

Université de Montréal

Rôle de la lipoprotéine lipase (LPL) dans l'athérogenèse.

par

Jean-Claude Mamputu Mbaki

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

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

Juin 1999

© Jean-Claude Mamputu Mbaki, 1999



QU
145
U58
2000
v. 002



Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée:
“Rôle de la lipoprotéine lipase (LPL) dans l’athérogenèse”

présentée par:
Jean-Claude Mamputu Mbaki

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président rapporteur:	Emile Levy
Directeur de recherche:	Geneviève Rénier
Membres du jury:	Christine DesRosiers Pierre Julien
Représentant du doyen:	Paul Brazeau

Thèse acceptée le: 20 décembre 1999

SOMMAIRE

Bien que la lipoprotéine lipase (LPL) puisse exercer un effet périphérique anti-athérogénique, de nombreuses évidences suggèrent que l'enzyme puisse jouer un rôle important dans le développement et la progression de l'athérosclérose. Il a été postulé que l'enzyme puisse exercer ses effets proathérogéniques tant par ses propriétés enzymatiques que par ses propriétés structurales. Les effets potentiels de la LPL dans le processus athérosclérotique incluent l'altération de la barrière endothéliale vasculaire par les acides gras libres dérivés de l'action hydrolytique de l'enzyme sur les lipoprotéines riches en triglycérides, la rétention des lipoprotéines dans la paroi artérielle, et la stimulation de la captation des lipoprotéines par les macrophages dérivés des monocytes et les cellules musculaires lisses. Nous avons examiné de nouveaux mécanismes par lesquels la LPL pourrait contribuer au développement de l'athérosclérose.

Dans notre première étude, nous avons examiné la possibilité que la LPL puisse, grâce aux sites de liaison aux héparans sulfate protéoglycans présents sur chacun de ses monomères, faciliter l'interaction des monocytes humains avec les cellules endothéliales. Nos résultats démontrent que 1) la LPL augmente l'adhésion des monocytes humains aux cellules endothéliales, 2) les héparans sulfate protéoglycans exprimés à la surface des monocytes humains et des cellules endothéliales sont indispensables pour cet effet, et 3) l'activité de la LPL est nécessaire pour son effet stimulant sur l'adhésion des monocytes humains à l'endothélium.

Dans notre deuxième étude, nous avons examiné l'effet de la LPL sur l'activation des monocytes et des macrophages dérivés des monocytes humains. Nos résultats mettent en évidence que 1) la LPL induit l'expression et la production du facteur de nécrose tumorale alpha par les monocytes et les macrophages dérivés des monocytes humains, 2) la différenciation des monocytes humains en macrophages est associée à une augmentation de l'expression et de la production du facteur de nécrose tumorale alpha induite par la LPL, et 3) la LPL exerce son effet via l'activation de la protéine kinase C.

Dans notre troisième étude, nous avons étudié l'effet de la LPL sur la prolifération des cellules musculaires lisses. Nos résultats démontrent que 1) la LPL stimule la prolifération des cellules musculaires lisses, 2) la liaison de la LPL aux héparans sulfate protéoglycans exprimés à la surface des cellules musculaires lisses est nécessaire pour son effet, et 3) l'activation de la protéine kinase C est impliquée dans la prolifération des cellules musculaires lisses induite par la LPL.

En conclusion, nous avons démontré que la LPL pourrait contribuer au développement et à la progression de l'athérosclérose par trois nouveaux mécanismes incluant la stimulation de l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire, l'activation des monocytes/macrophages, et la stimulation de la prolifération des cellules musculaires lisses.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iii
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xiii
Dédicace	xvi
Remerciements	xvii
Introduction	1
I.1. L'athérosclérose	2
I.1.1. Généralités	2
I.1.2. Facteurs de risque	6
I.1.3. Structure et biologie de la paroi artérielle	19
I.1.3.1. Structure de la paroi artérielle	19
I.1.3.2. Les cellules de la lésion athéromateuse	20
I.1.3.2.1. L'endothélium	20
I.1.3.2.2. Les cellules musculaires lisses	21
I.1.3.2.3. Les monocytes/macrophages	23
I.1.3.2.4. Les lymphocytes T	23
I.1.3.2.5. Les plaquettes	24

I.1.4. Stades de l'athérosclérose	25
I.1.4.1. La strie lipidique	25
I.1.4.2. La lésion intermédiaire ou pré-athérome	27
I.1.4.3. La plaque fibreuse ou lésion avancée	29
I.1.5. Étiopathogénie	31
I.1.5.1. Hypothèse de la réponse au dommage endothélial	32
I.1.5.2. Hypothèse de la réponse à la rétention	33
I.1.5.3. Hypothèse de l'infiltration des lipides	35
I.1.5.4. Hypothèse de la déficience en antioxydants	35
I.1.5.5. Hypothèse virale de l'athérosclérose	37
I.1.5.6. Hypothèse inflammatoire de l'athérosclérose	38
I.1.5.7. Hypothèse unifiée de l'athérosclérose	39
I.1.6. Mécanismes immunitaires de l'athérosclérose	41
I.1.6.1. Importance des facteurs immunitaires	41
I.1.6.1.1. Immunité cellulaire et athérosclérose	42
I.1.6.1.2. Auto-immunité et athérosclérose	47
I.1.6.2. Rôle immunomodulateur des facteurs nutritionnels	48
I.1.6.2.1. Effets des acides gras polyinsaturés sur les mécanismes immunitaires.	48
I.1.6.2.2. Effets des acides gras monoinsaturés sur les mécanismes immunitaires	54

I.1.7. Prévention et thérapie nutritionnelle des maladies cardio-vasculaires	55
I.1.7.1. Traitement de l'hyperlipidémie	55
I.1.7.2. Traitement de l'hypertension artérielle	56
I.1.7.3. Traitement du diabète ou de l'insulino-résistance	57
I.2. La lipoprotéine lipase	58
I.2.1. Généralités	58
I.2.1.1. Propriétés enzymatiques de la LPL.	60
I.2.1.2. Propriétés structurales de la LPL.	62
I.2.2. Organisation du gène	65
I.2.3. Structure et domaines fonctionnels de la LPL	67
I.2.4. Mécanismes de régulation de la LPL	68
I.2.4.1. Régulation transcriptionnelle	68
I.2.4.2. Régulation post-transcriptionnelle	70
I.2.4.2.1. Stabilité du messenger.	70
I.2.4.2.2. Glycosylation	70
I.2.4.2.3. Liaison de la LPL aux protéoglycans	71
I.2.4.2.4. Interaction avec l'apo CII.	72
I.2.5. Régulateurs physiologiques de la LPL	73
I.2.5.1. L'état de jeûne et l'état post-prandial	73
I.2.5.2. Régulateurs hormonaux et nutritionnels.	74
I.2.5.2.1. Les stéroïdes.	75
I.2.5.2.2. Insuline et IGF-1	76

I.2.5.2.3. Autres hormones	77
I.2.5.2.4. Les cytokines.	78
I.2.5.2.5. Les prostaglandines.	80
I.2.5.2.6. Les oxystérols	81
I.2.5.2.7. Le PDGF et le M-CSF.	82
I.2.5.2.8. Les nutriments	83
I.2.6. Rôle de la LPL dans la biologie des macrophages	84
I.2.7. Effets potentiels de la LPL dans le processus athérosclérotique	85
I.2.7.1. Effet pathologique de la LPL sur la paroi artérielle	85
I.2.7.2. Rôle de la LPL dans la rétention des lipoprotéines	87
I.2.7.3. Rôle de la LPL dans la captation des lipoprotéines par les macrophages et les cellules musculaires lisses	88
I.3. Hypothèse de travail	92
II. Résultats	95
II.1. Premier article:	96
“ Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells”	
II.2. Deuxième article:	122
“ Differentiation of human monocytes to monocyte-derived macrophages is associated with increased TNF α expression and production. A process involving cell surface proteoglycans”	

II.3. Troisième article:	148
“Proliferative effect of lipoprotein lipase on human vascular smooth muscle cells”	
III. Discussion	180
IV. Conclusions et perspectives	204
IV.1. Conclusions	205
IV.2. Perspectives	205
V. Références	208

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau 1.43
Tableau 2.86

ARTICLE 3

Tableau 1.161

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1.40
Figure 2.49
Figure 3.90

ARTICLE I

Figure 1.106
Figure 2.107
Figure 3.108
Figure 4.109
Figure 5.110
Figure 6.111
Figure 7.112

ARTICLE II

Figure 1.133
Figure 2.134
Figure 3.135
Figure 4.136

Figure 5. 137

ARTICLE III

Figure 1. 162

Figure 2. 163

Figure 3. 164

Figure 4. 165

Figure 5. 166

Figure 6. 167

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

- AA : acide arachidonique
- AGLs : acides gras libres
- AGPI : acides gras polyinsaturés
- AMPc : adénosine monophosphate cyclique
- ANG-II : angiotensine-II
- ADN : acide desoxyribonucléique
- AP-1 : “activator protein-1”
- Apo : apolipoprotéine
- ARNm : acide ribonucléique messenger
- CDV : cellules dendritiques vasculaires
- CMLs : cellules musculaires lisses
- CSPGs : chondroïtine sulfate protéoglycans
- EPA : “eicosapentaenoic acid”, acide eicosapentaénoïque
- FGF : “fibroblast growth factor”, facteur de croissance des fibroblastes
- GM-CSF: “granulocyte-macrophage-colony stimulating factor”
- GPI : glycosylphosphatidyl inositol
- HB-EGF: “heparin-binding epidermal growth factor”
- HDL : lipoprotéines de haute densité
- HLA : “human leukocyte antigen”

- HNE : hydroxy-nonenal
- HSP : “heat shock protein”
- HSPGs : héparans sulfate protéoglycans
- 7 β -OH : 7 bêta-hydroxycholestérol
- 25-OH : 25 hydroxycholestérol
- ICAM-1 : “intercellular cell adhesion molecule-1”, molécule d’adhésion intercellulaire-1
- IDL : “intermediate density lipoproteins”, lipoprotéines de densité intermédiaire
- IFN γ : interféron gamma
- IGF-1 : “insulin-like growth factor”
- IL : interleukin
- LDL : “low density lipoproteins”, lipoprotéines de basse densité
- Lp(a) : lipoprotéine (a)
- LPL : “lipoprotein lipase”, lipoprotéine lipase
- LPS : lipopolysaccharide
- LRP : “LDL receptor-related protein”
- LysoPC: lysophosphatidylcholine
- MCP-1 : “monocyte chemoattractant protein-1”, protéine chimiotactique des monocytes-1
- M-CSF : “monocyte-colony stimulating factor”
- MCV : maladies cardio-vasculaires
- MDA : malondialdéhyde
- MDMs : “monocyte-derived macrophages”, macrophages dérivés des monocytes
- MHC : “major histocompatibility complex”, complex majeur d’histocompatibilité

- NF- κ B : “nuclear factor-kappaB”, facteur nucléaire kappaB
- NO : monoxyde d’azote
- Oct-1 : octamère-1
- PAI-1 : “plasminogen activator inhibitor-1”, inhibiteur de l’activateur du plasminogène
- PDGF : “platelet-derived growth factor”, facteur de croissance dérivé des plaquettes
- PGI₂ : prostacycline
- PKC : protéine kinase C
- PI-PLC : phosphatidylinositol phospholipase C
- PMSF : phenyl methylsulfonyl fluoride
- PPAR : “peroxisome proliferator-activated receptor”
- Rag-1* : “recombination activating gene-1”
- Smase : sphingomyelinase
- TGF β : “transforming growth factor bêta”
- TNF α : : “tumor necrosis factor alpha”, facteur de nécrose tumorale alpha
- VCAM-1: “vascular-cell adhesion molecule-1”, molécule d’adhésion vasculaire-1
- VLDL : “very low density lipoproteins”, lipoprotéines de très basse densité

DÉDICACE

À mon épouse Denise

À mes filles Cynthia et Gwenaëlle

À mes parents, frères, soeurs,...

REMERCIEMENTS

À Dr. Geneviève Renier, ma directrice de thèse, qui m'a guidé et encouragé tout au long de mes études de doctorat.

À la Fondation des Maladies du Coeur du Canada pour la subvention de mon projet de doctorat.

À la Faculté des Études Supérieures et au Département de Nutrition de l'Université de Montréal pour l'appui financier apporté durant mes études.

I. INTRODUCTION

I.1. L'athérosclérose

I.1.1. Généralités

L'athérosclérose avec ses complications majeures, les maladies cardio- et cérébro-vasculaires, représente la première cause de mortalité dans le monde occidental (Gerrity et Antonov, 1997; Parmley, 1998). Aux États-Unis d'Amérique, on estime que 6 millions de personnes présentent une ischémie symptomatique du myocarde et qu'un Américain meurt chaque minute à la suite de maladie coronarienne athérosclérotique (Gerrity et Antonov, 1997). Une diminution importante de la mortalité par maladie coronarienne est toutefois observée aux États-Unis et en Europe depuis quelques années. Des mesures de prévention ciblant notamment la réduction des facteurs de risque ont joué un rôle important dans cette évolution (Hunink et coll., 1997). Par ailleurs, on note une augmentation de la morbidité et de la mortalité associées à la maladie coronarienne dans certains pays asiatiques en voie de développement (Janus et coll., 1996).

L'examen des événements précoces survenant au cours de l'athérogenèse démontre que les cellules inflammatoires impliquées dans ce processus sont des composantes classiques d'une réponse inflammatoire de type chronique précédant la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (CMLs) artérielles (Ross, 1993a). L'accumulation de lipides et de lipoprotéines dans l'espace sous-endothélial représente un des événements précoces de l'athérogenèse (Ross, 1993a). L'infiltration des lipoprotéines est suivie de l'adhésion des monocytes et des lymphocytes T à l'endothélium vasculaire, puis de leur migration dans l'espace sous-endothélial (Schwartz et coll., 1991). En présence de lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées, les monocytes sont convertis en macrophages activés, captent les LDL-oxydées via les récepteurs "scavenger" et se transforment

en cellules spumeuses (Ross, 1993a). La formation des cellules spumeuses et leur accumulation dans l'intima conduit à la formation de la strie lipidique qui constitue le stade initial de la lésion athérosclérotique (Gerrity et Antonov, 1997). L'accumulation des monocytes et des lymphocytes T dans l'intima peut se poursuivre si l'agent responsable de l'initiation de la réponse inflammatoire persiste. Par conséquent, cette réponse inflammatoire qui a débuté comme un mécanisme de protection peut évoluer d'une façon excessive avec le temps et être responsable du développement et de la progression de la maladie athéromateuse (Ross, 1998).

