, Michèle Pfister

Clin Chem Lab Med, 2007, 45: 1154-68

Le processus d'inflammation, seul ou en relation/interaction avec d'autres voies biologiques cardiovasculaires, est suggéré comme la voie centrale pour le développement et la progression des maladies cardiovasculaires (MCV). Cette étude a eu pour but, de proposer un modèle spécifique et informatif pour explorer cette hypothèse.

Par une approche dite des systèmes biologiques, nous avons étudié l'expression de 182 gènes-candidats des MCV dans les globules blancs mononucléaires (PBMCs), cellules étroitement liées à l'inflammation. Nous avons étudié leur expression chez 20 individus sans ou avec des facteurs de risques de MCV (obésité, hypertension).

Nous avons trouvé que : 1) 166 parmi les 182 gènes sélectionnés ont été exprimés au moins chez un individu dans les PBMCs ; parmi les 166 gènes, certains étaient exprimés pour la première fois dans ce type cellulaire, 2) toutes les voies biologiques ont été représentées, puisque la majorité des gènes appartenant à chaque voie a été exprimée, 3) l'expression des gènes a été suffisamment élevée pour étudier ultérieurement leur ARNm et pouvoir ainsi décrire les variations biologiques entre individus et, 4) 15 gènes ont pu discriminer les individus ayant une hypertension par rapport aux individus obèses et aux contrôles.

Les résultats préliminaires de la présente étude suggèrent un modèle prometteur et une nouvelle stratégie, basée sur les études des PBMCs en transcriptomique pour élucider la complexité des voies métaboliques cardiovasculaires en relation avec l'inflammation. Nos résultats soutiennent également l'utilité des PBMCs comme modèle pour la recherche dans les domaines hypertension et inflammation.

## Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs): a possible model for studying cardiovascular biology systems

Sophie Visvikis-Siest\*, Jean-Brice Marteau,  
Anastasia Samara, Hind Berrahmoune,  
Berangère Marie and Michèle Pfister

INSERM, U525, équipe 4, Nancy, France

### Abstract

**Background:** The inflammation system, alone or in relation to or interaction with other cardiovascular pathways, is suggested to be the central pathway in the development and progression of cardiovascular diseases. The aim of the present investigation was to propose a specific and informative model for exploring this hypothesis.

**Methods:** In a biological system approach, we studied the expression of 182 candidate cardiovascular genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), cells that provide specific information on the inflammatory pathway. We explored their expression in 20 individuals with or without risk factors (obesity, hypertension) for cardiovascular disease.

**Results:** We found that: 1) 166 among the 182 selected genes were expressed in at least one individual's PBMCs, some of them being detected for the first time in this tissue; 2) all pathways were represented by the majority of their genes selected; 3) genes were expressed at a level sufficient for further study of the inter-individual variations in their mRNA to determine their biological variation; and 4) 15 genes discriminated hypertensive from obese or controls.

**Conclusions:** The results of the present investigation support our proposal of a promising novel strategy based on PBMC transcriptomic studies to elucidate the complexity of the cardiovascular system in relation to inflammation. Preliminary data support the usefulness of the PBMC model in hypertension/inflammation research.

Clin Chem Lab Med 2007;45:1154-68.

**Keywords:** cardiovascular metabolic pathways; epidemiology; gene expression inflammation; peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

### Introduction

The most evident clinical manifestation of the relationship between inflammation and cardiovascular diseases (CVD) was described as early as 1974, when

white blood cell count was found to be a strong predictor of myocardial infarction (1).

Today, an important number of clinical observations support the essential participation of inflammatory mechanisms in the development of CVD (2). Atherosclerosis is considered to be a state much more complicated than merely lipid deposition and storage, as previously thought. In detail, lipid retention, low-density lipoprotein (LDL) oxidation and oxidative stress in general, control of the expression genes of lipid metabolism by transcriptional factors and nuclear receptors, cellular adhesion, coagulation, shear stress related to blood flow and blood pressure regulation, cell proliferation and apoptosis, and probably microbial infection are all involved in atherosclerotic plaque creation. In the above network, inflammation is considered as a central regulatory mechanism. Therefore, it participates in atherosclerosis from its conception and development to its ultimate endpoint, with immune cells and particularly peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) interfering in all stages (3, 4).

In fact, increasing evidence indicates that hypertension promotes and accelerates the atherosclerotic process via inflammatory mechanisms (5). Some inflammatory markers show positive associations with blood pressure in healthy individuals, suggesting that inflammation can be a factor for increased blood pressure (6). Other findings suggest that leukocytes respond to changing plasma lipid levels by regulating a network of genes, including genes involved in fatty acid metabolism (7). A recent review underlines the importance of leukocytes in promoting a pro-thrombotic state (8). Moreover, a relationship has been demonstrated between inflammatory markers and oxidative stress (9). In the whole process, some nuclear receptors respond to oxidative stress and inflammatory mechanisms by regulating the expression of genes involved in inflammation and lipid metabolism (10, 11). All the above data suggest that integrated research work is needed for better understanding and explanation of the molecular basis of CVD, which is probably dependent on interactions between the different pathways involved and inflammation.

Plasma levels of some molecules considered as inflammatory markers have been well correlated to cardiovascular (CV) risk in many epidemiological studies, such as adhesion molecules, cytokines and others, as well as the now popular high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) (12-14). However, epidemiological studies show discrepancies and conflicting results that do not allow rigorous progress in the field, and such outcomes are not sufficient for characterizing these molecules as independent markers of risk (15). The great majority of research works to iden-

\*Corresponding author: Dr Sophie Visvikis-Siest, Université Henri Poincaré Nancy 1, INSERM U525, 30 rue Lionnois, 54000 Nancy, France  
Phone: +33-3-83682184, Fax: +33-3-83-32-13-22,  
E-mail: sophie.visvikis-siest@nancy.inserm.fr



tify biomarkers focus on soluble molecules in plasma or serum. However, plasma/serum concentrations represent a pool of molecules that come from different types of tissues and describe the overall physiopathological situation. In fact, plasma/serum levels of molecules do not reflect their production by specific tissues (16). A sub-clinical state of disease is probably masked when measuring blood proteins, and thus the priority should be to study the specific tissue principally involved. In this way, the gene expression responses of circulating PBMCs can potentially provide an early warning.

Using a candidate-gene micro-array approach in PBMCs from 20 individuals with or without CV risk factors (hypertension and/or obesity), we determined the presence of 182 candidate genes involved in ten biological pathways (blood pressure regulation, cellular adhesion, coagulation, oxidative stress, lipid, obesity and glucose metabolism, cellular growth factors, drug-metabolizing enzymes, transcriptional factors and immune defense) that seem to interact with inflammation.

The main aim of the study was to propose a specific and informative model for further investigating relations/interactions between the different CV metabolic pathways, assuming that inflammation is a central pathway modulating the expression of other pathways.

## Materials and methods

### Subjects and blood samples

**Subjects for micro-array assay** A total of 20 supposed healthy individuals were chosen from the Stanislas Cohort Study (17) for PBMC expression micro-array assay. All individuals gave their informed consent for sample collection and molecular analysis prior to their inclusion. They were of French origin and did not have CVD or any other inflammatory disease. Specific exclusion criteria were medication, smoking (ex- and non-smokers only included) and heavy alcohol consumption (>32 g/day). They were all matched for age ( $49.8 \pm 3.1$  years). The sample comprised nine females and 11 males (Table 1).

**Subjects for quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis** A total of 83 subjects, including the 20 for micro-array assay, served to validate the micro-array results. These subjects are also part of the Stanislas Cohort. No individual was on medication and their characteristics can be summarized as follows: age,  $49.3 \pm 3.6$  years; systolic blood pressure (SBP),  $122.9 \pm 15.0$  mm Hg; diastolic blood pressure (DBP),  $71.6 \pm 9.2$  mm Hg; body mass index (BMI),  $25.4 \pm 4.1$  kg/m<sup>2</sup>; glucose,  $5.38 \pm 0.55$  mmol/L; cholesterol,  $5.77 \pm 0.84$  mmol/L; high-density lipoprotein (HDL),  $1.75 \pm 0.43$  mmol/L. The sample comprised 42 females and 41 males.

**PBMC collection** Samples used in these experiments were chosen from a bank of human PBMCs from 1176 healthy volunteers. Fresh whole blood (10 mL) was collected by standardized venipuncture in EDTA tubes (Vacutainer™; Becton Dickinson, NJ, USA). PBMCs were isolated by centrifugation on a density gradient of Ficoll (Ficoll-Paque™ PLUS; Ge Healthcare, Orsay, France) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction. The PBMC bank was constituted according to a

well-validated protocol, with high recovery of lymphocytes (97.5%), and mRNA quality and stability were carefully tested (18).

### Total RNA extraction and micro-array amplification

Total RNA was extracted from samples from 20 individuals by an automated isolation procedure (MagNA Pure LC instrument), using a MagNa Pure LC RNA HP isolation kit and an RNA HP Blood External Lysis protocol according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Meylan, France). The choice of a robotic machine yields consistent isolation of high-quality RNA and minimizes potential errors arising from the manipulation procedure. RNA concentrations and quality were determined on a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Labtech International, Paris, France). RNA was amplified using an Amino allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit (Ambion, Austin, TX, USA) and a T7-(dT)<sub>24</sub> primer. The double-strand cDNA obtained was transcribed in aRNA using 5-(3-aminocallyl)-UTP (aaUTP) (Ambion). Fluorochromes Cy3 and Cy5 were incorporated into aRNA, resulting in labeled aRNA. No dye swap was used. Fluorochrome incorporation was measured on a NanoDrop spectrophotometer. Labeled aRNA was hybridized to the chip manufactured by MWG (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany). Slides were prehybridized in 5% bovine serum albumin, and Cy3- and Cy5-labeled aRNA were hybridized to the micro-array at  $50^{\circ}\text{C}$  for one night. All the RNAs from the samples were labeled with Cy3 and co-hybridized with the reference RNA (Universal Human Reference RNA, comprising 10 different cell lines including lymphocytes; Stratagene, La Jolla, CA, USA) labeled with Cy5, both adjusted to the same concentration. Following hybridization, slides were scanned using an Axon GenePix 4000B scanner (Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and analyzed using GenePix version 6 software (Axon Instruments).

### Design of the 182 candidate CVD-gene micro-array

Using an in-house micro-array approach, we selected a total of 207 genes (Table 2). Among these, 21 were blood cell markers and four were reference genes (*GAPDH*, *EEF1A1*, *B2M* and *RPL13A*) based on the literature (19, 20). The other 182 genes were selected as candidate genes for the major biological pathways implicated in cardiovascular pathology according to our expertise in the field (21–25) and to literature data (5, 26). Oligonucleotides for all candidate genes were selected from the MWG database (MWG Biotech AG).

### Data normalization and analysis

Normalization and analysis were assessed using Genespring v6.1 software (Silicon Genetics, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Spots or areas of the array with obvious blemishes were flagged and excluded from subsequent analysis. To eliminate dye-related artifacts in two-color experiments, intensity-dependent Lowess normalization was performed.

To evaluate the expression or non-expression of selected genes in PBMCs, the ratio of the Cy3 intensity for each gene to Cy3 background noise was calculated for each spot. Then, if the mean ratio for a given RNA (2 spots per slide) was not significantly different from the mean ratio for *Arabidopsis thaliana* RNA (8 spots per slide), the gene was considered to be non-expressed (Student's t-test,  $p < 0.01$ ).

Gene expression ratios were obtained by calculating the ratio (Cy3 intensity/Cy3 background noise)/(Cy5 intensity/Cy5 background noise) of the expression intensity corresponding to sample RNA/reference RNA.

Table 1 Characteristics of the 20 individuals selected for the micro-array analysis.

	Sex	Age, years	Height, cm	Weight, kg	DBP, <sup>a</sup> mm Hg	SBP, <sup>a</sup> mm Hg	BMI <sup>b</sup> , kg/m <sup>2</sup>	Tobacco	Alcohol <sup>c</sup>	Cholesterol, mmol/L	Glucose, mmol/L	HDL, mmol/L
Non-hypertensive/ non-obese n=7	M	43	172	72.2	69	129	24.40	N-Sm	3	5.58	4.96	1.49
	M	50	172.8	77.1	65	117	25.82	N-Sm	2	5.42	5.21	1.85
	F	48	173	69.8	69	120	23.30	N-Sm	3	4.50	4.96	1.96
	F	50	156.9	68	68	114	27.62	Ex-Sm	3	5.89	4.9	1.77
	F	45	164.3	57.4	65	103	21.26	N-Sm	3	4.67	4.94	1.88
	M	51	170	67.2	79	125	23.25	N-Sm	1	5.86	5.25	1.98
	F	50	154.3	54.9	68	101	23.05	Ex-Sm	2	4.93	4.65	1.43
Mean		48.1	165.1	66.6	69	115.6	24.10			5.26	5.01	1.76
Hypertensive n=3	F	46	168.5	75.8	83	148	26.70	N-Sm	4	4.92	5.16	2.17
	M	46	177.9	79.9	78	140	25.24	Ex-Sm	1	5.3	4.91	1.97
	M	55	172	86.2	84	147	29.14	N-Sm	3	5.68	5.62	1.62
Mean		47	172.8	80.6	81.6	145.0	27.02			5.23	5.23	1.92
Obese n=6	F	51	168.6	90	74	124	31.66	N-Sm	3	5.7	5.6	1.14
	M	52	171.6	94.9	70	130	32.23	Ex-Sm	2	5.54	6.35	1.13
	F	48	159.2	78.7	70	120	31.05	N-Sm	2	5.16	5.17	1.17
	F	49	168.4	107	66	133	37.73	N-Sm	2	6.1	6.09	1.22
	M	52	167.4	90.2	70	120	32.20	Ex-Sm	3	7.10	6.69	1.53
	F	50	151	68.6	70	122	30.10	Ex-Sm	2	6.3	5.65	2.09
Mean		50.3	164.4	88.2	70	124.8	32.50			5.98	5.93	1.38
Hypertensive/obese n=4	M	52	177.8	110.1	85	140	34.83	Ex-Sm	2	6.5	6.04	1.7
	M	50	161.5	78.4	89	145	30.06	Ex-Sm	2	5.45	6.3	1.3
	M	55	179.4	122	93	155	37.91	Ex-Sm	3	4.78	6.18	1.52
	M	52	181.6	99.7	80	140	30.23	N-Sm	2	5.13	6.76	1.35
Mean		52.2	177.9	102.6	86.7	145	33.25			5.46	6.32	1.47

The four sub-categories were created based on the risk factors of obesity and hypertension, and individuals were classified regardless of other risk factors as tobacco and alcohol consumption. M, male; F, female; DBP, diastolic blood pressure; SBP, systolic blood pressure; HDL, high-density lipoprotein cholesterol; N-Sm, non-smoker; Ex-Sm, ex-smoker. \*Hypertensive; DBP >90 mm Hg or/and SBP >140 mm Hg. <sup>b</sup>Overweight: 25 kg/m<sup>2</sup> < BMI < 30 kg/m<sup>2</sup>. <sup>c</sup>Alcohol use: 1, drinker; 2, drinks several days per week; 3, drinks rarely; 4, abstainer.

**Table 2** Classification of human genes studied according to cardiovascular pathways.

Gene	RefSeq	Description
<b>Blood pressure</b>		
<b>Renin-angiotensin system</b>		
<i>ACE</i>	NM_000789_1	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1, transcript variant; ace
<i>AGTR2</i>	NM_000686_1	Angiotensin II receptor, type 2; agtr2
<i>KLK1</i>	NM_002257_1	Kallikrein 1, renal/pancreas/salivary; klk1
<i>REN</i>	NM_000537_1	Renin; ren
<i>RENBP</i>	NM_002910_1	Renin binding protein; renbp
<i>BDKRB2</i>	NM_000623_1	Bradykinin receptor B2; bdkrb2
<i>AGT</i>	NM_000029_1	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8); agt
<i>AGTR1</i>	NM_031850_1	Angiotensin II receptor, type 1, transcript variant 4; agtr1
<b>Adrenergic-cholinergic receptors</b>		
<i>ADRA2A</i>	NM_000681_1	Adrenergic receptor, type $\alpha$ -2A; adra2a
<i>ADRA2B</i>	M34041_1	Adrenergic receptor, type $\alpha$ -2B; adra2b
<i>ADRB1</i>	NM_000684_1	Adrenergic receptor, type $\beta$ -1; adrb1
<i>ADRB2</i>	NM_000024_1	Adrenergic surface receptor, type $\beta$ -2; adrb2
<i>ADRB3</i>	NM_000025_1	Adrenergic receptor, type $\beta$ -3; adrb3
<i>CHRM1</i>	NM_000738_1	Cholinergic muscarinic receptor, type 1; chrm1
<i>RGS2</i>	NM_002923_1	Regulator of G protein signaling 2, 24 kDa; rgs2
<i>GNAS</i>	NM_000516_1	GNAS complex locus, transcript variant 1; gnas
<i>GNB3</i>	NM_002075_1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), $\beta$ -polypeptide 3; gnb3
<b>Sodium system</b>		
<i>ADD1</i>	NM_014189_1	Adducin 1 ( $\alpha$ ), transcript variant 2; add1
<i>ADD2</i>	NM_001617_1	Adducin 2 ( $\beta$ ), transcript variant beta-1; add2
<i>SCNN1A</i>	NM_001038_1	Sodium channel, non-voltage-gated, type 1 $\alpha$ ; scnn1a
<i>SCNN1B</i>	NM_000336_1	Sodium channel, non-voltage-gated, type 1 $\beta$ (Liddle syndrome); scnn1b
<i>SCNN1G</i>	NM_001039_1	Sodium channel, non-voltage-gated, type 1 $\gamma$ ; scnn1g
<b>Transport</b>		
<i>ATP1A2</i>	NM_000702_1	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting polypeptide, type $\alpha$ 2 (+); atp1a2
<i>ATP1B1</i>	NM_001677_1	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting polypeptide, type $\beta$ 1, transcript variant 1; atp1b1
<b>Arachidonic acid metabolism</b>		
<i>ALOX12</i>	NM_000697_1	Arachidonate 12-lipoxygenase; alox12
<i>ALOX15</i>	NM_001140_1	Arachidonate 15-lipoxygenase; alox15
<i>ALOX5</i>	NM_000698_1	Arachidonate 5-lipoxygenase; alox5
<i>LTC4S</i>	NM_000897_1	Leukotriene C4 synthase, transcript variant 2; ltc4s
<i>PTGIS</i>	NM_000961_1	Prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase; ptgis
<i>PTGS1</i>	NM_000962_1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase), transcript variant 1; ptgs1
<i>PTGS2</i>	NM_000963_1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase); ptgs2
<b>Vasodilatation</b>		
<i>CLCNKB</i>	NM_000085_1	Chloride channel Kb; clcnkb
<i>NPR1</i>	NM_000906_1	Natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A (atrionatriuretic peptide receptor A); npr1
<i>NPR2</i>	NM_000907_1	Natriuretic peptide receptor B/guanylate cyclase B (atrionatriuretic peptide receptor B), transcript variant 1; npr2
<i>NPPA</i>	AL021155.5 (NM_006172_1)	Natriuretic peptide precursor A; nppa
<i>NPR3</i>	NM_000908_1	Natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C); npr3
<i>NOS2A</i>	NM_000625_1	Nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes), transcript variant 1; nos2a
<i>NOS3</i>	NM_000603_1	Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell); nos3
<b>Vasoconstriction</b>		
<i>AVPR1A</i>	NM_000706_1	Arginine vasopressin receptor 1; avpr1a
<i>EDN1</i>	NM_001955_1	Endothelin 1; edn1
<i>EDN2</i>	NM_001956_1	Endothelin 2; edn2
<i>EDNRA</i>	NM_001957_1	Endothelin receptor type A; ednra
<i>EDNRB</i>	NM_000115_1	Endothelin receptor type B, isoform 1, transcript variant 1; ednrb
<i>KYNU</i>	NM_003937_1	Kynureninase (L-kynurenine hydrolase), transcript variant 1; kynu
<i>PNMT</i>	NM_002686_1	Phenylethanolamine N-methyltransferase; pnmt
<i>ACSM3 (SAH)</i>	NM_005622_1	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3 [SA (rat hypertension-associated) homolog], isoform 1; acsm3
<b>Hormone regulation</b>		
<i>HSD11B1</i>	NM_005525_1	Hydroxysteroid (11- $\beta$ ) dehydrogenase 1, transcript variant 1; hsd11b1
<i>HSD11B2</i>	NM_000196_1	Hydroxysteroid (11- $\beta$ ) dehydrogenase 2; hsd11b2
<i>HSD3B1</i>	NM_000862_1	Hydroxy- $\delta$ -5-steroid dehydrogenase, type 3 $\beta$ and steroid $\delta$ -isomerase 1; hsd3b1

(Table 2 continued)

Gene	RefSeq	Description
<i>CASR</i>	NM_000388_1	Calcium-sensing receptor (hypocalciuric hypercalcemia 1, severe neonatal hyperparathyroidism); casr
<i>SGK</i>	NM_005627_1	Serum glucocorticoid-regulated kinase; sgk
<b>Coagulation and pro-thrombosis</b>		
<i>F2</i>	NM_000506_1	Coagulation factor II (thrombin); f2
<i>F5</i>	NM_000130_1	Coagulation factor V (proaccelerin, labile factor); f5
<i>F7</i>	M13232_1	Coagulation factor VII (serum prothrombin conversion accelerator), transcript variant 1; f7
<i>FGB</i>	NM_005141_1	Fibrinogen $\beta$ chain; fgb
<i>SERPINE1</i>	NM_000602_1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1; serpine1
<i>CBS</i>	NM_000071_1	Cystathionine- $\beta$ -synthase; cbs
<i>MTHFR</i>	NM_005957_1	5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase NADPH; mthfr
<b>Cellular adhesion</b>		
<i>VCAM1</i>	NM_001078_1	Vascular cell adhesion molecule 1, transcript variant 1; vcam1
<i>ICAM1</i>	NM_000201_1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor; icam1
<i>SELE</i>	NM_000450_1	Selectin E (endothelial adhesion molecule 1); sele
<i>SELL</i>	NM_000655_1	Selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1); sell
<i>SELP</i>	NM_003005_1	Selectin P (granule membrane protein 140 kDa, antigen CD62); selp
<i>ITGA2</i>	NM_002203_1	Integrin, type $\alpha$ 2 (CD49B, $\alpha$ 2 subunit of VLA-2 receptor); itga2
<i>ITGB3</i>	NM_000212_1	Integrin, type $\beta$ 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61); itgb3
<i>CD36</i>	NM_000072_1	CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor), transcript variant 3; cd36
<i>LMNA</i>	NM_005572_1	Lamin A/C, transcript variant 1; lmnA
<i>MMP3</i>	NM_002422_1	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase); mmp3
<b>Glucose, obesity and lipid metabolism</b>		
<b>Glucose</b>		
<i>INSR</i>	NM_000208_1	Insulin receptor; insr
<i>GYS1</i>	NM_002103_1	Glycogen synthase 1 (muscle); gys1
<i>GPD1</i>	NM_005276_1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble); gpd1
<i>GPD2</i>	NM_000408_1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial); gpd2
<i>GCGR</i>	NM_000160_1	Glucagon receptor; gogr
<i>CAPN10</i>	NM_023083_1	Calpain 10, transcript variant 1; capn10
<b>Lipids</b>		
<i>APOA1</i>	NM_000039_1	Apolipoprotein A-I; apoa1
<i>APOA2</i>	NM_001643_1	Apolipoprotein A-II; apoa2
<i>APOA4</i>	NM_000482_1	Apolipoprotein A-IV; apoa4
<i>APOB</i>	NM_000384_1	Apolipoprotein B [including Ag(x) antigen]; apob
<i>APOC1</i>	NM_001645_1	Apolipoprotein C-I; apoc1
<i>APOC2</i>	M10612_1	Apolipoprotein C-II; apoc2
<i>APOC3</i>	NM_000040_1	Apolipoprotein C-III; apoc3
<i>APOC4</i>	NM_001646_1	Apolipoprotein C-IV; apoc4
<i>APOD</i>	NM_001647_1	Apolipoprotein D; apod
<i>APOE</i>	NM_000041_1	Apolipoprotein E; apoe
<i>APOH</i>	NM_000042_1	Apolipoprotein H ( $\beta$ -2-glycoprotein I); apoh
<i>LDLR</i>	NM_000527_1	Low-density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia); ldlr
<i>VLDLR</i>	NM_003383_1	Very-low-density lipoprotein receptor, isoform a; vldlr
<i>LPL</i>	NM_000237_1	Lipoprotein lipase; lpl
<i>LIPC</i>	NM_000236_1	Lipase, hepatic; lipc
<i>LIPE</i>	NM_005357_1	Lipase, hormone-sensitive; lipe
<i>FABP2</i>	NM_000134_1	Fatty acid binding protein 2, intestinal; fabp2
<i>LPA</i>	NM_005577_1	Lipoprotein, Lp(a); lpa
<i>PLA2G1B</i>	NM_000928_1	Phospholipase A2, group IB (pancreas); pla2g1b
<i>PLTP</i>	NM_006227_1	Phospholipid transfer protein, transcript variant 1; pltp
<i>MTP</i>	NM_000253_1	Microsomal triglyceride transfer protein; mtp
<i>LCAT</i>	NM_000229_1	Lecithin-cholesterol acyltransferase; lcat
<i>CETP</i>	NM_000078_1	Cholesteryl ester transfer protein, plasma; cetsp
<i>SCARB1</i>	NM_005505_1	Scavenger receptor class B, member 1; cd361
<i>SCARB2</i>	NM_005506_1	Scavenger receptor class B, member 2; cd362
<i>POMC</i>	NM_000939_1	Proopiomelanocortin (adrenocorticotropin/ $\beta$ -lipotropin/ $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone/ $\beta$ -melanocyte stimulating hormone/ $\beta$ -endorphin, transcription variant 2); pomc
<i>UCP</i>	NM_021833_1	Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier); ucp1
<i>LEP</i>	NM_000230_1	Leptin (obesity homolog, mouse); lep
<i>LEPR</i>	NM_002303_1	Leptin receptor, isoform 1; lepr
<i>ARTS-1</i>	NM_016442_1	Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator; arts-1

(Table 2 continued)

Gene	RefSeq	Description
<b>Inflammation (cytokines and chemokines)</b>		
<i>IL10</i>	NM_000572_1	Interleukin 10; il10
<i>IL13</i>	NM_002188_1	Interleukin 13; il13
<i>IL18</i>	NM_001562_1	Interleukin 18 (interferon- $\gamma$ -inducing factor); il18
<i>IL1A</i>	NM_000575_1	Interleukin 1, type $\alpha$ ; il1a
<i>IL1B</i>	NM_000576_1	Interleukin 1, type $\beta$ ; il1b
<i>IL2</i>	NM_000586_1	Interleukin 2; il2
<i>IL4</i>	NM_000589_1	Interleukin 4, transcript variant 1; il4
<i>IL4R</i>	NM_000418_1	Interleukin 4 receptor, transcript variant 1; il4r
<i>IL5RA</i>	NM_000564_1	Interleukin 5 receptor, type $\alpha$ , transcript variant 1; il5ra
<i>IL6</i>	NM_000600_1	Interleukin 6 (interferon, $\beta$ 2); il6
<i>IL8</i>	NM_000584_1	Interleukin 8; il8
<i>IL9</i>	NM_000590_1	Interleukin 9; il9
<i>TNFRSF1B</i>	NM_001066_1	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B; tnfrsf1b
<i>CCR2</i>	NM_000648_1	Chemokine (c-c motif) receptor 2, transcript variant B; ccr2
<i>CCR3</i>	NM_001837_1	Chemokine (c-c motif) receptor 3, transcript variant 1; ccr3
<i>CCR5</i>	NM_000579_1	Chemokine (c-c motif) receptor 5; ccr5
<i>CCR7</i>	NM_001838_1	Chemokine (c-c motif) receptor 7; ccr7
<i>CCL11</i>	NM_002986_1	Chemokine (C-C motif) ligand 11; scya11
<i>CCL2</i>	NM_002982_1	Chemokine (C-C motif) ligand 2; scya2
<i>CSF2</i>	NM_000758_1	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage); csf2
<i>TNF</i>	NM_000594_1	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2); tnf
<i>CXCL12</i>	NM_000609_1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1), isoform $\beta$ ; sdf1
<i>SCGB1A1</i>	NM_003357_1	Secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin); scgb1a1
<i>LTA</i>	NM_000595_1	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1); lta
<b>Drug-metabolizing enzymes (CYP 450)</b>		
<i>CYP11B2</i>	NM_000498_1	Cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2; cyp11b2
<i>CYP1A1</i>	NM_000499_1	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1; cyp1a1
<i>CYP2A6</i>	NM_000762_1	Cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 6; cyp2a6
<i>CYP2C18</i>	L16876_1 (NM_000772_1)	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18; cyp2c18
<i>CYP2C19</i>	NM_000769_1	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19; cyp2c19
<i>CYP2C9</i>	NM_000771_1	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9; cyp2c9
<i>CYP2D6</i>	NM_000106_1	Cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6, transcript variant 1; cyp2d6
<i>CYP2E1</i>	AF182276_1 (NM_000773_1)	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1; cyp2e1
<i>CYP2J2</i>	NM_000775_1	Cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2; cyp2j2
<i>CYP3A4</i>	NM_017460_1	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4; cyp3a4
<i>CYP3A5</i>	NM_000777_1	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5; cyp3a5
<i>CYP4A11</i>	NM_000778_1	Cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11; cyp4a11
<i>CYP4F2</i>	AF221943_1 (NM_001082_1)	Cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 2; cyp4f2
<b>Transcriptional factors</b>		
<i>AHR</i>	NM_001621_1	Aryl hydrocarbon receptor; ahr
<i>ARNT</i>	NM_001668_1	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; arnt
<i>MEF2A</i>	NM_005587_1	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide A (myocyte enhancer factor 2A); mef2a
<i>NR1H2</i>	NM_007121_1	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2; nr1h2
<i>NR1H3</i>	NM_005693_1	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3; nr1h3
<i>NR1H4</i>	NM_005123_1	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4; nr1h4
<i>NR1I2</i>	NM_003889_1	Nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2, transcript variant 1; nr1i2
<i>NR1I3</i>	NM_005122_1	Nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3; nr1i3
<i>NR3C1</i>	NM_000176_1	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor), transcript variant 5; nr3c1
<i>TCF7</i>	NM_003202_1	Transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box), isoform 1; tcf7
<i>PPARA</i>	NM_005036_1	Peroxisome proliferative activated receptor, type $\alpha$ , transcript variant 5; ppara
<i>PPARG</i>	NM_015869_1	Peroxisome proliferative activated receptor, type $\gamma$ , transcript variant 2; pparg
<i>VDR</i>	NM_000376_1	Vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor, transcript variant 1; vdr
<b>Cellular growth factors</b>		
<i>EGF</i>	NM_001963_1	Epidermal growth factor ( $\beta$ -urogastrone); egf
<i>PDGFA</i>	M19988_1	Platelet-derived growth factor $\alpha$ polypeptide, transcript variant 1; pdgfa
<i>PDGFB</i>	NM_033016_1	Platelet-derived growth factor $\beta$ polypeptide [simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog], transcript variant 2; pdgfb
<i>IGF1</i>	NM_000618_1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C); igf1
<i>VEGF</i>	NM_003376_1	Vascular endothelial growth factor, transcript variant 2; vegf
<i>TGFB1</i>	NM_000660_1	Transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease); tgfb1
<i>CLU</i>	NM_001831_1	Clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J), isoform 1; clu

(Table 2 continued)

Gene	RefSeq	Description
<b>Oxidative stress</b>		
<i>GGT1</i>	NM_013421_1	$\gamma$ -Glutamyl transferase 1, transcript variant 2; $\gamma$ t1
<i>GSTM1</i>	NM_000561_1	Glutathione S-transferase M1, transcript variant 1; <i>gstm1</i>
<i>GSTP1</i>	NM_000852_1	Glutathione S-transferase $\pi$ ; <i>gstp1</i>
<i>GSTT1</i>	NM_000853_1	Glutathione S-transferase $\theta$ 1; <i>gstt1</i>
<i>PHGDH</i>	NM_006623_1	3-Phosphoglycerate dehydrogenase; <i>phgdh</i>
<i>PON1</i>	NM_000446_1	Paraoxonase 1; <i>pon1</i>
<i>PON2</i>	NM_000305_1	Paraoxonase 2, transcript variant 1; <i>pon2</i>
<i>MPO</i>	NM_000250_1	Myeloperoxidase; <i>mpo</i>
<i>HMOX1</i>	NM_002133_1	Heme oxygenase (decycling) 1; <i>hmx1</i>
<i>CYBA</i>	NM_000101_1	Cytochrome b-245, $\alpha$ polypeptide; <i>cyba</i>
<i>CYBB</i>	S67289_1 (NM_000397_1)	Cytochrome b-245, $\beta$ polypeptide (chronic granulomatous disease); <i>cybb</i>
<b>Immune defense</b>		
<i>DEFA3</i>	NM_005217_1	Defensin, type $\alpha$ 3, neutrophil-specific; <i>defa3</i>
<i>DEFA4</i>	NM_001925_1	Defensin, type $\alpha$ 4, corticostatin; <i>defa4</i>
<i>CAMP</i>	NM_004345_1	Cathelicidin antimicrobial peptide; <i>camp</i>
<i>C3</i>	NM_000064_1	Complement component 3; <i>c3</i>
<i>C5</i>	NM_001735_1	Complement component 5; <i>c5</i>
<i>CD14</i>	NM_000591_1	Cd14 antigen; <i>cd14</i>
<i>CTLA4</i>	NM_005214_1	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, transcript variant 1; <i>ctla4</i>
<i>FPRL1</i>	NM_001462_1	Formyl peptide receptor-like 1, transcript variant 1; <i>fprl1</i>
<i>FPR1</i>	NM_002029_1	Formyl peptide receptor 1; <i>fpr1</i>
<i>MS4A2</i>	NM_000139_1	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2 (receptor for Fc fragment of IgE, high affinity I; $\beta$ polypeptide); <i>ms4a2</i>

Gene symbols are according to HUGO. RefSeq, reference sequence.

We used unsupervised hierarchical cluster analysis (word distance), which is an exploratory multivariate statistical method for identifying natural groupings of objects considered in an analysis. Values for clustering correspond to the sample RNA/reference RNA ratio.

Stepwise discriminant analysis using the STEPDISC procedure from SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) was further applied to determine genes that distinguish our two groups. These genes presented significant values ( $p < 0.05$ ) when the Fisher test was used to evaluate their discriminatory power.

#### Quantitative RT-PCR

RNA was extracted from PBMCs according to the protocol described above. RNA was reverse-transcribed (Quantitect<sup>®</sup> RT Kit; Qiagen, Courtaboeuf, France) and purified cDNA was used at a constant concentration (5 ng/ $\mu$ L) in PCRs using a LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). Absolute quantification of PCR products was performed using standard curves generated from serially diluted standards of known concentration. Primer design was based on Primer Premier 5.0 software (Biosoft International, Palo Alto, CA, USA). Experimental samples were run

in duplicate and results were averaged. A control sample was run with samples in every PCR assay to determine the analytical coefficient of variation. Genes assayed for quantitative PCR were *ICAM1* (NM\_000201), *SELL* (NM\_000655), *TNF* (NM\_000594), and *IL6* (NM\_000600) and PCR conditions are described in Table 3.

#### Results

For designing the in-house micro-array, 182 candidate genes were chosen according to CVD metabolic pathways (Table 2). The characteristics of the subjects are summarized in Table 1.

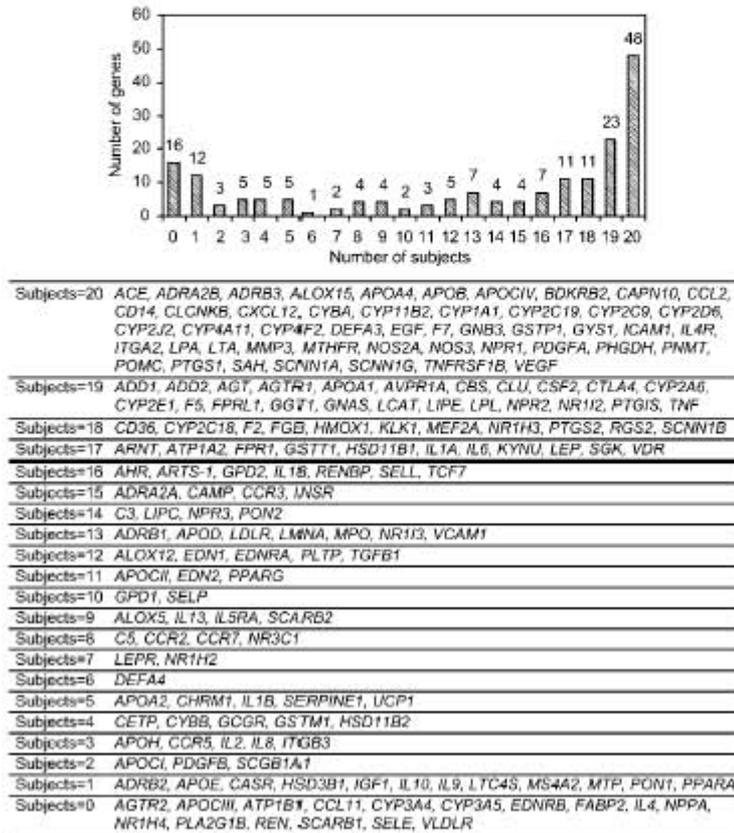
#### Distribution of overall gene expression

Among the 182 candidate CVD genes, 166 were found to be expressed in PBMCs with high significance ( $p < 0.01$ , assuming that a gene is considered as expressed when its mRNA is detected in at least one individual). Figure 1 describes in detail the distribution of gene expression and gives the number of

**Table 3** PCR conditions.

Gene	RefSeq	Primer sequences	Annealing	Extension	No. of cycles
<i>ICAM1</i>	NM_000201	F: 5' CCCC GG TATGAGATTG 3' R: 5' ATGCGTGGCCTAGTGT 3'	58°C for 5 s	72°C for 15 s	40
<i>IL6</i>	NM_000600	F: 5' TACCC CAGGAGAAATTCC 3' R: 5' GCCATCTTTGGAAGGTTCAAG 3'	60°C for 5 s	72°C for 8 s	40
<i>SELL</i>	NM_000655	F: 5' GGAACA TCTTCAAGTTGTGG 3' R: 5' GTGTAATTGTCTCGGCAG 3'	62°C for 10 s	72°C for 6 s	40
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	NM_000594	F: 5' TCTACTTTGGGATCATTGCC 3' R: 5' GTGGTGGTCTTGTTCCTAA 3'	60°C for 10 s	72°C for 7 s	40

RefSeq, reference sequence; F, forward primer; R, reverse primer.



**Figure 1** Distribution of gene expression in PBMCs of the 20 supposed healthy individuals studied. The graphic shows the number of genes expressed in relation to the number of individuals. For a total of 182 genes selected, 166 were expressed ( $p < 0.001$ ). The detailed list presents the distribution of gene expression in relation to the number of individuals.

genes expressed in relation to the number of individuals.

#### Distribution by metabolic pathway

With regard to the distribution of genes by metabolic pathway, five genes (*AGTR2*, *REN*, *EDNRB*, *ATP1B1*, and *NPPA*) among the 51 involved in the regulation of blood pressure (the largest category) were not expressed in our model. Candidate genes for coagulation and pro-thrombotic pathways ( $n=7$ ), immune defense ( $n=10$ ), oxidative stress ( $n=11$ ), and cellular growth factors ( $n=7$ ) were all found in detectable levels. Among ten cellular adhesion genes, only *SELE* was not detected. All the principal drug-metabolizing enzymes, involving 16 genes, were expressed by PBMCs, except two cytochromes P450 (*CYP3A4*, *CYP3A5*). Concerning the 36 genes representing glucose, obesity and lipid metabolism, five were undetectable (*APOC3*, *PLA2G1B*, *FABP2*, *SCARB1*, and *VLDLR*). For transcriptional factors, we revealed the presence of 12 from a total of 13 genes; *NR1H4* was not detected. Finally, among 24 selected major chemokines and cytokines included in the inflammation pathway, two were not expressed (*IL4* and *CCL11*).

#### Levels of gene expression

We evaluated the levels of expression of the 166 genes detected (Figure 2). Considering each metabolic pathway separately, we observed gene expression levels for a significant number of genes, high enough for studying specific expression profiles quantitatively.

#### Validation of micro-array results

We performed a two-step validation of the micro-array results by focusing on four genes involved in the two principal biological pathways related to leukocytes, inflammation and cellular adhesion mechanisms, which were expressed in a significant number of individuals (more than 16): *ICAM1*, *TNF*, *SELL* and *IL6* (Table 4).

**qRT-PCR on the same population** Genes were considered as expressed when there was a gene-specific amplification melting curve. Calculation of the percentage presence of a gene showed that the qRT-PCR results are in agreement with those obtained by micro-array analysis.

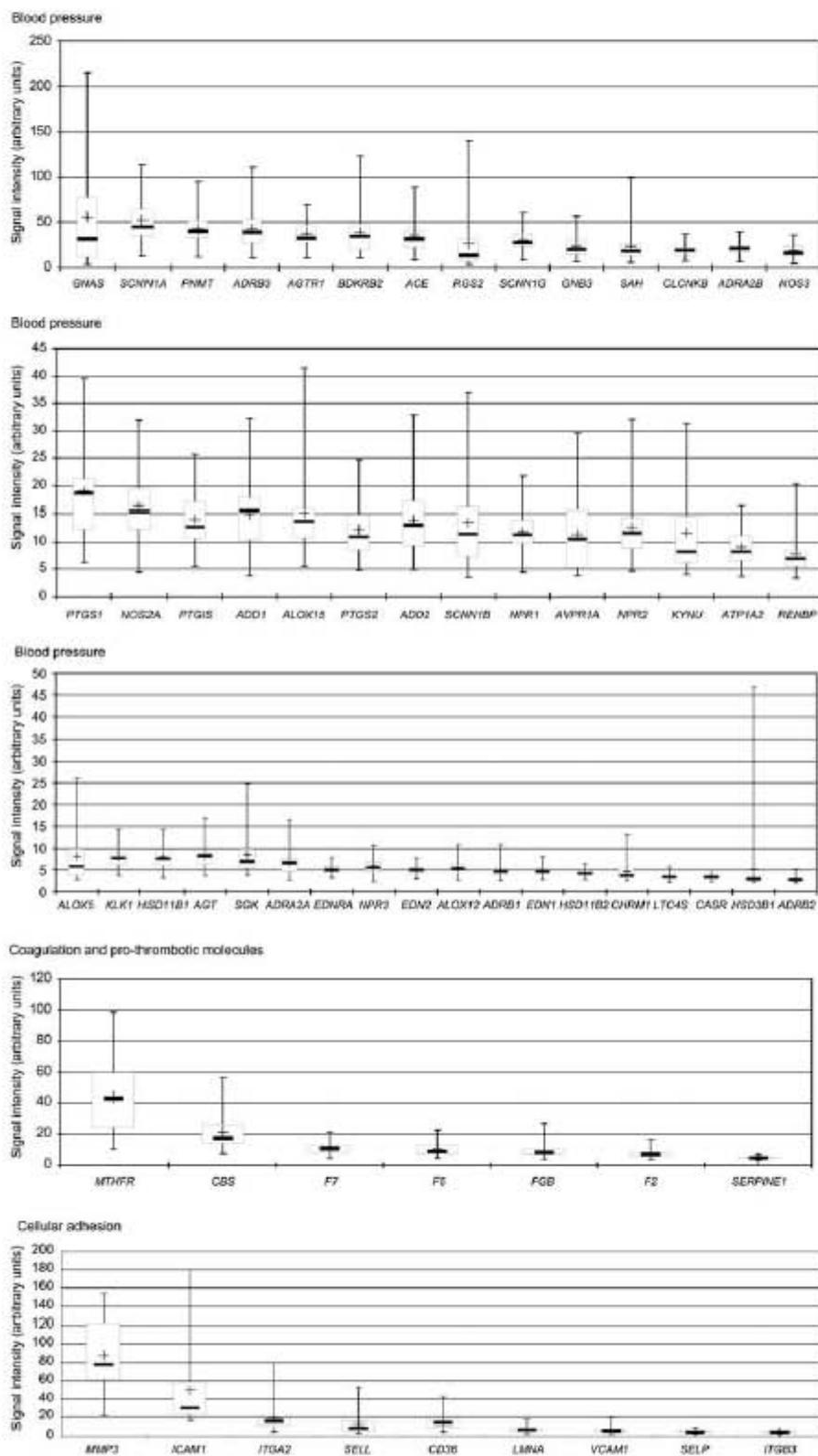
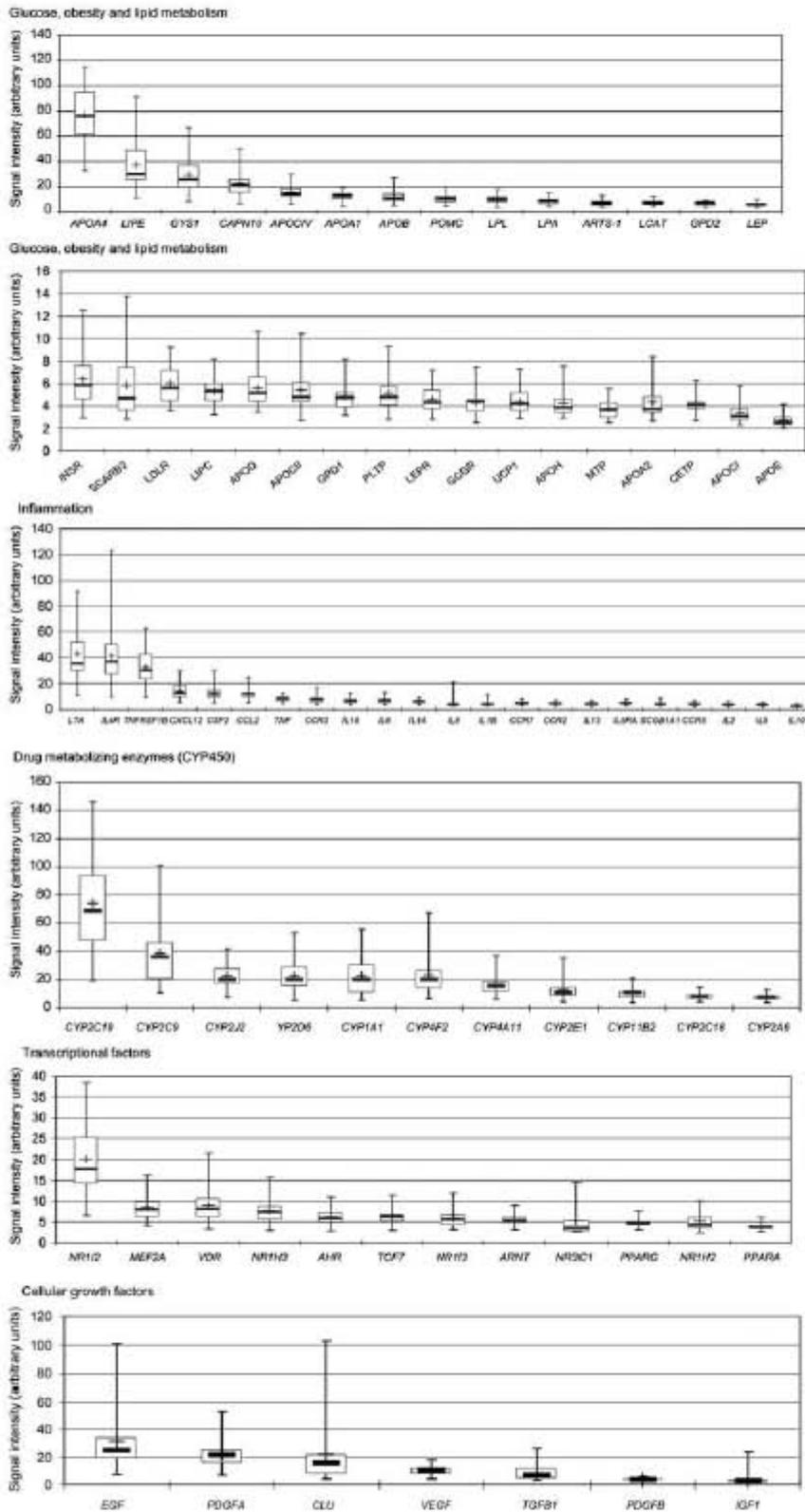
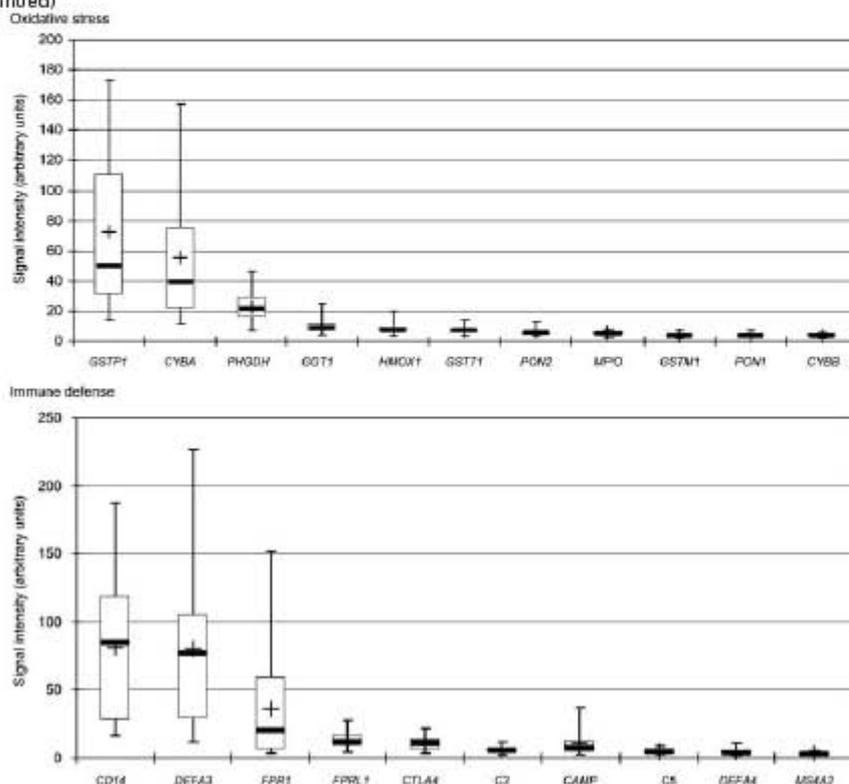


Figure 2 Signal intensity (arbitrary units) of the 166 genes expressed in PBMCs.

(Figure 2 continued)



(Figure 2 continued)

**Figure 2** Signal intensity (arbitrary units) of the 166 genes expressed in PBMCs.

A gene is considered as expressed when its mRNA was detected in at least one of the 20 individuals. Signal intensity represents the ratio of the intensity value for a specific gene vs. background noise. All the ten cardiovascular pathways are shown separately. Results are shown as box-plots with medians (lines inside boxes), 25th and 75th percentiles (box limits), minima and maxima, and means (crosses).

**qRT-PCR in a larger healthy population** We conducted a larger qPCR study on 83 supposed healthy individuals. The qPCR efficacy was >95% and intra-assay (duplicate) and inter-assay (compared to a control subject) analytical coefficients of variation were estimated as 0.4% and 0.5%, respectively, for all genes tested. Inter-individual variability ranged from 50.2% to 112.0% (*ICAM1*, 50.2%; *IL6*, 59.0%; *SELL*, 59.1%; *TNF*, 112.0%).

#### Discrimination of individuals according to risk factors

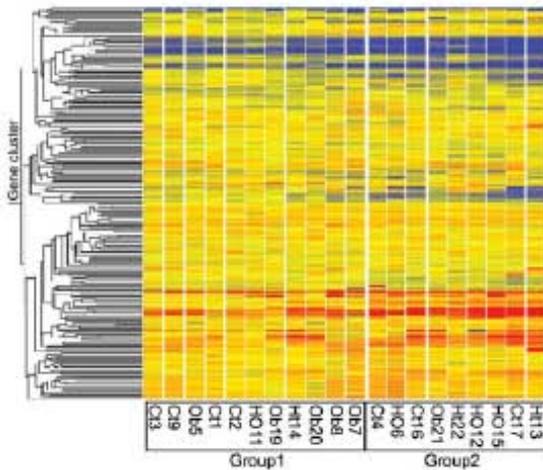
In the next step, we carried out unsupervised clustering analysis of micro-array results, which revealed

two distinct clusters (Figure 3) for the population studied (7 individuals without CV risk factors, 3 hypertensive, 6 obese and 4 hypertensive/obese individuals). The first group seems to be principally composed of obese subjects without risk factors, and the second group of hypertensive and obese/hypertensive subjects. Then we used STEPDISC for selection of pertinent genes responsible for discrimination of the two groups. This revealed 15 genes: *MS4A2*, *ARNT*, *KLK1*, *DEFA3*, *HSD11B2*, *TGFB1*, *C3*, *NR1H2*, *LEPR*, *UCP1*, *F5*, *IL1A*, *RGS2*, *EDN2*, and *HSD3B1*. Among these, five genes were classified in the blood pressure regulation group (*RGS2*, *EDN2*, *KLK1*, *HSD3B1*, and *HSD11B2*), two in the obesity group (*LEPR* and *UCP1*), and two in the inflammation group (*IL1A* and *TGFB1*);

**Table 4** Percentage presence of the four genes studied.

Gene	Micro-array study on 20 healthy individuals	qPCR study on 20 healthy individuals	qPCR study on 83 healthy individuals
<i>ICAM1</i>	100.0% (20/20)	100% (20/20)	100% (83/83)
<i>TNF</i>	95.0% (19/20)	100% (20/20)	100% (83/83)
<i>SELL</i>	80.0% (16/20)	95.0% (19/20)	98.8% (82/83)
<i>IL6</i>	85.0% (17/20)	85.0% (17/20)	95.0% (79/83)

The number of individuals who showed expression of the selected genes is in parentheses.



**Figure 3** Unsupervised cluster analysis of gene expression in PBMCs for the 20 individuals. The matrix shows gene expression corresponding to individuals. The values represent the ratio of the intensity of gene expression to the intensity in reference RNA that served as a normalization value for every gene expressed in each individual. These values were used for the cluster analysis and different colors correspond to higher (red) or lower (blue) levels of gene expression. Some expression zones seem to distinguish subjects in different groups. We selected the following categories prior to clustering: Ct, individual without CV risk factor; Ht, hypertensive individual; O, obese individual; HO, hypertensive/obese individual. Unsupervised analysis, i.e., analysis without setting a priori criteria, revealed two groups. The first comprises mostly the control and obese individuals, while the second consists principally of individuals who have hypertension as a risk factor (hypertensive and hypertensive/obese).

the others belonged to transcriptional factors (*ARNT* and *NR1H2*), and immune (*MS4A2*, *DEFA3*, and *C3*), and coagulation (*F5*) systems.

## Discussion

The aim of the present investigation was to support two hypotheses: a) PBMCs could be a representative tissue for studying the major pathways involved in CVD in relation to inflammation and for further elucidating interactions between them; and b) gene expression variations in PBMCs could differentiate individuals with risk factors for CVD.

In this context, we designed an in-house microarray of 182 genes belonging to 10 pathways crucially involved in the development and progression of these diseases. The choice of these genes was based on literature data and the experience of our laboratory in genetics (5, 21–26). Genes involved in inflammation, cellular adhesion, lipid metabolism, blood pressure regulation, drug metabolism, and oxidative stress, as well as other metabolic pathways known to be related to CV disorders, were included because of confirmed knowledge on their involvement in the development and progression of atherosclerosis plaques.

We applied the micro-array assay to PBMCs (97.5% lymphocytes) from 20 supposed healthy individuals with or without the presence of the CVD risk factors hypertension and/or obesity. Results for two adhesion (*ICAM1* and *SELL*) and two inflammatory genes (*TNF* and *IL6*), which are well implicated in the atherosclerosis process (27, 28), were validated by qRT-PCR in these subjects and in a larger sample of 83 healthy individuals.

The great majority of the genes selected (166 genes) were significantly expressed in PBMCs and all metabolic pathways were well represented. Moreover, measurement of gene expression levels by sensitive qRT-PCR on a larger population revealed interesting inter-individual variation, confirming the need for more advanced studies.

To the best of our knowledge, most of the genes investigated in this work have never been studied before in this type of tissue, and are usually explored in plasma (for proteins) or total blood (for transcriptomic studies) (16). To date, although studies are continuously providing additional data that emphasize the central role of inflammation in CVD, PBMCs are not sufficiently investigated in this context. Only a few transcriptomics studies have used PBMCs (29–32), but all of them suggest that this type of cell can be a useful sensor for detecting environmental exposure or pathological states. We hypothesized that PBMCs could reflect inflammatory mechanisms in a more specific way compared to serum/plasma. There is already evidence supporting this hypothesis; in particular, it was reported that serum cytokines only weakly reflect PBMC cytokine production (16). Thus, a strategy specifically targeting PBMCs could give new and more precise information on the involvement of inflammation in CVD.

Moreover, gene expression is a sensitive measure of cell environment and function and may potentially be influenced by subtle changes or differences between individuals and/or environmental conditions. In the present study, we chose gene expression of a considerable number of candidate genes to investigate CVD in more detail.

We showed that the blood pressure regulation system was highly represented; the majority of genes of the renin-angiotensin system were expressed in PBMCs. Angiotensin-converting enzyme has already been found in human lymphocytes (33), as in our study. We also detected adrenergic, bradykinin, and endothelin receptors. Wahle et al. (34) have shown that  $\beta$ -adrenergic receptors may play a role in mediating the differential catecholamine effects on cytokine production by these cells. As suggested by Horiguchi et al. (35), lymphocytes could be a good model for investigating  $\text{Na}^+$  regulation because of the high expression of sodium channel non-voltage-gated protein 1.

Another important result was that almost all genes involved in lipid metabolism were expressed in PBMCs from healthy individuals, providing a potential new tool to study dyslipidemia. Furthermore, all genes involved in glucose metabolism were expressed.

The presence of mRNA for leptin and its receptor, molecules that seem to relate obesity to inflammation, opens promising perspectives in the field of obesity. Actually, leptin can induce the production of multiple cytokines by PBMCs via its receptor, but its production by these cells has never been reported. It seems that secretion of leptin serves to sustain proliferation and lymphocyte survival (36).

Matrix metalloproteinase 3 was highly expressed in our population and these results are consistent with a previous study (37), suggesting that PBMCs may be involved in the remodeling of extracellular matrix by their ability to produce matrix metalloproteinases.

Genes involved in oxidative stress were also represented. More precisely, three glutathione-S-transferases were expressed in our model. The expression of these genes is increased during inflammation (38). The usefulness of PBMCs as a more appropriate model than serum or cerebrospinal fluid for studying glutathione-S-transferases was already demonstrated by a recent study (39).

Finally, as expected, all pro-inflammatory interleukins we investigated were expressed in non-activated PBMCs. Our results are also relevant for genes of the immune defense pathway and transcriptional factors. However, some interleukins (anti- and pro-inflammatory types) were weakly expressed in a small number of individuals. For example, IL-9 and IL-10 were expressed only in one individual, IL-2 and IL-8 in two and IL-4 was expressed in no individual.

Interestingly, to the best of our knowledge, some genes were shown to be expressed in PBMCs for the first time, including coagulation factor VII, *APOA4*, the aryl hydrocarbon receptor, and some cytochromes P450.

Detection of the majority of the investigated genes in PBMCs and the existence of inter-individual variations in supposed healthy individuals open new perspectives for the investigation of gene expression in both healthy (i.e., pre-pathology) and diseased individuals. To date, most studies focus on determining a possible pattern of gene expression characteristic of a disease when a pathology is considered to be present, based on either overt clinical signs or the use of drug intervention to treat the pathology (40). These applications, which are of great value in clinical and therapeutic settings, cannot provide much useful information when the disease is silently developing. Thus, it is also important to investigate the physiological variations of gene expression by 1) determining the inter-individual variation of gene expression, 2) explaining it in terms of constitutional, environmental and genetic factors, and 3) comparing such with pathological states. Considering the above, this pilot study on relatively young, supposed healthy individuals represents the basis for further investigation in pathological situations.

In a first attempt to discriminate individuals with and without risk factors in our population, we performed cluster analysis, which separated the population into two groups. The first comprises obese subjects without risk factors, while the second group

is composed predominantly of hypertensive and obese-hypertensive patients. We found a total of 15 genes able to discriminate these groups. Interestingly, five of these genes are involved in blood pressure regulation (*AGS2*, *EDN2*, *KLK1*, *HSD3B1*, and *HSD11B2*). To explain these preliminary results, we hypothesize that *NR1H2* (a transcription factor) could modulate arterial pressure via an effect on these five hypertensive genes. Interestingly, it has recently been demonstrated that *NR1H2* has an effect on another hypertensive gene, renin (41). In addition, *LEPR* and *UCP1* may also be activated by *NR1H2*. Indeed, it seems that *NR1H2* is involved in energy metabolism via *UCP1* (42). It is important to note that a locus of susceptibility to severe obesity is situated on chromosome 19q, on which *NR1H2* is located (43). Finally, the leptin receptor may influence the immune process by regulating the activation of circulating cells and the production of inflammatory molecules (36).

One limitation of the use of PBMCs as a model in CVD risk could be the fact that some genes were not expressed by this type of tissue, and consequently this model does not support the study of all the candidate CVD genes selected.

While this study addressed a relatively small number of subjects (which is the case for most micro-array research), we selected a population with strict inclusion criteria and performed hypothesis-driven research based on the selection of specific candidate genes. The potential interpretation of these findings certainly needs further studies including more candidate genes in larger populations.

The majority of the candidate CVD genes were present in lymphocytes and in levels high enough to investigate their expression profile in healthy individuals, providing the possibility to assess variations in pathological states. Surprisingly, lymphocytes expressed genes with important roles in CVD development that are typically secreted by other types of tissues. This opens new perspectives for elucidating the contribution of lymphocytes to the atherosclerosis process. The significance and potential interpretation of these findings obviously require further studies in larger populations and investigations targeted at each of the pathways connected to leukocytes before considering interactions with inflammation. It is currently well accepted in CVD research that only investigation of the different biological pathways involved and of potential interactions (among them and with environmental factors) can provide added benefit for understanding the architecture of these diseases.

In conclusion, our results highlight the importance of studying PBMCs in a strategy targeting inflammation-related metabolic pathways to explore CVD and its risk factors (such as hypertension) for better understanding of the architecture of these diseases.

## Acknowledgements

This work was supported by an INSERM Grant CRB "Collection de Ressources Biologiques" 4CH07H. We thank Dr. Pascal Soularue (PARTNERCHIP CEA/DSV/DRR/SGF Evry) for his

excellent technical assistance. We also thank the staff of the Centre de Médecine Préventive of Vandœuvre-lès-Nancy (France) for their involvement in the recruitment of the Stanislas cohort. We are indebted to the families of the Stanislas survey who made this study possible. The Stanislas cohort study is supported by the Caisse Nationale d'Assurance Maladies des Travailleurs Salariés (CNAM), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Région Lorraine, the Communauté Urbaine du Grand Nancy and the Henri Poincaré University of Nancy I.

## References

- Friedman GD, Klatsky AL, Siegelaub AB. The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1974;290:1275-8.
- Hoffman M, Blum A, Baruch R, Kaplan E, Benjamin M. Leukocytes and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2004;172:1-6.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
- Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2006;83(Suppl):466S-60S.
- Li JJ, Chen JL. Inflammation may be a bridge connecting hypertension and atherosclerosis. *Med Hypotheses* 2005;64:925-9.
- Abramson JL, Lewis C, Murrain NV, Anderson GT, Vaccaro V. Relation of C-reactive protein and tumor necrosis factor-alpha to ambulatory blood pressure variability in healthy adults. *Am J Cardiol* 2006;98:649-52.
- Ma J, Dempsey AA, Stamatou D, Marshall KW, Liew CC. Identifying leukocyte gene expression patterns associated with plasma lipid levels in human subjects. *Atherosclerosis* 2007;191:63-72.
- Afshar-Kharghan V, Thiagarajan P. Leukocyte adhesion and thrombosis. *Curr Opin Hematol* 2006;13:34-9.
- Kotur-Stevuljevic J, Memon L, Stefanovic A, Spasic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N, et al. Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *Clin Biochem* 2007;40:181-7.
- Puddu GM, Cravero E, Arnone G, Muscari A, Puddu P. Molecular aspects of atherogenesis: new insights and unsolved questions. *J Biomed Sci* 2005;12:839-53.
- Pascual G, Glass CK. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol Metab* 2006;17:321-7.
- Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med* 2002;252:283-94.
- Ferri N, Paoletti R, Corsini A. Biomarkers for atherosclerosis: patho-physiological role and pharmacological modulation. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:495-501.
- Khuseynova N, Koenig W. Biomarkers of outcome from cardiovascular disease. *Curr Opin Crit Care* 2006;12:412-9.
- Blankenberg S, Yusuf S. The inflammatory hypothesis: any progress in risk stratification and therapeutic targets? *Circulation* 2006;114:1557-60.
- Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Byrd MG, Kazembe PN, Dobbie H, et al. Comparison of serum and cell-specific cytokines in humans. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:1097-103.
- Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Gueguen R, Vincent-Viry M, Sass C, et al. Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:35-42.
- Marteau JB, Mohr S, Pfister M, Visvikis-Siest S. Collection and storage of human blood cells for mRNA expression profiling: a 15-month stability study. *Clin Chem* 2005;51:1250-2.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:research0034.1-11.
- Stürzenbaum SR, Kille P. Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comp Biochem Physiol B* 2001;130:281-9.
- Marteau JB, Zaiou M, Siest G, Visvikis-Siest S. Genetic determinants of blood pressure regulation. *J Hypertens* 2005;23:2127-43.
- Visvikis-Siest S, Marteau JB. Genetic variants predisposing to cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:139-51.
- Cheng S, Grow MA, Pallaud C, Klitz W, Erlich HA, Visvikis S, et al. A multilocus genotyping assay for candidate markers of cardiovascular disease risk. *Genome Res* 1999;9:936-49.
- Pallaud C, Sass C, Zennaro F, Siest G, Visvikis S. APOC3, CETP, fibrinogen and MTHFR are genetic determinants of carotid intima-media thickness (Stanislas cohort). *Arch Mal Coeur Vaiss* 2001;59:316-24.
- Pallaud C, Gueguen R, Sass C, Grow M, Cheng S, Siest G, et al. Genetic influences on lipid metabolism trait variability within the Stanislas cohort. *J Lipid Res* 2001;42:1879-90.
- Gibbons GH, Liew CC, Goodarzi MO, Rotter JL, Hsueh WA, Siragy HM, et al. Genetic markers: progress and potential for cardiovascular disease. *Circulation* 2004;109:47-58.
- Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. C-Reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study. *Circulation* 2005;112:976-83.
- Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;170:191-203.
- Moore DF, Li H, Jeffries N, Wright V, Cooper RA, Elkahoul A, et al. Using peripheral blood mononuclear cells to determine a gene expression profile of acute ischemic stroke: a pilot investigation. *Circulation* 2005;111:212-21.
- Wibaut-Berlaimont V, Randi AM, Mandryko V, Lunnon MW, Haskard DO, Naoumova RP. Atorvastatin affects leukocyte gene expression in dyslipidemia patients: in vivo regulation of hemostasis, inflammation and apoptosis. *J Thromb Haemost* 2005;3:677-85.
- Chon H, Gaillard CA, van der Meijden BB, Dijkstra Bloem HM, Kraaijenhagen RJ, van Leenen D, et al. Broadly altered gene expression in blood leukocytes in essential hypertension is absent during treatment. *Hypertension* 2004;43:947-51.
- Lampe JW, Stepaniants SB, Mao M, Radish JP, Dai H, Linsley PS, et al. Signatures of environmental exposures using peripheral leukocyte gene expression: tobacco smoke. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:445-53.
- Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 1993;290:33-40.
- Wahle M, Neumann RP, Moritz F, Krause A, Buttgerit F, Baerwald CG. Beta2-adrenergic receptors mediate the differential effects of catecholamines on cytokine production of PBMC. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25:384-94.
- Horiguchi M, Kimura M, Skumick J, Aviv A. Parameters of lymphocyte  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  regulation and blood pressure: the gender effect. *Hypertension* 1998;32:869-74.

36. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4:371-9.
37. Di Girolamo N, Tedla N, Lloyd A, Wakefield D. Expression of matrix metalloproteinases by human plasma cells and B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1998;28:1773-84.
38. Aitken AE, Richardson TA, Morgan ET. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:123-49.
39. Kuzma M, Jamrozik Z, Baranczyk-Kuzma A. Activity and expression of glutathione S-transferase pi in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Chim Acta* 2006;364:217-21.
40. Henriksen PA, Kotelevtsov Y. Application of gene expression profiling to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2002;54:16-24.
41. Morello F, de Boer RA, Steffensen KR, Gnecci M, Chisholm JW, Boomsma F, et al. Liver X receptors  $\alpha$  and  $\beta$  regulate rennin expression in vivo. *J Clin Invest* 2005;115:1913-22.
42. Steffensen KR, Neo SY, Stulnig TM, Vega VB, Rahman SS, Schuster GU, et al. Genome wide expression profiling: a panel of mouse tissues discloses novel biological functions of liver X receptors in adrenals. *J Mol Endocrinol* 2004;33:609-22.
43. Bell CG, Benzinou M, Siddiq A, Lecoeur C, Dina C, Lemainque A, et al. Genome-wide linkage analysis for severe obesity in French Caucasians finds significant susceptibility locus on chromosome 19q. *Diabetes* 2004;53:1857-65.

Received March 21, 2007, accepted May 4, 2007

## Publication No5

### **Leptin expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) is related with blood pressure variability.**

Anastasia Samara, Berangère Marie, Pfister Michèle, Sophie Visvikis-Siest

Clin Chim Acta, 2008, 395: 47-50

La leptine est une adipokine initialement considérée comme une molécule exclusivement associée à l'obésité. L'avancement des connaissances a mis en évidence des rôles multiples dans d'autres mécanismes physio-pathologiques et particulièrement ceux de l'inflammation. La présente étude a voulu démontrer la présence de l'ARNm de la leptine dans les globules blancs mononucléaires (PBMCs), et quantifier l'expression de ce gène dans ce type de cellules liées à l'inflammation.

L'ARNm de la leptine était présent dans les PBMCs des individus supposés sains. Nous avons ensuite étudié son expression chez 83 sujets supposés sains de la cohorte STANISLAS en relation avec les facteurs constitutionnels, les variables anthropométriques, la pression artérielle, le profil lipidique, le glucose et les marqueurs d'inflammation (CRP, nombre de lymphocytes circulants).

Les taux d'expression de la leptine ont été significativement associés d'une façon négative avec la pression artérielle systolique (PAS) et diastolique (PAD) ( $p=0.03$ ,  $p=0.003$  respectivement). Une analyse de régression multiple a montré que les taux d'ARNm de la leptine pouvaient expliquer 11% de la variation de la PAS ( $p=0.007$ ) et de la variation de la PAD ( $p=0.003$ ). Ces pourcentages n'ont pas été altérés après l'introduction de l'indice de masse corporelle dans le modèle (9% et 10% pour la PAS et la PAD respectivement).

Dans cet article, nous décrivons pour la première fois l'expression de la leptine dans les PBMCs humains de sujets supposés sains. Les associations trouvées avec la pression artérielle, suggèrent un rôle possible de cette adipokine dans la pression artérielle *via* les PBMCs.



Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinchim



## Leptin expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) is related with blood pressure variability

Anastasia Samara, Berangere Marie, Michèle Pfister, Sophie Visvikis-Siest\*

INSERM, CIC 950, Biopôle, Génétique Cardiovasculaire, Nancy, F-54000 France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 March 2008

Accepted 28 April 2008

Available online xxx

#### Keywords:

Leptin

PBMCs

Blood pressure

Physio-pathology

Gene expression

### ABSTRACT

**Background:** Leptin is an adipokine initially considered as a molecule related exclusively to obesity but advances in research revealed its multiple roles in other physio-pathological mechanisms and particularly in the inflammatory ones. The aim of the present study was to demonstrate the presence of leptin in human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) and to quantify its mRNA in this type of tissue, closely related to inflammation.

**Methods:** Leptin mRNA was present in PBMCs of healthy individuals. Its expression was further studied in 83 individuals in relation to constitutional factors, anthropometric variables, blood pressure, lipid profile, glucose and markers of inflammation (C-reactive protein, lymphocyte count).

**Results:** Expression levels were significantly associated with systolic blood pressure (SBP) ( $p = 0.03$ ) and diastolic blood pressure (DBP) ( $p = 0.003$ ). Using a multiple regression analysis model, we showed that leptin mRNA levels explained 11% of the variation of SBP ( $p = 0.007$ ) and of DBP ( $p = 0.003$ ). These percentages remained at the same magnitude for SBP (9%) and for DBP (10%), after introducing BMI in the model.

**Conclusion:** We report here for the first time, leptin expression in human PBMCs of healthy individuals. The associations found with blood pressure suggest a possible role of leptin in blood pressure regulation via PBMCs.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The key event which led research to consider adipose tissue as a major site of secretion of protein signals of obesity was the discovery of leptin [1]. Circulating leptin levels are proportional to adipose tissue mass and therefore, they reflect the amount of adipose tissue in the body and this adipokine is thought a signal of the body's energy reserves [2].

Even though elevated leptin levels are observed in the case of obesity, the physiological properties of this adipokine are not limited in representing and mediating functions of adipose tissue. Beyond linking nutritional status with neuroendocrine and immune functions, leptin is increased in the plasma in the case of infection and inflammation, suggesting that this molecule is involved in inflammation and innate and adaptive immunity [3–5]. Leptin exerts multiple actions on Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) [6] and *in vitro* studies where leptin was administered in PBMCs showed that it can directly induce inflammatory response and expression of its receptors in PBMCs [7]. Furthermore, leptin is produced by inflammatory-regulatory cells proposing specific properties of this molecule in inflammatory mechanisms through direct para- or autocrine action [4].

It is noteworthy that leptin not only acts on inflammatory cells but it is also produced by them in some cases. The production of leptin by T lymphocytes was firstly described in an animal experimental model of autoimmune disease (encephalomyelitis) and authors presumed a role in sustaining proliferation of inflammatory cells via an autocrine loop [8]. Another study focusing on human chronic viral hepatitis demonstrated leptin expression in PBMCs [9]. However, beyond the suggested implication of leptin in autoimmune diseases and acute inflammatory states, its physio-pathological roles in the inflammation-related cardiovascular disease risk factors as hypertension are not yet described.

Many studies support the involvement of inflammation in hypertension [10]. Moreover, many clinical trials have shown elevated plasma leptin in patients with essential hypertension and a significant positive correlation between leptin and blood pressure independent of body adiposity both in normotensive and in hypertensive individuals [11]. Meanwhile, in these relationships, they do not really take into consideration inflammatory process, even if independent relationships have been found. Studying PBMCs which is specific to inflammation tissue, could give an answer to an eventual inflammation-mediated relationship of leptin with blood pressure.

Therefore, in the present study, we aim to test whether leptin is expressed by human PBMCs of supposed healthy individuals, thus in the physio-pathological state and if this tissue is a source for leptin, to investigate the eventual links between leptin expression levels and blood pressure, as well as other cardiovascular risk factors.

\* Corresponding author: Equipe Inserm, Génétique Cardiovasculaire, du CIC 950, Université Nancy Henri Poincaré, Faculté de Pharmacie, 30, rue Lionello, 54000 Nancy, France. Tel: +33 3 83 68 21 84; fax: +33 3 83 32 13 22.

E-mail address: Sophie.Visvikis-Siest@nancy.inserm.fr (S. Visvikis-Siest).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study population

For this specific investigation, we selected a sub-population of 83 supposed healthy individuals (42 men and 41 women) genetically unrelated, making part of the STANSLAS cohort [12].

Participants were of French origin free from serious and/or chronic illnesses such as diabetes mellitus, cardiovascular disease, hepatic or renal failure or any other inflammatory disease or obvious inflammatory signs. All individuals gave their written informed consent for sample collection and molecular analysis prior to their inclusion. This cohort was approved by the local Ethics Committee of Nancy (France). Samples and data are making part of the CBR (Center of Biological Resources): "The STANSLAS cohort and the genetic determination of biological and clinical intermediate phenotypes of CVD" managed by Dr Soghie Vaisidis-Sixt.

### 2.2. Data collection

Data dealing with tobacco, alcohol and current use of medications were assessed by a questionnaire on the living habits of each participant. Smoking status was described as non-smokers, smokers, and ex-smokers. Alcohol consumption was expressed in grams per day. Body mass index (BMI) was calculated according to the Quetelet's formula of weight divided by height (kilograms per meters squared). Individuals were classified as described by the World Health Organization (WHO): lean with BMI of 18.5–24.9 kg/m<sup>2</sup>; overweight with BMI of 25.0–29.9 kg/m<sup>2</sup> and obese with BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> [13]. Blood pressure was calculated as the mean of three measurements taken under standardized conditions with a sphygmomanometer with the subject in a supine position.

Blood samples were taken from subjects after an overnight fast. Venous blood was collected without anticoagulant in Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Buhlerford NJ) containing a gel for serum separation. These samples were centrifuged at 1000 g for 15 min at room temperature and were analyzed for all constituents. Basic blood constituents were measured as described by Sixt et al. [12].

C-reactive protein (CRP) concentrations were measured by immunonephelometry with a Behring Nephelometer Analyzer II (Dade Behring Marburg, Germany).

### 2.3. PBMCs collection

Fresh whole blood (10 ml) was collected by standardized venipuncture in EDTA tube (Vacutainer™; Becton Dickinson). PBMCs were isolated by centrifugation on a density gradient of Ficoll (Ficoll-Paque™ PLUS; Amersham) and stored at -80 °C until RNA extraction. The PBMCs lysis was constituted according to a well validated protocol, with a high recovery in PBMCs (97.5%) and mRNA quality and stability were carefully tested [14].

### 2.4. Quantitative RT-PCR

Total RNA from PBMCs was extracted by an automated isolation procedure (MagNA Pure LC instrument) using MagNA Pure LC RNA HP isolation kit and RNA HP Blood External Lysis protocol according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics). DNase treatment is included in the MagNA Pure protocol. The choice of a robotic machine enables consistent isolation of high-quality RNA and minimizes potential errors rising from the manipulation procedure. The total RNA obtained was reverse-transcribed for 32 min at 42 °C (Quantitect RT kit, Qiagen) in a 20 µl reaction with wipe-out buffer (to eliminate "eventually" residual DNA and kit mix and buffer). After purification, cDNA was adjusted and used at constant concentration (5 ng/µl) in polymerase chain reactions using LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). Duplicates of 5 µl were run (25 ng) and polymerase chain reaction products were absolute quantified by applying standard curves generated from serially diluted standards of known concentration. A control sample was run with templates in every PCR assay, in order to determine the analytical coefficient of variation. Inter- and intra-assay analytical coefficient of variation (CV) was calculated and estimated at 0.4% and 0.5% respectively for leptin. The design of primers was based on Primer Premier 5.0 software (BioSoft International) and was as follows: 5'-GTGCGGATCTGTGG-3' (forward) and 5'-GACTTCTGTTTGAGGA-3'. An initial denaturation at 95 °C for 10 min was followed by 40 cycles each consisting of: denaturation at 95 °C for 10 s, amplification and elongation for 60 s at 60 °C for 10 s and 72 °C for 6 s.

As for the absolute quantification, we tested several housekeeping genes but their variation exceeded variation of leptin expression. Therefore, we did not use normalizer genes.

### 2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SAS package program version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Before statistical analysis, non-normally distributed parameters were logarithmically transformed to approximate a normal distribution. A *p*-value  $\leq 0.05$  was considered as statistically significant. Descriptive statistics were computed using means and standard deviations (SD) for continuous measurements. Mann-Whitney test was used to determine significant differences between men and women. We used Pearson's correlation coefficient (*r*) to evaluate the relationship

between continuous variables (age, BMI, cholesterol...) and leptin expression. We examined the relationships between leptin expression and systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) by one-way ANOVA.

Multiple regression analysis was used to test relations between SBP, DBP (dependent variables) and leptin accounting for the covariates: age, sex and cigarette smoking (independent variable).

## 3. Results

The clinical characteristics of the 83 individuals taking part in this study are shown in Table 1. The population consisted of 42 men and 41 women of the same age range (49.9 ± 3.8 years and 48.6 ± 3.3 years respectively).

Significant gender specific differences were observed for weight, BMI, waist-to-hip ratio and blood pressure and *p*-values are shown in Table 1.

Leptin was expressed in PBMCs of supposed healthy individuals. However, expression levels were not detectable for all individuals (for 48 detected, for 35 not detected). Meanwhile, it is important to notice that concentration levels of cDNA used for real-time PCR were low (5 ng/µl).

Using Pearson's correlation analysis, we found a significant correlation of leptin with SBP ( $p = 0.03$ ) and with DBP ( $p = 0.003$ ), but not with BMI or other factors tested (lipid profile, glucose, CRP and lymphocyte count). These associations are shown in Figs. 1 and 2 respectively.

To verify and further explain the associations we found, we used a multiple regression analysis model with SBP (Table 2) and DBP (Table 3) as dependent variables. Values were adjusted for the covariates such as age, sex and cigarette smoking. In this model, leptin explained 11% of the variation of SBP ( $p = 0.007$ ) and its contribution was 9% after introducing BMI in the model. As for DBP, leptin explained also 11% of DBP variation ( $p = 0.003$ ) and this percentage remained in the same magnitude (10%) even after introducing BMI in the model.

## 4. Discussion

In the present study, we demonstrated the presence of leptin mRNA in non-activated PBMCs of supposed healthy individuals, not suffering from inflammatory or autoimmune disease or other health states implicating acute or chronic inflammation. The presence of leptin in an inflammation-related tissue stands for a possible physiopathological role of leptin in inflammation process. This result

**Table 1**  
Characteristics of studied individuals

Variable	Female	Male	<i>p</i>
N	41	42	
Age (yr)	48.6 ± 3.3	49.9 ± 3.8	ns
Weight (kg)	63.8 ± 11.6	81.6 ± 13.4	<0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	34.1 ± 4	36.6 ± 3.9	0.001
Waist-to-hip ratio (cm)	0.77 ± 0.06	0.80 ± 0.06	<0.001
Fasting glucose (mmol/l)	5.1 ± 0.4	5.6 ± 0.6	<0.001
Systolic blood pressure (mmHg)	118.2 ± 17.0	127.4 ± 11.4	0.015
Diastolic blood pressure (mmHg)	67.6 ± 8.4	75.5 ± 8.4	<0.001
Total cholesterol (mmol/l)	5.7 ± 0.9	5.8 ± 0.8	ns
High-density lipoprotein in cholesterol (mmol/l)	1.8 ± 0.5	1.9 ± 0.3	ns
Low-density lipoprotein in cholesterol (mmol/l)	3.4 ± 0.8	3.6 ± 0.8	ns
Triglyceride (mmol/l)	1.0 ± 0.5	1.2 ± 0.6	0.082
CRP (mmol/l)	1.5 ± 1.8	2.1 ± 3.5	ns
Red blood cells count (10 <sup>12</sup> /l)	4.5 ± 0.4	4.9 ± 0.4	<0.001
White blood cells count (10 <sup>9</sup> /l)	5.8 ± 1.4	5.6 ± 1.4	ns
Lymphocyte count (10 <sup>9</sup> /l)	1.7 ± 0.4	1.7 ± 0.4	ns
Lymphocyte (%)	30.4	30.4	ns

Data are presented as mean ± SD or %; reported *p*-values were calculated by Mann-Whitney test; ns, not significant ( $p > 0.05$ ).  
BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein.

Please cite this article as: Samu A, et al., Leptin expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) is related with blood pressure variability, Clin Chim Acta (2008), doi:10.1016/j.cca.2008.04.028

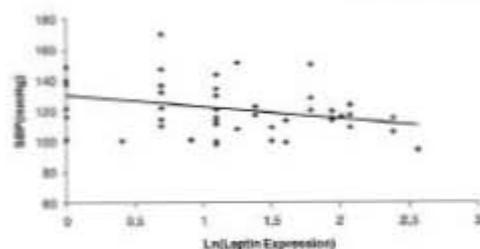


Fig. 1. Relationship between leptin mRNA levels in PBMCs and SBP. Data were transformed to achieve normal distribution and linear regression analysis was performed.

corroborates the already described implication of leptin in immune and inflammatory mechanisms [3–5].

Moreover, when studying mRNA levels of leptin in PBMCs, we found a significant association with both SBP and DBP but not with BMI or other factors related to obesity. These relationships remained significant after using a multivariate analysis model where BMI was also introduced. In this last model, leptin explained a significant part of the SBP and of the DBP independently of BMI. These findings show for the first time an independent to BMI relationship between leptin and blood pressure in PBMCs.

These results are in accordance with the existing research work on relationships between leptin and blood pressure [11]. Contrary to the positive associations until now described between serum leptin and blood pressure, we observed a negative relationship with both SBP and DBP. This could be explained by the fact that the relationship we tested was under physiological conditions that can change in pathological states. Moreover, we studied a specific type of cells instead of blood that may involve a possible regulatory mechanism specific to this tissue which recompenses expression of leptin by other production sites.

In fact, this relationship was never studied specific to inflammation tissue. Blood is only a 'pool' of different products of the organism and it does not always reflect what is really happening in the body. This is particularly the case for cytokines where it was found that serum cytokines reflect only weakly PBMCs cytokine production and balances [15]. More interestingly, research work focusing on PBMCs has revealed that these cells can serve as sentinels of disease or environmental alterations [16]. The so called 'sentinel principle' principle is based on the fact that PBMCs share over 80% gene expression with any given tissue, proposing them, as a large biosensor pool [17]. In the same direction to this principle, gene expression in PBMCs of another adipokine, visfatin was associated with BMI [18]. Based on the above, it does not come to surprise that we detected

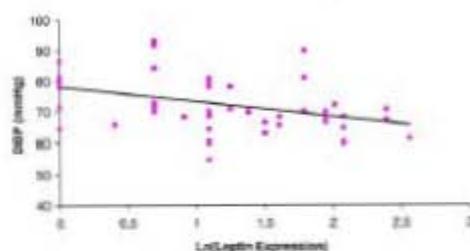


Fig. 2. Relationship between leptin mRNA levels in PBMCs and DBP. Data were transformed to achieve normal distribution and linear regression analysis was performed.

Table 2

Multivariate regression analysis between SBP (dependent variable) and gender, age, cigarette smoking, and leptin (model A) and BMI (model B) gene expression in PBMCs (independent variable)

Independent variable	Model A			Model B		
	$\beta$ (se)	$p$	$R^2$	$\beta$ (se)	$p$	$R^2$
Intercept	13.1 (27.8)	ns		-14.3 (28.4)	ns	
Men vs women	5.4 (4.1)	ns	0.30%	1.5 (4.2)	ns	0.30%
Age	2.3 (0.6)	<0.001	30.72%	2.1 (0.5)	<0.001	30.72%
Smokers	-6.2 (6.3)	ns	2.07%	-4.8 (6.0)	ns	2.07%
Ex-smokers	-6.1 (4.3)	ns	1.02%	-7.5 (4.2)	ns	1.02%
BMI	-	-	-	1.3 (0.5)	0.02	0.72%
Leptin	-8.1 (2.0)	0.0075	11.01%	-7.2 (2.8)	0.012	8.56%
Total $R^2$			41.2%			41.5%

$\beta$ , coefficient of regression; se, standard error; ns, not significant ( $p > 0.05$ );  $R^2$ , coefficient of determination.

leptin in PBMCs and furthermore that we described a relation with blood pressure.