Il est important de souligner que, sur le plan clinique, la lésion athéromateuse est parfaitement silencieuse au cours de son évolution qui peut s'étaler sur plusieurs dizaines d'années (Ross, 1993b). Les manifestations cliniques de la maladie apparaissent généralement aux stades tardifs de formation des lésions avancées et sont souvent le résultat de la rupture de la plaque et de l'apparition de phénomènes thrombotiques (Davies, 1990; Schwartz et coll., 1993; Ross 1993a). Toutefois, le processus athérosclérotique peut progresser rapidement dans certaines conditions, particulièrement chez des sujets présentant une hypercholestérolémie sévère (Strong et McGill Jr, 1962). Les lésions athérosclérotiques avancées sont responsables de modifications pouvant conduire à plusieurs événements cliniques tels l'angor, l'infarctus du myocarde, l'accident cérébro-vasculaire, et l'artériopathie des membres inférieurs (Ross, 1995). Ces lésions sont le résultat d'une série d'événements cellulaires et moléculaires impliquant les macrophages dérivés des monocytes (MDMs), les lymphocytes T, les cellules endothéliales, et les CMLs (Ross, 1993a). L'interaction entre ces cellules entraîne une réponse inflammatoire et fibro-proliférative massive responsable de la protubérance de la lésion dans la lumière vasculaire de l'artère affectée, compromettant la

circulation sanguine et, par conséquent, l'apport d'oxygène dans les régions environnantes (Ross, 1995).

Une des caractéristiques essentielles de l'athérosclérose est sa topographie focale, les lésions athérosclérotiques se développant sur des sites vasculaires spécifiques aussi bien chez les humains que chez les animaux (Stary et coll., 1992; Schwartz et coll., 1993). Les lésions d'athérosclérose sont communément rencontrées dans les zones artérielles exposées au stress mécanique secondaire aux fluctuations hémodynamiques (diminution ou reflux de la circulation sanguine) et/ou aux variations du tonus vasculaire: origine des branches, courbures et bifurcations artérielles (Cornhill et coll., 1985; Wissler et coll., 1983). Les sites de prédilection des lésions sont la partie inférieure de l'aorte descendante, les grosses branches de la crosse aortique, les carotides internes, les artères cérébrales, les artères coronariennes, et les artères des membres inférieurs (Campbell et Campbell, 1994). Ces différents sites sont caractérisés par 1) une perméabilité accrue de l'endothélium aux protéines plasmatiques telles que l'albumine, le fibrinogène, et le LDL-cholestérol (Schwartz et coll., 1993), 2) un taux de renouvellement accru des cellules endothéliales et des CMLs, et 3) un contenu élevé de macrophages dans l'intima (Stary et coll., 1992). Lorsque les lipoprotéines athérogéniques excèdent un certain niveau plasmatique, le stress mécanique présent au niveau de ces sites peut augmenter leur infiltration dans la paroi artérielle et ainsi conduire à la formation des lésions précoces (Massy et Keane, 1996). Toutefois, en présence d'une hypercholestérolémie sévère, presque toutes les régions de l'aorte et les petites artères peuvent développer des lésions athérosclérotiques avancées (Stary et coll., 1992).

Le processus athérogénique commence tôt dans la vie. Au cours de la première décennie de la vie, plus de 10% de la surface intimale aortique peut présenter des stries lipidiques. Certaines de ces lésions peuvent disparaître ou ne pas évoluer, alors que d'autres peuvent progresser vers des lésions avancées vers l'âge de 30 à 40 ans (Stary, 1989). Dans ce sens, l'athérosclérose n'est pas une maladie dégénérative, inévitable, et associée au vieillissement. La maladie est parfois confondue avec le phénomène "d'artériosclérose", soit le durcissement de la paroi artérielle dû au simple vieillissement (Jacobot et Robert, 1985). Les modifications de la paroi artérielle dues à l'âge apparaissent au cours des trois premières décennies de la vie et démontrent de grandes variations inter-individuelles. On considère que ces modifications sont un facteur favorisant des lésions d'athérosclérose (Jacobot et Robert, 1985).

Les interactions cellulaires survenant au cours de la formation et de la progression des lésions précoces, la libération de facteurs de croissance et de cytokines par ces cellules, les interactions entre les cellules et les substances à la fois promotrices et inhibitrices de la croissance, et les substances toxiques sécrétées par ces cellules déterminent l'avenir de la lésion, à savoir sa progression ou sa régression (Ross, 1990). Plusieurs études ont démontré une diminution de la progression, voir même la régression des lésions athéromateuses, après un traitement avec certains agents hypolipémiantes tels les inhibiteurs de l'hydroxyl-méthylglutaryl-coenzyme A reductase (Brown, 1993; Levine, 1995). Ces données suggèrent que la progression de la lésion peut être arrêtée si on parvient à maîtriser les facteurs responsables de la réponse inflammatoire et fibro-proliférative (Ross, 1993a).

I.1.2. Facteurs de risque

On distingue généralement trois groupes de facteurs de risque de l'athérosclérose: les facteurs de risque potentiellement réversibles, les facteurs de risque irréversibles, et les "autres" facteurs de risque possibles (Shils et coll., 1994). Les principaux facteurs de risque réversibles sont les dyslipidémies, le tabagisme, l'hypertension artérielle, le diabète, l'obésité, l'augmentation du taux de fibrinogène, l'homocystéinémie, et les facteurs infectieux (Ross, 1986; Schwartz et coll., 1992, Colwell et Lopes-Virella, 1988). Les antécédents familiaux de maladie ischémique, l'âge et le sexe mâle constituent des facteurs de risque irréversibles (Solberg et Strong, 1983; Parmley, 1998). Parmi les autres facteurs de risque, on peut citer l'inactivité physique, l'ossature corporelle, et le stress émotif (Slattery et coll., 1989; Lapidus et coll., 1984). Bien que tous les facteurs de risque soient importants, nous ne passerons en revue dans cette section que les données récentes de la littérature scientifique sur les principaux facteurs de risque de l'athérosclérose.

I.1.2.1. Les dyslipidémies

Les principaux syndromes dyslipidémiques sont les hypercholestérolémies, les hypertriglycéridémies, l'hyperlipoprotéine (a)-émie, et les déficiences en lipoprotéines de haute densité (HDL).

- Les hypercholestérolémies:

Les principaux types d'hypercholestérolémie sont l'hypercholestérolémie familiale, les hypercholestérolémies polygéniques, l'hyperlipidémie familiale combinée, et les hypercholestérolémies secondaires. Alors que les hypercholestérolémies secondaires peuvent être

causées par de nombreuses pathologies incluant le diabète, l'hypothyroïdie, l'obstruction biliaire, le syndrome néphrotique, et les glycoséoses (Tan et coll., 1999; Tanis et coll., 1996; Tsukahara et coll., 1997; Parl et coll., 1975; Liang et coll., 1997; Levy et coll., 1993), les autres formes de dyslipidémie peuvent être causées par plusieurs anomalies incluant un défaut génétique (hypercholestérolémie familiale) ou acquis au niveau des récepteurs hépatiques membranaires des LDL (récepteurs d'apolipoprotéines (apo) B, E), une mutation sur le gène de l'apo B (Genest Jr et coll., 1992; Lala et coll., 1998) et une sécrétion hépatique accrue de lipoprotéines de très basse densité (VLDL) (Cummings et coll., 1995; Wilson et coll., 1992). L'altération de la captation des LDL induit une accumulation de ces lipoprotéines dans le sang et leur infiltration dans la paroi artérielle (Young et Parthasarathy, 1994). L'hypercholestérolémie familiale, avec une prévalence de 0.5%, est une des plus fréquentes maladies héréditaires du métabolisme (Genest Jr et coll., 1992). Deux formes de cette pathologie existe: l'hypercholestérolémie pure (type IIa de la classification des hyperlipoprotéïnémies) caractérisée par une concentration élevée de LDL plasmatiques, et l'hypercholestérolémie s'accompagnant d'une hypertriglycéridémie modérée (type IIb). Sur le plan évolutif, l'hypercholestérolémie familiale est caractérisée par la fréquence élevée des lésions d'athérosclérose, surtout coronarienne. De nombreuses évidences indiquent que le processus athérosclérotique débute dès l'enfance dans l'hypercholestérolémie familiale (Kawagushi et coll., 1999; Lambert et coll., 1996). Les infarctus du myocarde s'observent avant l'âge de 20 ans chez les sujets homozygotes et, en général entre 30 et 50 ans chez les sujets hétérozygotes (Genest Jr et coll., 1992; Tonstad et coll., 1996; Golstein et coll., 1973). Les hypercholestérolémies polygéniques regroupent des formes d'hypercholestérolémie où interviennent des facteurs génétiques et des facteurs nutritionnels. Comme dans le cas de l'hypercholestérolémie familiale, les

hypercholestérolémies polygéniques peuvent être pures ou s'accompagner d'hypertriglycéridémie modérée. Le risque de maladies cardio-vasculaires (MCV) dans les hypercholestérolémies polygéniques est lié au degré d'hypercholestérolémie (Lala et coll., 1998). L'hyperlipidémie familiale combinée représente quant à elle une forme fréquente de dyslipidémie. On estime que cette maladie est trois fois plus fréquente que l'hypercholestérolémie familiale monogénique et le risque de MCV y est très élevé. Très souvent, l'hyperlipidémie familiale combinée se manifeste sous forme d'une hyperlipidémie mixte, avec une augmentation modérée du cholestérol et des triglycérides (Golstein et coll., 1973; Jongkind et coll., 1995).

- Les hypertriglycéridémies:

Sous ce terme, on regroupe les formes de dyslipidémie caractérisées par une augmentation des niveaux de triglycérides sanguins. Les principales formes d'hypertriglycéridémie sont les hypertriglycéridémies familiales pures (hyperlipidémies de type IV), l'hyperlipidémie familiale combinée, la dyslipidémie familiale de type III (due à la présence dans le sang de grandes quantités de lipoprotéines intermédiaires), les hyperlipidémies majeures de type V (due à la présence dans le sang de chylomicrons, de remnants, et de grandes quantités de VLDL), et l'hyperchylomicronémie (Betteridge et coll., 1993). La chylomicronémie est une maladie exceptionnelle qui se caractérise par l'accumulation des VLDL et des chylomicrons dans la circulation (Brunzell et coll., 1995). Le syndrome de chylomicronémie est induit soit par des anomalies génétiques de la lipoprotéine lipase (LPL), l'enzyme majeure de l'hydrolyse des triglycérides des VLDL et des chylomicrons, ou de son cofacteur, l'apolipoprotéine CII (apoCII) (Brunzell, 1995), soit par de nombreuses causes secondaires incluant l'obésité, le diabète sucré, l'alcool, et les maladies rénales (Murthy et coll.,

1996). L'homozygotie pour la déficience en LPL ne s'accompagne pas classiquement de complications athéromateuses cardio-vasculaires (Foubert et coll., 1996). L'état hétérozygote, avec une activité de LPL réduite, est associé à une dyslipidémie modérée au profil athérogène caractérisée notamment par la présence de particules de LDL denses et des niveaux réduits de HDL-cholestérol (Hokanson et coll., 1999; Foubert et coll., 1994). La susceptibilité accrue à l'oxydation des particules riches en triglycérides par suite de leur élimination ralentie pourrait accroître le risque de MCV chez les patients hétérozygotes pour le déficit en LPL (Benlian et coll., 1996).

L'hypothèse selon laquelle des concentrations plasmatiques élevées de triglycérides constituent un facteur de risque d'athérosclérose continue de faire l'objet de nombreuses discussions. Des études épidémiologiques réalisées au cours des dernières décennies ont montré une association entre les triglycérides plasmatiques et les MCV; toutefois, cette association ne demeure pas significative après ajustement pour les autres lipides plasmatiques, principalement le HDL-cholestérol (Austin, 1991). Très récemment, une méta-analyse par Austin et Hokanson (1998) comprenant uniquement des études prospectives de cohorte a montré que l'hypertriglycéridémie constitue un facteur de risque indépendant des MCV. En effet, les auteurs ont observé que l'augmentation des niveaux plasmatiques de triglycérides est associée à une augmentation du risque de MCV de 31% chez les hommes et de 76% chez les femmes. Après ajustement pour le HDL-cholestérol et les autres facteurs de risque, ces risques ont été réduits à 15% chez les hommes et à 37% chez les femmes, mais sont demeurés statistiquement significatifs (Austin et Hokanson, 1998). Sur le plan clinique, plusieurs études ont montré l'existence d'une association d'une part entre la présence ou la sévérité des MCV et les concentrations élevées de lipoprotéines riches en triglycérides

(Tatami et coll., 1981; Barbir et coll., 1988; Karpe et coll., 1994; Weintraub et coll., 1996) et d'autre part entre la présence de lipoprotéines riches en triglycérides et la progression angiographique des MCV (Watts et coll., 1993; Phillips et coll., 1993; Hodis et coll., 1994, Mack et coll., 1996). Malgré ces différentes données, de nombreux chercheurs soutiennent que les triglycérides ne représentent pas un facteur de risque indépendant des MCV. Par exemple, Faergeman (1998) avance que la majeure partie des triglycérides plasmatiques se retrouve dans les chylomicrons et les VLDL larges qui ne peuvent pas traverser l'endothélium vasculaire. Pourtant, des études animales ont démontré que les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) et les résidus de chylomicrons peuvent pénétrer dans la paroi artérielle, la taille des particules déterminant le taux d'infiltration (Zilversmit, 1995). Il est important de mentionner ici que la liaison des VLDL et des chylomicrons à la LPL fixée sur l'endothélium vasculaire est suivie de la lipolyse des triglycérides et d'échanges de lipides et de protéines, mécanismes par lesquels ces particules diminuent de taille et acquièrent des esters de cholestérol. Il est possible que les acides gras libérés par l'action hydrolytique de la LPL puissent endommager l'endothélium vasculaire et initier des événements thrombotiques (Zilversmit, 1995). Par ailleurs, Grundy et Vega (1992) ont rapporté que l'hypertriglycémie peut stimuler la thrombogénèse par l'augmentation des niveaux plasmatiques de fibrinogène et de facteurs VII et X.