Beyond the relationship between serum leptin levels and blood pressure, some evidence already exists on its specific roles on vascular function. The leptin receptor has been identified in endothelial cells and leptin can modulate several physiologic processes as angiogenesis, neointima formation and endothelial oxidative stress [19]. Since PBMCs are implicated in inflammation related to atherosclerosis [20] and mechanistic studies have demonstrated important actions of leptin on vascular site, the production of leptin by PBMCs could be a part of these actions related to vasculature mechanisms.

As for the low levels of leptin gene expression, some explanation could be given. Firstly, when studying apparently healthy subjects, some genes implicated in physiological mechanisms could show basal expression levels. Induction of genes takes place often when the disease is installed. Secondly, for technical reasons, cDNA concentrations of PBMCs we used were limited and this factor is crucial especially when we are interested in studying subjects in physiological conditions. Meanwhile, detection of mRNA of leptin in PBMCs could not be attributed to an artifact because leptin was also expressed in a recent study of our team exploring gene expression of cardiovascular disease related genes in PBMCs [21].

In conclusion, we demonstrated here the presence of leptin in human PBMCs of supposed healthy individuals and more importantly we described a significant relation between leptin expression levels and blood pressure independent of BMI, suggesting that leptin in PBMCs could contribute in regulating blood pressure levels. The important element of this work is that it offers new insights for understanding relations of leptin with blood pressure by taking into consideration inflammation. However, complementary research studies including adipose tissue gene expression, together with blood

Table 3

Multivariate regression analysis between DBP (dependent variable) and gender, age, cigarette smoking, and leptin (model A) and BMI (model B) gene expression in PBMCs (independent variable)

Independent variable	Model A			Model B		
	$\beta$ (se)	$p$	$R^2$	$\beta$ (se)	$p$	$R^2$
Intercept	8.7 (14.0)	ns		13.3 (14.9)	ns	
Men vs women	4.3 (2.0)	0.0380	11.02%	3.6 (2.2)	ns	11.02%
Age	3.1 (0.8)	<0.001	38.19%	1.0 (0.3)	<0.001	38.19%
Smokers	-5.7 (3.7)	ns	8.36%	-5.4 (3.1)	ns	8.36%
Ex-smokers	0.1 (2.1)	ns	0.47%	-0.1 (2.2)	ns	0.47%
BMI	-	-	-	0.2 (0.3)	ns	1.58%
Leptin	-4.4 (1.4)	0.0039	11.34%	-4.2 (1.4)	0.0058	10.32%
Total $R^2$			49.5%			50.1%

$\beta$ , coefficient of regression; se, standard error; ns, not significant ( $p > 0.05$ );  $R^2$ , coefficient of determination.

Please cite this article as: Samura A, et al. Leptin expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) is related with blood pressure variability. Clin Chim Acta (2008), doi:10.1016/j.cca.2008.04.025

levels of leptin are necessary to better evaluate the importance of this result.

#### Acknowledgements

We thank the staff of the Centre de Médecine Préventive of Vandœuvre-lès-Nancy (France) for their involvement in the recruitment of the STANISLAS cohort. We are indebted to the participants of the STANISLAS survey who made this study possible. The STANISLAS cohort study is supported by the Caisse Nationale d'Assurance Maladies des Travailleurs Salariés (CNAM), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Région Lorraine, the Communauté Urbaine du Grand Nancy and the Henri Poincaré University of Nancy I.

#### References

- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425–32.
- Cosentino RV, Sinha MK, Helman ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996;334:292–5.
- Bernothiene E, Palmer G, Galay C. The role of leptin in innate and adaptive immune responses. *Arthritis Res Ther* 2006;8:217.
- La Cava A, Marzese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4:371–80.
- Otero M, Lago R, Gomez R, et al. Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:944–50.
- Sanchez-Margalec V, Martin-Romero C, Santos-Avarez J, Goberna R, Najib S, Gonzalez-Senes C. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin Exp Immunol* 2003;133:11–9.
- Zakaria-Esfahani H, Pocius G, Metcalf BA, et al. High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J Immunol* 2001;167:4993–9.
- Samra V, Di Giacomo A, La Cava A, et al. Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. *J Clin Invest* 2003;111:241–50.
- Stefanou N, Satta M, Papanicolaou V, et al. Leptin receptor isoforms mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic viral hepatitis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:3653–63.
- Rosin BL. The progression of cardiovascular risk to cardiovascular disease. *Rev Cardiovasc Med* 2007;8(Suppl 4):53–8.
- Belkowitz J. Role of leptin in blood pressure regulation and arterial hypertension. *J Hypertens* 2006;24:789–801.
- Siest G, Visvikis S, Heith B, et al. Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene–environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:35–42.
- Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000; 894:1–253.
- Marceau JB, Moller S, Pfister M, Visvikis-Siest S. Collection and storage of human blood cells for mRNA expression profiling: a 15-month stability study. *Clin Chem* 2005;51:1250–2.
- Jason J, Archibald LK, Nwanjoku OC, et al. Comparison of serum and cell-specific cytokines in humans. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:1097–103.
- Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, et al. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8996–901.
- Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, Dempsey AA. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system-wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med* 2006;147:126–32.
- Samara A, Pfister M, Malle B, Visvikis-Siest S. Visceral, low-grade inflammation and BMI. *Clinical Endocrinology in press*. doi:10.1111/j.1365-2265.2008.02105.x.
- Rahmouni K, Haynes WG. Endothelial effects of leptin: implications in health and diseases. *Curr Diab Rep* 2005;5:289–95.
- Stoll G, Bendtson M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke* 2006;37:1823–32.
- Visvikis-Siest S, Marceau JB, Samara A, Benrahoune H, Malle B, Pfister M. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC): a possible model for studying cardiovascular biology systems. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1154–68.

## Publication No6

### Visfatin, low-grade inflammation and BMI

Anastasia Samara, Michèle Pfister, Berangère Marie, Sophie Visvikis-Siest

Clin Endocrinol (Oxf) in press

La visfatine est une adipokine ayant des rôles dans les mécanismes inflammatoires mais son implication dans l'inflammation associée à l'adiposité/obésité n'a pas été encore étudiée. Nous avons ciblé l'étude des relations de la visfatine avec les marqueurs d'inflammation et l'indice de masse corporelle (IMC) dans les globules blancs mononucléaires (PBMCs), un type de cellules lié aux mécanismes inflammatoires.

Nous avons étudié 83 individus de la cohorte STANISLAS supposés sains, appartenant à trois catégories d'IMC :  $IMC < 25\text{kg/m}^2$  (normaux),  $25\text{kg/m}^2 \leq IMC < 30\text{kg/m}^2$  (en surpoids),  $IMC \geq 30\text{kg/m}^2$  (obèses). Nous avons mesuré l'expression de la visfatine (PCR quantitative) en relation avec l'expression des cytokines pro-inflammatoires  $TNF\alpha$  et IL6 dans les PBMCs et avec les paramètres anthropométriques (poids, IMC, rapport taille/hanches), la pression artérielle, le profil lipidique et les marqueurs d'inflammation (CRP, nombre de lymphocytes circulants).

L'expression de la visfatine dans les PBMCs a été significativement associée avec l'IMC d'une façon négative ( $r=-0.21$ ,  $p=0.05$ ). L'analyse globale ANOVA pour les sujets normaux et en surpoids/obèses a démontré une association significative entre l'expression de la visfatine dans les PBMCs et l'IMC chez les hommes et chez les femmes ( $p=0.05$ ,  $p=0.01$  respectivement), et ces associations sont restées significatives après une séparation de sujets en trois groupes (poids normal, en surpoids et obèses) pour les hommes et pour les femmes ( $p=0.02$ ,  $p=0.05$  respectivement). L'analyse de corrélations entre les taux d'expression de la visfatine et du  $TNF\alpha$  a montré une association significativement positive ( $r^2=0.27$ ,  $p<0.0001$ ).

Ces résultats révèlent un nouveau rôle probable de la visfatine dans l'inflammation, reflété dans les PBMCs, dans le contexte de l'obésité.

## ORIGINAL ARTICLE

**Visfatin, low-grade inflammation and body mass index (BMI)**

Anastasia Samara, Michèle Pfister, Berangère Marie and Sophie Visvikis-Siest

INSERM, CIC 9501, Equipe Génétique Cardiovasculaire, Nancy, F-54000, France

**Summary**

**Objective** Visfatin is an adipokine with revealing roles in inflammatory mechanisms but its implication in inflammation related to excessive adiposity/obesity is not studied yet. Our aim was to investigate the relations of visfatin with inflammation markers and body mass index (BMI) in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), a type of cells closely related to inflammatory mechanisms.

**Design** Cross-sectional study, quantification of visfatin, TNF- $\alpha$ , IL-6 mRNA in PBMCs.

**Patients** Eighty-three supposed healthy individuals from the STANISLAS cohort, belonging in three BMI categories: BMI < 25 kg/m<sup>2</sup> (lean), 25 kg/m<sup>2</sup>  $\leq$  BMI < 30 kg/m<sup>2</sup> (overweight) or BMI  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup> (obese).

**Measurements** We measured visfatin gene expression (by real-time quantitative PCR), in relation to gene expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 in PBMCs and to anthropometric parameters (weight, BMI, waist:hip ratio), blood pressure, lipid profile, glucose and inflammatory markers (C-reactive protein, lymphocyte count).

**Results** Visfatin expression in PBMCs was significantly associated with BMI in a negative way ( $r = -0.21$ ,  $P = 0.05$ ). Global across analysis test for lean and over-weight/obese individuals showed a negative significant association between visfatin expression in PBMCs and BMI both for men and women ( $P = 0.05$  and  $P = 0.01$ , respectively) and these associations remained significant after separating subjects in three groups (lean, overweight, obese) for men and women ( $P = 0.02$  and  $P = 0.05$ , respectively). Correlation analysis between levels of expression of visfatin and TNF- $\alpha$  showed a significant positive linear association ( $r^2 = 0.27$ ,  $P < 0.0001$ ).

**Conclusion** These findings reveal a probable new role of visfatin in inflammation reflected in PBMCs, in the context of obesity.

(Received 4 September 2007; returned for revision 16 October 2007; finally revised 8 January 2008; accepted 22 January 2008)

**Introduction**

According to the final report of the National Cholesterol Education Programme (NCEP), overweight and obesity not only predispose to cardiovascular diseases (CVD) but are also associated with a greater all-cause mortality.<sup>1</sup> Obesity has been demonstrated to be associated with CVD risk factors as dyslipidaemia,<sup>2</sup> insulin resistance<sup>3</sup> and hypertension<sup>4</sup> which cluster together in the metabolic syndrome (MS), therein abdominal obesity playing a crucial role.<sup>5</sup>

It is well accepted today that beyond the excessiveness of the fat mass, the fat distribution is a key parameter for the installation or not of an inflammation-related pathological state. Evidently, accumulation of visceral fat mass is more and more related to a subsequent activation of numerous pathophysiological mechanisms which in turn, initially induce and finally prolong a systemic inflammatory state.<sup>6</sup> Adipose tissue is producing multiple bioactive molecules; among them cytokines. Cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6) are molecules essentially associated with immune system functions.<sup>6</sup> Visceral adipose tissue (VAT) secretes preferentially pro-inflammatory molecules, such as TNF- $\alpha$  and IL-6, compared to subcutaneous adipose tissue (SAT)<sup>7</sup> and the production of these molecules is increased with obesity.<sup>8</sup> Undoubtedly, obesity, inflammation and CVD seem to be closely linked but it is difficult to establish the existing relationships between them, even though the most simplified assumption is that of obesity-induced inflammation as a causal factor for CVD.<sup>9</sup>

It is continuously confirmed that inflammation indeed contributes in developing CVD or/and its related pathologies.<sup>10</sup> Supportive to this is a prospective study of our group, on supposed healthy French Families (STANISLAS Cohort) that revealed TNF- $\alpha$  as a factor for the prevalence of MS.<sup>11</sup>

A demonstration of the existing dialogue between obesity and inflammation could be offered by visfatin. This molecule at first named pre-B-celony enhancing factor was initially described in activated human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) *in vitro*,<sup>12</sup> and later detected in adipose tissue and characterized as adipokine with a preferential expression by VAT and a probable contribution to MS.<sup>13</sup> Visfatin exerts influence on inflammatory mechanisms and immune cells<sup>14,15</sup> but only one study has searched for the possible associations of this molecule with inflammation in relation with adiposity.<sup>16</sup> In that study, a negative relationship between SAT expression of visfatin and circulating TNF- $\alpha$  was described but no further investigation in VAT or plasma was carried out. Overall, only a handful of studies exist concerning this largely unknown adipokine and it is not clear if adipose tissue is the main

Correspondence: Sophie Visvikis-Siest, Equipe INSERM, Génétique Cardiovasculaire, do CIC 9501, Université Nancy Henri Poincaré, Faculté de Pharmacie, 30, rue Liotard, 54000 Nancy, France. Tel: +33 3 83 68 21 84; Fax: +33 3 83 32 13 22; E-mail: sophie.visvikis-siest@nancy.inserm.fr

source of circulating visfatin or if plasma is the appropriate *milieu* having in mind that it often serves as a pool rather than a specific site-mirroring its relations to obesity and inflammation.<sup>17</sup>

We propose here studying PBMCs, a type of cells that is easily accessible and essentially representative of inflammatory mechanisms. No investigation has examined links of visfatin with inflammation in relation to body mass index (BMI) as well as *in vivo* expression of the molecule by human non-activated PBMCs.

Minding this, we measured gene expression of visfatin in relation to BMI and to pro-inflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  and IL-6 in PBMCs of 83 supposed healthy individuals (42 men and 41 women) classified in three groups according to their BMI: 18.5–24.9, 25.0–29.9 and  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>.

## Methods

### Study population

For this specific investigation, we selected a subpopulation of 83 supposed healthy individuals (42 men and 41 women) making part of the STANISLAS cohort<sup>18</sup> a 10-year longitudinal follow-up study conducted since 1993 (first point of recruitment) on 1006 families selected at the Centre for Preventive Medicine of Vandoeuvre-lès-Nancy, east of France. Participants were of French origin free from serious and/or chronic illnesses such as diabetes mellitus, CVD, hepatic or renal failure or any other inflammatory disease or obvious inflammatory signs. All individuals gave their written informed consent for sample collection and molecular analysis prior their inclusion.

We selected a group of subjects making part of the third point of recruitment (2003) where a bank of PBMCs was constituted for which we had available material for doing mRNA analyses and all necessary for this specific study anthropometric, biochemical and haematological data. This group of subjects comprised 45 lean and 38 overweight/obese individuals that were genetically unrelated. None of the selected individuals was upon anti-obesity medication. Samples and data are making part of the Centre of Biological Resources (CBR): 'The STANISLAS cohort and the genetic determination of biological and clinical intermediate phenotypes of CVD' managed by Dr Sophie Visvikis-Siest.

### Data collection

Data dealing with tobacco, alcohol and current use of medications were assessed by a questionnaire on the living habits of each participant. Smoking status was described as nonsmokers, smokers and ex-smokers. Alcohol consumption was expressed in grams per day. BMI was calculated according to the Quetelet's formula of weight divided by height (kg/m<sup>2</sup>). Individuals were classified as described by the World Health Organization (WHO): lean with BMI of 18.5–24.9 kg/m<sup>2</sup>; overweight with BMI of 25.0–29.9 kg/m<sup>2</sup> and obese with BMI of  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>.<sup>19</sup> Blood pressure was calculated as the mean of three measurements taken under standardized conditions with a sphygmomanometer, with the subject in a supine position.

Blood samples were taken from subjects after an overnight fast. Venous blood was collected without anticoagulant in Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Rutherford, NJ) containing a gel for serum

separation. These samples were centrifuged at 1000 g for 15 min at room temperature and were analysed for all constituents. Basic blood constituents were measured as described previously.<sup>18</sup>

C-reactive protein (CRP) concentrations were measured by immunonephelometry with a Behring Nephelometer Analyser II (Dade Behring, Marburg, Germany).

### PBMCs collection

Fresh whole blood (10 ml) was collected by standardized venipuncture in EDTA tubes (Vacutainer<sup>TM</sup>; Becton Dickinson). PBMCs were isolated by centrifugation on a density gradient of Ficoll (Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) and stored at -80 °C until RNA extraction. The PBMCs bank was constituted according to a well validated protocol, with a high recovery in lymphocytes (97.5%) and mRNA quality and stability were carefully tested.<sup>20</sup>

### Quantitative RT-PCR

Total RNA from PBMCs was extracted by an automated isolation procedure (MagNA Pure LC instrument) using MagNA Pure LC RNA HP isolation kit and RNA HP Blood External Lysis protocol according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ). DNase treatment is included in the MagNA Pure protocol. The choice of a robotic machine enables consistent isolation of high-quality RNA and minimizes potential errors rising from the manipulation procedure. The total RNA obtained was reverse-transcribed for 32 min at 42 °C (Quantitect<sup>®</sup> RT Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) in a 20- $\mu$ l reaction with wipe-out buffer (to eliminate 'eventually' residual DNA and kit mix and buffer). After purification, cDNA used at constant concentration (5 ng/ $\mu$ l) in polymerase chain reactions using LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). Duplicates of 5  $\mu$ l were run (25 ng) and polymerase chain reaction products were absolute quantified by applying standard curves generated from serially diluted standards of known concentration. A control sample was run with templates in every PCR assay, in order to determine the analytical coefficient of variation. Inter- and intra assay analytical coefficient of variation (CV) was calculated and estimated at 0.4% and 0.5%, respectively, for all genes tested. PCR efficiency was estimated at 91% for TNF- $\alpha$ , 100% for IL-6 and 93% for visfatin.

Primers' design was based on PRIMER PRIMER 5.0 software (Biosoft International, Palo Alto, CA) and were as follows: visfatin, 5'TGTGGTCA GCGATAGC3' (forward) and 5'AAGAT AAGGTG GCAGC3' (reverse), TNF- $\alpha$ , 5'TCTACTTTGGGATCAATGCC3' (forward) and 5'GTGGTGGTCTTGTGCTTAA3' (reverse), IL-6, 5'TACCCCCAGGAGAA GATCC3' (forward) and 5'GCCAICT TTGGTTCAG3' (reverse). An initial de-naturation at 95 °C for 10 min was followed by 40 cycles each consisting of denaturation at 95 °C for 10 s, amplification and elongation for visfatin at 62 °C for 10 s and 72 °C for 8 s, for TNF- $\alpha$  at 60 °C for 10 s and 72 °C for 7 s, and for IL-6 at 60 °C for 5 s and 72 °C for 8 s, respectively.

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the sas package program version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Before statistical analysis,

non-normally distributed parameters were logarithmically transformed to approximate a normal distribution. A *P*-value ( $P < 0.05$ ) was considered as statistically significant. Descriptive statistics were computed using means and SD for continuous measurements. Mann-Whitney test were used to determine significant differences between men and women. We used Pearson's correlation coefficient ( $r$ ) to evaluate the relationship between continuous variables (age, BMI, cholesterol...) and visfatin, IL-6 and TNF- $\alpha$  expression. We examined the relationships between visfatin and TNF- $\alpha$  expression by one-way ANOVA, first between lean and nonlean (overweight/obese) and in a second step, separately for the three groups of BMI (lean, overweight and obese) both for men and women.

Multiple regression analysis was used to test relations between BMI (dependent variable) and visfatin or TNF- $\alpha$  accounting for the covariates: age, sex, CRP and cigarette smoking (independent variables).

## Results

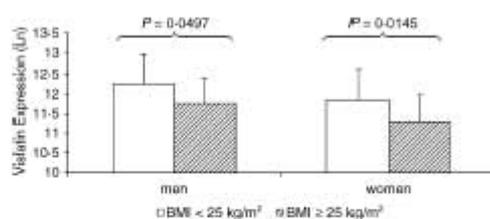
The clinical characteristics of the 83 individuals studied are shown in Table 1. The population consisted of 42 men and 41 women of the same age range ( $49.9 \pm 3.8$  and  $48.6 \pm 3.3$  years, respectively). Mean BMI values were  $25.4 \pm 4.1 \text{ kg/m}^2$  (for the whole population)  $26.6 \pm 3.9 \text{ kg/m}^2$  for men,  $24.1 \pm 4.0 \text{ kg/m}^2$  for women including 14 obese and 24 overweight individuals in the overall group (45 lean and 38 overweight/obese subjects). Among men, 10 were obese and 16 overweight. As for women, we had four obese and eight overweight.

Significant gender specific differences were observed for weight, BMI, waist : hip ratio and blood pressure and *P*-values are shown in Table 1.

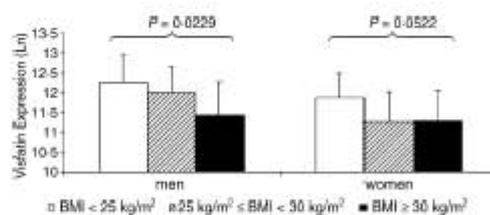
**Table 1.** Characteristics of studied individuals

Variable	Female	Male	<i>P</i>
<i>N</i>	41	42	
Age (years)	$48.6 \pm 3.3$	$49.9 \pm 3.8$	NS
Weight (kg)	$63.8 \pm 11.6$	$81.6 \pm 13.4$	$< 0.001$
BMI ( $\text{kg/m}^2$ )	$24.1 \pm 4.0$	$26.6 \pm 3.9$	$< 0.001$
Waist : hip ratio (cm)	$0.77 \pm 0.06$	$0.89 \pm 0.06$	$< 0.001$
Fasting glucose (mmol/l)	$5.1 \pm 0.4$	$5.6 \pm 0.6$	$< 0.001$
Systolic blood pressure (mmHg)	$118.2 \pm 17.0$	$127.4 \pm 11.4$	$0.015$
Diastolic blood pressure (mmHg)	$67.6 \pm 8.4$	$75.5 \pm 8.4$	$< 0.001$
Total cholesterol (mmol/l)	$5.7 \pm 0.9$	$5.8 \pm 0.8$	NS
High-density lipoprotein cholesterol (mmol/l)	$1.8 \pm 0.5$	$1.9 \pm 0.3$	NS
Low-density lipoprotein cholesterol (mmol/l)	$3.4 \pm 0.8$	$3.6 \pm 0.8$	NS
Triglyceride (mmol/l)	$1.0 \pm 0.5$	$1.2 \pm 0.6$	$0.032$
CRP (mmol/l)	$1.5 \pm 1.8$	$2.1 \pm 3.5$	NS
Red blood cells count ( $10^{12}/l$ )	$4.5 \pm 0.4$	$4.9 \pm 0.4$	$< 0.001$
White blood cells count ( $10^9/l$ )	$5.8 \pm 1.4$	$5.6 \pm 1.4$	NS
Lymphocyte count ( $10^9/l$ )	$1.7 \pm 0.4$	$1.7 \pm 0.4$	NS
Lymphocyte (%)	30.4	30.4	NS

Data are presented as mean  $\pm$  SD or percentage; reported *P*-values were calculated by Mann-Whitney test; NS, not significant ( $P > 0.05$ ). BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein.



**Fig 1** Expression of visfatin in PBMCs in lean ( $\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$ ) and overweight/obese individuals ( $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) for men and women. Visfatin expression was ln-transformed to achieve normal distribution and data represent mean values  $\pm$  SD.



**Fig 2** Expression of visfatin in PBMCs in three distinct BMI groups for men and women: lean ( $\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$ ), overweight ( $25 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$ ), obese ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ). Visfatin expression was ln-transformed to achieve normal distribution and data represent mean values  $\pm$  SD.

## Visfatin

Visfatin was expressed by non-activated, human PBMCs of supposed healthy individuals. Expression levels were well above background noise for all subjects. To assess possible relations between visfatin expression levels in PBMCs with age, cigarette smoking, anthropometric and biochemical parameters, we performed Pearson's correlation analysis for the overall population (Table 2). No relationships were found with gender, age, glucose, lipid profile or with CRP, white blood cells, and lymphocyte count or with blood arterial pressure. Neither body weight nor waist : hip ratio gave statistically significant results.

BMI was associated with visfatin expression levels ( $r = -0.21$ ,  $P = 0.05$ ).

Global ANOVA analysis test for lean and overweight/obese individuals showed a negative significant association between visfatin expression in PBMCs and BMI both for men and women ( $P = 0.05$  and  $P = 0.01$ , respectively) (Fig. 1).

Associations remained significant after separating subjects in three groups (lean, overweight, obese) for men and women ( $P = 0.02$  and  $P = 0.05$ , respectively) (Fig. 2).

## TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  was expressed in all individuals studied. TNF- $\alpha$  showed no gender significant effect or correlations to anthropometric and

**Table 2.** Pearson correlation analysis of variables with visfatin, TNF- $\alpha$  and IL-6 expression levels in PBMCs

Variable	Visfatin		TNF- $\alpha$		IL-6	
	r	P	r	P	r	P
Age	0.07	NS	-0.03	NS	-0.01	NS
Weight	-0.13	NS	-0.16	NS	-0.22	0.05
BMI	-0.21	0.05	-0.22	0.04	-0.16	NS
Waist : hip ratio	0.12	NS	-0.04	NS	-0.02	NS
Systolic blood pressure	0.03	NS	-0.12	NS	-0.08	NS
Diastolic blood pressure	0.1	NS	-0.04	NS	-0.07	NS
Glucose*	0.02	NS	-0.11	NS	-0.19	NS
Total cholesterol	0.10	NS	0.13	NS	-0.03	NS
High-density lipoprotein cholesterol*	-0.13	NS	-0.18	NS	0.01	NS
Low-density lipoprotein cholesterol	0.16	NS	0.23	0.03	-0.01	NS
Triglyceride*	0.06	NS	-0.07	NS	-0.09	NS
White blood cells*	-0.01	NS	-0.08	NS	0.12	NS
Lymphocyte count*	-0.20	NS	-0.09	NS	0.05	NS
Lymphocyte percentage	-0.15	NS	0.01	NS	-0.07	NS
CRP*	0.20	NS	0.14	NS	-0.10	NS
Visfatin*	-	-	0.52	< 0.0001	0.16	NS
TNF- $\alpha$ *	0.52	< 0.0001	-	-	0.22	0.05
IL-6*	0.16	NS	0.22	0.05	-	-

\*Statistic tests on ln-transformed values; r, coefficient of correlation; NS, not significant ( $P > 0.05$ ). BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein.

**Table 3.** Multivariate regression analysis between BMI (dependent variable) and gender, age, cigarette smoking, CRP and visfatin (model A) or TNF- $\alpha$  (model B) gene expression in PBMCs (independent variables)

Independent variable	Model A			Model B		
	$\beta$ (SE)	P	$R^2$ (%)	$\beta$ (SE)	P	$R^2$ (%)
Intercept	40.5 (9.0)	< 0.001	-	28.9 (7.6)	< 0.001	-
Men vs women	2.62 (0.84)	0.002	9.6	2.15 (0.85)	0.013	9.0
Age	0.17 (0.12)	NS	1.8	0.16 (0.12)	NS	1.9
Smokers	-0.83 (1.44)	NS	1.9	-0.93 (1.49)	NS	1.9
Ex-smokers	0.77 (0.87)	NS	1.6	1.31 (0.89)	NS	1.9
CRP	0.40 (0.16)	0.013	6.2	0.26 (0.15)	0.091	2.3
Visfatin	-1.95 (0.59)	0.001	6.9	-	-	-
TNF- $\alpha$	-	-	-	-1.37 (0.56)	0.017	6.1
Total $R^2$	-	-	28.0	-	-	23.1

$\beta$ , coefficient of regression; SE, standard error; NS, not significant ( $P > 0.05$ );  $R^2$ , coefficient of determination; CRP, C-reactive protein.

biochemical parameters. Gene expression of the molecule was negatively correlated with BMI ( $P = 0.04$ ) and positively correlated with IL-6 ( $P = 0.05$ ). All results obtained for TNF- $\alpha$  are shown in detail in Table 2.

After a global ANOVA analysis for men and women, in the three groups of BMI (lean, overweight, obese) only a trend of association was retained for TNF- $\alpha$  and BMI ( $P = 0.10$ ) (data not shown).

#### Visfatin and TNF- $\alpha$

We used a multiple regression analysis to observe the influence of visfatin and TNF- $\alpha$  expression levels on BMI, after taking into

account age, sex, smoking and CRP concentration, as independent variables. Two statistical models were tested because of the colinearity observed between visfatin and TNF- $\alpha$ . Visfatin and TNF- $\alpha$  gene expressions were significantly correlated to BMI ( $P = 0.001$  and  $P = 0.017$ , respectively). Visfatin and TNF- $\alpha$  expression levels in PBMCs explained, respectively, 6.9% and 6.1% of the BMI variability almost equally to circulating CRP (6.2%) (Table 3).

After adjusting visfatin on circulating CRP, the association with BMI remained significant (data not shown).

Correlation analysis between levels of expression of visfatin and TNF- $\alpha$  showed a significant positive linear association ( $r^2 = 0.27$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 3).

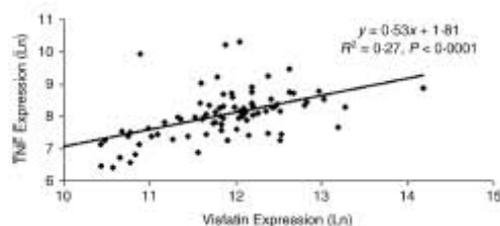


Fig 3 Linear regression analysis between TNF- $\alpha$  and visfatin gene expression in PBMCs measured by real-time PCR. Data were ln-transformed to achieve normal distribution.  $R^2$ , coefficient of determination.

## Discussion

Visfatin seems to be a pro-inflammatory adipokine since it influences actively mechanisms of injury/infection-induced inflammation as previously reported.<sup>14,15,21</sup> However, many points remain unclear as for its contribution to low-grade inflammation linked to obesity.

In the present research work, we demonstrated for the first time visfatin expression in human PBMCs of supposed healthy individuals that were neither activated by induction *in vitro* nor subjected to a microenvironment-stimulated inflammatory state, at least clinically apparent. Measurement of two classic circulating inflammatory markers (white blood cells, CRP) showed that individuals had no clinical manifestation of inflammation: CRP =  $1.8 \pm 2.76$  mg/l ( $< 6$  mg/l), white blood cells =  $5.8 \pm 1.4 \times 10^9/l$  ( $4-10 \times 10^9/l$ ). However, CRP was significantly higher in obese compared to non-obese individuals (data not shown), speculating an existing subclinical inflammatory state probably related to obesity. We further quantified mRNA of visfatin in these PBMCs by q RT-PCR.

Interestingly, we found a significant negative association of this molecule with BMI. After separating individuals according to gender, this relationship remained significant for both men and women. This was the case when we used the usual cut-off of greater or less than  $25 \text{ kg/m}^2$  for the BMI values and even when we ultimately further analysed individuals by groups of lean, overweight and obese. The observed persistence of association for all three groups stands for a relation of visfatin expression with BMI in PBMCs.

As for the nature of the correlation described, probably a negative feedback loop takes place in the overall or tissue specific regulation of the expression of visfatin (endocrine or paracrine/autocrine action). Our study was not the only one to show a negative correlation of visfatin with obesity. In fact, similar were the findings for SAT visfatin.<sup>16,22</sup> Yet, one study explored the relations of visfatin with inflammation in the context of obesity.<sup>16</sup> This study observed a negative association between SAT visfatin expression and circulating TNF- $\alpha$ , and authors suggested an anti-inflammatory role of visfatin in adipose tissue. A similar protective role could be also the case in PBMCs.

Additionally, the strongly significant association of visfatin found with TNF- $\alpha$  seems to further attribute to visfatin a specific role and a contribution in inflammation and immune mechanisms. This link was previously described in other types of tissues. To date, in an amniotic epithelial cell line, visfatin was up-regulated by TNF- $\alpha$

and IL-6,<sup>21</sup> while in cultured adipocytes, treatment with TNF- $\alpha$  suppressed visfatin expression in a dose- and time-dependent manner.<sup>23</sup> Again in adipocytes *in vitro*, another study revealed a negative regulation of visfatin by IL-6.<sup>24</sup> As for human PBMCs, it has been only recently evidenced that treatment of cells with recombinant visfatin induces the cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6, among others and exerts influence on immune cells *via* multiple actions.<sup>25</sup> Based on that study, we could hypothesize that the positive significant correlation between visfatin and TNF- $\alpha$  we found, reflects direct, causal effects of visfatin on TNF- $\alpha$  production, even though not mechanistically proven.

However, we did not find any associations between visfatin and IL-6 suggesting no direct effect of visfatin on this cytokine, in contrast to the study cited above.<sup>25</sup> This is not surprising if we consider that, even though both IL-6 and TNF- $\alpha$  are closely related to obesity, they can act differentially.<sup>6</sup> Indeed, in adipose tissue, TNF- $\alpha$  production is associated more to autocrine/paracrine inflammatory mechanisms, while IL-6 has endocrine properties. It could be also the case for PBMCs.

As for TNF- $\alpha$  and its expression in PBMCs in relation to obesity, we found a negative correlation with BMI. A study<sup>26</sup> on obese and non-obese women showed that circulating levels of the molecule, as well as mRNA levels in PBMCs, were positively associated with obesity. Another study<sup>27</sup> showed that mRNA and protein levels in PBMCs and circulating levels of TNF- $\alpha$  were all negatively related with obesity. Results of the first study reinforce certainly the hypothesis of obesity-related inflammation by demonstrating induction of a pro-inflammatory cytokine as TNF- $\alpha$ . On the other hand, the second study proposes that in PBMCs a probable compensatory response to elevated expression at other sites is the cause for this negative correlation.

Till now, the few existing scientific reports on visfatin are preferentially interested in the associations of this molecule to obesity targeting adipose tissue (SAT/VAT) or plasma/serum but results are rather conflicting.<sup>11,16,22,28-31</sup> Adipose tissue is difficult to access and is rather heterogeneous (consisting of adipose cells, macrophages...). Moreover, in this tissue different depot sites exist that have most probably different secretory properties, reflecting specific to the site biological functions.<sup>7</sup> On the other hand, plasma could not be considered as a specific tissue for its investigation, since visfatin levels result from the contribution of multiple tissue-sites. Indeed, bone marrow, liver, muscle and PBMCs contribute to the overall production of this molecule in the body.<sup>12</sup>

Considering the above, and willing to study visfatin in relation to inflammation, we selected PBMCs, a type of cells easily accessible, and specific to inflammatory mechanisms. The strong association of visfatin with TNF- $\alpha$  we found in PBMCs, could be attributed to the fact that these cells are directly related to inflammation therefore reflecting regulatory immune mechanisms better than other tissues. This is also the case for cytokines, most commonly assessed at a macro level (serum). Apparently, studying them in a microenvironmental level (immune cells) that is additionally closely related to their principal functions (inflammation), is the preferable approach for obtaining consistent results.<sup>32</sup> In the same manner, we could suggest PBMCs for investigating visfatin that gives fluctuating results when measured in plasma/serum, in relation to obesity and BMI.

The conception of PBMCs as biosensors is affirmed in an ongoing way in a number of studies.<sup>33,34</sup>

Finally, we tried to compare the significance of the relations found with levels of CRP in plasma. Elevated CRP levels reflect an inflammatory state in the organism but in a general way, even though some studies suggest its specific involvement in obesity-related inflammation.<sup>35</sup> Interestingly, visfatin and TNF- $\alpha$  were able to explain BMI variations, equally to circulating CRP, in a multiple regression analysis model. This means, that when studying inflammation-related obesity, these two molecules could be probably have a non-negligible significance compared to the classically used CRP. It is also noteworthy, that after adjusting the associations of visfatin with BMI on circulating CRP, these associations remained significant, meaning that visfatin and BMI relationship is independent of CRP.

In conclusion, the principal outcome of this work was the relationship of visfatin with BMI and the cytokine TNF- $\alpha$  in the context of inflammation, by studying peripheral blood mononuclear cells. These results support the hypothesis of a specific role of this molecule in inflammatory mechanisms related to obesity, even though further research is needed in order to describe its exact implication. A low-grade inflammation state seems to exist in obesity and probably visfatin is a molecule that could give supplementary data as for better understanding this physiopathological condition.

#### Acknowledgements

We thank the staff of the Centre de Médecine Préventive of Vandœuvre-lès-Nancy (France) for their involvement in the recruitment of the STANISLAS cohort. We are indebted to the participants of the STANISLAS survey who made this study possible. The STANISLAS cohort study is supported by the Caisse Nationale d'Assurance Maladies des Travailleurs Salariés (CNAM), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Région Lorraine, the Communauté Urbaine du Grand Nancy and the Henri Poincaré University of Nancy I.

#### References

- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). (2002) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III) final report. *Circulation*, **106**, 3143–3421.
- Garrison, R.J., Wilson, P.W., Castelli, W.P., Feinleib, M., Kannell, W.B. & McNamara, P.M. (1980) Obesity and lipoprotein cholesterol in the Framingham offspring study. *Metabolism*, **29**, 1053–1060.
- Stern, M.P. & Haffner, S.M. (1986) Body fat distribution and hyperinsulinemia as risk factors for diabetes and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis*, **6**, 123–130.
- Francischetti, E.A. & Genuth, V.A. (2007) Obesity-hypertension: an ongoing pandemic. *International Journal of Clinical Practice*, **61**, 269–280.
- Despres, I.P. & Lemieux, I. (2006) Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, **444**, 881–887.
- Ronti, T., Lupattelli, G. & Mannarino, E. (2006) The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical Endocrinology*, **64**, 355–365.
- Fain, J.N., Madan, A.K., Hiker, M.L., Cheema, P. & Bahouth, S.W. (2004) Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*, **145**, 2275–2282.
- Fontana, L., Eagon, J.C., Trujillo, M.E., Scherer, P.E. & Klein, S. (2007) Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*, **56**, 1010–1013.
- Franks, P.W. (2006) Obesity, inflammatory markers and cardiovascular disease: distinguishing causality from confounding. *Journal of Human Hypertension*, **20**, 837–840.
- Hansson, G.K. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*, **352**, 1685–1695.
- Mannus, S., Marie, B., Siest, G. & Visvikis-Siest, S. (2005) A prospective study on the prevalence of metabolic syndrome among healthy french families: two cardiovascular risk factors (HDL cholesterol and tumor necrosis factor- $\alpha$ ) are revealed in the offspring of parents with metabolic syndrome. *Diabetes Care*, **28**, 675–682.
- Samal, B., Sun, Y., Stearns, G., Xie, C., Stiggs, S. & McNiece, I. (1994) Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B cell colony-enhancing factor. *Molecular and Cellular Biology*, **14**, 1431–1437.
- Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tarui, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., Watanabe, E., Takagi, T., Akiyoshi, M., Ohtsubo, T., Kohara, S., Yamashita, S., Makishima, M., Furuhashi, T., Yamataka, S., Hiramoto, R., Matsuzawa, Y. & Shimomura, I. (2005) Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, **307**, 426–430.
- Jia, S.H., Li, Y., Parodo, J., Kapus, A., Fan, L., Rotstein, O.D. & Marshall, J.C. (2004) Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *Journal of Clinical Investigation*, **113**, 1318–1327.
- Ye, S.Q., Simon, B.A., Maloney, J.P., Zambelli-Weiner, A., Gao, L., Grant, A., Easley, R.B., McVerry, B.J., Tuler, R.M., Standiford, T., Brower, R.J., Barnes, K.C. & Garcia, J.G. (2005) Pre-B cell colony-enhancing factor as a potential novel biomarker in acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **171**, 361–370.
- Varma, V., Yao-Borengasser, A., Rasouli, N., Bodles, A.M., Phannanah, B., Lee, M.J., Starks, T., Kern, L.M., Spencer, H.J., McGehee, R.H., Fried, S.K. & Kern, P.A. (2007) Human visfatin expression: relationship to insulin sensitivity, intramyocellular lipids, and inflammation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **92**, 666–672.
- Stephens, J.M. & Vidal-Puig, A.J. (2006) An update on visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor, an ubiquitously expressed, illusive cytokine that is regulated in obesity. *Current Opinion in Lipidology*, **17**, 128–131.
- Siest, G., Visvikis, S., Herbeth, B., Guegnen, R., Vincent-Viry, M., Saus, C., Beaud, B., Lecomte, E., Steinmetz, J., Locuty, J. & Chevrier, P. (1998) Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **36**, 35–42.
- World Health Organization (WHO) (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. *WHO Technical Report Series 894*, World Health Organization, Geneva, 16–48.
- Marteau, J.B., Mohr, S., Pfister, M. & Visvikis-Siest, S. (2005) Collection and storage of human blood cells for mRNA expression profiling: a 15-month stability study. *Clinical Chemistry*, **51**, 1250–1252.
- Ognjanovic, S., Bao, S., Yamamoto, S.Y., Garibay-Tupus, J., Samal,

- B. & Bryant-Greenwood, G.D. (2001) Genomic organization of the gene coding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *Journal of Molecular Endocrinology*, **26**, 107–117.
- 22 Pagano, C., Pilon, C., Olivieri, M., Mason, P., Fabris, R., Serra, R., Milan, G., Rossato, M., Federspil, G. & Vettor, R. (2006) Reduced plasma visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **91**, 3165–3170.
- 23 Kralisch, S., Klein, J., Lossner, U., Blüher, M., Paschke, R., Stumvoll, M. & Fasshauer, M. (2005) Hormonal regulation of the novel adipocytokine visfatin in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Endocrinology*, **185**, R1–R8.
- 24 Kralisch, S., Klein, J., Lossner, U., Blüher, M., Paschke, R., Stumvoll, M. & Fasshauer, M. (2005) Interleukin-6 is a negative regulator of visfatin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism*, **289**, E586–E590.
- 25 Moschen, A.R., Kaser, A., Enrich, B., Mosheimer, B., Theurl, M., Niederegger, H. & Tilg, H. (2007) Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *Journal of Immunology*, **178**, 1748–1758.
- 26 Ghanim, H., Aljada, A., Hofmeier, D., Syed, T., Mohanty, P. & Dandona, P. (2004) Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation*, **110**, 1564–1571.
- 27 O'Rourke, R.W., Kay, T., Iyfe, E.A., Trader, S.A., Deveney, C.W., Jobe, B.A., Roberts, C.T., Marks, D. & Rosenbaum, J.T. (2006) Alterations in peripheral lymphocyte cytokine expression in obesity. *Clinical and Experimental Immunology*, **146**, 39–46.
- 28 Berndt, J., Klöting, N., Kralisch, S., Kovacs, P., Fasshauer, M., Schön, M.R., Stumvoll, M. & Blüher, M. (2005) Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes*, **54**, 2911–2916.
- 29 Haider, D.G., Schindler, K., Schaller, G., Prager, G., Wolz, M. & Ludvik, B. (2006) Increased plasma visfatin concentrations in morbidly obese subjects are reduced after gastric banding. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **91**, 1578–1581.
- 30 Manco, M., Fernandez-Real, J.M., Equitani, E., Vendrell, J., Mora, M.E.V., Nanni, G., Tordolo, V., Cabani, M., Ricart, W., Castagneto, M. & Mingrone, G. (2007) Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **92**, 483–490.
- 31 Jian, W.X., Luo, T.H., Gu, Y.Y., Zhang, H.L., Zheng, S., Dai, M., Han, J.F., Zhao, Y., Li, G. & Luo, M. (2006) The visfatin gene is associated with glucose and lipid metabolism in a Chinese population. *Diabetic Medicine*, **23**, 967–973.
- 32 Jason, J., Archibald, L.K., Nwaryanwu, O.C., Byrd, M.G., Kazembe, E.N., Doblie, H. & Jarvis, W.R. (2001) Comparison of serum and cell-specific cytokines in humans. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **8**, 1097–1103.
- 33 Moore, D.F., Li, H., Jeffries, N., Wright, V., Cooper, R.A., Elkhakim, A., Gelderman, M.P., Zoclaire, E. & Blevins, G., Yu, H., Goldin, E. & Baird, A.E. (2005) Using peripheral blood mononuclear cells to determine a gene expression profile of acute ischemic stroke: a pilot investigation. *Circulation*, **111**, 212–221.
- 34 Lampe, J.W., Stepaniants, S.B., Mao, M., Radich, J.P., Dai, H., Linsley, P.S., Friend, S.H. & Potter, J.D. (2004) Signatures of environmental exposures using peripheral leukocyte gene expression: tobacco smoke. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **13**, 445–453.
- 35 Visser, M., Bouter, L.M., McQuillan, G.M., Wener, M.H. & Harris, T.B. (1999) Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *The Journal of the American Medical Association*, **282**, 2131–2135.

## Publication No7

### **Transcription factor and drug metabolizing enzyme genes expression in lymphocytes from healthy human subjects.**

Gérard Siest, Elise Jeannesson, Jean-Brice Marteau, Anastasia Samara, Bérangère Marie, Michèle Pfister, Sophie Visvikis-Siest

Drug Metab Disp, 2008, 36: 182-9

Notre but a été de mesurer simultanément l'expression des enzymes du métabolisme des médicaments et des facteurs de transcription, dans les PBMCs de sujets supposés sains. Ces gènes sont aussi d'une grande importance en physiopathologie cardiovasculaire.

Leur ARN a été isolé à partir de globules blancs mononucléaires (PBMCs) de 20 sujets de la cohorte STANISLAS. Nous avons appliqué une approche 'microarray' pour mesurer 16 enzymes du métabolisme des médicaments et 13 facteurs de transcription.

Les cytochromes P450, incluant CYP2C19, CYP2C9, CYP2J2, CYP2D6, CYP1A1, CYP4F2, CYP4A11, CYP2E1, CYP11B2, CYP2C18 et CYP2A6 ont été exprimés chez tous les sujets étudiés. Les enzymes CYP3A4 et CYP3A5 n'ont pas été détectées. Les glutathiones S-transférases (GST) ont été exprimées mais GSTM1 a été trouvée seulement chez certains individus. Le récepteur PXR, le 'myocyte enhancer factor 2', le récepteur de la vitamine D, le récepteur hépatique LXR-alpha, le récepteur de l'aryl-hydrocarbone hydroxylase (AhR), le 'T-cell facteur 2', le translocateur nucléaire du récepteur de l'aryl-hydrocarbone hydroxylase (ARNT), le récepteur CAR ont été exprimés chez la majorité des sujets. Le récepteur de glucocorticoïdes, le récepteur PPAR-gamma et LXR-beta ont été mesurables seulement chez certains sujets. L'ARNm de PPAR-gamma a été trouvé chez un individu et le récepteur FXR n'a pas été détecté. Nous avons observé des corrélations significatives entre l'expression de AHR, ARNT et CYP1A1 et entre PXR et les enzymes CYP450 impliquées dans le métabolisme des leukotriènes (CYP2C, CYP4F2, CYP4A11, CYP2J2, CYP11B2).

Nous avons donc décrit pour la première fois, la présence de la majorité des facteurs de transcription et des enzymes du métabolisme des médicaments dans les PBMCs-non induits, de sujets supposés sains. L'expression de ces gènes dans les PBMCs pourrait servir pour des études ultérieures sur les variations physiologiques/pathologiques des enzymes du métabolisme des médicaments et des facteurs de transcription, associées à l'environnement, à la consommation de médicaments et aux mécanismes biologiques impliqués dans les pathologies cardiovasculaires.

## Transcription Factor and Drug-Metabolizing Enzyme Gene Expression in Lymphocytes from Healthy Human Subjects

Gérard Siest, Elise Jeannesson, Jean-Brice Marteau, Anastasia Samara, Bérangère Marie, Michèle Pfister, and Sophie Visvikis-Siest

Equipe Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale "Génétique Cardiovasculaire" CIC 9501, Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy I, Nancy, France

Received June 21, 2007; accepted October 11, 2007

### ABSTRACT

We aimed to measure simultaneously the expression of drug-metabolizing enzymes (DME) and transcription factors (TF) with high importance in cardiovascular pathophysiology in lymphocytes from healthy subjects. RNA was isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 20 subjects from the Stanislas Cohort. We used a microarray approach to measure 16 DME and 13 TF. Cytochromes P450 (P450s), including CYP2C19, CYP2C9, CYP2J2, CYP2D6, CYP1A1, CYP4F2, CYP4A11, CYP2E1, CYP11B2, CYP2C18, and CYP2A6, were expressed in all the subjects. CYP3A4 and CYP3A5 were not expressed. Glutathione S-transferases (GST) were expressed, but GSTM1 was seen only in some subjects. Pregnane X receptor (PXR), myocyte enhancer factor 2, vitamin D receptor, liver X receptor [LXR] $\alpha$ , aryl hydrocarbon receptor (AHR), T-cell factor 7, constitutive androstane receptor, and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) were

expressed in the majority of the subjects. Glucocorticoid receptor, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$ , and LXR $\beta$  were expressed only in some individuals. PPAR $\alpha$  mRNA was found in one subject only, and farnesoid X-activated receptor was not expressed. In addition, we found significant correlations between the expression of AHR, ARNT, and CYP1A1 and between PXR and P450 involved in leukotriens metabolism (CYP2C, CYP4F2, CYP4A11, CYP2J2, and CYP11B2). We describe here for the first time the presence of the majority of TF and DME in PBMC of healthy subjects without previous induction. The expression of these genes in lymphocytes could be a useful tool for further studying the physiological and pathological variations of DME and TF related to environment, to drug intake, and to cardiovascular metabolic cycles.

Drug-metabolizing enzymes (DME) and cytochromes P450 (P450s) in particular are central players in cardiovascular health and disease (Elbekai and El-Kadi, 2006). DME are important in the follow-up of cardiovascular drugs because many drugs are metabolized by them. These enzymes are also involved in the metabolism of natural substrates (such as leukotrienes, steroids, and bile acids) that are in turn implicated in several cardiovascular-related pathways, including inflammation, lipid metabolism, and blood pressure regulation. In addition, many environmental factors (tobacco, polycyclic hydrocarbons and dioxins, alcohol, and nutrients) modulate their patterns of expression, and expression of several of these genes is under control of transcription factors (TF), such as the pregnane X receptor (PXR), the constitutive androstane receptor (CAR), the glucocorticoid receptor (GR), or the aryl hydrocarbon receptor (AHR).

This work was supported by the Region Lorraine and the Communauté Urbaine du Grand Nancy. This work was also made possible thanks to an INSERM Grant GRE "Collection de Ressources Biologiques" 4CH204.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://dmd.aspetjournals.org>.  
doi:10.1194/dmpt.D77018

Finally, some polymorphisms in genes coding for these DME are well known to influence the level of expression with clinical and pharmacological relevance.

Some DME, including glutathione S-transferases (GST), N-acetyltransferases, and sulfotransferases (ST), are soluble enzymes measurable as phenotypes in the plasma. However, the majority is mainly localized in the endoplasmic reticulum and is rarely excreted or found in the plasma. That is one of the reasons we looked for the expression of DME in an easily accessible type of cells: the peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The second reason is the involvement of lymphocytes in cardiovascular events, i.e., through inflammation. Lymphocytes could be a useful target and tool for investigating relationships between DME, inflammation, and other metabolic pathways related to cardiovascular pathophysiology. In addition, the mechanisms of inflammation and immune defenses are regulated by the same TF.

During the past 10 years, a large number of P450s have been studied in PBMC of healthy subjects, including CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2J2, CYP3A3, CYP3A4, CYP3A5,

**ABBREVIATIONS:** DME, drug-metabolizing enzyme(s); P450, cytochrome P450; TF, transcription factor(s); PXR, pregnane X receptor(s); CAR, constitutive androstane receptor(s); GR, glucocorticoid receptor(s); AHR, aryl hydrocarbon receptor(s); GST, glutathione S-transferase(s); ST, sulfotransferase(s); PBMC, peripheral blood mononuclear cell(s); EH, epoxide hydrolase(s); ARNT, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator(s); BMI, body mass index; PCR, polymerase chain reaction; LXR, liver X receptor(s); VDR, vitamin D receptor(s); PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor(s); FXR, farnesoid X receptor(s); WBC, white blood cell(s).

TABLE I  
Characteristics of the 20 selected individuals from the Stavakis Cohort

Sex	Age	BMI	WBC	Cholesterol	HDL	TG	Glucose	GGT	GTP	CRP	Alcohol Consumption
	yr	kg/m <sup>2</sup>	10 <sup>9</sup> /l	mM	mM	mM	mM	U/l	U/l	mg/l	
Male	43	24.40	4.5	5.58	1.49	0.85	4.96	17	25	0.16	○
Male	50	25.82	4.9	5.42	1.85	0.86	5.21	22	17	0.55	○+
Female	48	23.30	6.5	4.50	1.96	0.60	4.96	12	15	0.18	○
Female	50	27.62	8.1	5.89	1.77	0.71	4.90	18	15	0.72	○
Female*	51	31.66	5.5	5.70	1.14	1.03	5.60	25	54	8.53	○
Male	52	34.83	5.9	6.30	1.70	2.06	6.04	58	20	3.13	+
Male	52	32.23	4.5	5.54	1.13	2.00	6.35	41	64	1.98	+
Female	48	31.05	7.0	5.16	1.17	1.93	5.17	N.A.	37	2.08	+
Female	49	21.26	5.1	4.67	1.88	0.69	4.94	9	12	0.30	○
Male	50	30.06	5.6	5.45	1.30	2.17	6.30	N.A.	54	2.03	+
Male	55	37.91	6.5	4.78	1.52	0.68	6.18	44	42	6.09	○
Female	46	26.70	6.5	4.82	2.12	0.86	5.16	14	16	1.40	○
Male	46	25.24	5.2	5.30	1.50	0.58	4.91	17	18	0.64	+
Male	52	30.23	5.6	5.13	1.35	1.67	6.76	19	23	0.59	+
Male	51	23.25	5.6	5.86	1.98	0.70	5.26	17	21	0.70	○+
Female*	50	23.05	6.0	4.95	1.47	0.54	4.85	27	18	1.01	+
Female	49	37.73	8.3	6.10	1.22	2.89	6.09	36	31	4.86	+
Male	52	32.20	5.6	7.10	1.53	1.43	6.69	30	28	0.67	○+
Female	50	30.10	5.8	6.30	2.09	0.86	5.65	29	46	5.08	○
Male	55	29.14	5.4	5.68	1.62	1.44	5.62	99	60	0.51	○

HDL, high-density lipoprotein; TG, triglycerides; GGT,  $\gamma$ -glutamyl transaminase; GTP, glutamyl pyruvate transaminase; CRP, C-reactive protein; N.A., not available.  
○, alcohol consumption ( $\leq 0$ ); ○+ = 1; ++ = 2; +++ = 3; ++++ = 4 glasses of wine/day.  
\* Taking oral contraceptives.

CYP3A7, CYP4A11, CYP4B1, and CYP4F. Epoxide hydrolase (EH), GST, *N*-acetyltransferase, and ST also have been described (Raucy et al., 1997; Barron et al., 1998; Dant et al., 1998; Spencer et al., 1999; Stridel et al., 1999; Takeda et al., 1999; Bouchier et al., 2000; Krovat et al., 2000; Nakamoto et al., 2000; Nguyen et al., 2000; Smart and Daly, 2000; Finnstrom et al., 2001, 2002; Hamon-Fletcher et al., 2001; Ashgar et al., 2002; Carcillo et al., 2003; Gashaw et al., 2003; Landi et al., 2003, 2005; Lin et al., 2003; Toide et al., 2003; Tuominen et al., 2003; Furukawa et al., 2004; Lampe et al., 2004; Yamamoto et al., 2004; Haus et al., 2005; Liangpansakul et al., 2005; Muna et al., 2006). However, study of the expression of both DME and TP is rarely conducted at the same time. The existing work in the field examined preferentially CYP1A1, AHR, and the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (Smart and Daly, 2000; Landi et al., 2003; Lin et al., 2003; Yamamoto et al., 2004).

The global objectives of this investigation are to propose useful biomarkers easily measurable without any activation on a large scale, i.e., during clinical trials. The main objective consisted in investigating patterns of expression of DME together with their related TP in PBMC, a type of cells easily accessible and closely related to inflammation. Before studying these genes in pathological states or in patients undergoing treatment, looking for them in healthy subjects is an obligatory step. Therefore, we studied the simultaneous expression of an important number of DME and TP RNA in lymphocytes (without previous induction) of 20 supposedly healthy subjects. Finally, we have reviewed articles that described expression of DME and TP in PBMC of healthy subjects, and we discussed the biological variation factors found in these articles.

#### Materials and Methods

**Population.** Twenty supposedly healthy individuals, 11 males and 9 females, from the Stavakis Cohort were chosen for measurement of PBMC gene expression by an in-house microarray assay (Vivikis-Saint et al., 2007). The investigation conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Individuals were of French origin and exempt of any acute or chronic diseases. Some of them had slight cardiovascular risk (i.e., obesity and hypertension). Specific exclusion criteria were medication except contraceptives, current smoking, and heavy alcohol consumption. Characteristics are shown in Table I.

**PBMC Collection.** The PBMC bank was constituted according to a well validated protocol, with a high recovery in lymphocytes (97%). Briefly, fresh whole blood (10 ml) was collected from 8 to 10 AM by standardized venipuncture in EDTA tubes (Vacutainer, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) during a period of 5 months (November to March). PBMC were isolated by centrifugation on a density gradient of Ficoll (Ficoll-Paque PLUS; GE Healthcare, Orsay, France). Percentages of lymphocytes, monocytes, and polynuclear cells were determined in some samples by microscopic observation after May-Grunwald-Giemsa staining. PBMC were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction. RNA quality and stability were carefully tested (Marteau et al., 2005).

**Microarray Design.** An in-house microarray was designed as previously described (Vivikis-Saint et al., 2007). Briefly, we selected numerous genes including 16 DME and 13 TP. In addition, we included a nonhuman RNA (*Arabidopsis thaliana*) to test unspecificity. Oligonucleotides were selected from the MWG database, and the chip was manufactured by MWG Biotech (Ebersberg, Germany). RNA was extracted by an automated isolation procedure (MagNA Pure LC instrument; Roche Applied Science, Meylan, France). Concentration and quality were determined by the spectrophotometer NanoDrop ND-1000 (Labtech International, Paris, France). RNA was amplified using the amino allyl MessageAmp II aRNA Amplification Kit (Ambion, Austin, TX) and a T7a1 primer. The double-strand cDNA obtained was transcribed in amplified RNA using 5'-3'-aminoadenyl-UTP (Ambion). The RNA yield ranged from 1.3 to 8  $\mu\text{g}$ . RNA samples were labeled with fluorochrome Cy3, and a reference RNA (Universal Human Reference RNA, Stratagene, La Jolla, CA) was labeled with fluorochrome Cy5. The labeled RNA sample and the corresponding quantity of labeled reference RNA were poly-bracketed on each slide in 5% bovine serum albumin. Cy3- and Cy5-labeled RNA were cohybridized to the microarray at  $50^{\circ}\text{C}$  for one night. Slides were scanned using an Axon GenePix 400B scanner and GenePix version 6 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

**Data Normalization and Analysis.** Normalization and analysis were assessed using GeneSpring version 6.1 software (Silicon Genetics, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). The ratio of Cy3 intensity on Cy3 background noise was calculated for each spot. Then, to evaluate the expression of the transcription, we used a Student's *t* test ( $p < 0.01$ ). If the mean of ratios for a given RNA (2 spots/slide) is not significantly different from the mean of ratios for *A. thaliana* RNA (8 spots/slide), the gene was considered nondetectable. Spearman's correlation coefficients were calculated to look for potential relationship between gene expression, age, and body mass index (BMI). Mann-Whitney test was used to identify significant difference between men and women for the gene expression.

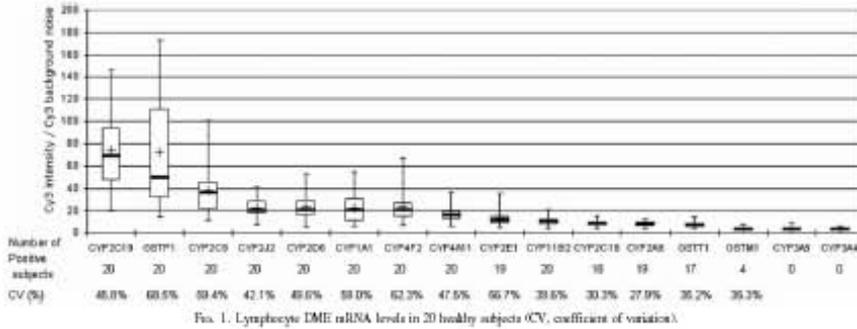


FIG. 1. Lymphocyte DME mRNA levels in 20 healthy subjects (CV, coefficient of variation).

**Validation of Microarray Results.** This chip was used to study expression of other genes such as genes involved in the two principal biological pathways related to leukocyte inflammation and cellular adhesion (Vivó-Soto et al., 2007). Validation of the results obtained with this chip was performed by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) on four genes expressed in a significant number of individuals: intercellular adhesion molecule 1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , L-selectin, and interleukin 6.

#### Results

**Expression of DME Genes.** All the subjects expressed CYP2C19, CYP2C9, CYP2J2, CYP2D6, CYP1A1, CYP4F2, CYP4A11, CYP11B2, and GSTP1 (Fig. 1). In addition, CYP2E1, CYP2C18, CYP2A6, and GSTT1 were expressed in 19, 18, 19, and 17 subjects, respectively. Concerning CYP3A4 and CYP3A5, they were not measurable here. GSTM1 was expressed in only four individuals.

The variability is important (coefficients of variation shown in Fig. 1). We obtained no difference depending on gender, age, or BMI. We observed no variation resulting from the time of the day or the day or month of collection (data not shown).

**Expression of TF Genes.** Among 13 TF, 12 were found in PBMC (Fig. 2). PXR, CAR, liver X receptor (LXR)- $\alpha$ , AHR, ARNT, vitamin D receptor (VDR), TP-7, and myocyte enhancer factor 2 were expressed in the majority of subjects. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$ , LXR $\beta$ , and GR were expressed in some subjects, PPAR $\alpha$  in one individual, and farnesoid X-activated receptor was not detected.

The variability is also high (coefficients of variation shown in Fig. 2). No trends of age, sex, and BMI were observed that could have explained part of this variability (data not shown).

**Association of TF and DME.** We found results of interest as concern P450 involved in inflammation and blood pressure regulation. There is a significant correlation between the expression of PXR and the CYP2C ( $p < 0.0001$ ; Fig. 3). The CYP2C were also correlated with LXR $\alpha$  ( $p < 0.001$ ) and LXR $\beta$  ( $p < 0.07$  except CYP2C9) and with CAR ( $p \leq 0.001$ ) but not with GR (data not shown).

Like the two other P450s involved in leukotriene metabolism, namely, CYP2C19 and CYP2C9, CYP4F2 (leukotriene  $\beta$ 4 omega

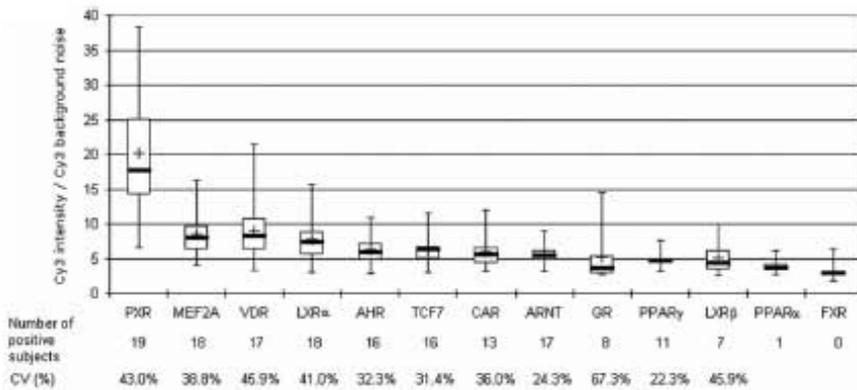


FIG. 2. Lymphocyte TF mRNA levels in 20 healthy subjects (CV, coefficient of variation).

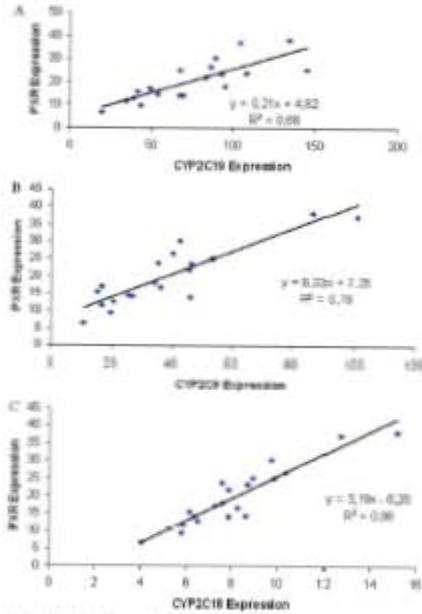


FIG. 3. Correlation between PXR and CYP2C RNA expressions in PBMC of healthy subjects (Expression = Cyt intensity/Cyt<sub>β</sub> background noise).

hydroxylase), CYP4A11 (fatty acid omega hydroxylase), and CYP2J2 (epoxygenase active on eicosanoids) were correlated with PXR. In addition, CYP11B2 (aldosterone synthase) was also correlated with PXR ( $p < 0.0005$ , Fig. 4).

Finally, we found also a significant correlation between ARNT and AHR ( $p < 0.0001$ ), ARNT and CYP1A1 ( $p < 0.006$ ), and a trend between AHR and CYP1A1 ( $p = 0.022$ , Fig. 5).

**Validation of Microarray Results.** The quantitative real-time PCR results were in agreement with those observed by microarray analysis (Vatnikin-Stest et al., 2007).

**Discussion**

**P450 and GST Expression in PBMC of Healthy Subjects.** The choice of the DME was based on their importance in cardiovascular drug pharmacogenetics (CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, CYP1A4, CYP1A5, and CYP2C8), their environmental interest (CYP1B1, CYP1A1, CYP2A6, and GST), and their possible involvement in hypertension or vascular regulation via endogenous metabolites (CYP1C, CYP4F2, CYP2J2, CYP4A11, and CYP11B2).

We measured simultaneously 11 P450 and 3 GST mRNA in lymphocytes without any previous induction or cell culture. Most of the genes are expressed in each individual, contrary to what was observed in other studies (Asghar et al., 2002; Han et al., 2005). GSTM1 is only expressed in four subjects. This is not surprising because the complete gene is only present in 30% of Caucasians.

We report here for the first time the expression of CYP2C18, CYP2J2, and CYP4F2 in lymphocytes of healthy subjects. In addition, we also found CYP2A6 in contrast to previous studies (Koskela et al., 1999; Kovat et al., 2000). As for the lack of expression of CYP1A4 and CYP1A5 in our subjects, these findings are not in agreement with others previously reported (Nakamoto et al., 2000; Finstrom et al., 2001; Goshaw et al., 2003). Kovat et al. (2000), who were not able to detect CYP1A5 and whose detection of CYP1A4 was near the detection limit of the assay, proposed as an explanation the preferential localization of CYP1A in B cells, which constitute only a small part of total lymphocytes.

**TF and P450 Expression in PBMC of Healthy Subjects.** To our knowledge, this is the first time that such an important number of DME and TF are simultaneously studied. We have found a large panel of TF in PBMC. Only a few authors have been interested in measuring TF expression in PBMC of healthy subjects (Table 2). In addition, study of the expression of both P450 and TF is rarely conducted at the same time. AHR pathway is associated with induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 (Gauguin et al., 2006). Four authors have looked for the TF-regulating CYP1A1 expression: Lin et al. (2003) (AHR), Smart and Daly (2006), Lantti et al. (2003) (AHR, ARNT), and Yamamoto et al. (2004) (AHR, ARNT, and AHR repressor).

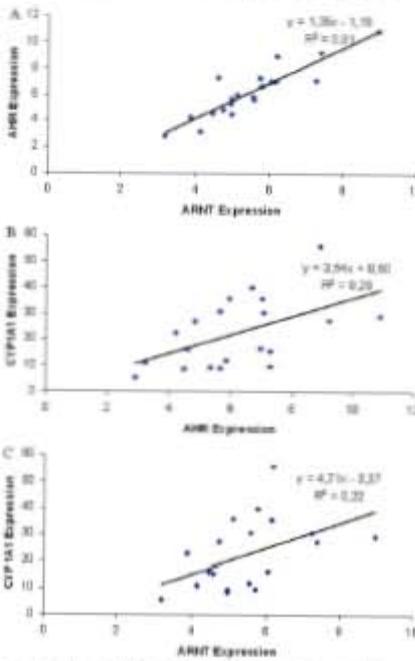


FIG. 4. Correlation of P450 involved in biotransformation and PXR expression in PBMC of healthy subjects (Expression = Cyt intensity/Cyt<sub>β</sub> background noise).

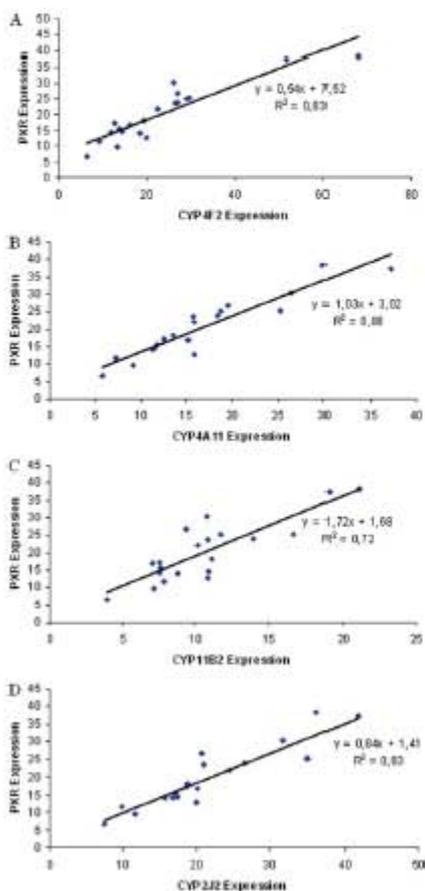


FIG. 5. Correlations between AHR, AHR, and CYP1A1 RNA expressions in PBMC of healthy subjects (Expression =  $Cy5$  intensity/ $Cy3$  background noise).

Expression of retinoic acid receptor and retinoid X receptor (RXR) has been described in healthy subject PBMC but only qualitatively (Szabova et al., 2003). No one has looked in healthy lymphocytes for the three other transcriptional activation mechanisms involved in P450 regulation: CAR-RXR, PXR-RXR, and PPAR $\alpha$ -RXR. It is generally admitted that PXR regulates CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4, CYP3A7, GST, ST, UGT1A1, and ABCB1 mainly in the liver (Gueguen et al., 2006), whereas CAR modulates CYP2B6, CYP2C9, and CYP2C19.

P450s are often regulated simultaneously by two or more mecha-

nisms (Miao et al., 2004), including VDR and GR (Pascucci et al., 2003). The different TF influence mutually their relative expression. CAR and PXR are regulated, at least in part, by the GR, and a signal transduction cascade GR-[CAR-PXR]-P450 exists at least for CYP3A4 and CYP2C9 (Dronk et al., 2005) and maybe CYP2C19 (Chen et al., 2003). In addition, VDR probably regulates CYP3A4, CYP2C9, and CYP2B6 (Droccout et al., 2002). Only limited information is available on the regulation of CYP3A5 expression, but it appears to be inducible via the GR, PXR, and CAR as for CYP3A4 (Daly, 2006) and CYP2C9 (Karchheiser et al., 2004). CYP2C8 expression is regulated by CAR, PXR, GR, and hepatic nuclear factor 4 $\alpha$  in the liver (Ferguson et al., 2005). Finally, constitutive hepatic expression of CYP2A6 is governed by interplay between the TF hepatic nuclear factor- $\alpha$ , CCAAT/enhancer-binding protein- $\alpha$ , CCAAT/enhancer-binding protein- $\beta$ , and octamer TF 1 (Pitangue et al., 2005).

It is also possible to describe activation through the antioxidant response element, which could cross-talk with the xenobiotic response elements (Miao et al., 2004). CAR could in addition be regulated by activation through phosphorylation, which permits its translocation in the nucleus (Sueyoshi and Negishi, 2001). Finally, regulation could also be mediated through mRNA or protein stabilization (CYP2E1). These mechanisms are mainly studied in the liver (Sueyoshi and Negishi, 2001; Pascucci et al., 2003; Miao et al., 2004; Hanchichin and Meyer, 2005).

**Choice of the PBMC as a Tool for Measuring DME and TF.** As previously mentioned, a large number of P450s have been described in PBMC of healthy subjects (Table 2). Gene's expression in lymphocytes is not always representative of expression in other tissues. However, considering that they are involved in cardiovascular-related diseases, mainly through the inflammation pathway, lymphocyte expression could be used to evaluate modification of expression observed with this system. In addition, gene's expression in lymphocytes remains a good biomarker to evaluate P450 and TF phenotypes and thus to monitor, for example, exposure to and risk associated with xenobiotics. We would like to mention here the work of Wilmut-Berlaimont et al. (2005). Using an Affymetrix (Santa Clara, CA) chip, they described the significant regulation of 240 genes (among 12,650 genes) in PBMC of dyslipidemic patients after atorvastatin treatment. Unfortunately, neither P450 nor TF that we studied here appears among the regulated genes.

PBMC are easily accessible cells. They could be a great tool to investigate biomarkers in large population studies if only a small quantity of blood is taken from the patient (we recommend 5–10 ml). Quantities of blood taken are often too high (Table 2), the main reason being the need of enough material for measuring protein levels of DME in microsomes after ultracentrifugation (Raucy et al., 1997; Baron et al., 1998; Hannon-Fletcher et al., 2001) or after lymphocytes cultures (Spencer et al., 1999; Smart and Daly, 2000; Landt et al., 2003; Lin et al., 2003).

We consider that the choice of PBMC is a good one because P450s are largely represented in lymphocytes (Raucy et al., 1997). In PBMC we found essentially T lymphocytes, which are the richest cells in P450 content. In addition, monocytes, even if they contaminate PBMC, have a low P450 content. Our experimental conditions were well defined for PBMC preparation, and the lymphocyte purity obtained was very high (97%) compared with the 70 to 90% described in articles cited in Table 2. Total white blood cells (WBC) were used without any problem by Finnström et al. (2001) and buffy coat with all the WBC by Furukawa et al. (2004). The heterogeneity of the cell population is no longer an argument. It is not more heterogeneous than a liver extract that is also a mixture of more than four different cell

TABLE 2  
DME and TF described in PBMC of healthy subjects during the past 10 years

Authors, Year	Cell Type	Blood Quantity	Number of Healthy Subjects	Diagnosis	Inducing Compounds	DME and TF
Raucy et al., 1997	Lymphocytes	320	22	Immuno-blot (microarray) RT-PCR Chloroquine - clearance	Alcohol	CYP2E1
Baron et al., 1998	Monocytes and culture		10	Immuno-blot <i>p</i> -Nitrophenol hydroxylase	Benzofuranone Dienanthrone Cyclosporine Phenobarbital Tetrahydrocannabinol Liponacetic acid Tobacco	CYP1A1, CYP1B1, CYP2B6, CYP2E1, CYP3A4
Dast et al., 1998	PBMC	7*	75	RT-PCR		CYP1B1
Spencer et al., 1999	PBMC and culture	60	10	RT-PCR	Dioxin	CYP1B1
Stark et al., 1999	Neutrophils and lymphocytes	100	8	Immuno-blot G6PD-activity	Glifanziprin	CYP3A
Takeda et al., 1999	PBMC	7	10	RT-PCR Southern blot		CYP1B2
Boscher et al., 2000	PBMC	7	17	Flow cytometry RT-PCR	Fat diet	CYP2E1 protein and mRNA
Kovac et al., 2000	PBMC	40	10	RT-PCR		CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, epoxide hydrolase, CYP2F1 (very low)
Nakamoto et al., 2000	Lymphocytes	10	8	RT-PCR	Glifanziprin 3 weeks (diabetes mellitus)	CYP3A4
Nyaga et al., 2000	PBMC	7	10	DNA arrays	Interface	CYP4A11, CYP2E1, CYP2E2, CYP2E3, CYP2A6, CYP1A1, CYP2B6, CYP4B1, CYP2C8, CYP3A, CYP1B1, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A1, AHR
Smart and Daly, 2000	PBMC and culture	20	30	EROD assay Immuno-blot		CYP2E1, CYP1B1, CYP1A2, CYP2E2, CYP3A4
Finnefret et al., 2001	Leucocytes	7	13	RT-PCR		CYP2E1, CYP1B1, CYP1A2, CYP2E2, CYP3A4
Hartman-Platzer et al., 2001	Lymphocytes	15	8	Immuno-blot (microarray)	(Diabetic)	CYP2E1
Asghar et al., 2002	PBMC	25	50	RT-PCR	Glifanziprin	CYP2C8, CYP2E1, CYP3A5, CYP3A7, CYP4A11, CYP4B11, ABCB1
Finnefret et al., 2002	Leucocytes	7	19	RT-PCR		CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A4
Carrillo et al., 2003	PBMC	8	9	Dabrinquin clearance RT-PCR		CYP2D6
Gulone et al., 2003	Leucocytes	8	86	RT-PCR	Glifanziprin 5 days	CYP3A4
Landi et al., 2003	PBMC and culture	50	6269	RT-PCR EROD assay	Dioxin	AHL, CYP1B1, ARNT, and CYP1A1 only after culture
Liu et al., 2003	PBMC and culture	20	32	RT-PCR	Benzofuranone Tobacco Dioxin	CYP1A1, CYP1B1, AHR, ARNT
Toido et al., 2003	Leucocytes		72	RT-PCR		CYP1B1
Tuominen et al., 2003	PBMC	8	16	RT-PCR	Ferrocenehexafluoride	CYP1A1, CYP1B1
Finnefret et al., 2004	Buffy coat	10	20	RT-PCR	(Cancer)	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2E1
Lampo et al., 2004	PBMC	10	85	Microarray	Tobacco	CYP1B1
Yamamoto et al., 2004	PBMC	7	13	RT-PCR	Methylcholanthrene	CYP1A1, AHR, AHR response gene, ARNT
Hase et al., 2006	Lymphocytes	8	12	Caffeine, dabrinquin, serapranolol, midazolam clearance RT-PCR	Glifanziprin	CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C19 (very low)
Landi et al., 2006	PBMC and culture	50	6269	RT-PCR EROD assay	Dioxin 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin/nitrogen Alcohol	CYP1A1, CYP1B1
Liangpansakul et al., 2006	PBMC	25	20	RT-PCR		CYP2E1, CYP3A4
Mura et al., 2006	PBMC culture	7	7	RT-PCR	Angiotensin II	CYP1B2 and mineralocorticoid receptor

RT, reverse transcription; EROD, ethoxycoumarin O-deethylase.  
\*7 = not known.

types. In comparison with the liver, the concentration of P450 in PBMC is 20 to 2000 times lower, thus creating some limitations. Some authors have used cultures and inducers to increase the P450 levels, but such a strategy is not applicable to studies in large populations or to new drug trials. We show here that it is possible to measure the majority of them without induction. However, we observed a high variability in expression of these DME. This, as well as the very low level for CYP5A4, could be attributed to expression in a limited number of cells (Gastaw et al., 2003). We are looking essentially with our PBMC preparation to T lymphocytes with a low content of B (<5%) and monocytes (<5%). The difficulties that should be more deeply studied are linked to the low levels of expression and to the nonsystematic expression in all the subjects.

The work of Whitney et al. (2003), which also uses microarray expression to study interindividual and temporal variations in healthy subjects, stimulated interest of studying WBC and lymphocytes for health surveillance. However, they did not investigate P450 expression (Whitney et al., 2003). The majority of the published data on P450 mRNA content in PBMC has been obtained using real-time PCR (Table 2), except for two who used microarray technology (Nguyen et al., 2001; Lampe et al., 2004).

**Biological Variations.** Determination of reference values and biological variations in healthy individuals is an obligatory step in the development of any candidate biomarker before its application in diagnostic or pharmacogenetic studies. In laboratory medicine, biological variation data that are two times higher than the analytical variations could be related. A biomarker with high variability is of great interest in health screening and prepathological state studies.

The main factors affecting biological variability of clinical chemistry constituents are age, gender, biological rhythms, BMI, alcohol, tobacco, diet, drug intake, and genetic variations. We tested the possible contribution of some factors, but the biological variation observed could not be explained by them. We should study these factors on a greater set of healthy subjects. Finally, the mRNA profiling approaches by microarray technologies should be confirmed by real-time reverse transcription-PCR.

We show here that the majority of DME and TF are expressed in lymphocytes of 20 healthy subjects. This is of importance not only for pharmacokinetic studies in drug clinical trials but also because it gives the perspective of further studying cardiovascular-related pathways such as inflammation, blood pressure regulation and lipid metabolism by using PBMC. These TF are involved in cholesterol (LXR), triglycerides (PPAR), bile acids (VDR, farnesoid X-activated receptor, LXR), steroids (CAR, PXR), and bilirubin (CAR, PXR) (Handschin and Meyer, 2005) metabolism. TF also interact with many other cardiovascular-related pathways, including the cytokines for PPAR (Jones et al., 2002; Trullieux et al., 2003). To conclude, a biological system approach could be defined for better understanding on the relation of each TF with every P450 or other constituent candidate marker measured in PBMC.

**Acknowledgments.** We thank Dr. Pascal Soulaire and his team (PARTNERCHIP CEA/DSV/LRR/SGF Evry, France) for excellent technical assistance and Dr. Steve Mohr for his scientific involvement. We also thank the families of the Statistis Survey and the staff of the Centre for Preventive Medicine for their involvement.

## References

- Angier A, Gaultier EC, Kuster-Dantoni E, and Hill SD (2002) Isolation of multiple cyp1a1 and cytochrome P450 mRNAs in human mononuclear cells by rt-PCR. *Drug Metab Dispos* 30:27–35.
- Barni JM, Zoube-Klavansky G, Jeger F, Bannan W, Ishida A, Malhotra H, and Meek HF (2000) Cytochrome P450 1B1: a type P450 isozyme in human blood monocytes and macrophage subsets. *Biochem Pharmacol* 56:1105–1110.
- Boscher F, Sime H, Vilon C, de Siron AC, Mikol PJ, Chantoin R, Bara Y, and Vallet JJ (2003) Dietary lipids affect human ethanol-inducible CYP2E1 gene expression *in vivo* in mononuclear cells. *Lipids* 38:1303–1316.
- Casillo JA, Alachioti A, Bonkat-GI, Peto RF, Yonatanannan R, Knoll C, Tharand K, Rostker L, Wilson JW, Senita S, et al. (2003) Covalently attached and constitutive regulation of cytochrome p4502E1 in healthy subjects and in patients after liver transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 75:46–60.
- Chen Y, Fujiwara SK, Nagata M, and Goldstein JA (2003) Identification of constitutive androstane receptor and glucocorticoid receptor binding sites in the CYP2E1 promoter. *Mol Pharmacol* 64:316–324.
- Daly AK (2005) Significance of the minor cytochrome P450 3A isozyme. *Clin Pharmacokinet* 45:13–31.
- Dand C, Sigurdson S, Garthoff F, Gernthals M, and Hantel B (2000) Cytochrome P450 1B1 mRNA expressed in mononuclear cells by quantitative reverse transcription-PCR. *Clin Chem* 44:2016–2021.
- Diocourt L, Guich C, Ponsard JM, Mounir H, and Vilarem M (2002) Expression of CYP5A4, CYP2E1, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes. *J Biol Chem* 277:25125–25132.
- Drobnik Z, Mochlanovsky M, Richard-Garcia I, Bilezikci J, Vilarem M, Ulichova J, Mounir H, and Ponsard JM (2003) Colestipol downregulates cytochrome P450 2B6, 2C9, and 3A4 in human lymphocytes by affecting their glucocorticoid receptor-mediated regulation. *Mol Pharmacol* 64:160–169.
- Ehblot SH and El Kadi AO (2005) Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. *Pharmacol Ther* 112:564–587.
- Ferguson SS, Chen Y, LaClerge EJ, Reynolds M, and Goldstein JA (2001) Human CYP2E1 is transcriptionally regulated by the nuclear receptors constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, glucocorticoid receptor, and hepatic nuclear factor- $\alpha$ . *Mol Pharmacol* 60:747–757.
- Hantel B, Aek H, Dahi MI, Guld M, and Rane A (2002) Intra-individual variation and sex differences in gene expression of cytochromes P450 in circulating leukocytes. *Pharmacogenetics* 12:111–116.
- Hantel B, Thoen M, Loeffl L, and Rane A (2001) Independent patterns of cytochrome P450 gene expression in liver and blood in patients with suspected liver disease. *Eur J Clin Pharmacol* 57:405–409.
- Harikawa M, Nakamura M, Ogino D, Chiba K, Imai J, Ueda N, Nishi S, Katsuyoshi S, Moriwaki MA, Uchida T, et al. (2004) Cytochrome p450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in cooperation with the liver. *Cancer Res* 64:520–529.
- Gastaw I, Kucharski J, Goldkammer M, Bauer S, Sedekman J, Zoller K, Mroczkiewicz PM, Rostker L, and Handschin J (2003) Cytochrome p450 3A4 messenger ribonucleic acid induction by ritonavir in human peripheral blood mononuclear cells: correlation with zidovudine pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 74:440–447.
- Giugliano V, Minori K, Faraà L, Turchio R, Ielloraro IM, Iatì AM, Pagari F, Volini P, Alagonese V, Giannini F, et al. (2005) Cytochromes P450: metabolic activation, regulation and clinical importance. *Ann N Y Acad Sci* 1043:538–548.
- Hill SD, Brennan E, Clifton D, Becker BM, Brdiczka V, Zemanick C, Peto RF, and Knoll C (2000) Cytochrome P450 mRNA expression in peripheral blood lymphocytes as a predictor of enzyme induction. *Eur J Clin Pharmacol* 41:503–503.
- Handschin C and Meyer UA (2005) Regulatory network of lipid sensing nuclear receptors: roles for CAR, FXR, LXR, and PXR. *Acc Chem Res* 38:387–396.
- Hansen Fletcher MF, CYP450 M, Mole NW, Farrell VA, and Barakat CR (2001) Lymphocyte cytochrome P450 CYP2E1 expression in human HBEM subjects. *Food Chem Toxicol* 39:125–132.
- Jones DC, Manning BM, and Dargatzis IA (2002) A role for the promitogenic proliferation activated receptor alpha 1b T-cell physiology and aging immunology. *Proc Natl Acad Sci* 99:353–359.
- Kucharski J, Tsuchida M, Ishikawa W, Rostker L, and Handschin J (2004) The CYP2E1 polymorphisms: from enzyme kinetics to clinical dose recommendations. *Pharmacol Med* 18:3–14.
- Kushida S, Hildebrandt J, Halkerson J, Holzman G, Sorel M, Sarason A, Arditi S, Fernandez-Salazar P, Gonzalez R, and Rando H (1999) Expression of CYP2E1 gene in human liver and extrahepatic tissues. *Biochem Pharmacol* 57:1407–1413.
- Kuznetsov LC, Tracy RH, and Orlowski CJ (2000) Fluorimetry of cytochrome P450 and environmental epoxide hydrolyase gene expression in human blood cells. *Toxicol Sci* 55:352–359.
- Lampe JW, Rappaport SR, Mao M, Kulkarni H, Dai H, Linsley PS, Wood SD, and Peto RF (2004) Signature of environmental exposure using peripheral leukocyte gene expression: tobacco smoke. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:445–453.
- Lank MT, Dargatzis AW, Baccarelli A, Peterson DG Jr, Giannini J, Te Muntzen M, Macciari G, Caporaso N, Martin SA, Perrotti AC, et al. (2005) CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms, and TCED-induced gene expression in subjects from Seveso, Italy. *Toxicology* 205:101–102.
- Lank MT, Bernard PA, Baccarelli A, Consonni D, Martin SA, Lacer G, Macciari G, Neelam L, Caporaso N, and Giannini J (2005) TCED mediated alterations in the AhR-dependent pathway in Seveso, Italy: 20 years after the accident. *Carcinogenesis* 26:573–600.
- Liangpansri S, Kobayashi G, Peto A, Gaultier EC, Hill SD, and Chabane N (2005) Activity of CYP2E1 and CYP3A expression in adults with moderate alcohol consumption: a comparison with metabolites. *Alimentology* 41:1144–1150.
- Liu F, Lu SW, and Chang TH (2003) Correlation between gene expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR), hydrocarbon receptor nuclear translocator (AhR), cytochromes P4501A1 (CYP1A1) and 1B1 (CYP1B1) and inducibility of CYP1A1 and CYP1B1 in human lymphocytes. *Toxicol Sci* 71:20–35.
- Mohr S, Mohr S, Pflanz M, and Vortisch-Streit E (2005) Collection and storage of human blood cells for mRNA expression profiling: a 15-month stability study. *Clin Chem* 51:1250–1262.
- Miao W, Hu L, Karabaz M, Handchin D, and Rane A (2004) A cell-based system to identify and characterize the molecular mechanism of drug-metabolizing enzyme (DME) modulation. *Biochem Pharmacol* 67:1897–1905.
- Miyazaki T, Nakamura K, Miura D, Miura A, Horikawa K, Nagata M, Handchin C, Nagata S, Morita H, Fukumoto Kawanishi K, et al. (2006) Aldehyde oxidase synthesis and cytochrome production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Sci* 192:288–295.
- Nakanishi T, Hase I, Imoto S, Itoh T, Oda Y, Aoki A, and Furuo Y (2000) Quantitative

- ET PCR for CYP3A4 mRNA in human peripheral lymphocytes: induction of CYP3A4 in lymphocytes and its liver by ritonavir. *Pharmacogenetics* **14**:571-575.
- Nguyen LT, Kawanishi M, Watanabe-Gotoh N, Toku K, Mikiyama C, Hatanaka M, Patrick E, Terawatake C, and Jacobs LD (2003) Detection of cytochrome P450 and other drug-metabolizing enzymes (CYPs) in peripheral blood mononuclear cells using DNA arrays. *Drug Metab Dispos* **28**:947-953.
- Pascual JM, Garcia-Cardena S, Daverat L, Maudel P, and Vilasani M (2003) The expansion of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a family of networks of nuclear and steroid receptors. *Nucleic Acids Res* **31**:243-253.
- Pharaph M, Rodriguez-Ariza A, Gonzalez M, and Ingelman-Sundberg M (2003) Transcriptional regulation of the human CYP2A6 gene. *J Pharmacol Exp Ther* **303**:614-622.
- Rauscy JL, Schuster RD, Woskie MR, Arora N, Schuster HE, Orsillo JL, and Caporaso NE (1997) Human lymphocyte cytochrome P4502B1, a potential marker for alcohol-mediated changes in hepatic cytochrome activity. *Drug Metab Dispos* **25**:1429-1435.
- Small J and Daly AK (2003) Variations in human CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTA1 polymorphisms. *Pharmacogenetics* **14**:11-20.
- Spencer DL, Meisen SA, Linder RM, Yang X, Garman JA, Miller CB, Sakai TK, Luster GW, and Walker NI (1999) Quantitative analysis of constitutive and 2,3,7,8-tetrahydrodibenzo-p-dioxin-induced cytochrome P450 1B1 expression in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**:139-146.
- Shihai F, Songyou C, Van Den Broege V, Stevens M, De Saeger C, Dinaghe JP, and Herveaux Y (1999) CYP 3A polymers are expressed in human neutrophils and lymphocytes but are not induced by ritonavir. *Life Sci* **64**:645-653.
- Suzuki T and Nagata M (2001) Pharmacokinetic response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **41**:123-140.
- Suzhou L, Maccioni D, Uroczkoska M, Moutibak S, Barckert S, Zrad S, Wiktani S, Cardinale D, Vases MF, Beck E, et al. (2003) Expression of nuclear aryl hydrocarbon receptor in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy subjects. *Life Sci* **72**:831-836.
- Tachibana T, Furukawa K, Iwata S, Miyazaki I, and Matsuda H (1995) Genetic analysis of allelic polymorphisms in patients with idiopathic hypochromic anemia. *J Clin Endocrinol Metab* **81**:1633-1635.
- Takita K, Yamazaki H, Nagakura K, Itoh K, Imano S, Takahashi Y, Watanabe S, and Kametaki T (2003) Aryl hydrocarbon hydroxylase represents CYP1B1, and not CYP1A1, in human freshly isolated vein cells: molecular distribution of Japanese population according to induction of CYP1B1 mRNA by environmental dioxin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**:210-222.
- TERRILL A, Bouch A, Harley M, Bayley D, Campbell E, and Whitaker P (2003) PPAR-alpha and -gamma but not -delta agonists inhibit airway inflammation in a murine model of asthma: in vivo evidence for an NF-kappaB-independent effect. *Br J Pharmacol* **139**:169-171.
- Toussaint R, Warkola M, Molin L, and Ranby A (2003) Constitutive CYP1B1 mRNA expression in human blood mononuclear cells in relation to gender, genotype, and environmental factors. *Environ Res* **90**:138-144.
- Wojcik-Szost S, Miesien JB, Samara A, Buczynska H, Miazek H, and Pilbur M (2007) Peripheral blood mononuclear cells (PBMC): a possible model for studying endovascular biology systems. *Chin Chem Lett* **38**:1154-1158.
- Wolsey AR, D'Amico M, Poppe SJ, Alizadeh AA, Tokhachi K, Bohman DA, and Brown PD (2005) Linkage disequilibrium and variable number of repeat expansion polymers in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:1896-1901.
- Wuori-Dorland V, Rausch AM, Mandylo V, Linnas MW, Hedlund DG, and Norstrom RP (2005) Atorvastatin affects leukocyte gene expression in dyslipidemic patients: in vivo regulation of inflammatory, inflammatory and apoptosis. *J Ther Biol* **35**:577-585.
- Yamamoto J, Imai K, Nakayama H, Hiki S, Sakai K, Kato N, Itoh T, Riji Y, and Hara T (2000) Chromatin-specific expression of aryl hydrocarbon receptor response gene in hematopoietic tissue-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. *Life Sci* **67**:329-338.