- *L'hyper-lipoprotéine (a)-émie:*

Des niveaux plasmatiques élevés de lipoprotéine (a) Lp(a) constituent un facteur de risque indépendant de l'athérosclérose (Kronenberg, 1997; Saito et coll., 1997; Rand et coll., 1998). La concentration plasmatique de Lp(a) est déterminée génétiquement et varie considérablement d'un sujet à l'autre, allant de traces à plus de 1 g/l (Hajjar et coll., 1989; Emmerich et Verges, 1992; Saito

et coll., 1997). On considère que 20% de la population humaine présentent un niveau plasmatique de Lp(a) supérieure à 0.30 g/l, ce qui représente un risque de MCV deux fois plus élevé que la normale (Hajjar et coll., 1989). La Lp(a) est une lipoprotéine semblable à la LDL mais différente de celle-ci par la présence d'une molécule d'apolipoprotéine (a) (apo(a)) fixée par une liaison covalente à l'apo B-100 de la particule de LDL (Kronenberg, 1997). La littérature rapporte actuellement 26 phénotypes différents de l'apo(a) (Saku et coll., 1999). Les patients souffrant d'infarctus du myocarde présentent des niveaux accrus de Lp(a) avec un pourcentage élevé d'isoformes de l'apo(a) de petite taille. À l'opposé, les sujets avec des niveaux réduits de Lp(a) ont une forte proportion d'isoformes de l'apo(a) de grande taille (Saku et coll., 1999). La petite taille de l'apo(a) pourrait donc contribuer aux niveaux élevés de Lp(a) chez certains patients et pourrait constituer un facteur de prédiction de la survenue de MCV (Gazzaruso et coll., 1999; Saku et coll., 1999). L'apo (a) a une forte homologie de structure avec le plasminogène, le précurseur de la plasmine. Cette homologie de structure confère à la Lp(a) la capacité de se lier à la fibrine et aux protéines membranaires des cellules endothéliales et des monocytes, et de ce fait d'inhiber par un mécanisme de compétition la liaison du plasminogène et la formation de plasmine (Couderc et Maachi, 1998; Lawn, 1998). L'inhibition de la production de plasmine et l'accumulation de la Lp(a) à la surface de la fibrine et des membranes cellulaires favorise le dépôt de fibrine et de cholestérol dans la paroi vasculaire (Stein et Rosenson, 1997; Romanic et coll., 1998). Il a été en outre rapporté que l'inhibition de la production de plasmine par la Lp(a) réduit l'activation du "transforming growth factor bêta" (TGF β) et stimule, par conséquent, la migration et à la prolifération des CMLs dans l'intima (Grainger et coll., 1993). Takami et coll. (1998) ont aussi suggéré que la diminution des niveaux de TGF β actif soit à l'origine de l'augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion

intercellulaire -1 (ICAM-1) à la surface de l'endothélium vasculaire (Takami et coll., 1998). Une étude récente par Morishita et coll. (1998) a démontré par ailleurs que la Lp(a) peut stimuler la prolifération des CMLs via un mécanisme indépendant de l'inhibition de l'activité du TGF β . Les autres effets proathérogéniques de la Lp(a) incluent l'augmentation de l'expression de l'ICAM-1 et de la molécule d'adhésion vasculaire-1 (VCAM-1) à la surface des cellules endothéliales, la stimulation de l'infiltration des monocytes circulants dans la paroi artérielle par l'induction de la production par les cellules endothéliales d'une activité chimiotactique des monocytes, et la stimulation de la formation de cellules spumeuses (Allen et coll., 1998, Tanaka et coll., 1998; Nielsen et coll., 1998).

- Les déficiences en HDL:

De nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont montré une association entre des taux plasmatiques diminués de HDL-cholestérol et l'augmentation du risque de MCV (Gordon, 1989; Brown, 1990). On distingue deux types de déficiences en HDL: les déficiences primaires et les déficiences secondaires. Les déficiences primaires en HDL, connues sous le terme d'hypoalphalipoprotéinémies familiales, peuvent avoir diverses causes génétiques telles qu'une déficience en apo AI ou en "lecithin-cholesterol-acyl transferase" (LCAT) (Kuivenhoven et coll., 1997). Les hypertriglycéridémies, le diabète de type II, l'obésité et certains traitements peuvent causer des déficiences secondaires en HDL (Betteridge et coll., 1992). Les HDL peuvent exercer un effet protecteur contre l'athérosclérose par plusieurs mécanismes incluant la stimulation de l'efflux cellulaire du cholestérol au stade initial du transport inverse de cholestérol (Barter et coll., 1996), l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales

(Cockerill et coll., 1995), et la protection des LDL contre l'oxydation (Parthasarathy et coll., 1990). Il a été démontré que les HDL exercent ce dernier effet grâce à deux enzymes associées à la molécule: le "platelet activating factor acetylhydrolase" et la "paraoxonase" (Stafforini et coll., 1993; Mackness et coll., 1991; Watson et coll., 1995; Watson et coll., 1994).

I.1.2.2. L'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle, en plus de constituer un facteur de risque important de l'athérosclérose, est aussi responsable d'autres complications vasculaires graves telles que l'insuffisance rénale, l'hypertrophie ventriculaire gauche, et les accidents hémorragiques cérébraux (Zanchetti, 1992). L'association entre l'hypertension et les MCV est un processus complexe incluant divers autres facteurs outre l'augmentation des valeurs de la pression artérielle. En effet, la seule réduction de la pression artérielle n'inverse pas complètement l'augmentation du risque de MCV relié à l'hypertension artérielle (Lembo et coll., 1998). Divers mécanismes physiologiques responsables de l'effet délétère de l'hypertension sur le développement de l'athérosclérose ont été documentés. L'hypertension est associée à une diminution de la sécrétion du monoxyde d'azote (NO) dans la paroi artérielle; un gaz assurant plusieurs fonctions importantes dans la paroi artérielle incluant le contrôle de la vasodilatation, l'inhibition de l'agrégation des plaquettes, de l'expression des molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium, et de la prolifération des CMLs. Cette diminution peut être consécutive à un défaut de synthèse ou à une dégradation oxydative excessive du NO (Cannon, 1998). Le stress hémodynamique associé à l'hypertension artérielle contribue en outre au recrutement des monocytes dans la paroi artérielle en induisant la production de la protéine chimiotactique des monocytes (MCP-1) par les CMLs (Capers et coll., 1997). Par ailleurs,

l'activation des leucocytes périphériques polymorphonucléés a été documentée dans l'hypertension, suggérant que ces cellules puissent endommager l'endothélium vasculaire par la relâche de diverses enzymes protéolytiques et d'espèces radicalaires oxygénées (Kristal et coll., 1998).

I.1.2.3. Le tabagisme

Le tabagisme est un facteur de risque indépendant de l'athérosclérose (Ross, 1986). L'association du tabagisme avec d'autres facteurs de risque tels la dyslipidémie ou l'hypertension artérielle, augmente en outre considérablement le risque associé à ces derniers facteurs (Wilhelmsen, 1988). Les effets physiopathologiques du tabagisme susceptibles de promouvoir l'athérosclérose sont nombreux et incluent notamment l'augmentation des niveaux de thromboxane, la diminution des niveaux de prostacycline, l'hypercoagulabilité, l'activation des plaquettes, le dommage endothélial, et l'augmentation de l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Lehr, 1993; Dovgan et coll., 1994).

I.1.2.4. Le diabète

Les complications athéromateuses sont particulièrement fréquentes chez les sujets diabétiques. En effet, tous les facteurs de risque majeurs de MCV tels que l'hypertension artérielle, les anomalies du métabolisme lipidique et l'obésité centrale sont rencontrés avec une grande fréquence chez ces patients (De Fronzo et Ferrannini, 1991). La déficience en HDL, rencontrée chez le diabétique de type II, constitue également un facteur de risque indépendant de MCV (Sary et coll., 1992). Actuellement, l'hyperinsulinémie, conséquence de l'insulinorésistance, est considérée comme un des facteurs majeurs responsables du risque élevé de maladies ischémiques des

diabétiques de type II (De Fronzo et Ferrannini, 1991; Hsueh et coll., 1998). L'hyperinsulinémie peut contribuer à la pathogenèse de l'athérosclérose par plusieurs mécanismes incluant l'altération de la fonction endothéliale (Hsueh et coll., 1998; Cleland, 1998), la stimulation de la synthèse cellulaire de cholestérol (Griffin et coll., 1998), l'inhibition de la fibrinolyse consécutive à une augmentation des niveaux de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) (Sobel et coll., 1998; Schneider et coll., 1998), la stimulation de la migration et de la prolifération des CMLs (Stout, 1990; Goalstone et coll., 1998), l'augmentation des niveaux de triglycérides plasmatiques et la diminution des niveaux des HDL (Reaven, 1988), et la stimulation de la liaison des LDL aux monocytes/macrophages et aux CMLs (Stout, 1990).

I.1.2.5. L'obésité

Plusieurs études ont démontré que l'obésité, définie comme un indice de masse corporelle égal ou supérieur à 30 kg/m^2 , est associée à une augmentation exponentielle des complications cardio-vasculaires (Hauner, 1995). L'effet de l'obésité est médié essentiellement par l'induction des facteurs de risque tels que les dyslipidémies, l'hypertension, et le diabète de type 2 (De Fronzo et Ferrannini, 1991; Hauner, 1995; Lamarche et Lewis, 1998). De nos jours, on considère que la localisation de la graisse corporelle, plutôt que la masse de tissu adipeux en soi, est plus importante pour la détermination du risque de développement des complications vasculaires. C'est ainsi que l'obésité abdominale, encore appelée obésité viscérale ou androïde, est considérée comme un facteur de risque des anomalies métaboliques, de l'hypertension, et des MCV, indépendamment du poids corporel (De Fronzo et Ferrannini, 1991; Hauner, 1995; Lamarche et Lewis, 1998).

I.1.2.6. Le fibrinogène

Des niveaux élevés de fibrinogène plasmatique constituent un facteur de risque de développement de maladies coronariennes (Yarnell, 1991; Kannel et coll., 1987). Alors que les niveaux normaux de fibrinogène plasmatique varient entre 220 à 280 mg/dl, des niveaux pouvant atteindre 500 mg/dl sont rencontrés chez les patients souffrant d'athérosclérose (Kovacs et coll., 1992). Le fibrinogène plasmatique peut contribuer au développement de l'athérosclérose par plusieurs mécanismes. Par exemple, il a été démontré que l'interaction du fibrinogène avec la surface des monocytes via des récepteurs spécifiques et les molécules CD11/CD18 (Altieri et coll., 1986; Trezzini et coll., 1988; Wright et coll., 1988) entraîne une activation de la fonction monocytaire. Celle-ci est traduite par la production d'espèces radicalaires oxygénées (Trezzini et coll., 1989) ou l'agrégation des leucocytes (Berliner et coll., 1987). De plus, l'interaction du fibrinogène avec les intégrines peut augmenter l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire (Duplâa et coll., 1993). Le fibrinogène peut aussi avoir des propriétés athérogéniques dans l'intima. En effet, la lyse du fibrinogène de l'intima peut conduire à la production de peptides possédant des propriétés mitogéniques et chimiotactiques pour les CMLs (Smith et coll., 1990).

I.1.2.7. L'homocystéinémie

Les concentrations plasmatiques normales d'homocystéine varient entre 5 et 10 $\mu\text{mol/l}$ (Ueland et coll., 1993). Cependant, des niveaux aussi élevés que 500 $\mu\text{mol/l}$ sont rencontrés chez les patients présentant une athérosclérose sévère (Rosenblatt, 1995; Brattsrom et coll., 1988). Cette dernière observation suggère l'existence d'une forte corrélation entre des taux élevés d'homocystéine plasmatique et l'incidence des maladies vasculaires (Stampfer et coll., 1992; Malinow et coll., 1995;

Bouchey et coll., 1995). Les mécanismes par lesquels l'homocystéine pourrait favoriser la formation de la plaque athéromateuse ont fait l'objet de plusieurs études. Ainsi, il a été démontré que l'homocystéine 1) dénude l'endothélium vasculaire in vivo (Harker et coll., 1974; Harker et coll., 1976), 2) a un effet cytotoxique envers les cellules endothéliales (Wall et coll., 1980), 3) stimule l'oxydation des LDL (Parthasarathy, 1987; Heinecke et coll., 1993), et 4) est impliquée dans la formation de radicaux libres (Olszweski et McCully, 1993). Récemment, Majors et coll. (1997) ont montré que l'hyperhomocystéinémie peut également contribuer à la formation de la plaque athéromateuse par la stimulation de la prolifération des CMLs et de la production du collagène par ces cellules.

I.1.2.8. Les facteurs infectieux

La contribution des facteurs infectieux dans la pathogénie de l'athérosclérose a reçu une attention particulière depuis que Fabricant et coll. (1978) ont démontré que des poussins infectés par le virus de l'herpès développent des lésions vasculaires évoquant l'athérosclérose humaine. Aujourd'hui, un grand nombre d'agents infectieux sont impliqués dans l'athérosclérose humaine, particulièrement *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, les virus de l'herpès, et le cytomegalovirus (CMV) (Mattila, 1989; Mattila et coll., 1993; Woodhouse et coll., 1994; Kuo et coll., 1995; Neito et coll., 1996; Chiu et coll., 1997; Maass et coll., 1998). Selon Mehta et coll. (1998), *Chlamydia pneumoniae* est l'organisme pathogène le plus associé à l'athérosclérose. En effet, l'association entre *Chlamydia pneumoniae* et l'athérosclérose coronarienne telle que démontrée par immunocytochimie est d'environ 70 à 100% (Mehta et coll., 1998).

Les agents pathogènes peuvent contribuer au développement de l'athérosclérose par plusieurs mécanismes incluant la sécrétion de cytokines tels le facteur de nécrose tumorale alpha ($TNF\alpha$), interleukin -1 (IL-1), et interleukin-6 (IL-6)) (Melnick et coll., 1994; Geist et Dai, 1996; Rasmussen et coll., 1997) et l'action de la lipopolysaccharide (LPS) présente dans leurs membranes. Comme nous le verrons plus tard, les cytokines libérées par les facteurs infectieux peuvent avoir une variété d'actions, notamment l'induction de la production par les leucocytes d'espèces radicalaires oxygénées susceptibles de stimuler l'oxydation des LDL et l'activation des plaquettes, la stimulation de la prolifération des fibroblastes et des CMLs, et la stimulation de la thrombogenèse (Steinberg et coll., 1989; Ross, 1993a; Mehta et coll., 1998). Pour ce qui est de la LPS, Baumberger et coll. (1991) ont démontré qu'elle se lie aux LDL-cholestérol et les rend immunogéniques ou toxiques pour les cellules endothéliales. De plus, la LPS stimule l'activité de la NO synthase, ce qui aboutit à la formation d'une importante quantité de NO (Mehta et coll., 1998). Lorsque présent dans le milieu, l'anion superoxide peut interagir avec le NO et la formation subséquente du radical peroxy-nitrite peut causer une dysfonction endothéliale ou une rupture de la continuité endothéliale (Moncada et coll., 1991).

Il est important de souligner que, malgré les différentes données démontrant l'existence d'une association entre la présence des facteurs infectieux et l'athérosclérose, l'absence de relation de cause à effet ne permet pas encore de conclure à un rôle étiologique de ces agents dans la pathogénie de l'athérosclérose (Nicholson et Hajjar, 1998; Mehta et coll., 1998).

I.1.3. Structure et biologie de la paroi artérielle

I.1.3.1. Structure de la paroi artérielle

La paroi de l'artère est composée de trois parties: l'intima, la média et l'adventice. Deux membranes plus ou moins bien individualisées, les limitantes élastiques interne et externe, séparent ces trois composantes (Glacov et coll., 1990, Badimon et coll., 1993).