**Address correspondence to:** Gérard Sirot, Faculté de Pharmacie, Equipe Interim "Génétique Cardiovasculaire" CIC 9501, 30 rue Lionne, 54000 Nancy, France. E-mail: gerald.sirot@pharma.uhp-nancy.fr

## Publication No8

### **Pharmacogenomics and cardiovascular drugs : need for integrated biological system with phenotypes and proteomic markers.**

Gérard Siest, Jean-Brice Marteau, Sandy Maumus, Hind Berrahmoune, Elise Jeannesson, Anastasia Samara, Anne-Marie Batt, Sophie Visvikis-Siest

Eur J Pharmacol, 2005, 527: 1-22

La médecine personnalisée est basée sur une meilleure connaissance de la variabilité biologique, en prenant en compte l'importance de la génétique. Quant à un effort d'identifier les gènes impliqués ainsi que leurs produits dans la réponse différentielle aux médicaments cardiovasculaires, nous proposons une stratégie de 5 étapes : 1) les gènes et phénotypes liés à la pharmacocinétique, 2) les gènes et produits (cibles thérapeutiques) liés à la pharmacodynamie, 3) les maladies et risques cardiovasculaires vus sous l'angle des cycles métaboliques spécifiques en cause, 4) les variations physiologiques des gènes et protéines précédemment identifiées et, 5) l'influence de l'environnement.

Après avoir pris comme exemple, des gènes impliqués dans le métabolisme des médicaments, nous nous intéresserons aux statines, considérées comme étant des médicaments très importants d'un point de vue de santé publique. Il existe une grande variabilité de la réponse à ces médicaments, notamment à cause de plusieurs polymorphismes dans les gènes cibles de ces hypolipémiants. Nous donnerons ici, des exemples des polymorphismes de l'ApoE influençant l'effet hypolipémiant des statines. Ces médicaments ont des effets pliotropiques et diminuent les taux des marqueurs d'inflammation. Ceci souligne le besoin de distinguer les phénotypes cliniques des maladies en fonction des voies métaboliques spécifiques, et par conséquent de classer différemment les maladies ainsi que les gènes liés à elles. L'hypertension est un bon exemple de phénotype clinique pour lequel les approches thérapeutiques pourraient tenir compte des polymorphismes et des marqueurs protéiques de cette pathologie.

Les variations des produits des gènes sont influencées par les facteurs constitutionnels et environnementaux tels que l'âge, l'indice de masse corporelle, l'obésité, la consommation d'alcool et de cigarettes, et le régime alimentaire. D'ailleurs, ces facteurs sont les premières cibles d'intervention thérapeutique pour les maladies cardiovasculaires. A chacune des cinq étapes de la stratégie pharmacogénomique, nous avons, en plus de l'information génétique, besoin d'utiliser les informations disponibles au sujet des peptides, protéines et métabolites, qui sont généralement les produits des gènes. Une approche de type profil est nécessaire et utile en génomique mais aussi en protéomique.

En conclusion, le nombre important de données va plus que jamais rendre nécessaire une interprétation intégrée des variations de l'ADN, de l'ARN messenger ainsi que des protéines au niveau individuel et de la population générale pour espérer, d'une façon cliniquement simple, adapter un médicament à chaque individu.

Review

## Pharmacogenomics and cardiovascular drugs: Need for integrated biological system with phenotypes and proteomic markers

Gérard Siest\*, Jean-Brice Marteau, Sandy Maumus, Hind Berrahmoune, Elise Jeannesson, Anastasia Samara, Anne-Marie Batt, Sophie Visvikis-Siest

*Inserm U525 Equipe 4, Université Henri Poincaré Nancy 1, 30 rue Lionnais Faculté de Pharmacie, 54000 Nancy, France*

Received 25 July 2005; received in revised form 23 September 2005; accepted 5 October 2005

### Abstract

Personalized medicine is based on a better knowledge of biological variability, considering the important part due to genetics. When trying to identify involved genes and their products in differential cardiovascular drug responses, a five-step strategy is to be followed:

- (1) Pharmacokinetic-related genes and phenotypes
- (2) Pharmacodynamic targets, genes and products
- (3) Cardiovascular diseases and risks depending on specific or large metabolic cycles
- (4) Physiological variations of previously identified genes and proteins
- (5) Environment influences on them

After summarizing the most well-known genes involved in drug metabolism, we will take as example of drugs, the statins, considered as very important drugs from a Public-Health standpoint, but also for economical reasons. These drugs respond differently in human depending on multiple polymorphisms. We will give examples with common ApoE polymorphisms influencing the hypolipemic effects of statins. These drugs also have pleiotropic effects and decrease inflammatory markers. This illustrates the need to separate clinical diseases phenotypes in specific metabolic pathways, which could propose other classifications, of diseases and related genes.

Hypertension is also a good example of clinical phenotype which should be followed after various therapeutic approaches by genes polymorphisms and proteins markers.

Gene products are under clear environmental expression variations such as age, body mass index and obesity, alcohol, tobacco and dietary interventions which are the first therapeutic actions taken in cardiovascular diseases. But at each of the five steps, within a pharmacoproteomic strategy, we also need to use available information from peptides, proteins and metabolites, which usually are the gene products. A profiling approach, i.e., dealing with genomics, but now also with proteomics, is to be used.

In conclusion, the profiling, as well as the large amount of data, will more than before render necessary an organized interpretation of DNA, RNA as well as proteins variations, both at individual and population level.

- Cluster analyses;
- Multidimensional approaches;
- Pathways and metabolomics;
- Biological systems analyses.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** ABC transporter; Antiobesity drug; Cardiovascular disease; Cardiovascular drug; Drug-metabolizing enzyme; Drug target; Inflammation; Nutrigenetics; Nutrigenomics; Obesity; Pharmacodynamic; Pharmacogenetic; Statin

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 682170; fax: +33 3 321322.

E-mail address: [gerard.siest@pharma.uhp-nancy.fr](mailto:gerard.siest@pharma.uhp-nancy.fr) (G. Siest).

## Contents

1. Introduction	2
2. Pharmacokinetics	3
2.1. Genotypes	3
2.1.1. Phase I drug-metabolizing enzymes: cytochromes P450	3
2.1.2. Phase II drug-metabolizing enzymes	3
2.1.3. Phase III drug transporters	3
2.1.4. DNA chips	5
2.2. Phenotypes	5
2.2.1. Proteins	5
2.2.2. Substrates	5
3. Pharmacodynamics. Example of statins	7
3.1. Target genes, or the study of the genotype influence on treatment response	8
3.1.1. Specific target genes	8
3.1.2. Pleiotropic target genes	9
3.2. Gene products	9
3.2.1. Lipoproteins	9
3.2.2. Modified proteins	9
3.2.3. Protein assessed for therapeutic surveillance	9
3.2.4. Integrated phenotypes derived from imaging studies	10
4. Hypertension: genes and protein markers	10
4.1. Polymorphisms, metabolites and antihypertensive drugs	10
4.2. Aldosterone-to-renin ratio	12
4.3. Inflammation and hypertension	12
5. Inflammation, a general physiopathological involvement	12
6. Diet, body mass index and obesity. Example of gene–environment effects in cardiovascular events	14
7. Pharmacoproteomics as a future	16
References	18

## 1. Introduction

We have recently proposed a five-step pharmacogenomic approach (Siest et al., 2004) for a new cardiovascular drug, successively taking into account the genes involved in:

- pharmacokinetics (absorption, distribution, metabolism, transport),
- pharmacodynamic phase
- specific cardiovascular disorders and related metabolic pathways deviations
- biological variability in genes responses including their physiological regulation, and
- environmental effects.

However, given the current existing pharmacogenomic tools and the development of the pharmacoproteomic field, a complete strategy needs the integration of gene products measured in laboratory medicine. These biomarkers could be the metabolites resulting from drug metabolizing enzymes activities, clusters of peptides related to an inflammatory process, specific proteins or the metabolites resulting from environmental effects. With the extraordinary amount of information which could now be given by the proteins separated from plasma by proteomic devices (HUPO, Van Ommen et al., 2004) (Fathi et al., 2003), we now have to add all these data to the genomic and transcriptomic ones. One DNA molecule is

capable in producing a hundred different protein isoforms (Fig. 1).

Biological systems are then the only way to put all this information in a comprehensive and clinically usable set of data (Kitano, 2002). The expression obtained from yeasts will be very useful in preparing a similar approach in human (Ideker et al., 2001; Hall et al., 2004). The genes and their products have to be linked together in metabolic cycle networks which will then be linked to disease entities. In the cardiovascular field, we have e.g. to consider drug metabolism, lipid and lipoproteins metabolism, homocysteine metabolic cycle, renin–angiotensin system, insulin-regulated genes, inflammation markers under expression by specific transcription factors, etc. The gene products are “better” phenotypes than the non-clearly defined disease phenotypes (Bougneres, 2003). We need to organize in this direction the genomic and proteomic information useful for cardiovascular drugs, and to add simultaneously some integrated phenotypes derived from organ imaging, such as carotid intima media thickness or more recent and sophisticated methods.

In addition to our general previous reviews (Siest et al., 2003; Siest et al., 2004), we wrote more specialized ones on pharmacogenomics of antihypertensive drugs (Marreau et al., 2005), hypolipemic drugs (Maumus et al., in preparation) and a review on biological variations of inflammatory markers, cytokines (Berrahmoune et al., 2005).

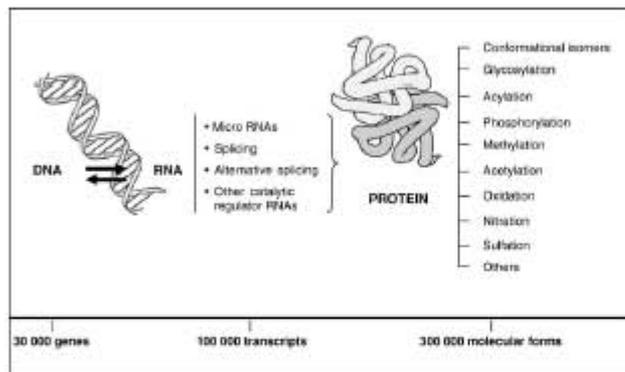


Fig. 1. Increase of information from DNA to RNA and proteins.

We will follow here the same five-point strategy: we have chosen after the drug-metabolizing enzymes involved in cardiovascular drugs metabolism, statins and corresponding pharmacological targets, hypertension-related genes and drugs, inflammation genes and related proteins and peptides, overweight and obesity problems affecting many cardiovascular drug effects. Finally, the future of pharmacoproteomic approach will be discussed.

## 2. Pharmacokinetics

A large number of cardiovascular drugs are lipophilic and influenced by the four pharmacokinetic processes: absorption, distribution, metabolism, and elimination. Drug-metabolizing enzymes act during either of the two first phases of substrate metabolism: during the functionalization phase (e.g. CYP450) or during the conjugation phase (e.g. glutathione *S*-transferase (GST)). The product is then taken by a transporter (e.g. ATP-binding cassette (ABC) transporters) which eliminates it definitely.

### 2.1. Genotypes

All genes of these processes are polymorphic. Some examples are presented for phase I (cytochromes P450) and phase II (conjugating enzymes) drug-metabolizing enzymes and for phase III drug transporters. For more details, see our last review on pharmacogenomics and drug response in cardiovascular disorders (Siest et al., 2004).

#### 2.1.1. Phase I drug-metabolizing enzymes: cytochromes P450

There are about 60 distinct cytochrome P450 (CYP) genes in humans. An up-to-date list of CYP gene polymorphisms can be obtained online (Homepage of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee; <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>). Interestingly, although many of these CYP450 have the capacity to metabolize drugs, the majority of CYP-mediated drug metabolism in humans is catalyzed by the CYP enzyme subfamilies CYP2D6, CYP3A, and CYP2C. Some of

these pathways are shown to have consequences on pharmacokinetic of the concerned drug. CYP2D6 is not a major CYP enzyme in terms of quantity in the liver. However, it metabolizes one-quarter of all drugs, and about 40 of them are used in the treatment of cardiovascular diseases. Individuals with genetically determined low or no CYP2D6 enzyme activity are referred to as poor metabolizers, whereas individuals with fully functional enzyme are known as extensive metabolizers. Poor metabolizers are at increased risk for excessive or prolonged therapeutic effect or toxicity, while ultra-rapid metabolizers may not achieve sufficient therapeutic levels of the drug to be efficient. For example, the clearance of the  $\beta$ -blocker metoprolol is decreased in poor metabolizers, leading to risk of hypotension or bradycardia. About 50 cardiovascular drugs like calcium channel blockers or statins are metabolized by CYP3A family. In addition, about 30 are metabolized by CYP2C family, like some anticoagulants antidiabetics and some non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (Siest et al., 2004).

#### 2.1.2. Phase II drug-metabolizing enzymes

Genetic polymorphisms have been described in many phase II drug-metabolizing enzymes. However, they seem to be of less importance to the pharmacogenomics of cardiovascular drugs. The exception may be the glutathione *S*-transferase enzymes which are candidate genes for the modulation of cardiovascular risks. In fact, GSTs are involved in protection of vascular tissue against oxidative stress and cellular damages induced by various pro-atherogenic agents. Inflammation and oxidative stress are two phenomena contributing to cardiovascular pathologies such as atherosclerosis. GSTM1 and GSTT1 polymorphisms could modulate inflammatory risks (Habdous et al., 2004). According to these authors, GSTM1\*0 null allele and GSTT1\*1 functional allele were associated with increased risk of coronary heart diseases in smokers and GSTT1\*1 was associated with increased risk of lower extremity arterial disease.

#### 2.1.3. Phase III drug transporters

Enzymatic metabolism is not the sole determinant of drug pharmacokinetics. Drug transporters, which can be subdivided

Table 1  
List of human ABC (ATP-binding cassette) transporters, their functions and diseases caused by ABC genes

Transporter	Functions	Diseases
ABCA1	Cholesterol and phospholipids transport Hypolipidemic drugs: induction (e.g. Clofibrate, Guan et al., 2003) or inhibition (e.g. statins, Audo et al., 2004)	Tangier disease (homozygous) HDL deficiency (heterozygous) Increased risk of atherosclerosis
ABCA2	Sterols transport (brain, macrophages) Cholesterol responsive gene	Drug resistance Links to Alzheimer's disease?
ABCA6, A10	Functions in macrophage lipid homeostasis?	
ABCA7	Phospholipids and cholesterol transport	Sjogren's syndrome?
ABCA9	Functions in macrophage lipid homeostasis and monocyte differentiation?	
ABCB1	Cholesterol and phospholipids transport (minor pathway) Hydrophobic xenobiotic compounds transport Hypolipidemic drugs: inhibition (e.g. fenofibrate and some statins (Richard et al., 2004))	Anticancer drugs resistance Modification of some cardiovascular drugs activity
ABCB4 (MDR3)	Bile-acid transport Secretion of phosphatidylcholine in bile	Progressive familial intrahepatic cholestasis-3 Cholestasis of pregnancy
ABCB7	Iron transport	X-linked sideroblastic anemia and anaemia
ABCB11 (BSEP)	Bile-acid transport	Progressive familial intrahepatic cholestasis-2
ABCC1	Leukotrienes transport	Anticancer drugs resistance
ABCC2 (MRP2)	Bile-acid transport	Anticancer drugs resistance Dubin-Johnson Syndrome
ABCC4	Nucleosides transport Prostaglandins transport	Resistance to antiviral and anticancer drugs
ABCC6	Unknown	Pseudoxanthoma elasticum Increased risk of premature coronary artery disease (Tap et al., 2002)
ABCC8 (SUR1)	ATP-sensitive potassium channel subunit in pancreatic cells: modulator of insulin release	Persistent hyperinsulinemic hypoglycaemia of infancy Non-insulin-dependent diabetes mellitus
ABCC9	ATP-sensitive potassium channel subunit in cardiac, skeletal, and vascular and non-vascular smooth muscle	Susceptibility to dilated cardiomyopathy (Biesengaaber et al., 2004)
ABCC10	Lipophilic anions transporter (e.g. estradiol 17 $\beta$ - <i>o</i> -glucuronide)	Anticancer drug resistance (taxanes, Hopper-Borge et al., 2004)
ABCD1	Very long chain fatty acids transport	Adrenoleukodystrophy
ABCG1	Macrophage cholesterol and phospholipid export (Klucken et al., 2000), ABCA1-independent pathway Induction by sterols (Schmitz et al., 2001) and inhibition by some statins (Wong et al., 2004)	–
ABCG4	Promote cholesterol efflux (minor in macrophages)	–

Table 1 (continued)

Transporter	Functions	Diseases
ABCG5, G8	Regulation of intestinal sterols (cholesterol and plant sterols) absorption and hepatic sterols output Induction by sterols (Schmitz et al., 2001)	Sitosterolemia Variation in cholesterol absorption efficiency depending on polymorphisms

Compiled from Stefkova et al., 2004; Eferth, 2003; Bont and Efferink, 2002; the HGNC Gene Family Nomenclature (<http://www.gene.ac.uk/nomenclature/gene-family/abc.html#table1>) and Michael Müller ([http://mutigene.4ic.com/huma\\_nabc.htm](http://mutigene.4ic.com/huma_nabc.htm)).

ABC: ATP-binding cassette; BSEP: bile salt transporter; MDR: multidrug resistance; MRP: multi-drug-resistant protein.

into uptake and efflux systems, have received increased attention for their role in determining drug disposition, intestinal absorption or renal elimination. Among these systems, we can find the ATP-binding cassette (ABC) transporters subfamily which contains nearly 50 different transporters.

The analysis of ABC transporters expression profiles is of great interest in monitoring drug effects. In fact, ABC transporters are involved in many physiologic processes, such as lipid transport, sterol homeostasis, immune mechanisms and drug transport. Furthermore, they can cause various human inherited diseases.

Many drugs have been shown to be substrates, inducers or inhibitors of drug transporters. For example, ABCB1, also known as P-glycoprotein, transports about 30 cardiovascular drugs like calcium channel blockers and cardiotonics, e.g. digoxin (Siest et al., 2004). Polymorphisms in the gene coding for this protein have been associated with a higher risk of toxicity of digoxin. Moreover, statins may be substrates or inhibitors of these transporters. Mutations in ABC transporter genes and in phenomena, such as induction, inhibition or interaction, can lead to changes in pharmacokinetic cardiovascular drugs and thus to potential interactions (e.g. the calcium channel inhibitor mibefradil, withdrawn from the market due to serious adverse effects, is both a substrate and an inhibitor of CYP3A and ABCB1). ABC transporters also transport endogenous products, such as sterols, biliary acids or phospholipids, which are known to be potentially involved in cardiovascular pathologies. It is important to note that concomitant medications and many other environmental factors such as diet, gender, and overall health, can inhibit or induce enzyme or transporters activity.

Table 1 shows a list of the human ABC transporters which are interesting in cardiovascular field, in their functions and diseases they may be implicated in.

Polymorphic activity of metabolism or drug transport proteins is of great interest in the exploration of adverse drug reactions, especially during drug development. Indeed, if an isoform is involved in the metabolism of a new drug candidate, health authorities may request in vivo information on its metabolic pathway(s). If genetic variation in metabolism is reported to be of in vivo clinical significance, then this would alter the

course of drug development and this knowledge could be translated into clinical practice (Pirmohamed and Park, 2003).

### 2.1.4. DNA chips

Outside phenotyping, genotyping by polymerase chain reaction (PCR) methods are used to predict the metabolizer status. A specific DNA chip is now on the market: Roche Diagnostics' AmpliChip™ CYP450 Genotyping Test. The AmpliChip™ is the first in its class to be cleared by the FDA (December 2004) for the analysis of genes that influence drug metabolism. This test, which is powered by Affymetrix microarray technology, analyses a patient's Cytochrome P450 2D6 and 2C19 genotypes (29 polymorphisms and mutations for the *CYP2D6* gene and 2 polymorphisms for the *CYP2C19* gene) from genomic DNA extracted from blood sample. Now, more CYP450 mutations need to be added to this microarray.

Other microarrays are home-made in different laboratories depending on their working thematic. For example, Jankson et al. (2003) constructed the ABCR400 microarray, a comprehensive mutation detection system for ABCR (ATP-binding transporter retina-specific)-associated retinopathies. This screening tool contains all currently known disease-associated genetic variants and many common polymorphisms of the *ABCR* gene. The ABCR400 microarray offers a prototype diagnostic tool to advance knowledge in ABCR-associated pathology and in ophthalmic genetics generally.

### 2.2. Phenotypes

If it is not possible to measure directly the protein or the RNA, proteic activity can be estimated by dosing one of the exo/endogenous substrates of the enzyme/transporter in biological liquids. Thus, as an alternative to genotyping methods, the metabolizer status can be safely determined, using a specific substrate having a large therapeutic index: for example, dextromethorphan or debrisoquine for CYP2D6. Estradiol 17- $\beta$ -D-glucuronide is a prototypical glucuronate conjugate which is selected as a model test compounds. Like the glutathione conjugate, leukotriene C4 (LTC4), it can be used radiolabeled to study the transport capacity of the transporters of the multidrug resistance family (Chen et al., 2003).

The cytochromes P450 are localized in membranes and these proteins cannot be measured readily in plasma. Sulfo-transferases and some glutathione-S-transferases are measurable in blood. Overall, measurements of drugs or endogenous metabolites are necessary to evaluate the consequences of the genetic polymorphisms.

Nevertheless, blood cells could sometimes be used to analyse mRNA and proteins corresponding to some enzymes/transporters: CYP2E1 and CYP4B1 mRNA levels in peripheral blood leucocytes reflect activity in the liver and could be measured by Reverse transcriptase (RT)-PCR method (Raucy et al., 2004).

DNA microarray technique has the sensitivity and the selectivity for applications in pharmaceutical sciences and for characterizing the expression of cytochrome P450 enzyme

mRNAs, other drug-metabolizing enzyme mRNAs, and transporter mRNAs in a variety of clinical samples. The results obtained are corroborated by quantitative real-time reverse transcription-PCR and are generally always confirmed. As the microarray allows the determination of the expression profile of many ABC transporters in a single hybridization experiment, it may be useful as a diagnostic tool to detect drug resistance in clinical samples and for monitoring expression profiles in clinical biopsies and their correlation to clinical treatment. Many ABC transporters microarrays are actually developed. Unfortunately, they are essentially developed in cancer field and the concerned ABC transporters and polymorphisms are not always the ones of interest in the cardiovascular field.

### 2.2.1. Proteins

Western Blot could be used to quantify some CYP450 or transporters. For example, some anti ABCA1 and Anti ABCB1 antibodies are commercialized. Some others can be created when necessary. However, it is difficult to determine if the protein quantity is representative of the activity.

### 2.2.2. Substrates

The 6 $\beta$ -hydroxycortisol ratio determination is thus validated for CYP3A4 induction survey in an individual being its own control, while it is still under debate for inhibition survey. This test may not be used as reflecting the basal level of expression of CYP3A4. In fact, some limitations appeared in the use of 6 $\beta$ -hydroxycortisol ratio to measure CYP3A4 activity. Cortisol is a substrate for both CYP3A4 and CYP3A5. The contribution of CYP3A5 (expressed abundantly in the liver and small intestine, but only in 30% of white subjects and 70% of blacks) on the metabolism of 6 $\beta$ -hydroxycortisol is poorly understood. CYP3A4 and CYP3A5 are highly polymorphic with some alleles (e.g. CYP3A5\*3) coding for an enzyme with severely decreased activity. The genetic component is thus likely to contribute significantly to the variability of the 6 $\beta$ -hydroxycortisol ratio and such variability is used to evaluate CYP3A induction or inhibition in a given ethnic population (Yin et al., 2004).

The efficiency of membrane transporters can also be assessed by evaluating the ability to accumulate and to extrude exogenous substrates. For example, calcin is already known to be transported by the multi-drug resistance system and in particular by multi-drug resistant protein (MRP) 1 and P-glycoprotein. Exogenous substrates can also be used to detect potent inhibitors, which may also be potent substrates, of a transporter. As an example, the ABCB1 fluorescent substrate, rhodamine 123, is commonly used to investigate the activity of P-glycoprotein inhibitors which affect the uptake of rhodamine 123.

As they are easily available in biological liquids, endogenous substrates are more interesting than exogenous substrates. Table 2 presents the known endogenous substrates and metabolites of various enzymes and ABC transporters of particular interest in cardiovascular field. Depending on their localization and on their capacities to be substrates of others proteins or to

**Table 2**  
Endogenous substrates as potential markers of human cytochrome P450 (CYP), UDP-galactose (UGT) transporters and ABC (ATP-binding cassette) transporters

Proteins	Phenotypes (endogenous substrates, metabolites)	References
CYP1A1	Acid anichidonic	
CYP3A4	6 $\beta$ -hydroxy cortisol/cortisol (urine; interest+++ (e.g. monitor CYP3A4 induction))	
CYP7A1	Synthesis of bile salts from cholesterol in the liver	
UGT1A1	Bilirubin, estrogens (estradiol, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol)	
UGT1A3	Leukotriene B4	
UGT2B4	Bile acids, catechol, estrogens	
UGT2B7	Androgens, biliary acids, estrogens, leukotriene B4, linoleic acid, pregnanes, retinoic acids	
UGT2B10, 2B11	13-Hydroxyoctadecadienoic acid hydroxy-cisocostetenoic	
UGT2B15	Androgens (dihydrotestosterone), 12-hydroxy-cisostetraenoic	
UGT2B17	13-hydroxyoctadecadienoic acid	
UGT2B28	Steroids, bile acids	
ABCA1	Unesterified cholesterol (interest++, plasma) Phospholipids (mostly phosphatidylcholine) Vitamin E, apolipoprotein A1 (not substrate, interest +++, plasma)	Oram et al., 2001 Tregouet et al., 2004
ABCA6, A8, A9, A10	Unknown	
ABCA7	Cholesterol, phospholipids	
ABCB1 (MDR1)	Cholesterol Phospholipids (phosphatidylcholine) Sphingomyelin Platelet-activating factor (PAF) Sex-steroid hormones like estradiol Flavonoids Aldosterone, prednisolone, glucocorticosteroid Bioactive peptides such as somatostatin and substance P	Romiti et al., 2002 Romiti et al., 2002 Romiti et al., 2002 Romiti et al., 2002 Romiti et al., 2002 Bont and Elkink, 2002 Uchiyama-Kokubu et al., 2004
ABCB4	Bile acids, phospholipids	
ABCB11 (BSEP)	Bile acids	
ABCC1 (MRP1)	Conjugates of steroid hormones, i.e. estradiol 17- $\beta$ - <i>n</i> -glucuronide, DHEAs Glutathione-conjugated leukotrienes	Zeker et al., 2003 Reid et al., 2003
ABCC2 (MRP2)	Bilirubin-glucuronides Estradiol 17- $\beta$ - <i>n</i> -glucuronide Glutathione-conjugated leukotrienes (Leukotriene C4)	Bont et al., 2000 Zeker et al., 2003 Reid et al., 2003
ABCC3 (MRP3)	Glutathione and glucuronate conjugates Monoanionic bile acid	Chen et al., 2003
ABCC4 (MRP4)	Conjugates of steroid hormones, i.e. estradiol 17- $\beta$ - <i>n</i> -glucuronide, DHEAs Bile acids PGE1 and PGE2 and PGE2 $\alpha$ , PGE1 $\alpha$ .	Zeker et al., 2003 Reid et al., 2003

**Table 2 (continued)**

Proteins	Phenotypes (endogenous substrates, metabolites)	References
	and thiamoxane B2 presumably substrates, (NSAIDs: inhibitory effect)	
ABCC6 (MRP6)	Glutathione conjugate Desmosines (not substrates, markers of elastin degradation, urine and plasma)	Chen et al., 2003 Annovazzi et al., 2004
	Sulfated glycosaminoglycans (not substrates, urine)	Maocari et al., 2003
ABCC10	Estradiol 17- $\beta$ - <i>n</i> -glucuronide	Chen et al., 2003
ABCG1 (White1, ABC8)	Cholesterol and phospholipids	Klucken et al., 2000
ABCG2 (BCRP)	Sulfated estrogens Phytoestrogens/flavonoids	Imai et al., 2004
ABCG5	Plant sterols (+/- plasma) e.g., campesterol and sitosterol	Sudhop and von Bergmann, 2004
ABCG8	Ratio plant sterols to cholesterol? Serum cholesterol-to-cholesterol ratio: surrogate marker of cholesterol absorption efficiency Cholesterol precursor, e.g. lanosterol, desmosterol, cholesterol Cholesterol Biliary acids	Gylling et al., 2004

DHEA: dihydro-epi-androsterone; MRP: multi-drug resistant protein; NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drug; PG: prostaglandin.

Interest ++: of a great interest.

Interest +++: of a very great interest.

be influenced by multiple polymorphic genes, some of these phenotypes might be used as potent markers for an enzyme/transporter activity. Thus, they could be measured in biological products like plasma or urines, reference values could then be established and the function of the enzyme/transporter evaluated. However, it is difficult to find a substrate with enough specificity for a protein/transporter to use it like a marker of the protein activity.

6 $\beta$ -Hydroxycortisol urinary excretion was, for a long time, considered as a marker of induction and, more recently, of drug inhibition in humans (Galteau and Shamsa, 2003). But its specificity is still under debate. Most authors consider that 6 $\beta$ -hydroxycortisol ratio is a useful non-invasive test to evaluate inducing properties of drugs towards CYP3A4. The great advantage of this test is that there is no drug to be administered, as cortisol and 6 $\beta$ -hydroxycortisol are natural metabolites.

To our knowledge, none of the transporter substrates are used in everyday practice to measure activity. However, in research laboratories, some substrates are often used, like estradiol 17- $\beta$ -glucuronide. Dosage methods are numerous, such as mass spectrometry for prostaglandins.

ABCB1 is well known because of its involvement in drug (in particular, anticancer drugs) resistance. It can also be implicated in modification of pharmacokinetic of cardiovascular drugs transport as it transports some antiarrhythmics, antihypertensives, cardiotonics or hypolipemics. Its physiological substrates are phospholipids and cholesterol. However, it is a minor pathway in the whole transport of these physiologic substrates.

Quantification of ABCB1 is thus interesting in many studies related to monitoring of drug treatment and of drug interactions with CYP3A substrates for example.

MRPs share overlapping substrate specificity despite different patterns of tissue distribution, localization in polarized cells and protein size. A common feature of MRPs is that they transport a wide variety of organic anions and compounds that are conjugated with sulfate, glucuronate, or glutathione (Zeleer et al., 2003). The oestradiol metabolite oestradiol 17- $\beta$ -D-glucuronide (E17 $\beta$ G) is a prototypical glucuronate conjugate which is selected as a model test compound to determine the capacity of a multidrug resistance family transporter to be a lipophilic anion pump and a component of the energy-dependent efflux system involved in the cellular extrusion of lipophilic compounds that are metabolized by the covalent attachment of bulky anionic moieties (Chen et al., 2003). This organic anion, which is often used to study transport by MRPs, is transported by MRP1 $\pm$ 4 with comparable affinities (Zeleer et al., 2003). However, this substrate can be similarly metabolized by a family of transporters. For example, oestradiol 17- $\beta$ -D-

glucuronide is not really specific as it is transported by all the multidrug resistance. So, we understand that it is difficult to find a specific endogenous marker (substrate or metabolite) for an ABC transporter. When studying phenotype, we cannot overcome the potential influence of another gene. Thus, it will be interesting to consider both the genotype and phenotype of a drug transporter while studying its expression.

### 3. Pharmacodynamics. Example of statins

In the context of pharmacogenomics and pharmacoproteomics, the evaluation of variations in gene sequence (genetic polymorphisms) and in gene products (concentrations and/or activities) of pharmacological targets is a task important to achieve. There are several pharmacological targets including receptors, enzymes, ion channels, lipoproteins, coagulation factors and signal transduction pathways. These targets may present variations within their gene sequence (e.g. single nucleotide polymorphisms or SNPs), that can alter the effect of the administered drug. We previously reviewed the main described

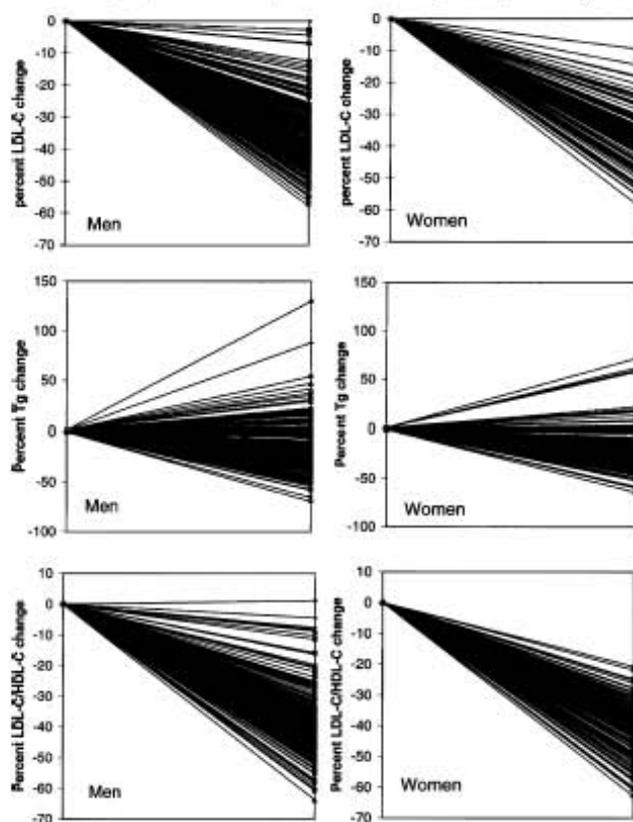


Fig. 2. Individual LDL-cholesterol, triglycerides, and HDL-cholesterol percent response to 10 mg per day of atorvastatin (from Pedro-Botet et al., 2001; with permission).

polymorphisms influencing pharmacodynamics of cardiovascular drugs (Siest et al., 2004). These polymorphisms concern the following genes:  $\alpha$ -adducin (Gly460Trp), *angiotensinogen* (Met235Thr), *angiotensin-II receptor type 1* (A1166C), *angiotensin-converting enzyme (ACE)* (insertion/deletion (I/D)), *cholesterol ester transfer protein (CETP)* (B1/B2), *apolipoprotein E (APOE)* (E2/E4), *factor V Leiden* (Arg506Gln), and the *glycoprotein IIIa (GPIIIa)* (P1<sup>132</sup>/P2 polymorphism) gene.

In order to illustrate the pharmacodynamic aspect of drug response variability in our current review, we chose the example of pharmacological targets of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase (HMG CoA reductase) inhibitors also called statins. An excellent example of the large range of drug responses induced by statins that can be found in individuals is given by the results of the study of Pedro-Botet et al. (2001) (Fig. 2). Their study investigated 328 men and women who participated in a multicentric, double-blind clinical trial and were treated by atorvastatin at the dosage of 10 mg/day. As shown in Fig. 2, the major part of individuals presented a mean percentage change in low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol, triglycerides and high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol relatively consistent. However, several patients showed a large interindividual variability that produced a broad range of response. Genetics contribution to the variability of drug disposition and effects is estimated to 20–95% (Evans and McL. ood, 2003).

Statins are metabolized by different P450 cytochromes, as well as phase II enzymes and their cellular transport is regulated by several transporters. Considering CYPs, 3A4, 3A5, 2C8, 2C9, and 2D6 have variations in their gene that can influence response to statin treatment. Candidate genes that are important to consider for ABC transporters are A1, G5, G8, B1, C2, MCT4, OATP2. According to Schmitz et al. (2001), *ABCG1* facilitates the translocation of phospholipids and cholesterol to the plasma membrane where ABCA1-facilitated efflux mechanisms are active in association with specialized lipid microdomains. Alternatively, *ABCG1* could participate in ABCA1-independent efflux pathways, for example, via apoE or passive diffusion mechanisms. Schmitz et al. (2001) propose that uptake of sterols (LXR ligands) and concomitant activation of the nuclear receptor pathway via LXR/RXR causes transcriptional induction of *ABCG1* and *ABCA1*. Statins regulate the LXR target genes, like *ABCA1* and *ABCG1* (Wong et al., 2004). They may down-regulate cholesterol efflux from non-loaded human macrophages by inhibiting synthesis of an oxysterol ligand for LXR.

More detailed information can be found in a review entirely dedicated to hypolipemic drugs (Maumus et al., submitted for publication). For this specific review, we focused on the effective pharmacological targets of these hypolipemics.

Statins act by affecting cholesterol synthesis, through the competitive inhibition of HMG-CoA reductase, the rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis. The resulting intracellular reduction of cholesterol concentration induces the activation of SREBP (sterol responsive element-binding proteins) processing proteins namely SCAP (SREBP cleavage activating protein), SP1 and SP2 (site-1 and site-2 proteases).

These proteins act synergistically to release the amino-terminal domain of SREBPs (SREBP-1 and -2) by proteolysis. The active domains are then transferred into the nucleus where they up-regulate several genes involved in cholesterol homeostasis, one of which being LDL-receptor gene (Brown and Goldstein, 1999). Recently, two more proteins, namely INSIG-1 and -2, were found to be involved in cholesterol homeostasis regulation by controlling SCAP activation according to local concentrations of cholesterol (Yang et al., 2002; Yabe et al., 2002). Statin therapy was also shown to induce an increase in HDL-cholesterol concentration via a PPAR- $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor alpha)-dependent mechanism (Martin et al., 2001; Schaefer et al., 1999; Gaw, 2003).

The therapeutic potential of statins goes further hypolipemic properties as shown by pleiotropic effects exerted by this drug class. Indeed, by altering isoprenylation which in turn induces the inhibition of small GTP-binding proteins Rho, Ras and Rac, statins are able to improve the endothelial function, to enhance the stability of atherosclerotic plaques, to decrease oxidative stress and inflammation, inhibit the thrombotic response, and to have beneficial effects on immune system (Liao and Laufs, 2005).