L'intima est la partie la plus interne de la paroi artérielle. Elle est composée des structures suivantes: 1) une couche de cellules endothéliales, l'endothélium, situées à l'interface entre le compartiment sanguin et la paroi vasculaire, 2) une membrane basale mince et discontinue sur laquelle repose l'endothélium, et 3) une couche sous-endothéliale composée de collagène, de fibres d'élastine, de CMLs isolées, et de quelques fibroblastes. La couche sous-endothéliale est souvent présente uniquement dans les gros vaisseaux telle que l'aorte alors que, dans la majorité d'autres vaisseaux sanguins, l'intima n'est formée que de l'endothélium et de la membrane basale (Badimon et coll., 1993). L'épaisseur de la couche sous-endothéliale varie selon l'âge du tissu: très mince et dépourvue de cellules chez le nouveau-né, elle s'épaissit au cours du vieillissement artériel par l'acquisition de tissu conjonctif. C'est au niveau de l'espace sous-endothélial que se développe initialement la lésion athéromateuse (Stary, 1992).

La média est la partie la plus épaisse de la paroi artérielle. Composée uniquement de CMLs, elle est séparée de l'intima et de l'adventice par les limitantes élastiques interne et externe, respectivement. La présence de petits orifices dans la membrane élastique interne permet l'échange de cellules et de molécules entre l'intima et la média (Glacov et coll., 1990, Badimon et coll., 1993).

Séparée de la média par la limitante élastique externe, l'adventice est la partie la plus externe de la paroi artérielle. Elle constitue une gaine de tissu conjonctif lâche qui entoure l'artère et la relie aux organes voisins. L'adventice est traversée par les vaisseaux sanguins nourriciers (le vasa vasorum) des CMLs, les lymphatiques et les filets du système nerveux autonome. On y retrouve essentiellement des fibroblastes (Robert, 1992).

I.1.3.2. Les cellules de la lésion athéromateuse

I.1.3.2.1. L'endothélium

En plus de constituer une barrière entre le sang et les structures de la paroi artérielle, l'endothélium assure diverses fonctions incluant:

1. la régulation du transport des solutés et des macro-molécules à travers la paroi vasculaire;
2. le contrôle du tonus vasculaire par la relâche de substances vasodilatrices telles que le NO, la prostacycline (PGI_2), et de substances vasoconstrictrices telles que l'endothéline et l'angiotensine-II (ANG-II);
3. le contrôle de la croissance des cellules vasculaires par la synthèse de divers facteurs de croissance tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance des fibroblastes (FGF);
4. la formation et le maintien de la matrice du tissu conjonctif, incluant la membrane basale sur laquelle il repose, le collagène, les fibres élastiques, et les protéoglycans;
5. la fonction immune par la synthèse et la sécrétion de cytokines telles que le $\text{TNF}\alpha$ et l'IL-1;
6. le maintien d'une surface antithrombotique par la formation des molécules telles que l'ecto- adénosine diphosphatase, le NO, et la PGI_2 ;

7. l'équilibre entre les activités anticoagulantes et procoagulantes par la formation des substances telles que les héparans sulfate, le NO, l'inhibiteur de PAI-1, la PGI₂, l'inhibiteur du facteur tissulaire, l'activateur du plasminogène, et l'urokinase (Ross, 1995; Massy et Keane, 1996).

L'altération d'une ou de plusieurs fonctions de l'endothélium, par des mécanismes très divers, est considérée comme l'un des processus initiaux de l'athérogenèse (Ross, 1995). L'augmentation de la perméabilité de l'endothélium est l'un des premiers événements observés dans l'athérogenèse. On observe, dans ce cas, un transport accru par l'endothélium d'une grande quantité de lipoprotéines athérogéniques dans l'espace sous-endothélial de l'intima (Simionescu et coll., 1986). Au cours de ce transport, l'endothélium peut modifier les LDL par oxydation ou glycation (Steinberg, 1991). En revanche, les LDL-oxydées peuvent agir sur l'endothélium et induire l'expression de molécules chimiotactiques, de molécules d'adhésion, de facteurs de croissance, et de cytokines qui vont contribuer à la progression du processus athérosclérotique (Ross, 1995).

I.1.3.2.2. Les cellules musculaires lisses

Situées dans la média, les CMLs représentent le type cellulaire prédominant de la paroi artérielle normale. En maintenant leur attachement aux cellules voisines et à la matrice du tissu conjonctif, les CMLs assurent le tonus vasculaire. Avec le vieillissement artériel, il se produit un épaissement graduel de l'intima de la paroi artérielle, et des CMLs isolées peuvent alors y apparaître. C'est au niveau de ces régions que se développe la lésion athéromateuse (Ross, 1995).

On distingue deux phénotypes de CMLs: les cellules contractiles (dans la média essentiellement), et les cellules sécrétrices (Stary et coll., 1992). Lorsque les CMLs sont dans le phénotype contractile, elles répondent aux agents tels que l'endothéline, le NO, la PGI₂, l'ANG-II, et les leukotriènes qui induisent la vasodilatation ou la vasoconstriction. Les cellules sécrétrices sont pour leur part capables d'exprimer des gènes pour un certain nombre de facteurs de croissance et peuvent synthétiser divers constituants de la matrice extracellulaire (Ross, 1990). Au cours de l'athérosclérose, l'événement initial marquant la fibroprolifération est le changement du phénotype des CMLs de la région située à proximité de l'intima de cellules contractiles en cellules sécrétrices (Pardee, 1989). Ces changements peuvent être dus à l'expression de molécules d'adhésion spécifiques de la famille des intégrines à la surface des CMLs (Campbell et coll., 1988, Thyberg et coll., 1990). En fait, les CMLs de la lésion athéromateuse contiennent les intégrines $\alpha 2\beta 1$ qui sont aussi rencontrées dans les CMLs embryonnaires humaines (Raines et Ross, 1993). Il a été démontré que les cellules exprimant les intégrines $\alpha 2\beta 1$ ont la capacité de se lier au collagène et à la fibronectine (Skinner et coll., 1994). La première action des CMLs ayant acquis le phénotype de cellules sécrétrices est de migrer dans l'intima à travers la limitante élastique interne en réponse aux substances chimiotactiques tel que le PDGF sécrété par les cellules endothéliales et les macrophages (Raines et Ross, 1993). Le PDGF peut aussi stimuler la prolifération des CMLs dans l'intima. Les CMLs peuvent aussi être la source d'une série de facteurs de croissance incluant le PDGF, le "monocyte-colony stimulating factor (M-CSF), le TGF β , et "l'heparin-binding epidermal growth factor" (HB-EGF) (Ross, 1995). Lorsque les gènes pour ces facteurs de croissance sont induits par divers agents, les CMLs peuvent activer les cellules environnantes d'une manière paracrine et s'activer elles-mêmes de façon autocrine (Libby et coll., 1988; Sjölund et coll., 1988). De plus, les

CMLs peuvent aussi contribuer à l'oxydation des LDL présentes dans la paroi artérielle par la production de l'anion superoxyde (Sigal et coll., 1994).

I.1.3.2.3. Les monocytes/macrophages

Comme dans de nombreux tissus, les macrophages peuvent apparaître dans l'intima de la paroi artérielle normale sous forme de cellules isolées. Leur présence dans l'intima augmente avec l'âge et se stabilise normalement au début de l'âge adulte (Sary et coll., 1992; Ross, 1993). Les régions de l'intima présentant un épaissement excentrique contiennent trois fois plus de macrophages que les segments artériels voisins (Sary et coll., 1992). La présence de monocytes dans l'intima est considérée comme un des événements précoces de l'athérogenèse (Schwartz et coll., 1991). Par leur capacité à capter les LDL-oxydées via les récepteurs "scavenger" qui ne sont pas régulés par la concentration intra-cellulaire de cholestérol, les MDMs représentent la principale source de cellules spumeuses de la lésion athéromateuse (Badimon et coll., 1993).

I.1.3.2.4. Les lymphocytes T

De nombreuses études ont démontré la présence de lymphocytes T dans la lésion athéromateuse, suggérant que ces cellules puissent représenter une composante de la réponse immunitaire impliquée dans l'athérogenèse (Hansson et coll., 1989; Munro et coll., 1987; Jonasson et coll., 1986). On retrouve aussi bien les cellules CD4⁺ que les cellules CD8⁺ dans la lésion (Libby et Hansson, 1991). Au cours de l'athérosclérose, la prolifération des lymphocytes est stimulée par l'interleukin-2 (IL-2) sécrétée par les macrophages. Les lymphocytes activés peuvent à leur tour

sécréter des cytokines telles que l'interféron-gamma ($\text{IFN}\gamma$), le "granulocyte-macrophage -colony stimulating factor" (GM-CSF), et le $\text{TNF}\alpha$ susceptibles d'activer les macrophages (Ross, 1993).

I.1.3.2.5. Les plaquettes

Les plaquettes jouent un rôle important dans la pathogenèse des lésions athérosclérotiques. Une caractéristique essentielle de la réponse des plaquettes au dommage vasculaire est leur adhésion irréversible au site de rupture de la continuité endothéliale entraînant l'exposition des éléments normalement présents dans la couche sous-endothéliale (Massy et Keane, 1996; Yarnell et coll., 1991). Les plaquettes adhèrent alors au collagène ou au facteur von Willebrand par l'intermédiaire des glycoprotéines exprimées à leur surface. Très récemment, Barnes et coll. (1998) ont défini le mécanisme par lequel la plaquette interagit avec le collagène. Cette interaction implique initialement la reconnaissance de séquences spécifiques du collagène par le récepteur plaquettaire $\alpha 2\beta 1$. La reconnaissance subséquente des séquences Gly-pro-Hyp du collagène par un deuxième récepteur plaquettaire, la glycoprotéine VI, conduit à une série d'événements aboutissant à l'activation et à l'agrégation de la plaquette (Barnes et coll., 1998). Les plaquettes activées sont la source de substances vasoconstrictrices telle que la thromboxane A_2 et de plusieurs facteurs de croissance incluant le PDGF, le FGF, le $\text{TGF-}\beta$, "l'insulin-like growth factor-1" (IGF-I) et le "platelet-derived endothelial cell growth factor "(PD-ECGF). Ces différents facteurs de croissance augmentent la réponse proliférative de la paroi vasculaire (Loscalzo, 1992).

I.1.4. Stades de l'athérosclérose

Les lésions de l'athérosclérose peuvent être divisées en trois catégories: la strie lipidique, la lésion intermédiaire ou pré-athérome, et la plaque fibreuse ou lésion avancée de l'athérosclérose.

I.1.4.1. La strie lipidique

La strie lipidique représente la lésion athéromateuse à son stade précoce (Berliner et coll., 1995). Elle est composée de cellules spumeuses, d'un nombre variable de lymphocytes T et de CMLs, et d'une faible quantité de lipides extra-cellulaires (Stary, 1990; Munro et coll., 1987). Les cellules spumeuses représentent la majeure partie de la lésion et occupent deux à six couches de l'intima. Elles donnent à la lésion une coloration jaunâtre, d'où l'origine du terme "strie lipidique" (Ross, 1995).

La formation de la strie lipidique commence par le transport des LDL dans l'espace sous-endothélial de la paroi artérielle. On considère que ce processus est directement proportionnel à la concentration des lipoprotéines plasmatiques (Young et Parthasarathy, 1995; Schwenke et Carew, 1989). Il a été démontré que les LDL interagissent d'une manière spécifique avec les composantes de la matrice sous-endothéliale (Camejo et coll., 1993). Nivelstein-Post et coll. (1994) ont observé que les LDL circulantes traversent l'endothélium intact avant d'être rapidement retenues par les fibres de collagène sous-jacentes à l'endothélium. De nombreuses substances provenant des cellules de la paroi artérielle, incluant les espèces radicalaires oxygénées, la lipoxigénase, et la myéloperoxidase, agissent sur les LDL retenues et initient l'oxydation de ces particules (Witztum et Steinberg, 1991; Witztum, 1994; Parthasarathy, 1994; Nagel et coll., 1994; Daugherty et coll.,

1994). Au cours de l'oxydation des LDL, les acides gras subissent la peroxydation et les aldehydes, des produits issus de cette peroxydation, se lient de façon covalente à l'apoB de la particule de LDL (Rosenfeld et coll., 1990).

L'accumulation des LDL dans la paroi vasculaire est suivie du recrutement des leucocytes, particulièrement les monocytes et les lymphocytes T, dans l'espace sous-endothélial de la paroi artérielle (Massy et Keane, 1996). Ce processus est facilité par les molécules d'adhésion exprimées à la surface des monocytes et des cellules endothéliales activées et par les facteurs chimiotactiques tel le MCP-1 sécrété par les cellules endothéliales activées. Il est important de souligner que la production de MCP-1 par ces cellules est augmentée en présence de LDL minimalement modifiées (Navab et coll., 1991). Par ailleurs, les LDL-oxydées induisent l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales et stimulent aussi la migration des monocytes dans l'espace sous-endothélial (van der Wal et coll., 1992; Autio et coll., 1990). Les LDL glyquées, fréquemment rencontrées chez les patients diabétiques, peuvent avoir des effets physiologiques similaires à ceux des LDL-oxydées (Massy et Keane, 1996).

Après leur migration dans l'espace sous-endothélial, les monocytes subissent une activation-différenciation et se transforment en macrophages (Schwartz, 1989). Les macrophages amplifient le signal chimiotactique par la sécrétion du MCP-1, favorisant ainsi le recrutement chronique de monocytes dans la paroi artérielle (Cushing et Fogelman, 1992). Étant donné que l'infiltration des lipoprotéines dans l'intima peut se poursuivre tant que les niveaux plasmatiques de LDL demeurent élevés, les cellules spumeuses peuvent continuer à se former et, par conséquent, contribuer à la

progression de la lésion. Plusieurs cellules spumeuses peuvent toucher l'endothélium qui peut alors devenir mince et présenter des distorsions et des renflements (Schwartz, 1991).

En plus des LDL, d'autres lipoprotéines peuvent être impliquées dans le processus athérogénique. Ces lipoprotéines incluent les β VLDL et la Lp(a) (Massy et Keane, 1996). Il a été démontré que les β VLDL peuvent induire la formation des cellules spumeuses in vitro (Steinberg et coll., 1989). Toutefois, il n'existe pas encore d'évidences démontrant un effet des β VLDL sur la fonction endothéliale (Massy et Keane, 1996).

I.1.4.2. La lésion intermédiaire ou pré-athérome

La lésion intermédiaire ou lésion fibro-lipidique représente le deuxième stade de l'athérosclérose. Cette lésion comprend plusieurs couches de cellules spumeuses, des lymphocytes T, et un nombre variable de CMLs entourées par une matrice conjonctive peu développée et constituée de fibres de collagène, de fibres élastiques, et de protéoglycans. Certaines CMLs peuvent contenir des gouttelettes lipidiques (Ross, 1995).