When considering Pharmacodynamics for integrative Pharmacogenomics studies, two major biological systems can be assessed, namely target genes (specific and pleiotropic ones), and gene products (lipoproteins, integrative metabolites and proteins assessed for therapeutic surveillance).

### 3.1. Target genes, or the study of the genotype influence on treatment response

#### 3.1.1. Specific target genes

By the term *target genes*, we refer to the genes which belong either to the mechanism of action or more generally to the metabolic pathway aimed by the drug. Therefore, in our example we will consider target genes of hypolipemic drugs, and more specifically target genes of statins. Here, we deal with genes of lipid pathway implicated directly/indirectly in the mechanism of action of statins.

In addition to genes that are classically described when talking about statins (for example *CETP* and *APOE* genes), recent genes have been recently reported to exhibit polymorphisms that influence the response to this class of drugs. A first list was given by Chasman et al. (2004) which we have tried to complete in a recent review (Maumus et al., in preparation). The list containing the candidate genes for pharmacogenomics of statin is shown in Table 3. The 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase gene (*HMGCR*) can be cited as an example of these recently reported polymorphisms. Recently, two common and tightly linked SNPs in the *HMGCR* gene (a A>T substitution at position 74726928 and a T>G substitution at position 74739571) were related to response to pravastatin treatment (Chasman et al., 2004). Individuals with a single copy of the minor allele of these SNPs had their overall efficacy for modifying total cholesterol concentration reduced of 22%. These effects were largely due to differences in LDL cholesterol: individuals heterozygous for the SNP experienced approximate

Table 3  
Candidate genes and their respective encoded proteins for an integrative study of the pharmacogenomics of statins

HUGO Gene Nomenclature of candidate genes involved in the lipid pathway (cholesterol synthesis, absorption, transport...) that may affect hypolipemic drugs efficacy by modifying lipid concentration regulation
HMGR (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase)
FDF1 (farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1, squalene synthase)
LPL (lipoprotein lipase)
HL/LIPC/LIPH (hepatic triglyceride lipase)
EL (endothelial lipase)
PPARA (peroxisome proliferator-activated receptor alpha)
APOA1 (apolipoprotein A-I)
APOA2 (apolipoprotein A-II)
APOC3 (apolipoprotein C-III)
APOA4 (apolipoprotein A-IV)
APO A1-C3-A4 cluster
APOA5 (apolipoprotein A-V)
APOB (apolipoprotein B)
APOE (apolipoprotein E)
Lp(a) (lipoprotein (a))
LCAT (lecithin cholesterol acyltransferase)
CETP (cholesteryl ester transfer protein)
FABP/FABP1 (fatty acid-binding protein)
LDLR (LDL receptor)
FATP (fatty acid transport protein)
SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein 1)
SREBP2 (sterol regulatory element-binding protein 2)
SRBI/CLA1
INSIG1 (insulin-induced gene 1)
INSIG2 (insulin-induced gene 2)
SCAP (SREBP cleavage activating protein)
S1P (site-1 protease)
S2P (site-2 protease)
LEPR (leptin receptor)
PCN1 (paroxonase 1)
ACAT/ACAT1 (mitochondrial acetyl-CoA acetyltransferase)
Candidate genes not involved in the lipid pathway
ACE (angiotensin-converting enzyme)
FGB ( $\beta$ -fibrinogen)
MMP3/STMY1 (matrix metalloproteinase 3, stromelysin 1)
GP IIIa (glycoprotein IIIa)
CD36/GP IIIb (CD36 antigen, glycoprotein 3b, fatty acid translocase)
ESR1 (estrogen receptor $\alpha$ )

19% smaller LDL-cholesterol reduction after pravastatin treatment. On the contrary, no significant difference was found between genotypes concerning the change in HDL-cholesterol with pravastatin. The differences observed in total cholesterol reduction by genotype were also true when studying men and women separately, even if these were more significant in men.

### 3.1.2. Pleiotropic target genes

These genes, which concern other metabolic pathway, have generally been proposed previously to be candidate to cardiovascular diseases. The pleiotropic genes which variations have been studied with statins are the angiotensin-converting enzyme (*ACE*) gene (Bray et al., 2001), the  $\beta$ -fibrinogen (*FGB*) gene (De Maat et al., 1998), the glycoprotein IIIa (*GP IIIa*) gene (Bray et al., 2001), the stromelysin-1 (*MMP3*) gene (De Maat et al., 1999), the *CD36* gene (Nakamura et al., 2004), and the estrogen receptor alpha (*ESR1*) gene (Kajinami et al., 2005).

A recent example of the pleiotropic target genes that can alter the lipid response to statin was given by Kajinami et al. (2005). The *ESR1* *PvuII*(-)/*XbaI*(+) haplotype was significantly and independently associated with a greater HDL-cholesterol raising in women, but not in men, in 338 hypercholesterolemic patients treated by atorvastatin. Thus, the estrogen receptor-mediated pathway may play a role in HDL-cholesterol response to statin treatment (Kajinami et al., 2005).

### 3.2. Gene products

Here we describe products deriving from the target genes which can be assessed as proteomic markers. In the case of statins, the first gene products to study are unequivocally lipids. An absolute list of the gene products that would be interesting to study in the case of statins is given in Table 3. In clinical practice, the first gene products to study are unequivocally lipids. However, in addition to the classical determination of triglycerides, total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol levels, the assessment of other lipoproteins plus apolipoproteins could be done.

#### 3.2.1. Lipoproteins

Lipoprotein and apolipoprotein assessments can be managed to follow the efficacy of a given treatment. The lipoproteins that could be surveyed are HDL particles, LDL particles, intermediate-density lipoprotein (IDL) particles, very-low density lipoprotein (VLDL) particles, and chylomicrons.

Of course, the assessment of these various constituents can bring valuable information only if considering that the proteins in question may present biological variations (as well as genetic ones). Thus, thanks to the STANISLAS cohort study (Siest et al., 1998; Mansour-Chemaly et al., 2002), we were able to propose reference values for the proteins described above, taking into account biological and genetic variations (Siest et al., 1990; Vincent-Viry et al., 1998; Tilly et al., 2003).

#### 3.2.2. Modified proteins

Like glycated hemoglobin in diabetes survey, circulating oxidized proteins and in particular oxidized LDL (Ox-LDL) could serve as biomarkers of exposition in hypercholesterolemia management, especially for surveying statin-treated patients. Elevated levels of plasma Ox-LDL were associated with the existence of coronary heart disease (Toshima et al., 2000) and the severity of acute coronary syndromes (Ehara et al., 2001). Fluvastatin has radical scavenging activity and is effective in the oxidative modification of LDL-cholesterol (Hussein et al., 1997; Suzumura et al., 1999). Recently, Inami and coworkers have shown for the first time that the level of circulating Ox-LDL was significantly decreased by statin treatment. Additionally, fluvastatin was more effective than pravastatin with regard to Ox-LDL decrease (Inami et al., 2004).

#### 3.2.3. Protein assessed for therapeutic surveillance

These biomarkers are currently used for surveying drug side effects. Statins are a good example to illustrate this part. Indeed,

in some cases statins can cause elevation of creatine phosphokinase (CPK) which signs the appearance of muscular lysis (rhabdomyolysis), the major side effects caused by statins. CPK are currently surveyed in statin treatment. The second major side effect caused by statins is an alteration of the hepatic function, which is surveyed by the assessment of transaminases levels. Transaminases control is imperative at least once in the three months following the beginning of treatment.

The mechanism by which statins induce increase in CPK levels has remained unclear for a long time. Recently, it was suggested that the modulation of isoprenoid-dependant processes may be involved in the pathophysiology of statin-related myopathy (Schmitz and Drobnik, 2003).

The first quality required for a biomarker checking that the treatment is evolving without adverse drug effects is to be easily assessed in routine, because the dosage concerns a great part of patients treated by the drug and because the assessment must be done regularly. Although very useful in clinical practice, one drawback of CPK is their lack of specificity due to their high sensitivity to physical activity and their great interindividual variability.

### 3.2.4. Integrated phenotypes derived from imaging studies

The first stage in atherosclerotic lesion formation is a thickening of the intima that results from proliferation of smooth muscle cells. Measurement of carotid intima-media thickness (IMT) by B-mode ultrasound is a well-validated procedure of tracking atherosclerosis progression and detecting early lesions. In their review, Grobbee and Bots examine the evidence for imaging studies for the efficacy of statins in slowing atherosclerosis progression and promoting regression of disease (Grobbee and Bots, 2004). These authors summarize the effects of statin therapy on the progression of atherosclerosis which have been examined in several clinical trials using vascular image techniques. Among their conclusions, they establish that carotid IMT determines plaque size directly rather than estimating plaque burden on the basis of luminal stenosis and, therefore, it may be a more sensitive technique for detecting subclinical atherosclerosis and lipid-rich plaques that are vulnerable to rupture.

At least 30% of patients with dyslipidemias are also hypertensive. Therefore, logically, while we chose to illustrate the variability in the drug response caused by pharmacodynamics with the example of hypolipemic statins, a good example of pathologic condition that may induce drug response variability is hypertension.

## 4. Hypertension: genes and protein markers

Hypertension is a multi-factorial disorder that likely results from the inheritance of a number of susceptibility genes and involves multiple environmental determinants. It is difficult to predict if an antihypertensive drug will be effective in patient. However, genetic approach based on the attempt to relate candidate-genes to antihypertensive drug effects was proposed in order to improve this responsiveness.

Lot of polymorphisms in genes of the renin-angiotensin system (RAS) or salt regulation system, are associated with

blood pressure regulation. Few variants are related to protein expression and several are currently described to influence blood pressure (BP)-response to antihypertensive drugs (Table 4). In the case of hypertension, the choice of the endpoint i.e. blood pressure decrease needs to be seen in addition to measurements including gene products and metabolites. Indeed, evaluation of these products could be useful in the concern of adverse effects that are not enough taken into consideration in usual pharmacogenetic studies. To illustrate this concept, only few major polymorphisms that could predict BP-response to antihypertensive drugs are described.

### 4.1. Polymorphisms, metabolites and antihypertensive drugs

The ACE insertion/deletion (I/D) polymorphism is one of the most famous polymorphism of the RAS known that is linked to hypertension. The deletion allele of the polymorphism is strongly associated with an increased level of circulating ACE (Rigat et al., 1990) and serum ACE activity has been recently correlated with measured adherence with ACE inhibitor treatment in congestive heart failure (Struthers et al., 2001) suggesting that more investigations should be done in other diseases such as hypertension.

Methods to detect therapeutic concentrations of ACE inhibitors, such as benazepril, enalapril, perindopril, quinapril, ramipril, trandolapril, their metabolites, or both, in human samples have been drawn (Maurer et al., 1998). Results have led to show that trandolapril was more active than enalapril on blood pressure and ACE activity, respectively and that its active metabolite (trandolaprilat) had greater lipophilicity and a better affinity to ACE (Chevallard et al., 1994). Surprisingly, although ACE I/D polymorphism was described to have an influence on the ACE inhibitor response, it does not seem to influence the adherence to these drugs (Schelleman et al., 2005). In this case, serum ACE activity could be more predictive to ACE inhibitor response than ACE I/D polymorphism. This suggestion is emphasized by recent findings suggesting that a common factor is involved in the regulation of serum ACE, which is different from the genetic determination of ACE activity (Boomsma et al., 2005). Nevertheless, if high doses of captopril and ACE inhibitors could inhibit ACE activity, the level of inhibition is not correlated with neither vascular pharmacodynamic performs nor clinical improvement. In particular, low doses of ACE inhibitors per os decrease ACE activity transiently while efficacy increases with time. Another negative argument in the proposition of ACE activity as direct risk factor is that ACE substrates, i.e. angiotensin I and bradykinin, seem to be the main factors that limit enzymatic reaction and that ACE anchored in endothelial membrane could be more important in terms of activity than circulating enzyme. The bradykinin half-life is too short to consider the relevance of bradykinin levels measurements in determining ACE inhibitor efficacy. The use of synthetic substrates (furylacryliques peptides) is also currently preferred than these two endogenous substrates in order to evaluate ACE inhibitor treatment efficacy and cardiovascular risk factor. However, the field of metabolic pathway activity is of a particular interest to rapidly and accurately identify the

Table 4  
Genes/polymorphisms and predictive BP response to antihypertensive drugs

Gene	SNP	Effect(s)	BP response to antihypertensives	References
$\alpha$ -Adducin (ADD1)	Gly460Ile	↓ Renin level ↓ Erythrocyte sodium content and faster Na–K cotransport	Greater BP reduction in response to diuretics but need to be confirmed	Sciarone et al., 2003; Tumer et al., 2003
$\alpha_2$ -Adrenoceptor (ADRA2)	1817 G/A 278 G/T		Greater BP reduction in response to beta-blockers	Hingonni et al., 1995; Liljedahl et al., 2003
Angiotensinogen (AGT)	Met235Thr	Association with blood pressure	Greater BP reduction possible in response to ACE inhibitor, $\beta$ -blockers, A-II receptor blockers	Liljedahl et al., 2003; Kurland et al., 2004
	Thr174Met		No association in response to A-II receptor blocker — possible BP reduction in response to $\beta_1$ -blocker	Kurland et al., 2002; Kurland et al., 2004
	–20A/C		No association in response to $\beta_1$ -blocker, A-II receptor blocker	Kurland et al., 2004
	–6G/A	AGT levels ↓	Greater BP reduction in response to $\beta_1$ -blocker and diuretic but not A-II receptor blocker	Kurland et al., 2004
Angiotensin-converting enzyme (ACE)	I/D	ACE levels ↓ ↑ Risk of developing CAD	Insertion allele could predict BP reduction in response to ACE inhibitor, A-II receptor blocker, diuretic — no BP response to $\alpha_1$ -blocker, Ca <sup>2+</sup> channel blocker	Sciarone et al., 2003; Liljedahl et al., 2003; Schwartz et al., 2002; Nikano et al., 1997
	12557A/G		Greater BP reduction in response to A-II receptor blockers	Liljedahl et al., 2003; Kurland et al., 2004
Angiotensin II receptor type 1 (AGTR1)	116A/C	Association with hypertension is controversial	Greater BP reduction in response to ACE inhibition and diuretic possible	Hingonni et al., 1995; Kurland et al., 2001; Frazier et al., 2004
Aldosterone synthase (CYP11B2)	–344C/T	T allele seems to be more associated with higher aldosterone excretion and blood pressure than C allele	Greater BP reduction in response to A-II receptor blocker but not diuretic and $\beta$ -blocker	Liljedahl et al., 2003; Kurland et al., 2002; Frazier et al., 2004; Orlepp et al., 2002; White and Rainey, 2005
G-protein $\alpha$ -subunit (GNAS1)	FokI (+/–) ATT → ATC	Association with hypertension	FokI <sup>+</sup> allele associated with a greater reduction of BP in response to $\beta_1$ -blocker	Jia et al., 1999
G-protein $\beta\gamma$ -subunit (GNB3)	825C/T	Lower renin levels, higher aldosterone to renin ratio	Greater BP reduction in response to diuretic and $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist	Tumer et al., 2001; Numbenger et al., 2003
$\beta_1$ -Adrenoceptor (ADRB1)	Arg389Gly		Greater BP reduction in response to $\beta_1$ -blockers	Tumer et al., 2003; Johnson et al., 2003; O'Shaughnessy et al., 2000
$\beta_2$ -Adrenoceptor (ADRB2)	1309G/A and 1342G/C Gly16 Gln27	Confer an ↑ risk for stage-2 hypertension Cardiac hypertrophy	1309G/A and 1342G/C associated with a greater BP reduction in response to $\beta_1$ -blockers. Gly16 and Gln27 alleles are not predictive of BP-response to diuretic or $\beta$ -blockers, respectively	Tumer et al., 2003; Liljedahl et al., 2003; Jia et al., 2000
Endothelin receptor type B (EDNRB)	40G/A	High circulating plasma levels of endothelin reported in hypertension	Frequent allele associated with a BP reduction in response to $\beta_1$ -blockers and A-II receptor blocker	Liljedahl et al., 2003

BP: blood pressure; CAD: coronary artery disease.

genetic determinants of adrenoceptors (ADRs) to ACE inhibitor medication. Indeed serum amyloid protein can predict susceptibility to ACE inhibitor-associated angioedema and it is possible to measure serum acute phase proteins activity using substrates that mimic des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin.

As with the ACE locus, several publications aim to predict patient response to antihypertensive drugs using genetic polymorphisms at the *angiotensinogen* locus (*AGT*). Carriers of the T allele genotyped for the *angiotensinogen* Met235Thr variation tend to have higher plasma levels of angiotensinogen (Jeunemaitre et al., 1992). The association of the Met235Thr polymorphism and blood pressure response to antihypertensive is confused. It seems that the Met235Thr variant may be important as a predictor of patient response to ACE inhibitor therapy (Hingonni et al., 1995; Kurland et al., 2004), illustrating the potential use of SNP genotyping as a pharmacogenetic

tool in antihypertensive treatment. However, a meta-analysis of more than 45 000 subjects (Sethi et al., 2003) revealed that genotype did not predict plasma angiotensinogen levels in Asian and black subjects, hypertension in black subjects, or systolic or diastolic blood pressure in either ethnic group. Measurements of AGT levels and genotyping of *AGT* polymorphisms is highly dependent on ethnicity.

In contrast, previous works reported that increases in high-molecular weight angiotensinogen (glycosylated), but not low-molecular-weight angiotensinogen (nonglycosylated) were associated with pregnancy-induced hypertension in woman (Tewksbury and Dart, 1982). Moreover, glycosylated AGT was a better substrate for renin, compared with low-molecular weight angiotensinogen (Tewksbury and Tryon, 1989). Consequently, post-translational modifications of angiotensinogen could complete informative measurements of AGT. In

conclusion, interest of individual genotyping for *AGT* polymorphisms to predict blood pressure response is clear; however, which *AGT* polymorphism could be taken into consideration is unclear, particularly since the association of *angiotensinogen* gene haplotypes with hypertension is discussed (Brand-Herrmann et al., 2004; Renner et al., 2005).

Fortunately, other genes are predictive of blood pressure (BP)-response to drug and prediction of the effect of medication on BP is highly dependent of the drug taken into consideration. Thus, the C825T polymorphism of the *G-protein β3* gene appears to predict patient response to thiazides diuretics (Turner et al., 2001), while CA repeat length of the *11-β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2* (*11β HSD2*) gene was strongly associated with the BP response to hydrochlorothiazide (Williams et al., 2005). The *11β HSD2* G534A polymorphism can cause a rare form of salt-sensitive monogenic hypertension (Lifton, 1996) and is proposed as "salt-sensitive" marker (Poch et al., 2001). Interestingly, a microsatellite CA repeat marker in intron 1 of the *HSD11B2* gene was associated with the urinary cortisol metabolites ratio reflecting a mild reduction in *HSD11B2* activity, which in turn was significantly related to plasma renin activity levels. Although the CA repeat polymorphism was not associated with BP levels, ratio has been demonstrated to be the best indicator of *HSD11B2* activity in vivo, and displays a lower intra-individual variability and a better discrimination between salt-sensitive and salt-resistant subjects compared to the ratio of the urinary free glucocorticoids (Ferrari et al., 2001). In this occurrence, metabolite ratio could be more predictive of salt-sensitive hypertension than *HSD2* polymorphism genotyping.

#### 4.2. Aldosterone-to-renin ratio

The prevalence of primary aldosteronism is less than 2% within the hypertensive population and is characterized by an excess production of the normal adrenal hormone, aldosterone, low serum potassium and also a suppressed plasma renin. Tests, looking at other adrenal steroid hormones, can be very useful as well as tests looking for the normal physiologic changes in hormones in the morning and evening, as well as responses to sodium challenge or sodium restriction. Body sodium has been established to change with age in hypertensive patients and correlated with blood pressure (Beretta-Piccoli et al., 1982). In the same manner, aldosterone–renin ratio was positively related to age and plasma sodium concentration in hypertensives (Komiya et al., 1997), relationships that could not be detectable using plasma aldosterone levels (Reubi and Weidmann, 1980) and with blood pressure in hypertensives (Lim et al., 2001). As suggested by Lim et al. (2002), aldosterone–renin ratio might help to isolate patients with inappropriate aldosterone activity who would respond favourably to aldosterone antagonists. However, although several studies have shown the favourable blood pressure-lowering effects of aldosterone antagonists (Lim et al., 2002; Brown, 2001), these results need to be investigated in large cohorts. As previously suggested, aldosterone–renin ratio seems to have a greater predictive power in blood pressure response to diuretics than

aldosterone levels. This could also explain why the aldosterone C-344T polymorphism that could influence aldosterone levels is not found to be associated with a greater blood pressure reduction in response to diuretics (Liljedahl et al., 2003; Frazier et al., 2004).

#### 4.3. Inflammation and hypertension

The overall contribution of inflammation to vascular damage in patients with hypertension is still unclear even after several investigations (Clozel et al., 1991; Dzielak, 1992). Inflammation has been associated with decreased endothelium-dependent relaxation, a process related to an alteration in the bioavailability of nitric oxide, and there is considerable evidence of a link between endothelial dysfunction and both essential and pregnancy-induced hypertension (Teran et al., 2000). The most recent and most promising biochemical marker is with no doubt high soluble C-reactive protein (CRP) that appears as a strong predictor of future cardiovascular disease (Rifai, 2005). A previous investigation had reported that there was a genetic contribution to baseline serum concentrations of C-reactive protein (MacGregor et al., 2004). A higher prevalence of hypertension related to higher levels of C-reactive protein (Schillaci et al., 2003) was also described. Therefore, greater plasma C-reactive protein concentrations were found in patients with hypertension than in normotensive healthy controls (Bautista et al., 2001) and were directly associated with systolic blood pressure and pulse pressure in newly diagnosed, never-treated hypertensive patients (Bautista et al., 2001). Moreover, a positive relationship between increased serum levels of C-reactive protein and the risk for development of incident hypertension in participants of the Women's Health Study (Sesso et al., 2003) was also described. Finally, high levels of C-reactive protein may upregulate angiotensin receptors and enhance expression of plasminogen activator inhibitor-1 by endothelial cells (Grundy, 2003). C-reactive protein levels measurements reflect inflammation that could lead to hypertension. Both investigations need to take genetic variants and soluble level measurements into consideration. It seems clearly of interest to also consider metabolite as a putative marker of the disease and adverse effects.

#### 5. Inflammation, a general physiopathological involvement

As mentioned beyond, it seems that inflammation is an important component of hypertension. It is also a physiopathological state and a sub-clinical cause of other risk factors leading to cardiovascular diseases (e.g. metabolic syndrome, diabetes, obesity). Thus, pharmacogenomics of cardiovascular drugs should take into account this metabolic deviation.

More than 100 genes are related to inflammation if we take into account those regulated by nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), Activator protein-1 (AP-1), peroxisomal proliferation-activating receptor- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), etc. Inflammation biomarkers, which are measurable in blood, could be divided in five groups: acute phase reactants (e.g. C-reactive protein, serum amyloid A protein, and fibrinogen), cytokines (e.g. interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ),

interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), chemokines (e.g. monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)), adhesion molecules (soluble forms) and proteases; in addition to lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA<sub>2</sub>) and CD40 ligand (McConnell, 2005).

Many polymorphisms could influence their level in circulation (Berrahmoune et al., 2005). Some of them have been studied in relation to cardiovascular risk. Indeed, they could affect balance of cytokine network that can lead in addition to some environmental risk factors, to disrupt cytokine equilibrium and improve atherogenesis (Alan et al., 2004). Finally, they could also have an impact on cardiovascular therapy (Table 5).

One of these polymorphisms, 915G/C of *TGF- $\beta$ 1* gene was found to be associated with molecule level and anti-hypertensive treatment effect (Hallberg et al., 2004). Indeed, these drugs are known for a long time to have an anti-inflammatory effect, like angiotensin-converting enzyme inhibitors (Marín et al., 1984). Considerable evidence now supports a role for angiotensin II as a pro-inflammatory mediator, elevating it to the category of an "honorary" cytokine. It can for example elicit vascular cell adhesion molecule 1 and MCP-1 expression by endothelial cells, and IL-6 production by smooth muscle cells (Libby, 2002).

Irbesartan-treated patients who were carriers of the C-allele at position 915, which is associated with low expression of TGF- $\beta$ 1, responded with a markedly greater decrease in left ventricular mass index than subjects with the G/G genotype, independent of blood pressure reduction (Hallberg et al., 2004).

Another polymorphism in *IL-1 $\beta$*  gene (-511) seems to correlates in vitro with the production of IL-1 $\beta$  by mononuclear cells (Pociot et al., 1992). A more recent study showed that this production increased a slight but non-significantly in indi-

viduals with a T allele of this SNP. However, an IL-1 receptor antagonist gene, with which the -511 SNP was in linkage disequilibrium, was a stronger determinant of raised IL-1 $\beta$  production (Santtila et al., 1998). Nevertheless, Komman et al. found that *IL-1 $\beta$*  (-511) polymorphism was important in combination with *IL-1RN* (+2018) marker and was associated with atherosclerotic plaque formation, as measured by angiography and arterial wall thickness (Komman et al., 1999). In addition, to be involved in atherogenesis, *IL-1 $\beta$*  (-511) polymorphism has been shown to interact with a cardiovascular drug: pravastatin, which exerts direct anti-inflammatory effects like other statins (as cited beyond). In addition, studies on Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial and the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS) suggest that statin therapy may be differentially effective among those with inflammation compared with those without (Ridker et al., 1998; Ridker et al., 2001).

Another study on effect of *IL-1 $\beta$*  -511 C/T polymorphism on treatment by pravastatin indicates that, after 6 months of treatment, in men with *IL-1 $\beta$*  C allele, levels of IL-1 $\beta$  decreased, while in men with the T allele, it increased; however, this difference is not very significant ( $p=0.061$ ). In addition, researchers found that changes in adenosine-stimulated flow and coronary flow reserve with pravastatin were significantly dependent on *IL-1 $\beta$*  genotype. They explained their results by the fact that statin treatment decreased IL-1 $\beta$  level more effectively in subjects with CC genotype, thus leading to lower endothelial inflammatory response, and better endothelial function as indicated by increased adenosine-stimulated flow and coronary flow reserve (Lehtimäki et al., 2003).

*IL-6*-174G/C genotype is a much studied one as it is correlated with IL-6 level in circulation (Haddy et al., 2005). It is related to carotid IMT (Rundek et al., 2002), peripheral artery

Table 5  
Polymorphisms influencing protein concentration, cardiovascular disease and treatment

Gene	SNP	Effect of polymorphism on			Effect of protein on treatment	References
		Protein concentration	Cardiovascular disease	Treatment		
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	-511 C/T	-511TT $\rightarrow$ $\uparrow$ IL-1 $\beta$ level	Atherosclerotic plaque formation (in combination with <i>IL-1RN</i> (+2018) marker)	-511CC $\rightarrow$ $\uparrow$ Effect of pravastatin		Pociot et al., 1992; Komman et al., 1999; Lehtimäki et al., 2003
		-174CC $\rightarrow$ $\uparrow$ IL-6 level -174GG $\rightarrow$ $\uparrow$ IL-6 level	Carotid IMT, peripheral artery occlusive disease and retinal artery occlusion	-174CC $\rightarrow$ $\uparrow$ Effect of pravastatin -174GG $\rightarrow$ Effect of enalapril and losartan		Haddy et al., 2005; Rundek et al., 2002; Flex et al., 2002; Weger et al., 2005; Burzotta et al., 2001; Trevelyan et al., 2004
<i>CRP</i>	-286 C/T/A	-286 CA/TA $\rightarrow$ $\uparrow$ CRP level <sup>a</sup>			$\uparrow$ CRP level $\rightarrow$ $\uparrow$ effect of aspirin	Kovacs et al., 2005
		1059G/C	1059G/G $\rightarrow$ $\uparrow$ CRP level			Suk et al., 2005
		1444C/T	1444T/T $\rightarrow$ $\uparrow$ CRP level			Brull et al., 2003
<i>TGF-<math>\beta</math>1</i>	915G/C	915G/G $\rightarrow$ $\uparrow$ TGF- $\beta$ 1 level		$\downarrow$ LVM index by irbesartan is more efficient for CC genotypes		Hallberg et al., 2004

IL-1 $\beta$ : interleukin-1 beta; IL-1RN: interleukin-1 receptor antagonist; IL-6: interleukin-6; CRP: C-reactive protein; TGF 1: transforming growth factor beta 1; IMT: intima media thickness, LVM: left ventricular mass.

<sup>a</sup> In patients with myocardial infarction and not in healthy individuals.

occlusive disease (Flex et al., 2002) and retinal artery occlusion (Weger et al., 2005).

*IL-6* polymorphism also interacts with pravastatin as men treated with this drug for one year carrying GG+GC genotype, had 25% lower risk (OR=1 reduced to OR=0.75), compared with the GG+GC placebo group, whereas in the CC group, risk was 77% lower than that in the CC placebo men (OR reduced from 1.19 to 0.42). In addition, the reduction in LDL cholesterol was greater in the CC group than in the GG+GC group. Larger declines in fibrinogen and C-reactive protein and a larger elevation in HDL levels in the CC group were found compared with the GG+GC group; these latter differences were, however, statistically not significant. Researchers hypothesized that the protective effect of the CC genotype in the treated group was likely to be due to either a greater pravastatin lipid-lowering effect or a greater inflammation-lowering effect in this genotype group. The analysis of the WOSCOPS data suggests that both of these effects may be involved (Basso et al., 2002).

In addition, in randomized men awaiting coronary artery bypass graft, enalapril produced a highly significant decrease of 51% in the release of IL-6 in patients identified as high producers of IL-6 by the -174 G/C polymorphism, whereas losartan has a similar but less marked effect (Trevelyan et al., 2004).

On the other hand, results from the Physicians Heart Study showed that the benefit of aspirin treatment was greatest in subjects with elevated baseline C-reactive protein levels (Ridker et al., 1997). This finding is confirmed by other results indicating that the effect of aspirin in preventing a first myocardial infarction was greatest among men with the highest baseline C-reactive protein concentrations and that the benefit diminished significantly with decreasing concentrations of this inflammatory marker (Vane, 1987).

These results suggest that the benefit of anti-inflammatory treatment may be greatest in those with highest inflammation and so in part, in individuals who bring alleles of polymorphisms that contribute to increase gene expression e.g. *IL-1β* (-31C/T (Hamajima et al., 2001), *IL-6* (-572G/C (Haddy et al., 2005)), *CRP* (-286 C/T/A (Kovaes et al., 2005), 1059G/C and intronic T/A (Suk et al., 2005) and 1444C/T (Brull et al., 2003)).

Moreover, proteomics could be very helpful in order to follow drug effect on inflammation process. Indeed, for example, treatment with enalapril and losartan decreases releases of IL-1 receptor and IL-6 in patients undergoing coronary artery bypass graft with cardio-pulmonary bypass (Trevelyan et al., 2004).

Other drugs are known to have an anti-inflammatory effect like lipid lowering drugs which stabilize atherosclerotic plaques by decreasing inflammation (Weissberg, 1999). Fibrates are activators of PPAR $\alpha$ , which stimulates  $\beta$ -oxidation of fatty acids. It was reported that in addition to their role, fibrates have anti-inflammatory action, at least in part, by negatively regulating NF- $\kappa$ B transcriptional activity. They inhibit interleukin-1-induced production of interleukins-6 and prostaglandin and expression of cyclooxygenase-2 (Staele et al., 1998).

It was shown that fenofibrate significantly decreases soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) (by 17%) and MCP-1 levels (by 12.5%) when simvastatin causes a significant decrease (by 10.5%) in sICAM-1 only (Kowalski et al., 2003).

Whereas inflammation plays a decisive role in atherogenesis, anti-inflammatory drugs could not be used in prevention or treatment of cardiovascular affections. In fact, these drugs interact with many others drugs, which are used in patients with cardio- or cerebrovascular disorders: They attenuate the effects of diuretics,  $\beta$ -blockers, ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers and potentiate the effect of oral anticoagulants and interact with platelet inhibitors (Stollberger and Finsterer, 2003).

Personalized medicine is based on differences between individuals and aspires to give for each one adequate treatment according to polymorphisms he brings. However, it could be interesting in addition to study these polymorphisms, to take into account proteins to follow treatment effect. It is so important to be able to measure new molecules instead of those routinely quantified (e.g. C-reactive protein, orosomucoid, haptoglobin, serum amyloid A, albumin, fibrinogen and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)) like cytokines (e.g. IL-1 $\beta$  and IL-6). The most common technique used to measure cytokine level is ELISA. However, this method is not yet randomised in clinical laboratories and there is a need to a rigorously standardized and reproducible assay. Indeed, many factors influence the outcomes of these assays, according to manufactures used, collection and storage procedures (Aziz et al., 1998).

In addition, biological and environmental factors contribute to interindividual variation in cytokine level like body mass index (Haddy et al., 2005). Indeed, various inflammatory cytokines (leptin, TNF- $\alpha$ , IL-6, adiponectin) and thrombotic molecules (PAI-1) cytokines are synthesized by adipocytes (You et al., 2005). In addition, obesity is a state of chronic inflammation, as indicated by increased plasma concentrations of C-reactive protein, IL-6, and PAI-1 in obese subjects. Novel data have now appeared showing that the concomitant presence of promoter polymorphisms of *TNF- $\alpha$*  (-308G/A) and *IL-6* (-174C/G) in these subjects with impaired glucose tolerance carry twice the risk of conversion to type 2 diabetes when compared with other genotypes. A -308G/A mutation of the *TNF- $\alpha$*  promoter is associated with increased plasma TNF- $\alpha$  concentrations and a 1.8 higher risk of developing diabetes compared to non-carriers. A -174C/G mutation of the *IL-6* promoter increases the risk for insulin resistance (Dandona et al., 2004). That is why anti-diabetic drugs also have anti-inflammatory effects. For example, thiazolidinediones decrease C-reactive protein, fibrinogen and PAI-1 levels, inhibit NF- $\kappa$ B and decrease TNF- $\alpha$  effect (Zarich, 2003). Cytokines and adipocytokines could be so good biomarkers to evaluate anti-diabetic drug effects.

## 6. Diet, body mass index and obesity. Example of gene-environment effects in cardiovascular events

Many genes are reacting differently to physiological variables such as age, gender and also their polymorphisms are

different for ethnicity due to human evolution. All the previous description and recommendations have to take these variations into account before looking to a pharmacogenomic effect of a cardiovascular drug. That is particularly well known for drug metabolizing enzymes genes. Furthermore, referring to the environment, tobacco smoking, alcohol and drug consumption, diet and body mass index are crucially implicated in the development and progression of cardiovascular disease.

Dietary recommendations are the first therapeutic approach in cardiovascular diseases. A diet low in total fats (particularly those of animal origin), low in cholesterol, and high in antioxidant elements has showed favorable outcomes in patients and an improved quality of life in healthy subjects. The response to diet and the interactions between diet and disease depend on genetic polymorphisms (nutrigenetics). In the case of cardiovascular disease the most established gene–nutrients interactions concern the dietary fats and genes involved in lipid metabolism (apolipoproteins, lipoprotein lipase and hepatic lipase among others). The apolipoprotein E gene remains the locus most consistently reported with respect to gene environment. In subjects carrying the apoE4 allele, a low-fat, and low-cholesterol strategy may be particularly beneficial in terms of lowering plasma cholesterol levels (Siest et al., 2000; Ordoas and Mosser, 2004). The same strategy can be possibly applied in altering the HDL concentrations, after dietary intake of polyunsaturated fatty acids (PUFA). It has been reported recently that their effect on HDL-cholesterol concentrations is modulated by a common genetic polymorphism in the promoter region of the *APOA1* gene. Thus, subjects carrying the A allele at the  $-75G/A$  polymorphism show an increase in HDL-cholesterol concentrations with increased intakes of PUFA, whereas those homozygotes for the more common G allele have the expected lowering of HDL-cholesterol levels as the intake of PUFA increases. Subsequently, it could be predicted that subjects with low levels of HDL-cholesterol and carriers of the A

allele may benefit from diets containing higher percentages of PUFA. A third very interesting example has been recently reported focusing on the interaction between intake of animal origin fat and variability at the hepatic lipase gene, encoding a key enzyme involved in reverse cholesterol transport. These has been shown, that subjects carrying the CC genotype (the most common among Caucasian subjects) “react” to high contents of fat in their diets by increasing the concentrations of HDL-cholesterol, which could be interpreted as a “defense mechanism” to maintain the homeostasis of lipoprotein metabolism. Conversely, carriers of the TT genotype experience decreases in HDL-cholesterol levels (Ordoas and Mosser, 2004). Beyond citing these interesting examples, it is important to note that there have been studies extensively on other genetic variants concerning mostly the *APOA1*, the *APOAIV*, the *APOCIII* and the *APOB*; some examples of which are cited in the Table 6 (Masson et al., 2003).

In the case of obesity, there has been a rapid increase the last years in the understanding of biochemical events thought to be causative factors aiming thus in the development of new therapeutic approaches. The new generation of drugs targeting obesity focalize in (i) reducing energy intake (leptin and leptin receptors, pro-opiomelanocortin and melanocortin receptors, neuropeptide Y and its receptors, endocannabinoids and cannabinoid CB1 receptor, etc.), (ii) increasing energy expenditure (uncoupling protein 1,  $\beta_3$ -adrenoceptors, PPAR- $\gamma$  modulators) and (iii) producing thermogenic effects ( $\beta_3$ -adrenoceptors, PPAR- $\delta$  agonists) (Jandacek and Woods, 2004; Nisoli and Carruba, 2004). In clinical practice, the current drugs for long-term treatment of obesity are sibutramine and orlistat which are designed to reduce food intake and utilization of ingested energy respectively. Sibutramine is a serotonin, norepinephrine and dopamine reuptake inhibitor, while orlistat inactivates pancreatic lipase thereby inhibiting hydrolysis and absorption of dietary triacylglycerol. The approach of orlistat

Table 6  
Examples of apolipoprotein polymorphisms modifying diet response

Polymorphism and study	Subjects (n)	Genotype groups (n)	Intervention	Response			
				Cholesterol	LDL	HDL	TG
<i>Apolipoprotein AI -75 (G/A)</i> Lopez-Miranda et al.	89 males	G/G, 58 G/G, 31	NCEP-I vs. high fat, high MUFA diet	S		NS	NS
<i>Apolipoprotein CIII C1100T</i> Humphries et al.	55 males and women	C/C, 38 C/T and T/T, 17	High SFA vs. high PUFA diet	NS	NS	NS	NS
<i>Apolipoprotein AIV Thr347Ser</i> Jansen et al.	41 males	Thr/Thr, 25 Ser (Thr/Ser and Ser/Ser), 16	NCEP-I vs. high MUFA diet	S	NS	NS	NS
<i>Apolipoprotein B Aa1887Ser</i> Ilmonen et al.	54 females	Asn/Asn, 52 Asn/Ser, 2	Low fat, low cholesterol, high P/S diet	NS	NS		

Adapted from Masson et al. (2003).

HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; MUFA: monounsaturated fatty acids; NCEP: National Cholesterol Education Program; P/S: polyunsaturated to saturated fatty acid ratio; PUFA: polyunsaturated fatty acids; SFA: saturated fatty acids; TG: triglycerides.  
NS: non-significant; S: significant.

has successfully achieved modest long-term reductions in body weight. Recently, the effect of weight reduction with orlistat treatment on lipid peroxidation levels, which is found to be associated with obesity, was investigated.

In general, the outcomes of the existing drugs targeting obesity are evaluated in clinical practice by markers as the weight loss and the waist circumference. The identification and determination of biomarkers independently related to body mass index appears to be the most promising approach for better evaluation of drug effects. The secretion of molecules from the adipose tissue, which are characterized as "adipocytokines", is a new interesting field towards this approach. More precisely, leptin and adiponectin are hormones produced mainly by the adipose tissue and the blood concentration of these molecules depends on the body mass index (see beyond). They are mainly implicated in the energy metabolism and recently there have been developed several assays to measure them (Meier and Gressner, 2004). In the case of leptin, the serum levels of this hormone are considered as an indicator to predict the clinical efficacy of troglitazone (antidiabetic drug) in patients with type 2 diabetes by measuring its levels before treatment (Muryama et al., 2001). As adipocytokines are implicated in glucose regulation and lipid metabolism, the association of their plasma concentrations with markers of triglyceride-rich lipoprotein metabolism was studied. Interestingly, adiponectin was an independent predictor of plasma apoB-48, apoC-III, RLP-cholesterol and triglycerides, where leptin was not, suggesting that plasma adiponectin levels may not only link abdominal fat, insulin resistance and dyslipidemia, but may also exert an independent role in regulating triglyceride-rich lipoprotein metabolism (Chan et al., 2005). Furthermore, saturated and  $\omega$ -3 fatty acids plasma concentrations were significantly correlated with plasma adiponectin levels, showing a negative and a positive correlation respectively (Fernandez-Real et al., 2005). Many other studies demonstrate the utility of circulating adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. This relationship includes decreased adiponectin levels in increased body mass index, decreased insulin sensitivity, less favourable plasma lipid profiles, increased levels of inflammatory markers and increased risk for the development of cardiovascular disease. Therefore, adiponectin levels hold great promise for use in clinical application serving as a potent indicator of underlying metabolic complications (Trujillo and Secherer, 2005). Besides its possible role as biomarker, adiponectin can be also considered as drug target in improving hepatic insulin sensitivity. Thiazolidinedione antidiabetic effects in the liver may be mediated through the up-regulation and increase secretion of adiponectin from adipocytes after stimulation of PPAR $\gamma$  in adipocytes (Bouskila et al., 2005).

The fact that many genes are implicated in obesity gives rise to new drug targets but also verifies the complexity of this phenomenon and underlies the importance of considering the genetic variants of these genes for evaluating the outcomes of drug therapeutic interventions. To date, there exist 358 findings of positive associations between obesity phenotypes and genetic variations of 113 candidate genes (Perusse et al., 2005).

Genetic variants of leptin and its receptor are related to obesity and increased body mass index, while polymorphisms in the gene of adiponectin result in phenotypes such as insulin resistance, type 2 diabetes additionally to obesity and increased adiposity. Interestingly, variations in both genes can result in altered circulating levels of these two proteins (Cancello et al., 2004), signalling the importance of taking these polymorphisms into account when tending to use these molecules as biomarkers. To mention, there are cited polymorphisms of dopamine receptors (DRD2, DRD4) related to obesity and of hepatic lipase related to abdominal visceral fat and to body mass index (Perusse et al., 2005), proposing possible variations in drug response in the case of sibutramine and orlistat.

## 7. Pharmacoproteomics as a future

Through the different examples we have taken, numerous enzymes, proteins, peptides, receptors can be used as phenotypes to enter in the pharmacoproteomic follow-up of cardiovascular drugs.

In Fig. 3, we put some examples of proteomic markers currently measured in laboratory medicine. However, pharmacoproteomics of cardiovascular drugs is more than that. We should follow the same large scale strategy as for SNP genotyping and expression profiling using the powerful methods of 2-D gel electrophoresis (Anderson and Anderson, 1996), mass spectrometry (Fathi et al., 2003) and protein chips (Wilson and Nock, 2002).

In a recent presentation on pharmacoproteomics in the Santorini Conference, Langen (2004) ("Proteomics Applications in Pharmaceutical Industry", Santorini October 2004) presented an industrial strategy for searching biomarkers linked to diabetes and useful in drug development. He was proposing to start with cellular models, pancreatic beta cells which loose their insulin secreting capabilities after a history of disturbed blood glucose uptake regulation and insulinoma cells. Through many proteomics spectra done in this cell line he could find 4,000 proteomics spots for approaching the different metabolic pathways. After this huge number of mass spec and quantification of the proteins, he was able to describe several proteins and enzymes which could be proposed as proteomics biomarkers for this disease.

For statins, a comparable strategy has been used for following the protein modification in rat liver after administration of lovastatin (Steiner et al., 2000) and fluvastatin (Steiner et al., 2001). In these studies, the group of N.L. Anderson, with his experience on 2D gels and using also MS/MS for specific confirmation, has described key modification in carbohydrate metabolism, stress protein, calcium homeostasis and protease activity. It has been suggested to follow other enzymes from the mevalonate pathway, an important information which could have avoid the problem with cerivastatin or some other side effects.