L'équilibre dynamique entre les concentrations de lipoprotéines du plasma et de l'intima, le potentiel oxydatif de l'intima, le niveau de recrutement des monocytes dans l'intima, et l'efficacité du transport inverse de cholestérol sont des facteurs clés dans la progression de la strie lipidique vers la lésion intermédiaire. Toutefois, d'autres processus entrent en ligne de compte dans la progression de la lésion, particulièrement la nécrose des cellules spumeuses dans l'intima et la prolifération des CMLs (Schwartz et coll., 1991).

Lorsque l'infiltration des lipoprotéines et leur modification oxydative subséquente dépasse la capacité des macrophages à capter les LDL-oxydées via les récepteurs "scavenger", ces lipoprotéines s'accumulent dans l'intima où elles vont favoriser la nécrose des cellules spumeuses (Schwartz et coll., 1991). La mort des cellules spumeuses conduit à la libération de leurs lipides dans le compartiment extracellulaire et à la formation de "l'atheros", soit la zone de la plaque riche en esters de cholestérol.(Schwartz et coll., 1991). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer la nécrose des cellules spumeuses. Des éléments toxiques présents dans les LDL-oxydées, principalement la lysophosphatidylcholine (LysoPC) et les stérols oxydés, peuvent être responsables de la nécrose cellulaire (Steinberg et coll., 1996). Très récemment, Tabas (1997) a suggéré que le cholestérol libre puisse induire une cytotoxicité pouvant conduire à la nécrose des cellules spumeuses. En effet, des études réalisées dans son laboratoire ont démontré qu'un ratio élevé cholestérol libre:phospholipides de la membrane cellulaire peut causer la nécrose des cellules spumeuses. Normalement, les macrophages répondent à une charge élevée de cholestérol libre par une synthèse accrue de phospholipides pour garder le ratio cholestérol libre:phospholipides de la cellule au-dessous des niveaux toxiques (Shiratori et coll., 1995). L'incapacité de cellules spumeuses de répondre à la charge de cholestérol libre par cette mesure adaptative conduit à la cytotoxicité et à la nécrose (Tabas, 1997).

Sous l'influence de substances chimiotactiques, les CMLs de la média migrent vers l'intima où elles vont proliférer sous l'action de mitogènes, notamment le PDGF sécrété par les cellules endothéliales, les macrophages, et les CMLs elles-mêmes (Campbell et Campbell, 1994; Badimon et coll., 1993). Dans l'intima, les CMLs vont contribuer à la croissance et à la progression de la

lésion par la sécrétion d'éléments de la matrice conjonctive dont le collagène, l'élastine, et les protéoglycans (Gerrity et Antonov, 1997).

La migration des CMLs et leur prolifération dans l'intima entraîne un changement dans la composition relative des cellules de la lésion athéromateuse. Malgré l'augmentation du nombre des CMLs, celui des macrophages et des cellules spumeuses demeure considérable, principalement dans les "accotements" de la plaque athéromateuse où le recrutement continu des monocytes semble maximal (Schwartz et coll., 1991). À mesure que la lésion progresse, les cellules de la plaque subissent un réarrangement qui peut conduire à la lésion avancée ou plaque fibreuse (Ross, 1995).

I.1.4.3. La plaque fibreuse ou lésion avancée

La plaque fibreuse représente la lésion avancée de l'athérosclérose. La formation de la plaque fibreuse est le résultat d'un processus de remodelage visant à restaurer la forme initiale de la lumière artérielle (Schwartz, 1991). Ce processus peut être régulé par les forces hémodynamiques locales et implique toutes les parties de la paroi artérielle (Friedman et coll., 1986; Schwartz et coll., 1991). Par exemple, on note l'amincissement de la zone de la média immédiatement sous-jacente au segment le plus épais de la plaque. Schwartz et coll. (1991) suggèrent que la perte de fonction des CMLs consécutive à la rigidité de la plaque, ou même la migration des CMLs de la média vers l'intima puissent être à l'origine de l'amincissement de la média. Par ailleurs, l'adventice est le site de plusieurs changements incluant une néo-vascularisation, une fibrose, et dans 80% des lésions, indépendamment du site artériel d'origine, d'une lymphocytose attribuée au développement d'un processus auto-immun (Schwartz et coll., 1989; Schwartz et coll., 1990).

La plaque fibreuse est caractérisée par une coiffe fibreuse contenant plusieurs CMLs entourées d'épaisses couches de tissu conjonctif essentiellement composé de collagène, de fibres d'élastine, et de protéoglycans (Stary, 1990; Ross, 1995). La coiffe fibreuse peut aussi contenir des MDMs et quelques lymphocytes T (Ross, 1995). Elle couvre un corps nécrotique profond contenant quelques CMLs, des débris cellulaires, des cristaux de cholestérol, et des dépôts de calcium (Ross, 1990; Ross, 1995). Des couches additionnelles de CMLs peuvent se trouver au-dessous du corps nécrotique (Fuster et coll., 1992). Avec l'épaississement de la lésion athéromateuse se forment de petits vaisseaux capillaires, le vasa vasorum, permettant probablement d'apporter les nutriments et l'oxygène nécessaires aux cellules de la lésion (Ross, 1995). Lorsque les "accotements" de la lésion sont minces et insuffisamment formés, les forces mécaniques accompagnant le cycle cardiaque peuvent affecter ces vaisseaux et conduire à leur rupture ou à leur ulcération (Fuster et coll., 1992; Schwartz et coll., 1991).

Les plaques vulnérables à la rupture ont généralement une coiffe fibreuse caractérisée par un contenu élevé en lipides extracellulaires, une densité élevée en macrophages, et un contenu faible en collagène et en CMLs (Davies, 1993; van der Wal, 1994). La diminution des niveaux de collagène dans la plaque est le résultat de leur dégradation par les métalloprotéinases sécrétées par les macrophages et les CMLs et/ou de la diminution de leur synthèse par les CMLs (Henney et coll., 1991; Galis et coll., 1994). Mach et coll. (1997) ont montré que certaines cytokines incluant l'IL-1 et le TNF α induisent la formation de métalloprotéinases par les macrophages et les CMLs. Par ailleurs, la présence d'un grand nombre de macrophages à proximité des CMLs apoptotiques a poussé Kockx et coll. (1996) à suggérer qu'un facteur dérivé des macrophages puisse être

responsable de la mort des CMLs. La démonstration par Geng et coll. (1996; 1997) que l'IFN γ , le TNF α , et l'IL-1 β induisent l'apoptose des CMLs in vitro suggère que le même phénomène puisse se produire dans la lésion athéromateuse et entraîner la réduction des niveaux de collagène. Les cytokines peuvent donc contribuer à l'appauvrissement des éléments de la matrice de la plaque et par conséquent à sa rupture en stimulant d'une part la production de métalloprotéinases et en induisant, d'autre part, l'apoptose des CMLs, sources de collagène.

L'observation selon laquelle les plaques stables ont généralement une coiffe fibreuse épaisse et contiennent peu de lipides (Libby, 1996) suggère que les lipides puissent être impliqués dans la rupture de la plaque. Très récemment, Aikawa et coll. (1998) ont démontré, chez le lapin, qu'une diète réduite en lipides diminue l'activité des métalloprotéinases et augmente les niveaux de collagène de la matrice. Les auteurs suggèrent que la diminution de lipides dans la lésion stabilise la coiffe fibreuse de la plaque en diminuant l'expression locale de cytokines et en réduisant, de ce fait, les stimuli responsables de l'apoptose des CMLs et des macrophages.

I.1.5. Étiopathogénie

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer la pathogenèse de l'athérosclérose. Parmi ces hypothèses, les plus connues sont: l'hypothèse de la réponse au dommage endothélial, l'hypothèse de la rétention des lipoprotéines, l'hypothèse de l'infiltration des lipides, l'hypothèse antioxydante, l'hypothèse virale de l'athérosclérose et l'hypothèse inflammatoire de l'athérosclérose.

I.1.5.1. Hypothèse de la réponse au dommage endothélial

L'importance de l'endothélium dans le développement de l'athérosclérose a été soulignée initialement par l'observation que la dénudation de l'endothélium facilite le développement de la lésion athéromateuse. De cette observation est née l'hypothèse que le processus athérogénique constitue une réponse au dommage endothélial (Ross et coll., 1977). Toutefois, la rupture physique de l'endothélium pendant l'athérogenèse a été difficile à documenter, et l'examen vasculaire de jeunes adolescents a montré la présence de lésions athérosclérotiques précoces en l'absence d'une quelconque évidence de rupture de la continuité endothéliale (Wissler, 1991; Di Salvo et coll., 1994). Partant de ces observations, l'hypothèse a été modifiée pour inclure dans la définition de dommage endothélial la dysfonction endothéliale, c'est-à-dire l'arrêt ou l'inactivation de certains mécanismes antiathérogéniques intrinsèques à l'endothélium (Busse et Flemind, 1996). Cette nouvelle version de l'hypothèse a été renforcée ultérieurement par des études démontrant que la dysfonction endothéliale précède la formation de la lésion athéromateuse proprement dite (Zeiber et coll., 1991; Egashira et coll., 1993; Egashira et coll., 1993; Reddy et coll., 1994).

Plusieurs mécanismes peuvent être responsables de cette dysfonction endothéliale. Des études effectuées avec des modèles hydrauliques reproduisant différents types de flux ont permis de montrer que les facteurs hémodynamiques peuvent causer un dommage endothélial direct (Ku et coll., 1985). De manière plus intéressante, ces études ont permis de prédire à partir des zones de turbulence maximale les sites de prédilection des lésions athéromateuses dans l'artère humaine. Par ailleurs, des modèles expérimentaux ont démontré que plusieurs facteurs de risque de l'athérosclérose peuvent être à l'origine d'une dysfonction endothéliale. Comme nous l'avons

mentionné précédemment, ces facteurs incluent l'hypertension, le diabète, l'hyperlipidémie, l'hyperhomocystéinémie, les complexes immuns, les infections virales, et le tabagisme (Ross, 1990). La dysfonction endothéliale est associée à une altération de la relâche par l'endothélium du NO et de l'endothéline en réponse aux agonistes circulants, entraînant des réponses vasoconstrictives anormales susceptibles de réduire le diamètre de la lumière vasculaire et de promouvoir l'interaction entre les éléments sanguins et la paroi artérielle (Badimon et coll., 1993). La réduction de la sécrétion du NO par les cellules endothéliales peut aussi entraîner une altération du ratio NO/anion superoxyde (O_2^-) susceptible d'augmenter l'expression de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium vasculaire. Dans l'ensemble, l'hypothèse de la réponse au dommage endothélial suggère que la dysfonction endothéliale induit l'accumulation de lipides et le recrutement des monocytes dans l'espace sous-endothélial (Ross, 1993).

I.1.5.2. Hypothèse de la réponse à la rétention

L'hypothèse de la réponse à la rétention suggère que la rétention des lipoprotéines athérogéniques dans l'espace sous-endothélial représente l'événement le plus important dans l'athérogenèse. Une fois retenues, ces lipoprotéines vont occasionner une série d'événements biologiques conduisant au développement de la lésion athéromateuse (Williams et Tabas, 1995). Les partisans de cette hypothèse avancent plusieurs arguments pour l'appuyer. Par exemple, Nievelstein et coll. (1991) ont démontré que l'accumulation rapide des LDL dans la paroi artérielle est le premier changement décelable après l'induction rapide d'une hypercholestérolémie chez des lapins (Schwenke et Carew, 1989a). De plus, ces auteurs ont montré que la rétention initiale des LDL injectées *in vivo* se produit dans les régions connues pour leur susceptibilité à développer des

lésions athéromateuses (Schwenke et Carey, 1989b). Très récemment, Borén et coll. (1998) ont créé une série de souris transgéniques porteuses de différentes mutations de l'apoB-100 humaine. Ils ont observé que les souris porteuses d'une forme de ces mutations, les souris K3363E, produisent des LDL présentant une liaison normale au récepteur des LDL, mais une absence d'affinité pour les protéoglycans. Borén et coll. (1998) ont montré que ces dernières souris ne développent pas de lésions athéromateuses après induction d'une hypercholestérolémie comparativement aux souris transgéniques pour l'apoB-100 humaine normale qui, elles, développent des lésions athéromateuses sévères pour un degré d'hypercholestérolémie et un profil de distribution des lipoprotéines similaires (Purcell-Huynh et coll., 1995). Selon Williams et Tabas (1998), les résultats de cette étude suggèrent que les LDL incapables de se lier à la matrice extracellulaire ne peuvent pas causer l'athérosclérose, et appuient l'hypothèse de la rétention des lipoprotéines dans la pathogenèse de l'athérogenèse.

Cette hypothèse a été dernièrement renforcée par plusieurs études suggérant que les LDL natives retenues dans la paroi artérielle puissent contribuer au développement de l'athérosclérose et ce en l'absence d'une quelconque modification oxydative de ces lipoprotéines. Premièrement, il a été rapporté que les LDL natives peuvent induire l'expression de VCAM-1 (Zhu et coll., 1998) et du facteur de transcription "activator protein-1" (AP-1) (Allen et coll., 1998) par les cellules endothéliales. Deuxièmement, Romano et coll. (1998) ont démontré que les LDL natives peuvent générer de la LysoPC sous l'action de la phospholipase non pancréatique A₂ (nps-PL A₂), une enzyme présente en grande quantité dans la lésion athéromateuse humaine. Finalement, Napoli et coll. (1997) ont rapporté la présence de LDL natives, de LDL-oxydées, et d'infiltrations cellulaires dans les lésions athérosclérotiques des foetus humains. De manière intéressante, ils ont observé

qu'un grand nombre de lésions athéromateuses montre des zones renfermant des lipoprotéines sans traces d'infiltrations cellulaires, suggérant que la rétention des lipoprotéines puisse précéder le recrutement des monocytes au stade initial de l'athérogenèse.

I.1.5.3. Hypothèse de l'infiltration des lipides

L'hypothèse de l'infiltration des lipides stipule que des niveaux élevés de LDL dans le plasma conduisent à une augmentation de leur infiltration dans la paroi artérielle. Cette hypothèse a pris naissance au début de ce siècle à partir des travaux d'Anichkov et Khalatov (1913) démontrant que les lapins nourris avec des diètes riches en cholestérol développent des lésions artérielles. Elle a été renforcée au cours des dernières années par des études cliniques telle que "The Framingham Study" démontrant une corrélation directe entre les niveaux de cholestérol sériques et les maladies cardio- et cérébro-vasculaires (Castelli et coll., 1990) ainsi que par des essais de prévention tels que "The Lipid Research Clinics Programs", l'étude d'Helsinki et d'autres documentant une réduction d'événements coronariens après diminution des niveaux de cholestérol plasmatiques (Lipid Research Clinics Program, 1984; Brown et coll., 1990). L'hypothèse propose que l'infiltration des lipides résulte en une augmentation de leur captation par les macrophages et les CMLs, et que l'accumulation subséquente de cholestérol dans ces cellules aboutisse à la formation de la lésion athéromateuse (Nordestgaard et Nielsen, 1994).