Proteomics approaches are clearly very useful during the development of new drugs (Witzmann and Grant, 2003) to control some toxicities including drug interactions and in different pathological states (Aldred et al., 2004). However, for

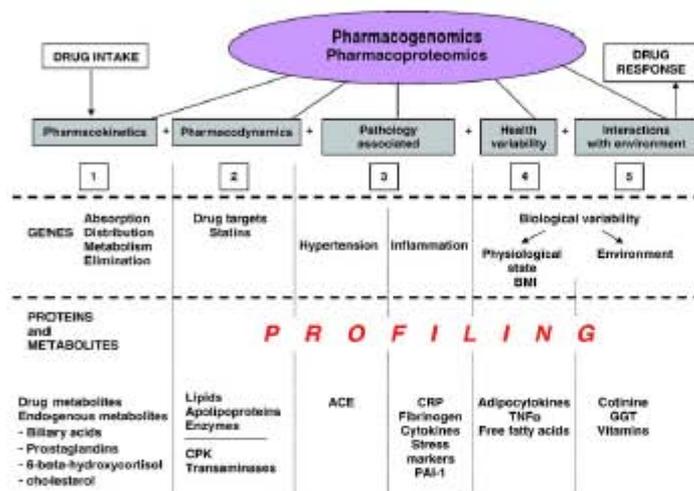


Fig. 3. Examples of pharmacoproteomic markers measured in addition to each of the five groups of pharmacogenomic markers. ACE: angiotensin-converting enzyme; BMI: body mass index; CPK: creatine phosphokinase; CRP: C-reactive protein; GGT: gamma glutamyl transferase; TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha.

doing a more specific use of pharmacoproteomic in the cardiovascular field, we need to better know the proteome profile of the organs involved: heart (Jungblut et al., 1994, 1999), vessels, and specific blood cells including lymphocytes. Here again looking for a set of specific protein, related if possible to a metabolic pathway, i.e. stress protein, will be very useful (Scheler et al., 1997). The relation with other pathologies can bring also interesting information i.e. proteomic information on inflammation markers in rheumatoid arthritis (Mattila and Frey, 1995) (Doherty et al., 1998) or oxidation in Alzheimer patients. Finally, proteomic approach could be applied to dissect the composition of particles which are involved in risk assessment i.e. LDL or HDL which are heterogeneous. Profiling such particles will probably be a real progress in knowing the composition related to the functional role of their constituents (Karpe and Hamsten, 1994).

Cardiovascular diseases cannot be studied as themselves, the clinical expression of this multifactorial diseases being too heterogeneous (Bougneres, 2003). We need focus on metabolic pathways linked to cardiovascular disorders and which are the real targets of the drugs and their individual pharmacogenomic and pharmacoproteomic responses.

We should take into account, after analysis of the literature (Persidis et al., 2004), the systems "biology approach" proposed, i.e. by Kitano (2002). System-level understanding, the approach advocated in systems biology (Van Ommen, 2004), requires a shift in our notion of "what to look for" in biology. While an understanding of genes and proteins continues to be important, the focus is on understanding a system's structure and dynamics. Because of system is not just an assembly of genes and proteins, its properties cannot be fully understood merely by drawing diagrams of their interconnections. Although such a diagram represents an important first step, it is

analogous to a static roadmap, whereas what we really seek to know are the traffic patterns, why such traffic patterns emerge, and how we can control them.

In the same spirit Leroy Hood and his team (Ideker et al., 2001) has used such an integrated approach in studying through different presentations, the yeast galactose pathway and the response of 1000 messengers RNAs. Using the same yeast model with 6000 protein arrays, Hall et al. (2004) were able to describe new protein/DNA interactions important in controlling metabolic pathways. Amoeba has also been used as a model cell with 10000 genes homologues or equivalents of genes found in humans (Van Driessche et al., 2005). It will soon be necessary to apply such strategies to higher eukaryotic cells and to test with these models new cardiovascular drugs and to discover new markers.

Genomic and proteomic biomarkers are biological measurements that serve as indices for disease progression, pharmacology or safety — they have become increasingly useful as a basis for decision-making in drug development. Used independently as indicators or in combination to produce a pattern profile, biomarkers can reflect a variety of disease characteristics, including the level of exposure to an environmental or genetic trigger.

With their potential use as validated surrogate endpoints to indicate drug efficacy or toxicity, biomarkers are emerging as the solution to many of the problems currently facing pharmaceutical companies.

Genomic and proteomics markers for cardiovascular drugs should be used to pinpoint individuals at high risk for the disease and at risk for the drug side effects or with a probability of nonresponse.

The practice of personalized medicine should use the huge amount of genomic, proteomics and metabolomic data which

will be developed during the next years with the powerful arrays technologies (Ruano et al, 2004). However, we should not forget that Humans are living in special environments regulating the expression of genes and genes products. Nutrition, tobacco, alcohol, obesity, and other drugs, such as contraceptives, have been particularly linked to the pharmacogenomic and pharmacoproteomic strategy for cardiovascular drugs.

In conclusion, for such multifactorial chronic diseases as cardiovascular ones, we have to dissect them into separate metabolic entities for selecting genes and gene products involved in each pathway. Following our five-step strategy, a cardiovascular drug could be adapted to each patient or to a subgroup of patients if each of this step can be followed with one to 10 genes and one to 10 proteomic or metabolic markers. We will then have to propose to clinicians a pharmacodiagnosis profile with an adapted interpretation using a multidimensional profile.

## References

- Alam, S.E., Nasser, S.S., Feraïny, K.E., Habib, A.A., Bakr, K.F., 2004. Cytokine imbalance in acute coronary syndrome. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 166–170.
- Akrod, S., Grant, M.M., Griffiths, H.R., 2004. The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. *Clin. Biochem.* 37, 943–952.
- Anderson, N.G., Anderson, N.L., 1996. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis* 17, 443–453.
- Ando, H., Ibaruka, S., Yamamoto, H., Takamura, T., Kaneko, S., Fujimura, A., 2004. Effects of pravastatin on the expression of ATP-binding cassette transporter AL. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 420–425.
- Annuzzi, L., Viglio, S., Gheduzzi, D., Pasquali-Ronchetti, I., Zanone, C., Ceta, G., Iadarola, P., 2004. High levels of desmosines in urine and plasma of patients with pseudoxanthoma elasticum. *Eur. J. Clin. Invest.* 34, 156–164.
- Aziz, N., Nishanika, P., Fabry, J.L., 1998. Levels of cytokines and immune activation markers in plasma in human immunodeficiency virus infection: quality control procedures. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 755–761.
- Basso, F., Lowe, G.D., Rumley, A., McMahon, A.D., Humphries, S.E., 2002. Interleukin-6 – 174G>C polymorphism and risk of coronary heart disease in West of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 599–604.
- Bautista, L.E., Lopez-Jaramillo, P., Vera, L.M., Casas, J.P., Otezo, A.P., Guzmán, A.L., 2001. Is C-reactive protein an independent risk factor for essential hypertension? *J. Hypertens.* 19, 857–861.
- Beretta-Piccoli, C., Davies, D.L., Boddy, K., Brown, J.J., Cumming, A.M., East, B.W., Finzer, R., Lever, A.F., Padfield, P.L., Scoble, P.F., Robertson, J.I., Weckmann, P., Williams, E.D., 1982. Relation of arterial pressure with body sodium, body potassium and plasma potassium in essential hypertension. *Clin. Sci. (Lond.)* 63, 257–270.
- Berthoin, H., Lamont, J., Fitzgenald, P., Viivikis-Siest, S., 2005. Inter-individual variation of inflammatory markers of cardiovascular risks and diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.* 43, 671–684.
- Biesengraber, M., Olson, T.M., Selivanov, V.A., Kaufmann, E.C., O’Cochlain, F., Gao, F., Karger, A.B., Ballew, J.D., Hodgson, D.M., Zingman, L.V., Pang, Y.P., Alekseev, A.E., Tezic, A., 2004. ABC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *Nat. Genet.* 36, 382–387.
- Boomsma, F., Pedersen-Bjergaard, U., Agestholm-Larsen, B., Hut, H., Dhanraj, S.S., Thomsen, B., van den Meiracker, A.H., 2005. Association between plasma activities of semicarbazide-sensitive amine oxidase and angiotensin-converting enzyme in patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 48, 1002–1007.
- Bont, P., Hékinä, R.O., 2002. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 537–592.
- Bont, P., Evers, R., Kool, M., Wijshok, J., 2000. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1295–1302.
- Bougeres, P., 2003. Genetics of common obesity and type 2 diabetes: please forget diseases and study pathogenic traits. *Diabetes Metab.* 29, 197–199.
- Bouskila, M., Pajvani, U.B., Scherer, P.E., 2005. Adiponectin: a relevant player in PPARgamma-agonist-mediated improvements in hepatic insulin sensitivity? *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 29, S17–S23.
- Brand-Hermann, S.M., Kopke, K., Reichenberger, F., Schmidt-Petersen, K., Reineke, T., Paul, M., Zidek, W., Brand, E., 2004. Angiotensinogen promoter haplotypes are associated with blood pressure in untreated hypertensives. *J. Hypertens.* 22, 1289–1297.
- Bray, P.F., Cannon, C.P., Goldschmidt-Clermont, P., Moye, L.A., Pfeffer, M.A., Sacks, F.M., Braunwald, E., 2001. The platelet P2(AD) and angiotensin-converting enzyme (ACE) D allele polymorphisms and the risk of recurrent events after acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 88, 347–352.
- Brown, M.J., 2001. Matching the right drug to the right patient in essential hypertension. *Heart* 86, 113–120.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1999. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11041–11048.
- Bull, D.J., Serrano, N., Zito, F., Jones, L., Montgomery, H.E., Rumley, A., Sharma, P., Lowe, G.D., World, M.J., Humphries, S.E., Hingorani, A.D., 2003. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 2063–2069.
- Buzonza, F., Iucivello, L., Di Castelnuovo, A., Glicca, F., Luciani, N., Zamporelli, R., Schiavello, R., Donati, M.B., Masci, A., Porsini, G., Andreotti, F., 2001. Relation of the –174G>C polymorphism of interleukin-6 to interleukin-6 plasma levels and to length of hospitalization after surgical coronary revascularization. *Am. J. Cardiol.* 88, 1125–1128.
- Cancello, R., Toussain, A., Poitou, Ch., Clement, K., 2004. Adiposity signals, genetic and body weight regulation in humans. *Diabetes Metab.* 30, 215–227.
- Chan, D.C., Wain, G.F., Ng, T.W., Uchida, Y., Sakai, N., Yamashita, S., Barrett, P.H., 2005. Adiponectin and other adipocytokines as predictors of markers of triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Clin. Chem.* 51, 578–585.
- Chasman, D.I., Posada, D., Subramanyam, L., Cook, N.R., Stanton Jr, V.P., Ridker, P.M., 2004. Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. *JAMA* 291, 2821–2827.
- Chen, Z.S., Hopper-Borge, E., Belinsky, M.G., Shchavaleva, I., Kotova, E., Kruh, G.D., 2003. Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCG10). *Mol. Pharmacol.* 63, 351–358.
- Chevillard, C., Jouquey, S., Bree, F., Mathies, M.N., Stepniowski, J.P., Tillement, J.P., Hanon, G., Corvol, P., 1994. Compared properties of ramolapril, enalapril, and their diacid metabolites. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23 (Suppl. 4), S11–S15.
- Chkrel, M., Kuhn, H., Heffl, P., Baumgartner, H.R., 1996. Endothelial dysfunction and subendothelial monocyte macrophages in hypertension. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition. *Hypertension* 18, 132–141.
- Dandona, P., Ajlaja, A., Bandyopadhyay, A., 2004. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 25, 4–7.
- De Maat, M.P., Kastelein, J.J., Jukema, J.W., Zwinderman, A.H., Jansen, H., Groeneweg, B., Bruschke, A.V., Kluij, C., 1998. –455G/A polymorphism of the beta-fibrinogen gene is associated with the progression of coronary atherosclerosis in symptomatic men: proposed role for an acute-phase reaction pattern of fibrinogen. RHEGROSS group. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 265–271.
- De Maat, M.P., Jukema, J.W., Ye, S., Zwinderman, A.H., Moghaddam, P.H., Beekman, M., Kastelein, J.J., van Boven, A.J., Bruschke, A.V., Humphries, S.E., Kluij, C., Henney, A.M., 1999. Effect of the stromalysin-1 promoter on efficacy of pravastatin in coronary atherosclerosis and restenosis. *Am. J. Cardiol.* 83, 852–856.

- Doherty, N.S., Litman, B.H., Reilly, K., Swindell, A.C., Buss, J.M., Anderson, N.L., 1998. Analysis of changes in acute-phase plasma proteins in an acute inflammatory response and in rheumatoid arthritis using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 355–363.
- Dzieliak, D.J., 1992. The immune system and hypertension. *Hypertension* 19, 136–144.
- Efferth, T., 2003. Adenosine triphosphate-binding cassette transporter genes in ageing and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* 2, 11–24.
- Ehara, S., Ueda, M., Naruko, T., Haze, K., Itoh, A., Otsuka, M., Komatsu, R., Matsuo, T., Iabe, H., Takano, T., Tsukamoto, Y., Yoshiyama, M., Takeuchi, K., Yoshikawa, J., Becker, A.E., 2001. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 103, 1955–1960.
- Ehrhardt, M., Lindenmaier, H., Barhene, J., Haeffel, W.E., Weiss, J., 2004. Influence of lipid lowering fibrates on P-glycoprotein activity in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 67, 285–292.
- Evans, W.E., McLeod, H.L., 2003. Pharmacogenomics—drug disposition, drug targets, and side effects. *N. Engl. J. Med.* 348, 538–549.
- Fathi, M., Corhals, G., Hochstrasser, D., 2003. Mass spectrometry in laboratory medicine. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, 1539.
- Fernandez-Real, J.M., Vendrell, J., Ricart, W., 2005. Circulating adiponectin and plasma fatty acid profile. *Clin. Chem.* 51, 603–609.
- Fernai, P., Sansonnes, A., Dick, B., Frey, F.J., 2001. In vivo 11beta-HSD-2 activity: variability, salt-sensitivity, and effect of folic acid. *Hypertension* 38, 1330–1336.
- Flex, A., Gaziani, E., Pola, R., Santoliquido, A., Aloi, F., Papaleo, P., DiLago, A., Pola, E., Sericchio, M., Tondi, P., Pola, P., 2002. The -174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter is associated with peripheral artery occlusive disease. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 24, 264–268.
- Frazier, L., Turner, S.T., Schwartz, G.L., Chapman, A.B., Boerwinkle, E., 2004. Multifocus effects of the renin-angiotensin-aldosterone system genes on blood pressure response to a thiazide diuretic. *Pharmacogenomics* 5, 17–23.
- Galteau, M.M., Shamsa, F., 2003. Urinary beta-hydroxycoisol: a validated test for evaluating drug induction or drug inhibition mediated through CYP3A in humans and in animals. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 59, 713–733.
- Gaw, A., 2003. HDL-C and triglyceride levels: relationship to coronary heart disease and treatment with statins. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 17, 53–62.
- Grobbec, D.E., Bois, M.L., 2004. Atherosclerotic disease regression with statins: studies using vascular markers. *Int. J. Cardiol.* 96, 447–459.
- Grundy, S.M., 2003. Inflammation, hypertension, and the metabolic syndrome. *JAMA* 290, 3000–3002.
- Guan, J.Z., Tamaawa, N., Murakami, H., Matsui, J., Yamato, K., Suda, T., 2003. Clofibrate, a peroxisome-proliferator, enhances reverse cholesterol transport through cytochrome P450 activation and oxysterol generation. *Tohoku J. Exp. Med.* 201, 251–259.
- Gylling, H., Hallikainen, M., Pihlajamäki, J., Agren, J., Laakso, M., Rajaratnam, R.A., Rauramaa, R., Miettinen, T.A., 2004. Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. *J. Lipid Res.* 45, 1660–1665.
- Haddou, M., Sest, G., Heibeth, B., Vincent-Viry, M., Visvikis, S., 2004. Glutathione S-transferases genetic polymorphisms and human diseases: overview of epidemiological studies. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 62, 15–24.
- Haddy, N., Sass, C., Maumus, S., Marie, B., Drosch, S., Sest, G., Lambert, D., Visvikis, S., 2005. Biological variations, genetic polymorphisms and familial resemblance of TNF-alpha and IL-6 concentrations: STANISLAS cohort. *Her. J. Hum. Genet.* 13, 109–117.
- Hall, D.A., Zhu, H., Zhu, X., Royce, T., Gerstein, M., Snyder, M., 2004. Regulation of gene expression by a metabolic enzyme. *Science* 306, 482–484.
- Halberg, P., Lind, L., Billbecker, K., Michaelsson, K., Karlsson, J., Kurland, L., Kahon, T., Malmqvist, K., Ohman, K.P., Nystrom, P., Liljedahl, U., Syvanen, A.C., Melhus, H., 2004. Transforming growth factor beta1 genotype and change in left ventricular mass during antihypertensive treatment—results from the Swedish Ibesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA). *Clin. Cardiol.* 27, 169–173.
- Hanajima, N., Katsuda, N., Matsuo, K., Saito, T., Ito, L.S., Ando, M., Inoue, M., Takezaki, T., Tajima, K., 2001. Smoking habit and interleukin 1B C-31T polymorphism. *J. Epidemiol.* 11, 120–125.
- Hingorani, A.D., Jia, H., Stevens, P.A., Hopper, R., Dickerson, J.E., Brown, M.J., 1995. Renin-angiotensin system gene polymorphisms influence blood pressure and the response to angiotensin converting enzyme inhibition. *J. Hypertens.* 13, 1602–1609.
- Hopper-Boege, E., Chen, Z.S., Shchavoleva, I., Belinsky, M.G., Krub, G.D., 2004. Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer Res.* 64, 4927–4930.
- Hussein, O., Schlezinger, S., Rosenblat, M., Keidar, S., Aviram, M., 1997. Reduced susceptibility of low density lipoprotein (LDL) to lipid peroxidation after fluvastatin therapy is associated with the hypocholesterolemic effect of the drug and its binding to the LDL. *Atherosclerosis* 128, 11–18.
- Iddeker, T., Thorsson, V., Ranish, J.A., Christmas, R., Bühler, J., Eng, J.K., Bumgarner, R., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Hood, L., 2001. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* 292, 929–934.
- Imai, Y., Takahara, S., Asada, S., Sugimoto, Y., 2004. Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance proteins/ABCG2-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.* 64, 4346–4352.
- Inami, S., Okamoto, K., Takano, M., Takagi, G., Sakai, S., Sano, J., Mizuno, K., 2004. Effects of statins on circulating oxidized low-density lipoprotein in patients with hypercholesterolemia. *Jpn. Heart J.* 45, 969–975.
- Jackson, K., Zeman, J., Kuhn, M., Hutchinson, A., Tonisson, N., Glavic, D., Ravnik-Glavac, M., Hawlina, M., Meltzer, M.R., Canoso, R.C., Testa, P., Mangeri, A., Hoyng, C.B., Gouans, P., Simondr, E., Lewis, R.A., Lupski, J.R., Cremens, F.P., Allikmets, R., 2003. Genotyping microarray (gene chip) for the ABCR (ABCR14) gene. *Human Mutat.* 22, 395–403.
- Jandacek, R.J., Woods, S.C., 2004. Pharmaceutical approaches to the treatment of obesity. *Drug Discovery Today* 9, 874–880.
- Jeunemaître, X., Soubrier, F., Kotlevnev, Y.V., Lifton, R.P., Williams, C.S., Chatur, A., Hunt, S.C., Hopkins, P.N., Williams, R.R., Lalouel, J.M., 1992. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 71, 169–180.
- Jia, H., Hingorani, A.D., Sharma, P., Hopper, R., Dickerson, C., Trutwein, D., Lloyd, D.D., Brown, M.J., 1999. Association of the G(alpha) gene with essential hypertension and response to beta-blockade. *Hypertension* 34, 8–14.
- Jia, H., Sharma, P., Hopper, R., Dickerson, C., Lloyd, D.D., Brown, M.J., 2000. Beta2-Adrenoceptor gene polymorphisms and blood pressure variations in East Anglian Caucasians. *J. Hypertens.* 18, 687–693.
- Johnson, J.A., Zisch, I., Puckett, B.J., McGormy, S.P., Varandi, H.N., Pauly, D. F., 2003. Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms and antihypertensive response to metoprolol. *Clin. Pharmacol. Ther.* 74, 44–52.
- Jungblut, P., Otto, A., Zeindl-Eberhart, E., Plessner, K.P., Knaech, M., Regitz-Zagrosek, V., Fleck, E., Wittmann-Liebold, B., 1994. Protein composition of the human heart: the construction of a myocardial two-dimensional electrophoresis database. *Electrophoresis* 15, 685–707.
- Jungblut, P.R., Zimny-Arndt, U., Zeindl-Eberhart, E., Sallik, J., Koupkova, K., Plessner, K.P., Otto, A., Muller, E.C., Sokolowska-Kohler, W., Grubler, G., Stoffler, G., 1999. Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis* 20, 2100–2110.
- Kajinami, K., Brousseau, M.E., Lamou-Fava, S., Ordovas, J.M., Schaefer, E.J., 2005. Gender-specific effects of estrogen receptor alpha gene haplotype on high-density lipoprotein cholesterol response to atorvastatin: interaction with apolipoprotein AI gene polymorphism. *Atherosclerosis* 178, 331–338.
- Karpe, F., Hamsten, A., 1994. Determination of apolipoproteins B-48 and B-100 in triglyceride-rich lipoproteins by analytical SDS-PAGE. *J. Lipid Res.* 35, 1311–1317.
- Kitano, H., 2002. Systems biology: a brief overview. *Science* 295, 1662–1664.
- Klucien, J., Buchler, C., Otto, E., Kaminski, W.E., Porsch-Oczurum, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., Allikmets, R., Schmitz, G., 2000. ABCG1 (ABCG8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 817–822.
- Komiyama, I., Yamada, T., Takasu, N., Asawa, T., Akamine, H., Yagi, N., Nagasawa, Y., Ohnaka, H., Miyahara, Y., Sakai, H., Sato, A., Aizawa, T.,

1997. An abnormal sodium metabolism in Japanese patients with essential hypertension, judged by serum sodium distribution, renal function and the renin-aldosterone system. *J. Hypertens.* 15, 65–72.
- Korhonen, K.S., Pankov, J., Offenbacher, S., Beck, J., di Giovine, F., Daff, G. W., 1999. Interleukin-1 genotypes and the association between periodontitis and cardiovascular disease. *J. Periodontol. Res.* 34, 353–357.
- Kovacs, A., Green, F., Hansson, L.O., Lundman, P., Samnegard, A., Boquist, S., Ericsson, C.G., Watkins, H., Hamsten, A., Tomvall, P., 2005. A novel common single nucleotide polymorphism in the promoter region of the C-reactive protein gene associated with the plasma concentration of C-reactive protein. *Atherosclerosis* 178, 193–198.
- Kowalski, J., Okopien, B., Madej, A., Zieliński, M., Belowski, D., Kallina, Z., Herman, Z.S., 2003. Effects of fenofibrate and simvastatin on plasma sICAM-1 and MCP-1 concentrations in patients with hyperlipoproteinemia. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 41, 241–247.
- Kurland, L., Mellbus, H., Karlsson, J., Kahana, T., Malmqvist, K., Ohman, K.P., Nystrom, F., Hagg, A., Lind, L., 2001. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism predicts blood pressure response to angiotensin II receptor type 1 antagonist treatment in hypertensive patients. *J. Hypertens.* 19, 1783–1787.
- Kurland, L., Mellbus, H., Karlsson, J., Kahana, T., Malmqvist, K., Ohman, P., Nystrom, F., Hagg, A., Lind, L., 2002. Aldosterone synthase (CYP11B2)-344 C/T polymorphism is related to antihypertensive response: result from the Swedish Ibesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) trial. *Am. J. Hypertens.* 15, 389–393.
- Kurland, L., Liljedahl, U., Karlsson, J., Kahana, T., Malmqvist, K., Mellbus, H., Syvanen, A.C., Lind, L., 2004. Angiotensinogen gene polymorphism: relationship to blood pressure response to antihypertensive treatment. Results from the Swedish Ibesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation vs Atenolol (SILVHIA) trial. *Am. J. Hypertens.* 17, 8–13.
- Langen, H., 2004. Proteomics and its applications in pharmaceutical industry. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42, A41.
- Lehtimäki, T., Laaksonen, R., Jauhoainen, T., Vesalainen, R., Nuutila, P., Matilla, K., Iveskoski, E., Luoma, M., Salonen, P., Kesäniemi, J., Hame, M., 2003. Interleukin-1B genotype modulates the improvement of coronary artery reactivity by lipid-lowering therapy with pravastatin: a placebo-controlled positron emission tomography study in young healthy men. *Pharmacogenetics* 13, 633–639.
- Lino, J.K., Linds, U., 2005. Pleiotropic effects of statins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 89–118.
- Libby, P., 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868–874.
- Lifton, R.P., 1996. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 272, 676–680.
- Liljedahl, U., Karlsson, J., Mellbus, H., Kurland, L., Linderson, M., Kahana, T., Nystrom, F., Lind, L., Syvanen, A.C., 2003. A microarray minisequencing system for pharmacogenetic profiling of antihypertensive drug response. *Pharmacogenetics* 13, 7–17.
- Lin, P.O., Doonan, P.T., MacDonald, T.M., 2001. Aldosterone to renin ratio as a determinant of exercise blood pressure response in hypertensive patients. *J. Hum. Hypertens.* 15, 119–123.
- Lin, P.O., Jung, R.T., MacDonald, T.M., 2002. Is aldosterone the missing link in refractory hypertension?: aldosterone-to-renin ratio as a marker of inappropriate aldosterone activity. *J. Hum. Hypertens.* 16, 153–158.
- Maccari, F., Gheduzzi, D., Volpi, N., 2003. Anomalous structure of urinary glycosaminoglycans in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Clin. Chem.* 49, 380–388.
- MacGregor, A.J., Gallimore, J.R., Spector, T.D., Pepys, M.B., 2004. Genetic effects on baseline values of C-reactive protein and serum amyloid A protein: a comparison of monozygotic and dizygotic twins. *Clin. Chem.* 50, 130–134.
- Mansour-Chemaly, M., Haddy, N., Siest, G., Visvikis, S., 2002. Family studies: their role in the evaluation of genetic cardiovascular risk factors. *Clin. Chem. Lab. Med.* 40, 1085–1096.
- Martens, J.B., Ziaou, M., Siest, G., Visvikis-Siest, S., 2005. Genetic determinants of blood pressure regulation. *J. Hypertens* 23, 2127–2143.
- Martin, M.F., Sarrail, K.E., McKenna, E., Dixon, J.S., Bird, H.A., Wright, V., 1984. Captopril: a new treatment for rheumatoid arthritis? *Lancet* 1, 1325–1328.
- Martin, G., Doezi, H., Blasquart, C., Berzewski, V., Poulain, P., Fruchart, J.C., Najib-Fruchart, J., Glisner, C., Staels, B., 2001. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J. Clin. Invest.* 107, 1423–1432.
- Manuyama, S., Yanagisawa, K., Kanamaru, R., Teno, S., Iwamoto, Y., 2001. Serum leptin level as an indicator to predict the clinical efficacy of troglitazone in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 53, 161–164.
- Mason, L.F., MacNeill, G., Avenell, A., 2003. Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1098–1111.
- Mattila, K.M., Frey, H., 1995. Two-dimensional analysis of qualitative and quantitative changes in blood cell proteins in Alzheimer's disease: search for extraneuronal markers. *Appl. Theor. Electrophor.* 4, 189–196.
- Maunus et al., in preparation. Pharmacogenomics of Dyslipidemia and lipid-lowering interventions.
- Mauze, H.H., Kraemer, T., Arlt, J.W., 1998. Screening for the detection of angiotensin-converting enzyme inhibition, their metabolites, and AT II receptor antagonists. *Ther. Drug Monit.* 20, 706–713.
- McConnell, J.P., 2005. Inflammatory biomarkers in cardiovascular disease. In: pp. 12–20.
- Meier, U., Gressner, A.M., 2004. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin. Chem.* 50, 1511–1525.
- Nakamura, T., Saito, Y., Ohyama, Y., Uchiyama, T., Sumino, H., Kurabayashi, M., 2004. Effect of cerivastatin on endothelial dysfunction and aortic CD36 expression in diabetic hyperlipidemic rats. *Hypertens. Res.* 27, 589–598.
- Nakano, Y., Oshima, T., Watanabe, M., Matsuda, H., Kajiyama, G., Kambe, M., 1997. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and acute response to captopril in essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 10, 1064–1068.
- Nisoli, E., Carruba, M.O., 2004. Emerging aspects of pharmacotherapy for obesity and metabolic syndrome. *Pharmacol. Res.* 50, 453–469.
- Nurnberger, J., Danmer, S., Mitchell, A., Siffert, W., Wenzel, R.R., Groll, M., Philipp, T., Michel, M.C., Schafers, R.F., 2003. Effect of the C825T polymorphism of the G protein beta 3 subunit on the systolic blood pressure-lowering effect of clonidine in young, healthy male subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 74, 53–60.
- Oram, J.F., Vaughan, A.M., Stocker, R., 2001. ATP-binding cassette transporter A1 mediates cellular secretion of alpha-tocopherol. *J. Biol. Chem.* 276, 39898–39902.
- Ordovas, J.M., Mooser, V., 2004. Nutrigenomics and nutrigenetics. *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 101–108.
- Ortlepp, J.R., Hanth, P., Mevisen, V., Kiel, G., Boggreffe, M., Hoffmann, R., 2002. Variants of the *CYP11B2* gene predict response to therapy with candesartan. *Eur. J. Pharmacol.* 445, 151–152.
- O'Shaughnessy, K.M., Fu, B., Dickenson, C., Thurston, D., Brown, M.J., 2000. The gain-of-function G389R variant of the beta-1-adrenoceptor does not influence blood pressure or heart rate response to beta-blockade in hypertensive subjects. *Clin. Sci. (Lond.)* 99, 233–238.
- Pedro-Bonet, J., Schaefer, E.J., Bakker-Arkema, R.G., Black, D.M., Stein, E.M., Comella, D., Ordovas, J.M., 2001. Apolipoprotein E genotype affects plasma lipid response to atorvastatin in a gender specific manner. *Atherosclerosis* 158, 183–193.
- Persidis, A., Deftereos, S., Persidis, A., 2004. Systems literature analysis. *Pharmacogenomics* 5, 943–947.
- Perusse, L., Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y.C., Weisnagel, S.J., Argyropoulos, G., Walts, B., Snyder, E.E., Bouchard, C., 2005. The human obesity gene map: the 2004 update. *Obes. Res.* 13, 381–490.
- Pimohamed, M., Pak, B.K., 2003. Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions. *Toxicology* 192, 23–32.
- Poch, E., Gonzalez, D., Giner, V., Bragulat, E., Coca, A., de La, S.A., 2001. Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms. *Hypertension* 38, 1204–1209.
- Pociot, F., Molvig, J., Wogensen, L., Worsaae, H., Neup, J., 1992. A *TaqI* polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* 22, 396–402.

- Raucy, J.L., Iasker, J., Ozaki, K., Zolna, V., 2004. Regulation of CYP2E1 by ethanol and palmitic acid and CYP4A11 by clofibrate in primary cultures of human hepatocytes. *Toxicol. Sci.* 79, 233–241.
- Reid, G., Wielinga, P., Zekker, N., van der Heijden, I., Kuil, A., de Haas, M., Wijnholds, J., Bont, P., 2003. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9244–9249.
- Renner, W., Nasch, M., Winkelmann, B.R., Hoffmann, M.M., Schamagl, H., Mayer, V., Boehm, B.O., Manz, W., 2005. Association of angiotensinogen haplotypes with angiotensinogen levels but not with blood pressure or coronary artery disease: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *J. Mol. Med.* 83, 235–239.
- Reubi, F.C., Weidmann, P., 1980. Relationships between sodium clearance, plasma renin activity, plasma aldosterone, renal hemodynamics and blood pressure in essential hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 2, 593–612.
- Ridker, P.M., Cushman, M., Stampfer, M.J., Tracy, R.P., Hennekens, C.H., 1997. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N. Engl. J. Med.* 336, 973–979.
- Ridker, P.M., Rifai, N., Pfeffer, M.A., Sacks, F.M., Moye, L.A., Goldmann, S., Flaker, G.C., Braunwald, E., 1998. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 98, 839–844.
- Ridker, P.M., Rifai, N., Clearfield, M., Downs, J.R., Wei, S.E., Miles, J.S., Gotto Jr., A.M., 2001. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N. Engl. J. Med.* 344, 1959–1965.
- Rifai, N., 2005. High-sensitivity C-reactive protein: a useful marker for cardiovascular disease risk prediction and the metabolic syndrome. *Clin. Chem.* 51, 504–505.
- Rigat, B., Hubert, C., Athene-Gelas, F., Cambien, F., Corvol, P., Soubrier, F., 1990. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J. Clin. Invest.* 86, 1343–1346.
- Romiti, N., Tramonzi, G., Chieli, E., 2002. Influence of different chemicals on MDR-1 P-glycoprotein expression and activity in the HK-2 proximal tubular cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 183, 83–91.
- Ruano, G., Collins, J.M., Domez, A.J., Wang, S.J., Guerciolini, R., Huang, S.M., 2004. Pharmacogenomic data submissions to the FDA: clinical pharmacology case studies. *Pharmacogenomics* 5, 513–517.
- Rundeck, T., Hekrod, M.S., Pittman, J., Boden-Albala, B., Martin, S., Humphries, S.E., Jao, S.H., Sacco, R.L., 2002. Carotid intima-media thickness is associated with allelic variants of stromelysin-1, interleukin-6, and hepatic lipase genes: the Northern Manhattan Prospective Cohort Study. *Stroke* 33, 1420–1423.
- Santila, S., Savinainen, K., Hurme, M., 1998. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN\*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. *Scand. J. Immunol.* 47, 195–198.
- Schaefer, J.R., Schwaer, H., Ikwaki, K., Stucke, H., Seyberth, H.J., Kaffanke, H., Maich, B., Steinmetz, A., 1999. Metabolic basis of high density lipoprotein and apolipoprotein A-I increase by HMG-CoA reductase inhibition in healthy subjects and a patient with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 144, 177–184.
- Scheeler, C., Muller, E.C., Stahl, J., Muller-Werdan, U., Sahlikow, J., Jungblut, P., 1997. Identification and characterization of heat shock protein 27 protein species in human myocardial two-dimensional electrophoresis patterns. *Electrophoresis* 18, 2823–2831.
- Schelleman, H., Klungel, O.H., van Duijn, C.M., Wineman, J.C., Hofman, A., de Boer, A., Stricker, B.H., 2005. Insertion/deletion polymorphism of the ACE gene and adherence to ACE inhibitors. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 59, 483–485.
- Schillaci, G., Piro, M., Gemelli, F., Pasqualini, L., Vaido, G., Marchesi, S., Siepi, D., Bagaglia, P., Mannarino, E., 2003. Increased C-reactive protein concentrations in never-treated hypertension: the role of systolic and pulse pressures. *J. Hypertens.* 21, 1841–1846.
- Schnitz, G., Drobnik, W., 2003. Pharmacogenomics and pharmacogenetics of cholesterol-lowering therapy. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, 581–589.
- Schnitz, G., Langmann, T., Heimerl, S., 2001. Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J. Lipid Res.* 42, 1513–1520.
- Schwartz, G.L., Turner, S.T., Chapman, A.B., Boerwinkle, E., 2002. Interacting effects of gender and genotype on blood pressure response to hydrochlorothiazide. *Kidney Int.* 62, 1718–1723.
- Sciarone, M.T., Stella, P., Barbasina, C., Manzoni, P., Lanzani, C., Bianchi, G., Cusi, D., 2003. ACE and alpha-adducin polymorphism as markers of individual response to diuretic therapy. *Hypertension* 41, 398–403.
- Sesso, H.D., Buring, J.E., Rifai, N., Blake, G.J., Gaziano, T.M., Ridker, P.M., 2003. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA* 290, 2943–2951.
- Sethi, A.A., Nordestgaard, B.G., Tybjaerg-Hansen, A., 2003. Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1269–1275.
- Siest, G., Henry, J., Schiele, F., 1990. Références en biologie clinique. Elsevier, Paris. Collection OPTION BK.
- Siest, G., Viivikis, S., Herberich, B., Gaeguen, R., Vincent-Viry, M., Sass, C., Beaud, B., Lecomte, E., Steinmetz, J., Locuy, J., Chevlier, P., 1998. Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas Cohort. *Clin. Chem. Lab. Med.* 36, 35–42.
- Siest, G., Bertrand, P., Herberich, B., Vincent-Viry, M., Schiele, F., Sass, C., Viivikis, S., 2000. Apolipoprotein E polymorphisms and concentration in chronic diseases and drug responses. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38, 841–852.
- Siest, G., Ferrari, L., Accasci, M.J., Batt, A.M., Viivikis, S., 2003. Pharmacogenomics of drugs affecting the cardiovascular system. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, 590–599.
- Siest, G., Jeannesson, E., Bernaboune, H., Maunus, S., Marteau, J.B., Mohr, S., Viivikis, S., 2004. Pharmacogenomics and drug response in cardiovascular disorders. *Pharmacogenomics* 5, 779–802.
- Snelis, B., Koenig, W., Habib, A., Merval, R., Lebret, M., Torn, I.P., Delerive, P., Fadel, A., Chinetti, G., Fruchart, J.C., Najib, J., Macdoug, J., Tedgui, A., 1998. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activation. *Nature* 393, 790–793.
- Stefkova, J., Polodna, R., Hubacek, J.A., 2004. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol. Res.* 53, 235–243.
- Steiner, S., Garlin, C.L., Lennon, J.J., McGrath, A.M., Aponte, A.M., Maluksky, A.J., Rohrs, M.C., Anderson, N.L., 2000. Proteomics to display lovastatin-induced protein and pathway regulation in rat liver. *Electrophoresis* 21, 2129–2137.
- Steiner, S., Garlin, C.L., Lennon, J.J., McGrath, A.M., Scouman, M.D., Maluksky, A.J., Aponte, A.M., Esquer-Blasco, R., Anderson, N.L., 2001. Cholesterol biosynthesis regulation and protein changes in rat liver following treatment with fluvastatin. *Toxicol. Lett.* 120, 369–377.
- Stollberger, C., Finsterer, J., 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in patients with cardio- or cerebrovascular disorders. *Z. Kardiol.* 92, 721–729.
- Struthers, A.D., Anderson, G., MacFadyen, R.J., Finser, C., MacDonald, T.M., 2001. Nonadherence with ACE inhibitors is common and can be detected in clinical practice by routine serum ACE activity. *Congest. Heart Fail.* 7, 43–46.
- Sudhop, T., von Bergmann, K., 2004. Sitosterolemia—a rare disease. Are elevated plant sterols an additional risk factor? *Z. Kardiol.* 93, 921–928.
- Suk, H.J., Ridker, P.M., Cook, N.R., Zee, R.Y., 2005. Relation of polymorphism within the C-reactive protein gene and plasma CRP levels. *Atherosclerosis* 178, 139–145.
- Suzumura, K., Yasuhara, M., Tanaka, K., Suzuki, T., 1999. Protective effect of fluvastatin sodium (XU-62-320), a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor, on oxidative modification of human low-density lipoprotein in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 57, 697–703.
- Teran, E., Escudero, C., Moya, W., Flores, M., Vallance, P., Lopez-Jaramillo, P., 2000. Markers of chronic inflammation in normal pregnancy and preeclampsia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 107, 201–208.
- Tewksbury, D.A., Durr, R.A., 1982. High molecular weight angiotensinogen levels in hypertensive pregnant women. *Hypertension* 4, 729–734.
- Tewksbury, D.A., Tryon, E.S., 1989. Immunochemical comparison of high molecular weight angiotensinogen from amniotic fluid, plasma of men, and plasma of pregnant women. *Am. J. Hypertens.* 2, 411–413.

- Tilly, P., Sassi, C., Vincent-Viry, M., Aguilon, D., Siest, G., Viovikis, S., 2003. Biological and genetic determinants of serum apoC-III concentration: reference limits from the Stanislas Cohort. *J. Lipid Res.* 44, 430–436.
- Toshima, S., Hasegawa, A., Kurabayashi, M., Iiabe, H., Takano, T., Sugano, J., Shimamura, K., Kimura, J., Michishita, I., Suzuki, T., Nagai, R., 2000. Circulating oxidized low density lipoprotein levels: A biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2243–2247.
- Tregouet, D.A., Ricard, S., Nicaud, V., Amouk, I., Soubigon, S., Rosier, M., Dauverger, N., Poitier, O., Mace, S., Kee, P., Morrison, C., Demele, P., Tiret, L., Evans, A., Deleuze, J.F., Cambien, F., 2004. In-depth haplotype analysis of *ABCA1* gene polymorphisms in relation to plasma ApoA1 levels and myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 775–781.
- Trivedi, J., Brull, D.J., Neofam, E.W., Montgomery, H.E., Morris, A., Mann, R.K., 2004. Effect of enalapril and losartan on cytokines in patients with stable angina pectoris awaiting coronary artery bypass grafting and their interaction with polymorphisms in the interleukin-6 gene. *Am. J. Cardiol.* 94, 564–569.
- Tripp, M.D., Smalder, Y.M., Wegman, J.J., Hu, X., Boer, J.M., ten Brink, J.B., Zwinderman, A.H., Kastelein, J.J., Feskens, E.J., Bergen, A.A., 2002. Frequent mutation in the *ABCC6* gene (R1141X) is associated with a strong increase in the prevalence of coronary artery disease. *Circulation* 106, 773–775.
- Tujillo, M.E., Scherer, P.E., 2005. Adiponectin—journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J. Intern. Med.* 257, 167–175.
- Tumer, S.T., Schwartz, G.L., Chapman, A.B., Boerwinkle, E., 2001. C825T polymorphism of the G protein beta(3)-subunit and antihypertensive response to a thiazide diuretic. *Hypertension* 37, 739–743.
- Tumer, S.T., Chapman, A.B., Schwartz, G.L., Boerwinkle, E., 2003. Effects of endothelial nitric oxide synthase, alpha-actinin, and other candidate gene polymorphisms on blood pressure response to hydrochlorothiazide. *Am. J. Hypertens.* 16, 834–839.
- Uchiyama-Kokubo, N., Naito, M., Nakajima, M., Tsuno, T., 2004. Transport of somatostatin and substance P by human P-glycoprotein. *FEBS Lett.* 574, 55–61.
- Van Driessche, N., Demant, J., Booth, E.O., Hill, P., Juvan, P., Zupan, B., Kuspa, A., Shaulsky, G., 2005. Epistasis analysis with global transcriptional phenotypes. *Nat. Genet.* 37, 471–477.
- Vane, J., 1987. The evolution of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their mechanisms of action. *Drugs* 33 (Suppl. 1), 18–27.
- Van Ommen, G.S., 2004. The human proteome organization plasma proteome project pilot phase: reference specimens, technology platform comparisons, and standardized data submissions and analyses. *Proteomics* 4, 1235–1240.
- Vincent-Viry, M., Schiele, F., Gueguen, R., Bohnet, K., Viovikis, S., Sisti, G., 1998. Biological variations and genetic reference values for apolipoprotein E serum concentrations: results from the STANISLAS cohort study. *Clin. Chem.* 44, 957–965.
- Weger, M., Steinbruggen, I., Haas, A., Marx, W., El Shabrawi, Y., Weger, W., Schmut, O., Renner, W., 2005. Role of the interleukin-6 -174 G>C gene polymorphism in retinal artery occlusion. *Stroke* 36, 249–252.
- Weisberg, P., 1999. Mechanisms modifying atherosclerotic disease — from lipids to vascular biology. *Atherosclerosis* 147 (Suppl. 1), S3–S10.
- White, P.C., Rainey, W.E., 2005. Editorial: polymorphisms in *CYP11B* genes and 11-hydroxylase activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 1252–1255.
- Williams, T.A., Muhtero, P., Filigheddu, F., Trofbi, C., Milan, A., Argiolas, G., Parpaglia, P.P., Veglio, F., Glorioso, N., 2005. Role of HSD11B2 polymorphisms in essential hypertension and the diuretic response to thiazides. *Kidney Int.* 67, 631–637.
- Wilson, D.S., Nock, S., 2002. Functional protein microarrays. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 81–85.
- Witzmann, F.A., Grant, R.A., 2003. Pharmacogenomics in drug development. *Pharmacogenomics* 4, 69–76.
- Wong, J., Quinn, C.M., Brown, A.J., 2004. Statins inhibit synthesis of an oxysterol ligand for the liver x receptor in human macrophages with consequences for cholesterol flux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 2365–2371.
- Yabe, D., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2002. Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12753–12758.
- Yang, T., Fipenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebemold, R., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2002. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110, 489–500.
- Yin, Q.Q., Shi, X., Tomlinson, B., Chow, M.S., 2004. Interindividual and intraindividual variability of the urinary 6beta-hydroxycortisol/cortisol ratio in Chinese subjects: implications of its use for evaluating CYP3A activity. *J. Clin. Pharmacol.* 44, 1412–1417.
- You, T., Yang, R., Lyles, M.F., Gong, D., Nicklas, B.J., 2005. Abdominal adipose tissue cytokine gene expression: relationship to obesity and metabolic risk factors. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E741–E747.
- Zanich, S.W., 2003. Treating the diabetic patient: appropriate care for glycemic control and cardiovascular disease risk factors. *Rev. Cardiovasc. Med.* 4 (Suppl. 6), S19–S28.
- Zelcer, N., Reid, G., Wielinga, P., Kull, A., van, d.H.J., Schuetz, J.D., Borst, P., 2003. Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem. J.* 371, 361–367.