I.1.5.4. Hypothèse antioxydante de l'athérosclérose

Cette hypothèse propose que de nombreux mécanismes observés dans la pathologie de l'athérosclérose soient la conséquence du stress oxydatif causé par des espèces radicalaires

oxygénées. Elle stipule que des niveaux faibles des principaux antioxydants (acide ascorbique, α -tocophérol, et β -carotène) sont des facteurs de risque sous-estimés des MCV, et que ces dernières peuvent être évitées en optimisant les niveaux plasmatiques d'antioxydants (Gey, 1995). À l'origine, cette hypothèse était basée sur plusieurs évidences démontrant les propriétés protectrices d'antioxydants contre les espèces radicalaires oxygénées, la présence de lésions évoquant l'athérosclérose chez les animaux présentant une déficience chronique en vitamines C et E, et sur diverses données recueillies au cours d'études épidémiologiques (Gey, 1986). Depuis, de nouvelles évidences suggérant un rôle de l'oxydation dans l'athérogenèse continuent à être présentées. Par exemple, des études cas-témoins récentes rapportent que l'augmentation de l'apport alimentaire ainsi que celle des taux sériques et de tissu adipeux de plusieurs antioxydants, notamment la vitamine E, la vitamine C, et le β -carotène, est associée à une réduction de risque de MCV (Todd et coll., 1995; Street et coll., 1994; Kardinaal et coll., 1993). De même, des études prospectives de cohorte suggèrent une association inverse entre l'apport alimentaire en vitamines E et C, et en β -carotène et le risque de MCV (Rimm et coll., 1993; Stampfer et coll., 1993; Knekt et coll., 1994). Plusieurs études expérimentales montrent que la consommation d'antioxydants essentiels atténuent la formation des lésions aortiques dans plusieurs espèces animales (Wojcicki et coll., 1991; Williams et coll., 1992; Verlangieri et Bush, 1992). De nombreuses études ont également indiqué que le probucol, un antioxydant pharmacologique, augmente la résistance des LDL à l'oxydation, réduit l'accumulation de lipides dans le macrophage, et inhibe la formation de lésions athéromateuses chez le lapin (Gey, 1993; Steinberg et coll., 1989; Witztum et Steinberg, 1991; Daugherty et coll., 1989). Toutefois, deux études ont rapporté que l'inhibition de l'athérosclérose par le probucol n'est pas associée à une présence réduite d'épitopes oxydés dans la paroi artérielle, contrairement à ce qu'on

devrait observer si le probucol réduisait l'athérosclérose en inhibant l'oxydation des LDL (O'Brien et coll., 1991; Chang et coll., 1995). Il est possible que le probucol puisse prévenir l'athérosclérose par un de ses nombreux effets, incluant son effet antioxydant au niveau cellulaire (Ylä-Herttuala, 1991; Nagano et coll., 1990; O'Brien et coll., 1991; Parthasarathy, 1993) et la modification de la composition des lipoprotéines (McPherson et coll., 1991; Chiesa et coll., 1993). Par ailleurs, deux essais de prévention cliniques n'ont pas appuyé de façon convaincante l'hypothèse antioxydante de l'athérosclérose. En effet, les études "The Cambridge Heart Antioxydant Study" (CHAOS) et "Alpha Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study" (ATBC Study) ont rapporté que la vitamine E a augmenté légèrement, bien que de façon non significative, le risque de mortalité par MCV (Stephens et coll., 1996; Rapola et coll., 1997). On considère que l'hypothèse antioxydante reste à être établie par des essais cliniques randomisés et contrôlés tels que les études "Women's Antioxidant and Cardiovascular Study" (WACS) et "The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study" (HOPE) actuellement en cours (Schwenke, 1998).

1.1.5.5. Hypothèse virale de l'athérosclérose

Cette hypothèse se base à l'origine sur des études démontrant que les virus de l'herpès induisent chez la poule des lésions artérielles ressemblant à l'athérosclérose humaine (Hajjar et coll., 1986; Fabricant et coll., 1983; Nicholson et Hajjar, 1998). Parmi les observations suggérant l'implication des virus de l'herpès dans l'étiologie et/ou la pathogenèse de l'athérosclérose, on note: 1) la présence d'antigènes et de génome des virus de l'herpès dans les lésions athérosclérotiques (Melnick et coll., 1983; Hendrix et coll., 1990; Hendrix et coll., 1991), 2) l'association entre l'infection au cytomegalovirus et la resténose après angioplastie (Zhou et coll., 1996; Kovacs et coll.,

1997), 3) l'altération du métabolisme du cholestérol dans les CMLs infectées par les virus de l'herpès (Hajjar, 1986; Hajjar et coll., 1990), 4) la perte des propriétés anticoagulantes et l'acquisition de propriétés procoagulantes par les CMLs infectées par les virus de l'herpès in vitro (Key et coll., 1990; Visser et coll., 1988), 5) l'adhésion accrue des cellules inflammatoires aux cellules endothéliales infectées par les virus de l'herpès (Etingin et coll., 1991; Etingin et coll., 1993), et 6) la capacité des virus de l'herpès à induire l'expression de facteurs de croissance et de cytokines par les cellules vasculaires et inflammatoires (Gosselin et coll., 1992; Smith et coll., 1992; Staats et coll., 1993).

Des études récentes suggèrent que d'autres agents infectieux incluant *Clamydia pneumoniae* et *Helicobacter pylori* sont impliqués dans la pathogenèse de l'athérosclérose. À propos de *Clamydia pneumoniae*, plusieurs études ont rapporté sa présence dans les lésions athéromateuses humaines (Kuo et coll., 1995; Campbell et coll., 1995; Ong et coll., 1996). Tel que mentionné antérieurement, on propose que cet organisme pathogène puisse promouvoir l'athérosclérose par l'induction de la sécrétion de cytokines (Mehta et coll., 1998) et d'une activité procoagulante dans les cellules endothéliales (Fryer et coll., 1997).

I.1.5.6. Hypothèse inflammatoire de l'athérosclérose

Plusieurs caractéristiques de la lésion athéromateuse ressemblent à un mécanisme inflammatoire. En effet, l'association d'une infiltration monocytaire, d'une prolifération des CMLs, et d'une sclérose conjonctive, est caractéristique de l'inflammation chronique (Ross, 1990). Ainsi, l'hypothèse inflammatoire de l'athérosclérose stipule que l'athérosclérose est le résultat d'une

réponse inflammatoire initiale suivie de la formation d'une réponse fibro-proliférative représentant un mécanisme de protection de la paroi artérielle. En cas de persistance de l'agent responsable (hypercholestérolémie ou autres facteurs de risque), cette réponse inflammatoire persiste, devient excessive, et devient en elle-même le processus pathologique (Ross, 1998).

I.1.5.7. Hypothèse unifiée de l'athérosclérose

Il n'existe pas encore actuellement d'hypothèse unifiée et cohérente expliquant la pathogenèse de l'athérosclérose. Les hypothèses formulées par divers groupes de chercheurs soutiennent en effet chacune le rôle d'un mécanisme pathologique donné dans le développement du processus athérosclérotique. Il semble pourtant se développer un consensus pour reconnaître le rôle contributif de chaque mécanisme proposé dans les différentes hypothèses, incluant la dysfonction endothéliale, l'infiltration des lipides, l'oxydation des lipoprotéines, les réactions immunes, et la rétention des lipoprotéines dans l'athérogenèse. Actuellement, la question semble être celle de savoir quel mécanisme est le plus important dans l'initiation de l'athérogenèse. Lorsque l'on se base sur les évidences actuellement proposées pour expliquer l'athérogenèse, il est possible d'intégrer les mécanismes proposés dans les différentes hypothèses en une seule hypothèse telle que celle représentée sur la figure 1.

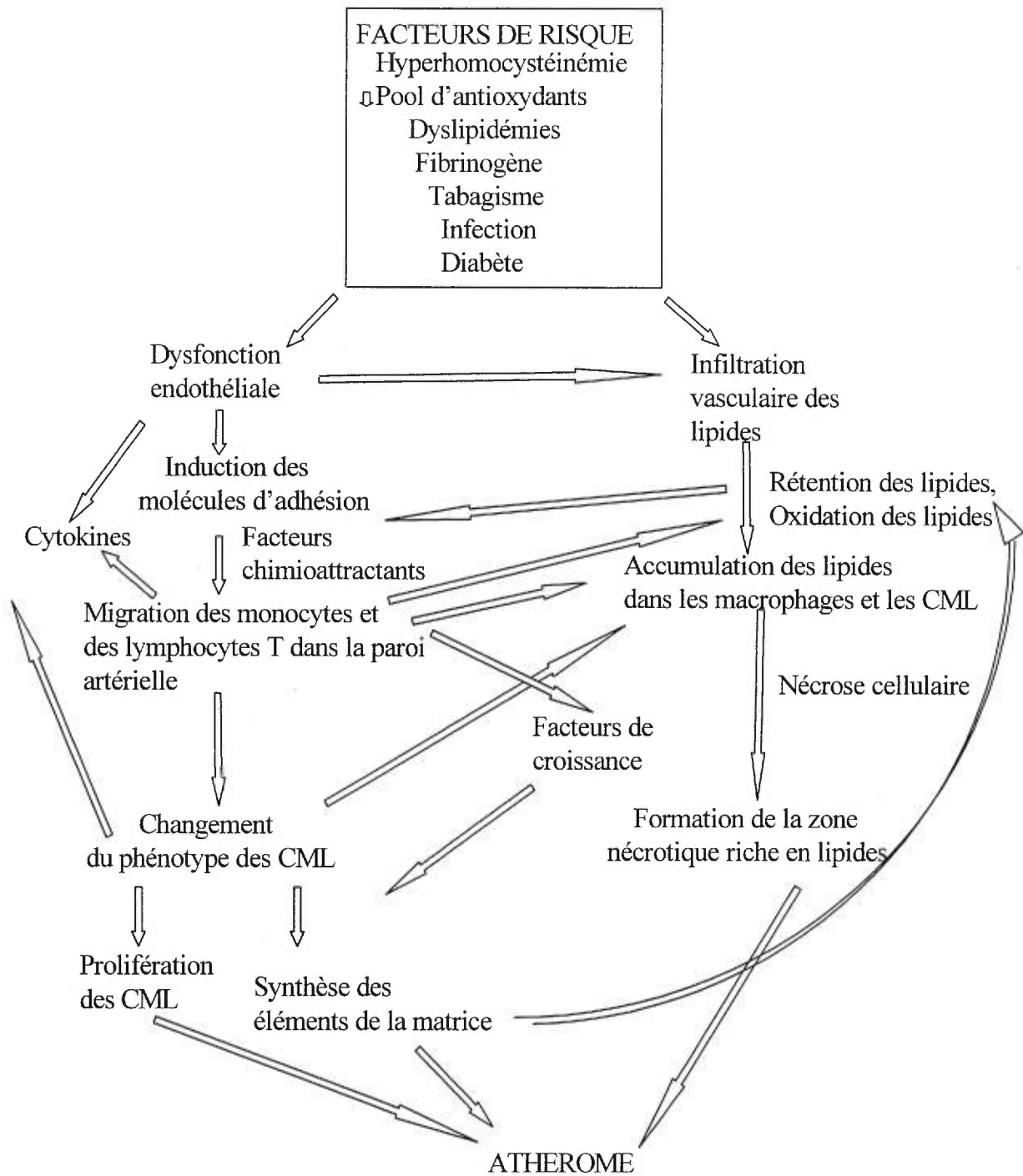


Figure 1. Principaux événements cellulaires impliqués dans l'athérogenèse.

I.1.6. Mécanismes immunitaires de l'athérosclérose

I.1.6.1. Importance des mécanismes immunitaires

L'accumulation précoce de monocytes et de lymphocytes T lors de la formation de la lésion athéromateuse (Hansson 1997; Stemme et Hansson, 1994), et la présence d'anticorps dirigés contre les monocytes et les cellules endothéliales chez 60% des patients souffrant d'athérosclérose (D'Anastasio et coll., 1988) suggèrent que le système immunitaire puisse jouer un rôle déterminant dans le développement de la maladie. L'importance des mécanismes immunitaires dans l'athérosclérose est en outre démontrée par la présence d'anticorps dirigés contre certaines composantes de la paroi artérielle incluant les LDL-oxydées (Palinki et coll., 1994) et la protéine de choc thermique "heat shock protein-60" (hsp-60) (Xu et Wick, 1996), ainsi que l'expression par les macrophages et les CMLs de molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité "human leukocyte antigen" (HLA) (Jonasson et coll., 1986; Hansson, 1997). Les cellules du système immunitaire peuvent être considérées comme des cellules endocrines qui, une fois activées, produisent d'importantes quantités de cytokines et de lymphokines susceptibles d'affecter la croissance et l'expression génique des cellules vasculaires et par conséquent de contribuer au développement de l'athérosclérose (Hansson et coll., 1989; Hansson, 1994).

Les cellules immuno-compétentes de la lésion athéromateuse sont essentiellement les monocytes/macrophages, les lymphocytes, les CMLs, et les cellules dendritiques vasculaires (Ross, 1993a; Bobryshev et coll., 1996; Bobryshev et coll., 1998).

I.1.6.1.1. Immunité cellulaire et athérosclérose

- Les monocytes/macrophages:

Les macrophages contribuent à la progression du processus athérosclérotique par leur capacité de synthétiser plusieurs enzymes, des cytokines, des facteurs de croissance pour les cellules endothéliales et les CMLs, et des substances chimiotactiques (Tableau 1). La présence de HLA à la surface des macrophages présents dans la lésion athéromateuse suggère une association fonctionnelle entre ceux-ci et les lymphocytes T (Hansson et coll., 1997)..

-Les lymphocytes:

Plusieurs études ont confirmé la présence de lymphocytes dans les lésions athéromateuses humaines (Jonasson et coll., 1986; Munro et coll., 1987; Hansson et coll., 1989). L'immunohistochimie et la cytométrie de flux ont permis de montrer qu'il s'agit surtout de lymphocytes T auxiliaires (CD4⁺, "helper/inducer") et de lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺, "cytotoxic/suppressor") (Jonasson et coll., 1986; Stemme et coll., 1992). Jonasson et coll. (1986) ont observé que les lymphocytes CD4⁺ sont prédominants dans toutes les régions de la lésion avancée. Au contraire, les lymphocytes CD8⁺ sont rencontrés plus fréquemment dans la lésion précoce (Emeson et coll., 1988; Munro et coll., 1987). Il est possible que les lymphocytes T soient impliqués dans l'initiation de la lésion athéromateuse et qu'une évolution vers une condition où les cellules CD4⁺ deviennent prédominantes intervienne lors de la progression de la lésion (Hansson et coll., 1989). Stemme et coll. (1992) ont rapporté que la majorité des lymphocytes T de la plaque sont des cellules à mémoire exprimant des récepteurs tels que le HLA-DR et le VLA-1.