## **Publication No9**

### **Pharmacogénomique et pharmacoprotéomique. Stratégie pour les médicaments cardio-vasculaires.**

Gérard Siest, Jean-Brice Marteau, Sandy Maumus, Hind Berrahmoune, Elise Jeannesson, Anastasia Samara, Anna-Marie Batt, Sophie Visvikis-Siest

Ann Pharm Fr, 2007, 65 : 203-10

La thérapeutique personnalisée est basée sur une meilleure connaissance de la variabilité biologique, en prenant en compte l'importance de la génétique. Afin d'identifier les gènes, ainsi que leurs produits, impliqués dans la réponse différentielle aux médicaments à visée cardio-vasculaire, nous proposons une stratégie en cinq étapes qui considère : 1) les gènes et phénotypes liés à la pharmacocinétique ; 2) les gènes et produits (cibles thérapeutiques) liés à la pharmacodynamie ; 3) les maladies et risques cardio-vasculaires vus sous l'angle des cycles métaboliques spécifiques en cause ; 4) les variations physiologiques des gènes et protéines précédemment identifiées ; 5) et l'influence de l'environnement. Après avoir pris comme exemple des gènes impliqués dans le métabolisme des médicaments, nous nous intéresserons aux statines, considérées comme étant des médicaments très importants d'un point de vue de santé publique. Il existe une grande variabilité de la réponse à ces médicaments notamment à cause de plusieurs polymorphismes dans les gènes cibles de ces hypolipémiants. Par ailleurs, à chacune des cinq étapes de la stratégie pharmacogénomique, nous avons, en plus de l'information génétique, besoin d'utiliser les informations disponibles au sujet des peptides, protéines et métabolites, qui sont généralement les produits des gènes. Une approche de type profil est nécessaire et utile en génomique mais aussi en protéomique. En conclusion, le nombre important de données va plus que jamais rendre nécessaire une interprétation intégrée des variations de l'ADN, de l'ARN messenger ainsi que des protéines au niveau individuel et de la population générale pour espérer, d'une façon cliniquement simple, adapter un médicament à chaque individu.

# Pharmacogénomique et pharmacoprotéomique

## Stratégie pour les médicaments cardio-vasculaires

G. Siest, J.-B. Marteau, S. Maumus, H. Berrahmoune, E. Jeannesson,  
A. Samara, A.-M. Batt, S. Visvikis-Siest

**Résumé.** La thérapeutique personnalisée est basée sur une meilleure connaissance de la variabilité biologique, en prenant en compte l'importance de la génétique. Afin d'identifier les gènes ainsi que leurs produits, impliqués dans la réponse différentielle aux médicaments à visée cardio-vasculaire nous proposons une stratégie en cinq étapes qui considère : 1) les gènes et phénotypes liés à la pharmacocinétique ; 2) les gènes et produits (cibles thérapeutiques) liés à la pharmacodynamie ; 3) les maladies et risques cardio-vasculaires vus sous l'angle des cycles métaboliques spécifiques en cause ; 4) les variations physiologiques des gènes et protéines précédemment identifiées ; 5) et l'influence de l'environnement. Après avoir pris comme exemple des gènes impliqués dans le métabolisme des médicaments, nous nous intéresserons aux statines, considérées comme étant des médicaments très importants d'un point de vue de santé publique. Il existe une grande variabilité de la réponse à ces médicaments notamment à cause de plusieurs polymorphismes dans les gènes cibles de ces hypolipémiants. Par ailleurs, à chacune des cinq étapes de la stratégie pharmacogénomique, nous avons en plus de l'information génétique, besoin d'utiliser les informations disponibles au sujet des peptides, protéines et métabolites, qui sont généralement les produits des gènes. Une approche de type profil est nécessaire et utile en génomique mais aussi en protéomique. En conclusion, le nombre important de données va plus que jamais rendre nécessaire une interprétation intégrée des variations de l'ADN, de l'ARN messenger ainsi que des protéines au niveau individuel et de la population générale pour espérer d'une façon cliniquement simple, adapter un médicament à chaque individu.

**Mots-clés :** Pharmacogénomique, Pharmacoprotéomique, Médicaments à visée cardio-vasculaire, Enzymes du métabolisme du médicament, Transporteurs ABC, Cibles thérapeutiques, Statines.

**Summary.** The development of personalized medicine will require improved knowledge of biological variability, particularly concerning the important impact of each individual's genetic makeup. A five-step strategy can be followed when trying to identify genes and gene products involved in differential responses to cardiovascular drugs: (1) Pharmacokinetic-related genes and phenotypes; (2) Pharmacodynamic targets, genes and products; (3) Cardiovascular diseases and risks depending on specific or large metabolic cycles; (4) Physiological variations of previously identified genes and proteins; (5) Environmental influences on them. After summarizing the most well known genes involved in drug metabolism, we used statins as an example. In addition to their economic impact, statins are generally considered to be of significant importance in terms of public health. Individuals respond differently to these drugs depending on multiple polymorphisms. Applying a pharmacoproteomic strategy, it is important to use available information on peptides, proteins and metabolites, generally gene products, in each of the five steps. A profiling approach dealing with genomics as well as proteomics is useful. In conclusion, the ever growing volume of available data will require an organized interpretation of variations in DNA and mRNA as well as proteins, both on the individual and population level.

**Key-words:** Pharmacogenomics, Pharmacoproteomics, Cardiovascular drug, Drug-metabolizing enzyme, ABC transporters, Drug target, Statins.

**Pharmacogenomics and pharmacoproteomics: a strategy for cardio-vascular drugs.** G. Siest, J.-B. Marteau, S. Maumus, H. Berrahmoune, E. Jeannesson, A. Samara, A.-M. Batt, S. Visvikis-Siest. *Ann Pharm Fr* 2007, 65: 203-210.

Inserm U525 Équipe 4, Faculté de pharmacie, Université Henri Poincaré Nancy I, 30, rue Lionnois, F 54000 Nancy.

Présentation devant l'Académie nationale de pharmacie, séance du 23 mars 2006 délocalisée à Nancy.

\* Cet article est dédié à la mémoire d'Anne-Marie Batt.

Correspondance : G. Siest, à l'adresse ci-dessus.

E-mail : gerard.Siest@pharma.uhp-nancy.fr

## Introduction

Nous avons récemment proposé une approche de pharmacogénomique en cinq étapes [1] pour un nouveau médicament à visée cardio-vasculaire (CV) qui prendrait en compte successivement les gènes impliqués dans :

- la pharmacocinétique (absorption, distribution, métabolisme, et élimination) ;
- la pharmacodynamie ;
- les désordres cardio-vasculaires spécifiques et les déviations des voies métaboliques en cause ;
- la variabilité biologique de la réponse des gènes incluant leur régulation physiologique ;
- les interactions avec l'environnement.

Cependant, si l'on considère les outils actuels en pharmacogénomique, une stratégie complète a besoin de l'intégration du produit du gène mesuré en laboratoire.

Ces bio-marqueurs peuvent être des métabolites résultant de l'activité des enzymes métabolisant les médicaments, des cibles pharmacodynamiques ou des *clusters* de peptides liés au processus inflammatoire. À la quantité extraordinaire d'informations qui peuvent être fournies aujourd'hui par les protéines plasmatiques séparées par des procédés tels que l'électrophorèse bidimensionnelle ou la spectrométrie de masse (HUPO) [2, 3], nous devons ajouter celles de génomique et de transcriptomique.

## La pharmacocinétique

Les médicaments à visée CV sont en général lipophiles et influencés par les quatre processus pharmacocinétiques : l'absorption, la distribution, le métabolisme, et l'élimination. Les enzymes métabolisant les médicaments agissent pendant l'une des deux premières phases du métabolisme du substrat : durant la phase de fonctionnalisation (ex. CYP450) ou durant la phase de conjugaison [ex. glutathion *S*-transférase (GST)]. Le produit est alors pris en charge par un transporteur [ex. *ATP-binding cassette* (ABC) transporteurs] qui permet son excrétion.

Tous les gènes de ce processus sont polymorphes. Quelques exemples sont présentés à la suite pour ce qui est de la phase I (cytochromes *P450*)

et de la phase II (enzymes de conjugaison), les enzymes du métabolisme des médicaments et pour la phase III, les transporteurs des médicaments. Pour plus de détails, lire la revue parue dans *Pharmacogenomics* sur la pharmacogénomique et la réponse aux médicaments dans les pathologies CVs [1].

### Phase I — enzymes du métabolisme

des médicaments : cytochromes *P450* ex. *CYP2D6*

Il existe environ 60 gènes de cytochrome *P450* chez l'Homme. Les polymorphismes de ces gènes peuvent être obtenus sur internet (*Homepage of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee*; <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>).

De manière très intéressante, malgré le fait que plusieurs de ces CYP450 aient la capacité de métaboliser des médicaments, la majorité de ce processus par les CYP chez l'Homme est catalysée par les sous-familles CYP2D6, CYP3A, et CYP2C. Quelques-unes de ces voies ont été montrées comme ayant une conséquence importante sur la pharmacocinétique des médicaments concernés. Bien que le CYP2D6 ne soit pas une enzyme majeure en terme de quantité dans le foie (1,5 à 2,5 % des CYP totaux), il métabolise un quart des médicaments et environ 40 d'entre eux sont utilisés dans les pathologies CV. Les individus ayant peu ou pas d'activité enzymatique de CYP2D6 déterminée génétiquement sont dits « métaboliseurs faibles » alors que ceux ayant une enzyme totalement fonctionnelle sont dits « métaboliseurs efficaces ». De plus, ceux qui présentent une duplication ou triplication de ce gène sont dits « métaboliseurs ultrarapides ».

Les accidents dus à l'accentuation des effets secondaires et à la toxicité des médicaments non transformés auraient pu être évités si ces connaissances existaient il y a vingt-cinq ans.

Le statut « métaboliseur » peut être prédit par des génotypes. Une puce à ADN est disponible aujourd'hui sur le marché, il s'agit de la puce *Roche Diagnostics' AmpliChip™ CYP450 Genotyping Test*. C'est la première de sa classe à être agréée par la FDA (décembre 2004) pour l'analyse des gènes influençant le métabolisme des médicaments. Ce test, mis au point par Affymetrix, permet d'analyser les génotypes des gènes des cytochromes *P450* 2D6 et 2C19. Aujourd'hui des

## Pharmacogénomique et -protéomique cardio-vasculaires

polymorphismes supplémentaires des gènes *CYP450* devraient être ajoutés à cette puce.

Par ailleurs, le statut de « métaboliseur faible, efficace ou ultrarapide » peut être aussi déterminé par phénotypage en utilisant un substrat spécifique bien toléré et facile à mesurer. Par exemple, le dextrométhorphan ou la débrisoquine pour *CYP2D6*.

En effet, la débrisoquine est transformée dans le foie en 4-hydroxydébrisoquine par *CYP2D6*. Ces deux composés sont ensuite éliminés dans l'urine. La mesure des concentrations de ces deux composés permet de calculer un rapport métabolique et de classer les sujets en métaboliseurs faibles, efficaces ou ultrarapides.

### Phase II — enzymes du métabolisme des médicaments *ex. les glutathion S-transférase (GST)*

Des polymorphismes génétiques ont été décrits dans les gènes de plusieurs enzymes du métabolisme des médicaments de la phase II. Cependant, ils semblent d'une moindre importance en pharmacogénomique des médicaments à visée CV. L'exception pourrait être celle des gènes des GSTs qui peuvent moduler le risque CV. En effet, les GSTs sont impliquées dans la protection du tissu vasculaire contre le stress oxydant et les dommages cellulaires induits par de nombreux agents pro-carcinogènes. L'inflammation et le stress oxydant sont deux phénomènes qui contribuent à la formation des plaques athéromateuses. Les polymorphismes des gènes *GSTM1* et *GSTT1* moduleraient les risques inflammatoires [4]. Selon ces auteurs (Habdous M *et al.*), l'allèle nul *GSTM1\*0* et l'allèle fonctionnel *GSTT1\*1* sont associés à un risque élevé de développer des maladies coronariennes chez les fumeurs et l'allèle *GSTT1\*1* est associé à un risque élevé d'artérite des membres inférieurs.

### Phase III — les transporteurs des médicaments *ex. glycoprotéine P*

Le métabolisme hépatique n'est pas le seul déterminant de la pharmacocinétique des médicaments. Les systèmes de transport des médicaments, qui peuvent être subdivisés en deux groupes : les systèmes d'influx et d'efflux, reçoivent une attention de plus en plus impor-

tante pour leur rôle en pharmacocinétique (absorption intestinale, transport hépatique et élimination rénale). Ces systèmes de transport sont aussi polymorphes. Les systèmes d'efflux sont souvent représentés par la superfamille des ABC (*ATP-binding cassette*) qui peuvent être divisés en sept sous-familles. Le gène *ABCB1* (aussi appelé *MDR1* pour *multi-drug résistance 1*) qui est responsable de la résistance des cellules cancéreuses aux substances cytotoxiques via un mécanisme d'efflux, est un membre de la sous-famille ABC-B des transporteurs. Ce gène code pour le transporteur majeur : la glycoprotéine P (P-gp), qui est exprimée dans l'intestin, les reins, le cerveau, le foie et d'autres organes. La P-gp transporte divers médicaments à travers les cellules intestinales et rénales et joue donc un rôle dans les processus de distribution et d'élimination. Plusieurs médicaments ont été montrés comme étant des substrats, inducteurs ou inhibiteurs des transporteurs. Quelques médicaments comme la ciclosporine sont à la fois des substrats et des inhibiteurs de la P-gp, alors que d'autres médicaments sont uniquement des inhibiteurs (*ex.* la nifédipine) ou des substrats (*ex.* la digoxine). Une expression altérée de la P-gp a été associée à des polymorphismes génétiques résultant en une absorption altérée. Spécifiquement, le polymorphisme 3435C/T dans le gène *ABCB1* a été associé à une réduction de l'expression intestinale et de ce fait, à une augmentation de la concentration en digoxine dans le plasma. Les patients portant ce polymorphisme ont donc besoin de doses moindres de digitaliques — des substrats de la P-gp.

## La pharmacodynamie *ex. les statines*

La variabilité génétique des systèmes de pharmacodynamie est un déterminant important de la réponse aux médicaments. Il existe plusieurs types de cibles aux médicaments à visée CV : les récepteurs, les enzymes, les canaux ioniques, les lipoprotéines, les facteurs de coagulation et les voies de transduction. Toutes ces cibles ont une variabilité génétique qui peut par exemple altérer l'affinité de la liaison d'un médicament ou de l'un de ses métabolites et donc de moduler sa réponse.

Nous avons précédemment décrit les plus importants polymorphismes influençant la pharmacodynamie des médicaments à visée CV [1]. Ces polymorphismes concernent les gènes suivants : l' $\alpha$ -adducine (Gly460Trp), l'angiotensinogène (Met235Thr), le récepteur de type 1 de l'angiotensin-II (A1166C), l'enzyme de conversion de l'angiotensine (*ACE*) (insertion/délétion (*I/D*)), la protéine de transfert de l'ester de cholestérol (*CETP*) (B1/B2), l'apolipoprotéine *E* (*APOE*) (E2/E4), le facteur V Leiden (Arg506Gln), et le gène de la glycoprotéine IIIa (*GPIIIa*) (*PIIa/IIb* polymorphism).

Pour illustrer l'aspect pharmacodynamique de la variabilité de la réponse aux médicaments, nous avons choisi l'exemple des statines dont la cible thérapeutique principale est la HMG CoA réductase (3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl coenzyme A réductase). Un excellent exemple de l'étendue des réponses induites par les statines est donné par les résultats de l'étude de Pedro-Botet *et al.* [5] (*fig. 1*). Cette étude a inclus 328 hommes et femmes qui ont participé à un essai multi-centrique en double-aveugle et ont été traités par l'atorvastatine à raison de 10 mg/jour. Comme montré dans la *figure 1*, la plupart des individus présentent un pourcentage moyen de changement en LDL (*low-density lipoprotein*)-cholestérol, triglycérides et HDL (*high-density lipoprotein*)-cholestérol relativement important. Cependant, plusieurs patients ont montré des réponses très différentes à l'atorvastatine. La contribution de la génétique à la variabilité des effets des médicaments est estimée à 20-95 % [6]. La liste contenant les gènes candidats de la pharmacogénomique des statines est présentée dans le *tableau 1*. Une première liste a été décrite par Chasman *et al.* [7] puis plus récemment par Thompson *et al.* [8]. Le gène *HMGCR* de la HMG CoA réductase peut être cité comme exemple des gènes polymorphes récemment rapportés. Deux SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) fréquents et fortement liés dans le gène de la *HMGCR* (deux substitutions : A > T à la position 74726928 et T > G à la position 74739571) ont été associés à la réponse à la pravastatine [7]. L'efficacité de la pravastatine chez les individus hétérozygotes pour le SNP est réduite de 19 % en terme de diminution de la concentration en LDL-cholestérol.

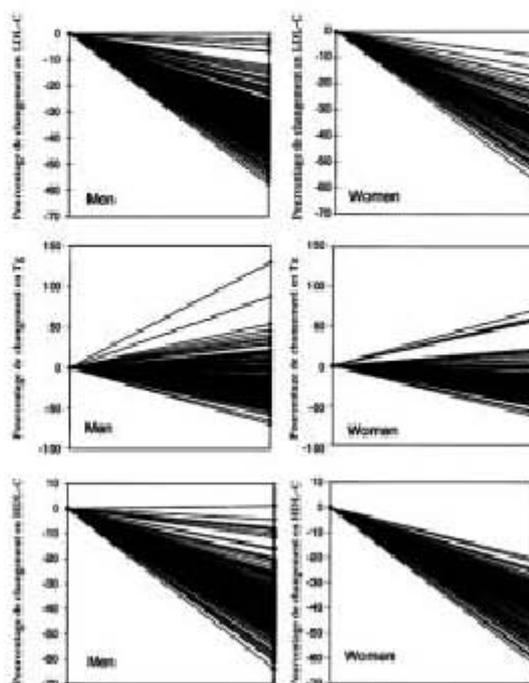


Figure 1. La réponse individuelle en pourcentage de LDL-cholestérol, triglycérides, et HDL-cholestérol après une dose de 10 mg/jour d'atorvastatine (Pedro-Botet *et al.*, 2001 [5] ; avec permission).

Individual LDL-cholesterol, triglycerides, and HDL-cholesterol percent response to 10 mg per day of atorvastatin (Pedro-Botet *et al.*, 2001 [5]; with permission).

## De la pharmacogénomique à la pharmacoprotéomique

À travers les différents exemples que nous avons pris, plusieurs enzymes, protéines de structure, peptides et récepteurs peuvent être utilisés comme phénotypes pour s'engager dans le suivi pharmacoprotéomique des médicaments CVs.

Dans la *figure 2*, nous donnons quelques exemples de marqueurs protéomiques couramment mesurés en laboratoire. Cependant, la pharmacogénomique des médicaments cardiovasculaires est plus que cela. Nous devons suivre une stratégie à grande échelle comme pour le génotypage et les profils d'expression, en utilisant de puissantes méthodes telles que les gels d'électrophorèse

## Pharmacogénomique et -protéomique cardio-vasculaires

---

Tableau I. — Les gènes candidats et les protéines correspondantes pour une étude intégrative de la pharmacogénomique des statines (nomenclature HUGO).

*Candidate genes and their respective encoded proteins for an integrative study of the pharmacogenomics of statins (HUGO nomenclature).*

---

Gènes candidats impliqués dans le métabolisme des lipides (synthèse du cholestérol, absorption, transport...) et qui peuvent affecter l'efficacité des hypolipémiants en modulant la régulation de la concentration en lipides)

HMGCR (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase)

FDFT1 (farnesyl diphosphate farnesyltransferase 1, squalene synthase)

LPL (lipoprotein lipase)

HL/LIPC/LIPH (hepatic triglyceride lipase)

EL (endothelial lipase)

PPARA (peroxisome proliferator-activated receptor alpha)

APOA1 (apolipoprotein A-I)

APOA2 (apolipoprotein A-II)

APOC3 (apolipoprotein C-III)

APOA4 (apolipoprotein A-IV)

APO A1-C3-A4 cluster

APOA5 (apolipoprotein A-V)

APOB (apolipoprotein B)

APOE (apolipoprotein E)

Lp(a) (lipoprotein (a))

LCAT (lecithin cholesterol acyltransferase)

CETP (cholesteryl ester transfer protein)

FABPL/FABP1 (liver fatty acid-binding protein)

LDLR (LDL receptor)

FATP (fatty acid transport protein)

SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein 1)

SREBP2 (sterol regulatory element-binding protein 2)

SRB1/CLA1

INSIG1 (insulin-induced gene 1)

INSIG2 (insulin-induced gene 2)

SCAP (SREBP cleavage activating protein)

S1P (site-1 protease)

S2P (site-2 protease)

LEPR (leptin receptor)

PON1 (paraoxonase 1)

ACAT/ACAT1 (mitochondrial acetyl-CoA acetyltransferase)

Gènes candidats non-impliqués dans le métabolisme des lipides

ACE (angiotensin-converting enzyme)

FGB ( $\beta$ -fibrinogen)

MMP3/STMY1 (matrix metalloproteinase 3, stromelysin 1)

GP IIIa (glycoprotein IIIa)

Cd36/GP IIIb (Cd36 antigen, glycoprotein 3b, fatty acid translocase)

ESR1 (estrogen receptor  $\alpha$ )

---

à deux dimensions [9], la spectrométrie de masse [3] ou les puces à protéines [10].

Il est clair que les approches en protéomique sont très utiles durant le développement de nouveaux médicaments [11] pour contrôler leur toxicité en incluant les interactions entre médicaments et dans plusieurs états pathologiques [12]. Cependant, pour utiliser plus spécifiquement la pharmacoprotéomique dans le domaine CV, nous avons besoin de mieux connaître le profil du protéome des organes impliqués : le cœur [13, 14], les vaisseaux, et quelques cellules sanguines spécifiques comme les lymphocytes. Ici encore, la recherche d'un groupe de protéines spécifiques, lié si possible à une voie métabolique (ex. protéines du stress) sera très utile [15]. La relation avec d'autres pathologies peut également apporter des informations intéressantes, comme c'est le cas pour les marqueurs protéiques inflam-

matoires dans les arthrites rhumatoïdes [16, 17] ou pour l'oxydation chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Enfin, l'approche protéomique pourrait être appliquée dans la détermination de la composition des particules impliquées dans l'évaluation du risque CV telles que les LDL ou les HDL qui sont hétérogènes. Le profil des particules va probablement apporter un réel progrès dans la connaissance de la composition et du rôle fonctionnel de leurs constituants [18].

Les pathologies CV ne peuvent pas être étudiées directement, l'expression clinique de ces pathologies multifactorielles étant trop hétérogène [19]. Nous avons donc besoin de cibler des voies métaboliques liées aux désordres CV qui sont les cibles réelles des médicaments et la clé des réponses pharmacogénomiques et pharmacoprotéomiques individuelles.

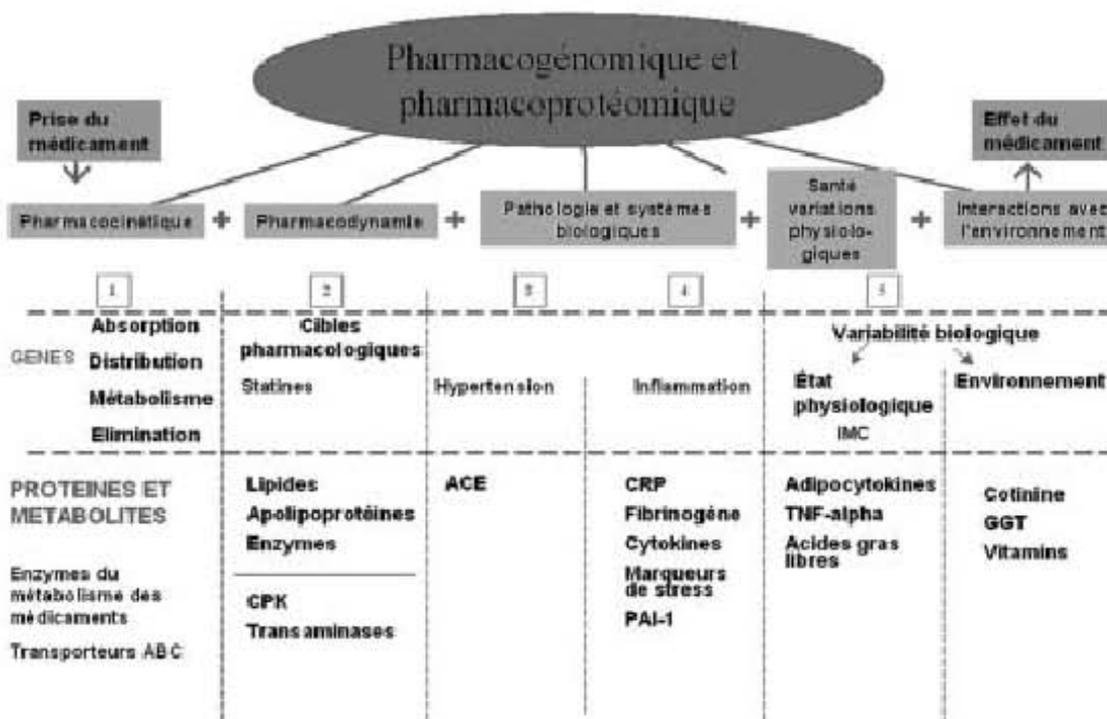


Figure 2. Exemples de marqueurs pharmacoprotéomiques mesurés en plus des 5 groupes de marqueurs pharmacogénomiques. ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine ; IMC : indice de masse corporelle ; CPK : créatine phosphokinase ; CRP : C-reactive protéine ; GGT : gamma glutamyl transférase ; TNF alpha : facteur nécrosant de tumeurs.

Examples of pharmacoproteomic markers measured in addition to each of the five groups of pharmacogenomic markers.

Nous devons prendre en compte, après l'analyse de la littérature [20-24], l'approche des systèmes biologiques proposés par Kitano et al [25] qui implique un nouveau mode de raisonnement en biologie. Parce qu'un système n'est pas seulement un assemblage de gènes et de protéines, les propriétés qui en découlent ne peuvent pas être entièrement comprises en dessinant simplement des diagrammes de leurs inter-connexions. Bien qu'un diagramme représente un important « premier » pas, il est analogue à une carte routière statique, alors que ce que nous cherchons vraiment à savoir est la modélisation des profils : pourquoi certains émergent, et comment les contrôler.

Les bio-marqueurs génomiques et protéomiques sont des mesures biologiques qui servent d'indices de la progression de la maladie et/ou des résultats de la thérapeutique — ils sont devenus très utiles comme base décisionnelle dans le développement des médicaments. Utilisés indépendamment ou en combinaison comme indicateurs, les bio-marqueurs peuvent refléter une variété de situations, incluant l'exposition à une substance de l'environnement ou un effet génétique. Avec leur utilisation potentielle comme phénotype substitutif pour indiquer l'efficacité ou la toxicité d'un médicament, les bio-marqueurs sont en train d'émerger comme la solution à plusieurs problèmes auxquels doivent faire face actuellement les compagnies pharmaceutiques. Les marqueurs génomiques et protéomiques de la réponse aux médicaments à visée CV devraient être utilisés pour identifier les individus ayant un risque élevé de développer une interaction médicamenteuse ou bien encore d'être non-répondeurs.

La pratique de la thérapeutique personnalisée devrait utiliser l'immense quantité de données en génomique, en protéomique et en métabolomique qui se développeront assez vite pendant les prochaines années grâce aux technologies multiplex [26]. Cependant, nous ne devons pas oublier que l'Homme vit dans des environnements spécifiques régulant l'expression des gènes et des produits des gènes. La nutrition, le tabac, l'alcool, l'obésité, et les autres médicaments comme les contraceptifs oraux, devront être particulièrement associés à la stratégie de pharmacogénomique et de pharmacoprotéomique des médicaments à visée CV.

## Conclusion

Nous devons disséquer les pathologies multifactorielles chroniques comme les pathologies CVs, en entités métaboliques séparées afin de sélectionner les gènes ainsi que les produits des gènes impliqués dans chaque voie métabolique. En suivant notre stratégie en cinq étapes, un médicament CV pourrait être adapté à chaque patient ou à un sous-groupe de patients en incluant un à dix gènes et un à dix marqueurs protéomiques ou métaboliques. Nous serions alors en mesure de proposer aux cliniciens un profil de pharmacodiagnostic avec une interprétation adaptée en utilisant une approche multidimensionnelle.

## Références

1. Siest G, Jeannesson E, Berrahmoune H, Maumus S, Marteau JB, Mohr S *et al*. Pharmacogenomics and drug response in cardiovascular disorders. *Pharmacogenomics* 2004; 5: 779-802.
2. Van Ommen GS. The human proteome organization plasma proteome project pilot phase: reference specimens, technology platform comparisons, and standardized data submissions and analyses. *Proteomics* 2004; 4: 1235-40.
3. Fathi M, Corthals G, Hochstrasser D. Mass spectrometry in laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 1539.
4. Haddous M, Siest G, Herbeth B, Vincent-Viry M, Visvikis S. Glutathione S-transferases genetic polymorphisms and human diseases: overview of epidemiological studies. *Ann Biol Clin* 2004; 62: 15-24.
5. Pedro-Botet J, Schaefer EJ, Bakker-Arkema RG, Black DM, Stein EM, Corella D *et al*. Apolipoprotein E genotype affects plasma lipid response to atorvastatin in a gender specific manner. *Atherosclerosis* 2001; 158: 183-93.
6. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003; 348: 538-49.
7. Chasman DI, Posada D, Subrahmanyam L, Cook NR, Stanton Jr VP, Ridker PM. Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. *JAMA* 2004; 291: 2821-7.
8. Thompson JF, Man M, Johnson KJ, Wood LS, Lira ME, Lloyd DB *et al*. An association study of 43 SNPs in 16 candidate genes with atorvastatin response. *Pharmacogenomics J* 2005; 5: 352-8.

9. Anderson NG, Anderson NL. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis* 1996; 17: 443-53.
10. Wilson DS, Nock S. Functional protein microarrays. *Curr Opin Chem Biol* 2002; 6: 81-5.
11. Witzmann FA, Grant RA. Pharmacoproteomics in drug development. *Pharmacogenomics J* 2003; 3: 69-76.
12. Aldred S, Grant MM, Griffiths HR. The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. *Clin Biochem* 2004; 37: 943-52.
13. Jungblut P, Otto A, Zeindl-Eberhart E, Plessner KP, Knecht M, Regitz-Zagrosek V *et al.* Protein composition of the human heart: the construction of a myocardial two-dimensional electrophoresis database. *Electrophoresis* 1994; 15: 685-707.
14. Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Zeindl-Eberhart E, Stulik J, Koupilova K, Regitz-Zagrosek V *et al.* Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis* 1999; 20: 2100-10.
15. Scheler C, Muller EC, Stahl J, Muller-Werdan U, Salnikow J, Jungblut P. Identification and characterization of heat shock protein 27 protein species in human myocardial two-dimensional electrophoresis patterns. *Electrophoresis* 1997; 18: 2823-31.
16. Mattila KM, Frey H. Two-dimensional analysis of qualitative and quantitative changes in blood cell proteins in Alzheimer's disease: search for extraneuronal markers. *Appl Theor Electrophor* 1995; 4: 189-96.
17. Doherty NS, Littman BH, Reilly K, Swindell AC, Buss JM, Anderson NL. Analysis of changes in acute-phase plasma proteins in an acute inflammatory response and in rheumatoid arthritis using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1998; 19: 355-63.
18. Karpe F, Hamsten A. Determination of apolipoproteins B-48 and B-100 in triglyceride-rich lipoproteins by analytical SDS-PAGE. *J Lipid Res* 1994; 35: 1311-7.
19. Bougneres P. Genetics of common obesity and type 2 diabetes: please forget diseases and study pathogenic traits. *Diabetes Metab* 2003; 29: 197-9.
20. Persidis A, Deftereos S, Persidis A. Systems literature analysis. *Pharmacogenomics* 2004; 5: 943-7.
21. Ideker T, Thorsson V, Ranish JA, Christmas R, Buhler J, Eng JK *et al.* Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* 2001; 292: 929-34.
22. Van Ommen GS. The human proteome organization plasma proteome project pilot phase: reference specimens, technology platform comparisons, and standardized data submissions and analyses. *Proteomics* 2004; 4: 1235-40.
23. Hall DA, Zhu H, Zhu X, Royce T, Gerstein M, Snyder M. Regulation of gene expression by a metabolic enzyme. *Science* 2004; 306: 482-4.
24. Van Driessche N, Demsar J, Booth EO, Hill P, Juvan P, Zupan B *et al.* Epistasis analysis with global transcriptional phenotypes. *Nat Genet* 2005; 37: 471-7.
25. Kitano H. Systems biology: a brief overview. *Science* 2002; 295: 1662-4.
26. Ruano G, Collins JM, Dorner AJ, Wang SJ, Guerciolini R, Huang SM. Pharmacogenomic data submissions to the FDA: clinical pharmacology case studies. *Pharmacogenomics* 2004; 5: 513-7. <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>

## ABSTRACT

The metabolic syndrome (MS) describes a concept or a pre-pathological state that raises the risk for developing type 2 diabetes and cardiovascular disease (CVD). The classic components of this state are obesity, hypertension, disturbed lipid profile and insulin resistance. Inflammation and hepatic steatosis are more and more considered as important elements of this cluster.

Obesity plays a crucial role probably causal/central for the development and the installation of the other parameters associated to the MS. The excessive accumulation of fat mass, particularly in the abdomen, leads to low-grade systemic inflammation. Indeed, the adipose tissue produces adipokines such as leptin, visfatin, IL-6 and TNF- $\alpha$  that are implicated in the inflammatory processes. Adipokines are the mediators of the actions of the adipose tissue and could have deleterious effects for the organism, even before the installation of severe obesity.

The STANISLAS cohort has enabled us to fulfil our research work due to: a) its longitudinal (3 points of recruitment with an interval of 5 years) and familial character (nuclear families), b) its relatively homogeneous composition (supposed healthy individuals, without diabetes, CVD or severe obesity), c) the collection of a great number of data concerning conventional (anthropometric characteristics, adiposity, blood pressure, lipid profile, glucose...) and novel risk factors (inflammatory markers, activity of hepatic enzymes, uric acid, circulating leptin...) of the MS and d) the existence of a PBMCs (Peripheral Mononuclear Blood Cells) mRNA and protein extracts banks, together with the other biological material (serum, plasma, DNA).

We were able to study the associations between 5 year-changes of the body mass index (BMI) and circulating leptin concentrations with the conventional and novel factors of the MS, as well as the expression of some adipokines (leptin, visfatin, IL-6 and TNF- $\alpha$ ) in the PBMCs, in order to explore their roles in the context of inflammation.

The longitudinal study on BMI changes and the factors associated with MS has shown that some of these factors evolve together (clusters) and that these groups of factors are associated with BMI changes in a sex dependent manner. We could define 5 clusters: 'protective lipids', 'risk lipids', 'inflammation', 'blood pressure' and 'hepatic enzymes'. We found significant associations between BMI changes and 'hepatic enzymes', 'protective lipids' only in men and between BMI changes and 'inflammation' only in women. These results suggest that an equivalent weight gain for women and men could result in different metabolic mechanisms between the two sexes.

As for the association of the cluster 'inflammation' and BMI changes only in women, it could be, at least partially, explained by leptin. The circulating leptin is associated with circulating CRP independently of adiposity in women. In this context, we have studied circulating leptin with a number of factors related to MS, by taking adiposity into account. We have verified the association between leptin and CRP only in women and we further revealed associations of uric acid, lipid profile and hepatic enzymes, exclusively in men. The above results could reflect different actions of this adipokine that are dependent to sex and independent to total fat mass. In other words, leptin could have direct effects on MS-related factors that are not dependent on total adiposity.

Another aim of the present work was to study the implication of adipokines in inflammation. Thus, we focalised our study on a specific to inflammation tissue, the PBMCs. We firstly studied the gene expression ('in house' micro-array) of an important number of genes implicated in 10 metabolic pathways associated to CVD (blood pressure, cellular adhesion, coagulation, oxidative stress, lipid and glucose metabolism and obesity, cellular growth factors, drug metabolizing enzymes, transcription factors, immune system). Most of the genes studied (166 out of 182) were expressed in PBMCs (among them some adipokines) with levels sufficient enough to quantify them. The results obtained underline the interest of using PBMCs as a model for studying the mechanisms linking adipokines with inflammation.

The quantification of mRNA of adipokines in PBMCs has shown associations of visfatin with BMI and gene expression of TNF- $\alpha$  and of leptin with blood pressure. These findings support the hypothesis of a contribution of these molecules in regulation of risk factors of CVD such as obesity and hypertension, in the context of inflammation.

The results obtained by this research work underline the mediating role of leptin and the impact of sex on the actions of this hormone and offers new perspectives for studying adipokines in the context of inflammation, by proposing a new model: PBMCs.

## RESUME

Le syndrome métabolique (SM) décrit un concept ou un état pré-pathologique qui augmente le risque de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires (MCV). Les composantes classiques de cet état sont l'obésité, l'hypertension, le profil lipidique et la résistance à l'insuline, alors que l'inflammation ainsi que l'atteinte hépatique sont de plus en plus considérées comme des éléments nouveaux de ce cluster.

L'obésité joue un rôle crucial et probablement causal/central pour le développement et l'installation des autres composantes du SM. L'accumulation excessive de la masse grasse, particulièrement abdominale, entraîne une inflammation systémique de faible niveau. En effet, le tissu adipeux secrète des adipokines, telles que la leptine, la visfatine, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  qui sont impliquées dans le processus d'inflammation. Les adipokines sont les médiateurs des actions du tissu adipeux et pourraient engendrer des effets délétères sur l'organisme, avant l'installation d'une obésité sévère.

La Cohorte STANISLAS a permis de mener nos travaux de recherche, grâce :a) à son caractère longitudinal (3 points de recrutement avec un intervalle de 5 ans) et familial (familles nucléaires), b) à sa composition relativement homogène (des individus supposés sains, non atteints de diabète, de MCV ou d'une obésité sévère), c) au recueil de nombreuses données concernant les facteurs de risque classiques (caractéristiques anthropométriques, adiposité, pression artérielle, profil lipidique, glucose..) et nouveaux (marqueurs d'inflammation, activité des enzymes hépatiques, acide urique, leptine circulante..) du SM et d) à l'existence d'une banque de PBMCs (Peripheral Mononuclear Blood Cells-cellules mononucléées circulantes) qui s'ajoute au matériel biologique classique (sérum, plasma, ADN).

Ainsi, nous avons pu étudier d'une part, les associations de l'évolution de 5 ans de l'indice de masse corporelle (IMC) et de la leptine circulante avec les facteurs du SM classiques et nouveaux, et d'autre part, l'expression de certaines adipokines (leptine, visfatine, IL-6 et TNF $\alpha$ ) dans les PBMCs, afin d'approfondir leurs rôles dans le contexte de l'inflammation.

L'étude longitudinale sur les changements de l'IMC et les facteurs du SM a démontré que certains de ces facteurs évoluent ensemble au fil du temps (clusters) et que ces groupes de facteurs sont liés avec l'IMC en fonction du sexe. Nous avons pu distinguer 5 clusters : 'lipides à risque', 'lipides de protection', 'inflammation', 'pression artérielle', 'enzymes hépatiques'. Les associations entre les 'enzymes hépatiques' et 'lipides de protection' et les changements de l'IMC sont significatifs seulement chez les hommes, alors que le cluster 'inflammation' est associé avec les changements de l'IMC exclusivement chez les femmes, suggérant qu'une prise de poids équivalente, déclenche des mécanismes métaboliques qui diffèrent entre les deux sexes.

En ce qui concerne l'association du cluster 'inflammation' avec l'aggravation de l'IMC chez les femmes, elle pourrait être expliquée, au moins partiellement, par la leptine. Les taux circulants de cette adipokine sont associés avec les taux de la CRP (C-Reactive Protein-protéine C-réactive), indépendamment de l'adiposité chez les femmes. Dans le même contexte, nous avons étudié cette adipokine en relation avec un ensemble de facteurs du SM, en tenant compte de l'adiposité. Nous avons pu constater une association de la leptine avec la CRP seulement chez les femmes et avec les enzymes hépatiques, l'acide urique et le profil lipidique exclusivement chez les hommes. Ces résultats pourraient refléter des actions différentes de cette adipokine liées au sexe et indépendantes de la masse grasse.

Pour approfondir l'implication des adipokines dans l'inflammation, nous nous sommes focalisés sur un tissu plus spécifique de l'inflammation que le plasma, les PBMCs. Nous avons élargi notre champ d'intérêt en étudiant, par une puce faite 'maison', 10 voies métaboliques liées aux MCV (pression artérielle, adhésion cellulaire, coagulation, stress oxydant, métabolismes lipidique et du glucose et obésité, facteurs de croissance cellulaire, enzymes du métabolisme des médicaments, facteurs de transcription, système immunitaire et inflammation). La plupart des gènes (166 sur 182) étudiés étaient exprimés ; parmi eux les adipokines, avec des taux d'expression suffisants pour les quantifier, ce qui souligne l'intérêt des PBMCs en tant que modèle, pour explorer les mécanismes liant les adipokines à l'inflammation.

La quantification de l'ARNm (RT-PCR) des adipokines, a démontré des associations, de la visfatine avec l'IMC et l'expression du TNF- $\alpha$ , et de la leptine avec la pression artérielle systolique et diastolique. Ces résultats confortent l'hypothèse d'une contribution de ces molécules aux facteurs de risque des MCV, tels que l'obésité et l'hypertension, dans le contexte de l'inflammation.

L'ensemble de nos résultats souligne le rôle-médiateur de la leptine et l'impact du sexe sur les actions de cette hormone et ouvre de nouvelles perspectives pour étudier les adipokines dans le contexte de l'inflammation, en proposant un modèle d'étude : les PBMCs.