Tableau 1. Produits de sécrétion des macrophages (Ross , 1995, 1999; Tabas, 1997; Unanue, 1989; Kraemer, 1992)

<p>Enzymes affectant le tissu conjonctif et les protéines sériques Métalloprotéinases (élastase, collagénase,...) Activateur du plasminogène Enzymes lysosomiales Enzyme de conversion de l'ANG-II</p> <p>Protéines impliquées dans réponse immunitaire et l'inflammation Protéines du complément: C2, C3, C4, C5, facteurs B, D, H, et I Lysozyme IFN α et β IL-1 IL-6 TNFα Fibronectine</p> <p>Facteurs de croissance GM-CSF M-CSF TGFβ PDGF "vascular endothelial growth factor" (VEGF) IGF-1</p> <p>Autres MCP-1 CD40 ligand Apo E LPL Sphingomyelinase "Platelet-activating factor" Métabolites oxygénés Prostaglandines E₂</p>
--

Les lymphocytes T sont activés au contact de l'antigène présenté par la cellule présentatrice, principalement le macrophage (Lanzavecchia, 1990). L'activation des lymphocytes T a deux conséquences principales: la sécrétion de cytokines par les cellules CD4⁺ et CD8⁺ et une activité cytotoxique directe par les cellules CD8⁺ (Stemme et Hansson, 1994). Certaines de ces cytokines

agissent sur les macrophages, les cellules endothéliales et les autres cellules mésenchymateuses pour propager et amplifier la réponse inflammatoire (Hansson, 1997). L'IFN γ , un puissant activateur de la fonction macrophagique, est la plus importante cytokine sécrétée par les lymphocytes T CD4⁺ du sous-type Th1 (Liblau et coll., 1995). Les cellules CD4⁺ du sous-type Th2 produisent des cytokines tels que l'interleukin-4 (IL-4) et l'interleukin-13 (IL-13) qui stimulent la différenciation des lymphocytes B et la production d'anticorps (Mosmann et Coffman, 1989). L'IFN γ sécrété par les lymphocytes Th1 induit aussi l'expression de HLA-DR par les macrophages, les cellules endothéliales, et les CMLs (van der Wal et coll., 1992; Jonasson et coll., 1985). L'expression de HLA-DR à la surface de ces cellules leur confère la capacité de présenter les antigènes aux lymphocytes T, ce qui peut en retour induire une production locale accrue d'IFN γ (Stemme et Hansson, 1994). Il a été démontré que l'IFN γ inhibe la prolifération des CMLs (Hansson et Holm, 1991), diminue l'expression du récepteur "scavenger" par les macrophages, inhibant ainsi la formation des cellules spumeuses (Geng et Hansson, 1992), réduit la teneur en élastine du tissu conjonctif en augmentant l'activité de l'élastase (Redini et coll., 1988), et inhibe la synthèse du collagène (Amento et coll., 1991; Granstein et coll., 1987).

Des études récentes utilisant des modèles de souris transgéniques ont donné des résultats contradictoires quant au rôle des lymphocytes T dans l'athérosclérose. Dansky et coll. (1997) ont observé que la déficience en lymphocytes T et B réduit le développement des lésions (stries lipidiques) chez la souris exempte de "recombination activating gene-1 (*Rag-1*) (gène responsable de la maturation des lymphocytes) et en apo E (souris *RAG1*^{-/-} apo E^{-/-}). Toutefois, l'absence de ces lymphocytes ne réduit pas l'athérosclérose chez cette souris dans les conditions

d'hypercholestérolémie sévère (Dansky et coll., 1997; Daugherty et coll., 1997). De leur côté, Emeson et coll. (1996) ont utilisé des anticorps cytolytiques pour neutraliser les lymphocytes CD4⁺ et/ou CD8⁺ chez la souris C57BL/6J. Ils ont observé que l'absence de cellules CD4⁺ limite de 70% la formation des lésions au stade de stries lipidiques alors que l'absence de cellules CD8⁺ n'a aucun effet sur le développement de la lésion. Gupta et coll. (1997) ont observé une diminution significative de la taille des lésions athéromateuses chez les souris transgéniques dépourvues de récepteur à l'IFN γ (souris IFN γ R^{-/-} apo E^{-/-}). L'analyse histologique des lésions a révélé dans ce modèle expérimental une diminution de la concentration de lipides, une diminution de la concentration totale de cellules, et une augmentation de la quantité de collagène (Gupta et coll., 1997). L'IFN γ inhibant la synthèse de collagène, ces données suggèrent un effet modulateur local de l'IFN γ dans le remodelage de la lésion athéromateuse. D'autre part, l'absence de récepteur à l'IFN γ a entraîné une augmentation de la production de lipoprotéines riches en apolipoprotéine A-IV (apo A-IV) chez les souris IFN γ R^{-/-} apo E^{-/-} (Gupta et coll., 1997). L'apoA-IV étant antiathérogénique lorsque introduite comme un transgène (Duverger et coll., 1996), l'inhibition de la production de lipoprotéines antiathérogéniques pourrait conférer à l'IFN γ des propriétés proathérogéniques (Hansson, 1998). Les résultats des études mentionnées ci-haut suggèrent que l'absence de lymphocytes puisse protéger contre l'athérosclérose. Toutefois, cette interprétation ne semble pas être partagée par Roselaar et coll. (1995) qui ont démontré que, au contraire, la suppression de l'immunité cellulaire stimule le développement de l'athérosclérose chez le lapin "New Zealand White", probablement par atténuation de l'effet inhibiteur des lymphokines sur l'accumulation de cholestérol par les macrophages. À la lumière des données actuellement disponibles, il ressort que des recherches futures sont nécessaires pour déterminer le rôle des

lymphocytes T dans la modulation de l'athérogenèse. L'étude récente de Nicoletti et coll. (1998) démontrant, pour la première fois, qu'un traitement par immunoglobuline réduit l'athérosclérose chez la souris apo E^{-/-} va dans ce sens et ouvre la voie à de nouvelles recherches orientées vers le traitement de l'athérosclérose par l'immunomodulation.

- Les cellules dendritiques vasculaires (CDV):

Les cellules dendritiques contrôlent la réponse immunitaire par leur contact direct avec les lymphocytes T (Steinman, 1991; Sprecher et Becker, 1993). Bobrysher et Lord (1995) ont détecté la présence de cellules dendritiques vasculaires (CDV) matures dans les lésions athéromateuses humaines et ont suggéré que ces cellules puissent jouer un rôle dans l'athérosclérose. Dans une étude postérieure, les mêmes auteurs ont observé que 1) plus de 90% de CDV sont co-localisées avec des lymphocytes T dans les zones de néo-vascularisation, 2) un grand nombre de CDV et de macrophages sont en contact autour du centre nécrotique, 3) les CDV présentes dans la média et dans l'adventice, principalement autour du vasa vasorum, expriment l'ICAM-1 et la VCAM-1 et sont en contact avec les lymphocytes T, et 4) les régions où sont co-localisées les CDV et les lymphocytes T montrent une expression accrue de HLA-DR. Dans l'ensemble, ces observations suggèrent que les CVD soient impliquées dans l'activation des lymphocytes T dans l'athérogenèse et que les CDV de l'intima traversent la média et l'adventice pour s'implanter dans les nodules lymphatiques adjacents où elles présentent des antigènes aux lymphocytes T (Bobrysher et Lord, 1998).

I.1.6.1.2. Auto-immunité et athérosclérose

De nombreuses études dont celle effectuée par Xu et coll. (1993) ont proposé qu'une réaction immune dirigée contre certaines composantes altérées de la paroi artérielle participe au développement de l'athérosclérose. Aujourd'hui, on considère que deux protéines, les LDL-oxydées et la protéine de choc thermique hsp65/60, représentent des cibles artérielles de l'auto-immunité: Des anticorps anti-malondialdéhyde (MDA)-LDL et -4-hydroxy-nonénal (4HNE) ont été détectés dans le sérum de patients porteurs d'athérosclérose (Palinski et coll., 1989; Palinski et coll., 1994; Jurgens et coll., 1993). Il a été démontré que ces anticorps réagissent avec des particules lipoprotéiniques isolées de plaques athérosclérotiques (Palinski et coll., 1989; Steinberg et coll., 1989). De plus, Salonen et coll. (1992) ont observé que le titre des anticorps anti-MDA-LDL corrèle positivement avec la sévérité de l'athérosclérose. On ne connaît pas encore le rôle spécifique des anticorps anti-MDA-LDL dans l'athérogenèse, mais l'immunisation de lapins hyperlipidémiques Watanabe avec ces anticorps réduit la sévérité de l'athérosclérose (Palinski et coll., 1995). Il a été rapporté que l'immunisation de lapins avec la hsp65 provoque l'épaississement de l'intima artérielle qui montre alors une population cellulaire évoquant la lésion athéromateuse humaine (Xu et coll., 1992). Dans une étude échographique, Xu et coll. (1993) ont observé une corrélation entre des titres élevés d'anticorps sériques anti-hsp-65 et l'athérosclérose. Toutefois, le fait que cette association n'apparaisse qu'après l'âge de 60 ans indique que le développement de l'immunité anti-hsp65 est une conséquence plutôt qu'une cause du développement des plaques athéromateuses (Xu et coll., 1993).

I.1.6.2. Rôle immunomodulateur des facteurs nutritionnels

Plusieurs composantes de la diète incluant les acides aminés (Daly et coll., 1990), les antioxydants (Hornstra et coll., 1998), et les acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 et n-6 sont susceptibles de moduler la fonction des cellules immunitaires (Hornstra et coll., 1998; Calder, 1998). Toutefois, les évidences accumulées à ce jour suggèrent surtout un rôle majeur des AGPI dans la modulation de fonction des cellules immuno-compétentes impliquées dans l'athérosclérose.

I.1.6.2.1. Effets des acides gras polyinsaturés sur les mécanismes immunitaires

Les mécanismes par lesquels les AGPI affectent la fonction des cellules immunitaires incluent une altération de la fluidité membranaire, une modification des mécanismes de transduction cellulaire, et un changement dans la production d'eïcosanoïdes (Fig. 2).

En plus de constituer une source d'énergie pour la cellule, les AGPI exercent également d'autres fonctions importantes en tant que constituants des phospholipides membranaires (Calder, 1998). Ainsi, un changement dans la proportion ou la composition de différents types d'acides gras de la membrane cellulaire peut altérer sa fluidité (Brenner, 1984), et affecter un certain nombre d'activités membranaires incluant le transport d'ions et de substrats, l'activité des récepteurs membranaires, et l'activité d'enzymes liées à la surface de la membrane (Stubbs et Smith, 1984; Brenner, 1984). De plus, certains phospholipides membranaires, par exemple le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate et la phosphatidylcholine, sont impliqués dans les mécanismes

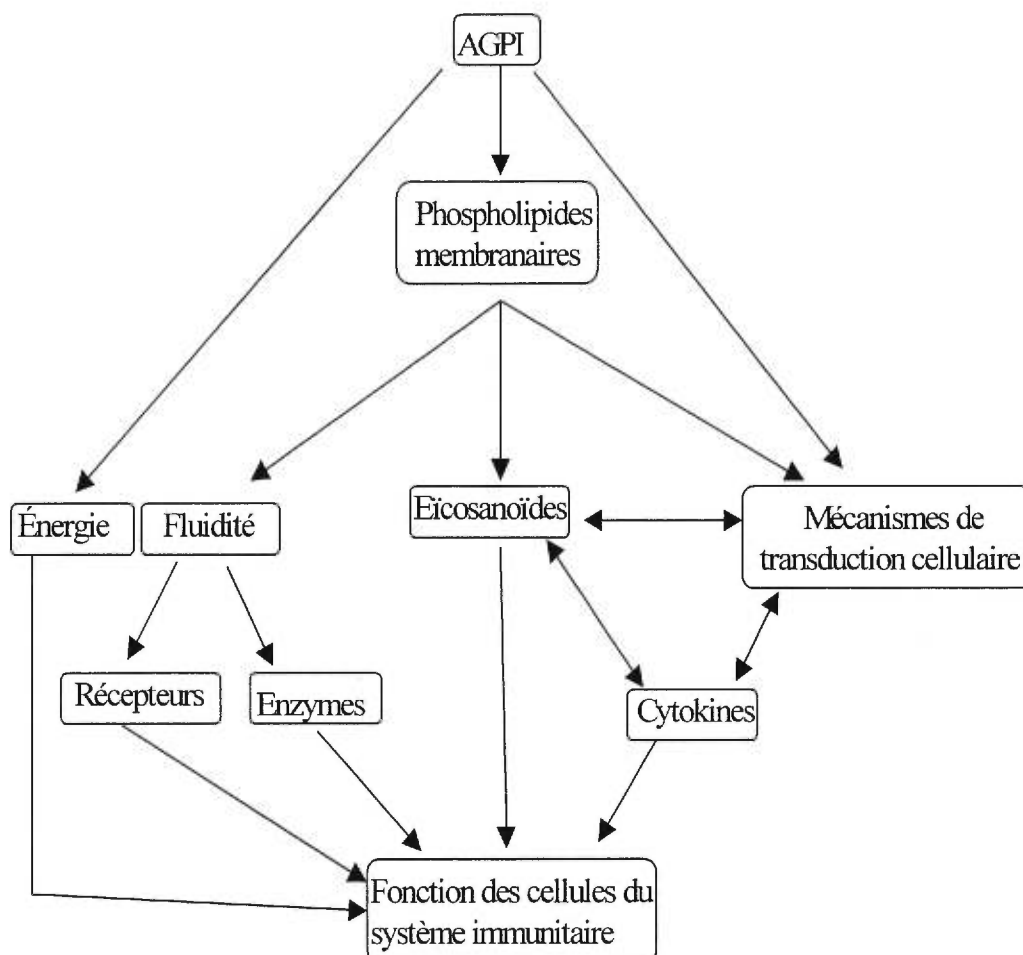


Figure. 2. Mécanismes par lesquels les AGPI peuvent affecter la fonction des cellules du système immunitaire

de transduction cellulaire en tant que précurseurs de seconds messagers tels que l'inositol-1,4,5-triphosphate et le diacylglycérol (Matzaris et coll., 1994). Par conséquent, le changement dans la composition en acides gras de ces phospholipides peut affecter la transduction cellulaire en altérant leur capacité d'agir comme substrats pour les phospholipases ou en altérant l'action du

diacylglycérol produit (Calder, 1998). Certains acides gras peuvent même jouer le rôle de seconds messagers intracellulaires. C'est le cas des acides oléique (C18:1) et arachidonique (AA, C20:4, n-6) libérés sous l'action des lipases qui peuvent affecter directement l'activité de la phospholipase A₂ et celle de la protéine kinase C (PKC) (Sumida et coll., 1993).

Certains acides gras membranaires tels que l'acide arachidonique, l'acide eïcosapentanoïque (EPA, C20:5, n-3) et l'acide dihomog- γ -linoléique (C18:3, n-6) agissent comme précurseurs de la formation des eïcosanoïdes qui incluent les prostaglandines (PGs), les thromboxanes (TXs), les leukotriènes (LT), les lipoxines (LXs), et les acides hydroxyeicosatetraenoïques (HETES) et hydroperoxyeicosatetraenoïques (HPETES) (Calder, 1998). Dans la majorité des cas, l'AA est le principal précurseur d'eïcosanoïdes, et les métabolites produits à partir de cet acide gras sont biologiquement plus puissants que ceux formés à partir de l'acide dihomog- γ -linoléique ou de l'EPA (Sardesai, 1992). La synthèse d'eïcosanoïdes commence par l'activation de la cyclo-oxygénase aboutissant à la formation des PGs et des TXs ou par celle de la lipoxygénase produisant les LTs et divers métabolites associés (Calder, 1998). La quantité et le type d'eïcosanoïdes synthétisés sont déterminés par plusieurs facteurs incluant la disponibilité de l'AA, l'activité de la phospholipase C déterminant la formation d'AA à partir des phospholipides membranaires, et par l'activité des enzymes cyclo-oxygénase et lipoxygénase.

De nombreuses évidences indiquent que la consommation d'AGPI n-3 entraîne une diminution des niveaux d'AA dans la membrane des macrophages et des lymphocytes et, par conséquent, une diminution dans leur capacité de synthétiser les eïcosanoïdes à partir de l'AA

(Broughton et coll., 1991; Lokesh et coll., 1986). Étant donné qu'ils influencent la production d'eicosanoïdes, on suggère que les AGPI n-3 puissent moduler la fonction immunitaire et les fonctions cellulaires par des effets médiés par les eicosanoïdes (Kinsella et coll., 1990).

A. Effets des AGPI sur la prolifération lymphocytaire

- *Effets des AGPI n-6.* De nombreuses études animales ex vivo ont examiné l'effet d'une diète riche en acide linoléique (C18:2, n-6) sur la prolifération lymphocytaire. Plusieurs études ont rapporté une réduction de la prolifération des lymphocytes par la concanavaline A (Con A) ou la phytohemagglutinine (PHA) après l'administration d'une diète riche en huile de maïs ou de tournesol à des rats ou souris de laboratoire (Yaqoob et coll., 1994; Yaqoob et Calder, 1995; Sanderson et coll., 1995). Au contraire, d'autres études n'ont rapporté aucun effet des diètes riches en acide linoléique sur la prolifération des lymphocytes T de ces animaux (Alexander et Smythe, 1988; de Deckere et coll., 1988; Berger et coll., 1993; Fritsche et coll., 1991; Cathcart et coll., 1987). Calder (1998) estime que les résultats contradictoires observés dans la littérature découlent principalement des conditions de culture des lymphocytes ex vivo, notamment de l'utilisation du sérum foetal de veau ou du sérum autologue (Calder, 1998).

- *Effets des AGPI n-3.* L'administration d'huile de poisson à des animaux de laboratoire entraîne une suppression de la prolifération des lymphocytes T et B (Kelly et coll., 1988; Fritsche et coll., 1991; Yaqoob et coll., 1994; Sanderson et coll., 1995; Yaqoob et coll., 1995). De manière similaire, il a été démontré que l'administration d'huile de lin (riche en acide linoléique, C18:3, n-

3) supprime la prolifération des lymphocytes T (Marshall et Johnston, 1985; Jeffery et coll., 1996; Fritsche et coll., 1991).

B. Effets des AGPI sur la présentation d'antigènes

L'introduction d'AGPI n-3 dans la diète de souris ou de rats ou la consommation d'huile de poisson entraînent une diminution de l'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) à la surface de macrophages péritonéaux (Kelly et coll., 1985; Mosquera et coll., 1990; Huang et coll., 1992; Sherrington et coll., 1995). Ces observations suggèrent que la consommation des AGPI n-3 puisse aboutir à la diminution de la présentation d'antigènes. À ce propos, il a été effectivement démontré que l'EPA et l'huile de poisson diminuent la présentation d'antigènes ex vivo par les cellules spléniques de souris (Fujikawa et coll., 1992; Sanderson et coll., 1997) ou par les cellules dendritiques de rats (Sanderson et coll., 1997). En accord avec les études animales, il a été démontré que l'enrichissement de la diète par des AGPI n-3 (environ 1.56 g/jour) induit une diminution de l'expression des niveaux de molécules MHC de classe II à la surface des monocytes humains (Hughes et coll., 1996).

C. Effets des AGPI sur la production de cytokines

- *Effets des AGPI sur la production de cytokines par les macrophages.* De nombreuses études ont rapporté que l'administration de diètes riches en AGPI n-3 à des rats ou à des souris augmente la production de TNF α ex vivo (Lokesh et coll., 1990; Hardardottir et Kinsella, 1991; Hardardottir et Kinsella, 1992; Turek et coll., 1991; Watanabe et coll., 1991; Chang et coll., 1992; Somers et Erickson, 1994; Chaet et coll., 1994). Ces résultats sont contredits par d'autres études

rapportant soit une diminution (Renier et coll., 1993; Billiar et coll. 1988; Boutard et coll., 1994; Yaqoob et Calder, 1995) soit aucune altération (Tappia et Grimble, 1994) de la production de $\text{TNF}\alpha$ après administration d'huile de poisson à divers modèles expérimentaux. Diverses études ont aussi documenté une réduction de la production d'IL-1 et d'IL-6 par les macrophages isolés de souris soumises à une diète enrichie en huile de poisson (Renier et coll., 1993; Billiar et coll. 1988; Yaqoob et Calder, 1995). Les résultats contradictoires obtenus au sujet de la production de $\text{TNF}\alpha$ peuvent s'expliquer par les différences dans les protocoles expérimentaux utilisés. En effet, les études mentionnées ci-haut diffèrent dans de multiples aspects incluant la quantité de lipides utilisés, la durée de la diète, le type d'animal utilisé, le type de macrophages utilisés, et la durée de leur culture *ex vivo*.

Chez les humains, la supplémentation de la diète par l'huile de poisson (1.23 à 6 g d'AGPI/jour pendant 6 à 24 semaines) diminue la capacité des monocytes à produire le $\text{TNF}\alpha$, l'IL- 1α , et l'IL- 1β (Endres et coll., 1993; Cooper et coll., 1993; Meydani et coll., 1991). L'administration d'huile de lin à des sujets normaux réduit aussi la production de $\text{TNF}\alpha$, et d'IL- 1β , toutefois, l'effet de cette huile est inférieur à celui observé avec l'huile de poisson (Caughey et coll., 1996).

- *Effets des AGPI sur la production de cytokines par les lymphocytes.* Peu d'études ont été réalisées sur l'effet des lipides alimentaires, principalement des huiles de poisson, sur la production *ex vivo* de cytokines par les lymphocytes, et les résultats obtenus jusqu'à présent sont quelque peu contradictoires. Turek et coll. (1994) ont observé une production diminuée d'IL-2 par les lymphocytes alvéolaires isolés de porcs nourris par une diète supplémentée en huile de poisson ou

en huile de lin. Au contraire, une production élevée d'IL-2 et d'IL-4 par les lymphocytes spléniques stimulés par la Con-A a été rapportée après administration de 100 g/kg d'huile de poisson à des souris (Fernandes et coll., 1994). De leur côté, Yaqoob et coll. (1995) ont montré que la diète n'a aucun effet sur la production des cytokines IL-2, IL-4, IL-10, et TNF α par les lymphocytes spléniques murins.

Dans une étude clinique, Meydani et coll. (1991) ont observé que la supplémentation de la diète en AGPI n-3 (1.23 ou 2.4 g/jour pendant 12 à 24 semaines) entraîne une diminution de la production ex vivo d'IL-2 par les lymphocytes humains. De même, une diminution de la production d'IL-2 lymphocytaire a été rapportée chez des sujets normaux après 6 semaines de supplémentation de leur diète par 8 ou 18 g/jour d'huile de poisson (Endres et coll., 1993; Endres et coll., 1989; Virella et coll., 1991).

I.1.6.2.2. Effet des acides gras monoinsaturés sur les mécanismes immunitaires

L'effet d'un niveau élevé d'acide oléique sur la fonction lymphocytaire a fait l'objet de quelques études. Berger et coll. (1993) ont rapporté que l'administration d'une diète contenant 100 g/kg d'huile d'olive à des rats femelles pendant la gestation et la lactation n'a aucun effet sur la prolifération de lymphocytes prélevés dans la progéniture au sevrage (Berger et coll., 1993). Au contraire, il a été démontré que l'administration de 200 g/kg d'huile d'olive à des rats diminue la prolifération des lymphocytes (Yaqoob et coll., 1994, Jeffery et coll. (1996). Il est important de mentionner que les lymphocytes étaient cultivés dans un milieu contenant du sérum foetal de veau dans la première étude, tandis que les cellules étaient cultivées dans un sérum autologue dans les

deux dernières études. Plus récemment, Jeffery et coll. (1997) ont observé une association inverse entre la prolifération lymphocytaire et le rapport acide oléique:acide linoléique présent dans la diète.

I.1.7. Prévention et thérapie nutritionnelle des maladies cardio-vasculaires

Le contrôle des facteurs de risque par le changement du style de vie ou la médication constitue la stratégie majeure pour la prévention primaire et secondaire des maladies coronariennes (National Cholesterol Education Program, 1994). Un régime alimentaire équilibré reste la base du traitement de divers facteurs de risque de la maladie athéromateuse tels l'hyperlipidémie, l'hypertension artérielle, et le diabète (Keys et coll., 1986; The Oslo Study Group, 1981; Mckeigue, 1993). La compliance à un régime alimentaire adéquat peut dans beaucoup de cas éviter une thérapie médicamenteuse. Bien entendu, la prescription du régime nécessitera au préalable une bonne évaluation nutritionnelle des sujets et l'approche nutritionnelle devra être associée à d'autres mesures sanitaires telles que la suppression du tabac et l'augmentation de l'activité physique.

I.1.7.1. Traitement de l'hyperlipidémie

De nombreux essais cliniques ont démontré que le traitement de l'hyperlipidémie aboutit à une diminution de la progression de la maladie coronarienne chez les patients présentant une dyslipidémie. Le fondement de ce traitement réside sur: 1) la relation causale entre une diminution des HDL et une augmentation du risque de MCV, 2) l'association entre une réduction des LDL et une diminution de la morbidité et mortalité par MCV, et 3) l'existence d'une possible relation entre l'hypertriglycéridémie et les MCV (Tall et coll., 1998; Holme, 1995; Austin, 1991).

Le traitement d'une hyperlipidémie commence toujours par un régime adéquat. L'"American Heart Association" (1996) recommande d'abaisser l'apport en lipides à 30% de l'apport énergétique total. En outre, l'apport en graisses saturées ne devrait pas dépasser 10% de l'apport énergétique total. On suggère de compenser la réduction d'acides gras saturés par une augmentation modérée d'acides gras mono et polyinsaturés (acides gras n-6 et n-3). Les acides gras n-6 et n-3 devraient représenter respectivement au moins 3% et 0.5% de l'apport énergétique total. Enfin, il est recommandé d'abaisser l'apport en cholestérol à moins de 300 mg/jour (American Heart Association, Krauss et coll., 1996).

I.1.7.2. Traitement de l'hypertension artérielle

Comme pour les dyslipidémies, des mesures nutritionnelles sont utilisées pour le traitement de l'hypertension. En général, la restriction calorique en cas d'excès pondéral est l'objectif principal poursuivi par ces mesures. Cet objectif est atteint essentiellement par la réduction de l'apport lipidique, la réduction d'apport en graisses saturées et leur remplacement par des graisses insaturées. À ce sujet, diverses études ont rapporté l'effet bénéfique des acides gras insaturés, qu'ils soient mono ou polyinsaturés (n-3 et n-6), sur le contrôle de la tension artérielle (Garguli et coll., 1986; Farinano et coll., 1992). L'effet favorable des acides gras insaturés pourrait être imputable à la réduction de l'apport sodé (Farinano et coll., 1992). Quelques études ont aussi mis en évidence une action hypotensive de certains acides gras monoinsaturés (Rasmussen et coll., 1993; Williams et coll., 1987).

1.1.7.3. Traitement du diabète ou de l'insulino-résistance

Le traitement du diabète ou de l'insulino-résistance vise à réduire l'apport lipidique à 30% de l'apport énergétique total, à réduire les graisses saturées, à apporter une quantité modérée d'acides gras polyinsaturés, et à privilégier les acides gras mono-insaturés. À ce propos, il semble qu'un régime riche en acides gras monoinsaturés représente une alternative valable au régime riche en glucides pour les sujets atteints de diabète non-insulino dépendant (NIDDM), car il permet d'améliorer la glycémie, d'assurer un meilleur contrôle du profil lipidique et, grâce à un bon apport en antioxydants, de limiter les processus de peroxydation lipidique (Garg et coll., 1988; Garg, 1994; Bonanome et coll., 1991).

I.2. La lipoprotéine lipase

I.2.1. Généralités

La lipoprotéine lipase (LPL) est une glycoprotéine de 448 acides aminés et de 51 kD de poids moléculaire (58 kD après glycosylation) (Foubert et coll., 1996). Elle appartient à la famille des sérine-estérases qui comprend également la lipase hépatique et la lipase pancréatique (Auwerx et coll., 1992). La LPL est active sous forme homodimérique non covalente (Osborne Jr et coll., 1989), et l'enzyme requiert, pour son activation, l'apo C II présente dans les HDL, les chylomicrons et les VLDL (Flier et Underhill, 1989). Chez les mammifères, la LPL est principalement synthétisée dans le tissu adipeux, le muscle cardiaque, et le tissu mammaire pendant la lactation (Chajek et coll., 1977; Hietanen et Greenwood, 1977; Cryer et Jones, 1978; Cryer et Jones, 1987). L'enzyme est aussi exprimée, mais à des niveaux faibles, dans le cerveau (Gavin et coll., 1987; Ben-Zeev et coll., 1990), les ovaires (Brannon et coll., 1978), les testicules (Kirchgessner et coll., 1989), le foie (Vilaró et coll., 1988; Peinado-Onsurbe et coll., 1992), les reins (Goldberg et coll., 1989), les poumons et les glandes surrénales (Semenkovich et coll., 1989; Kirchgessner et coll., 1989). La production de la LPL par les MDMs humains a été mise en évidence il y a une quinzaine d'années dans plusieurs laboratoires (Khoo et coll., 1981; Chait et coll., 1982; Lindquist et coll., 1983). Plus tard, il sera démontré que les CMLs vasculaires sécrètent aussi la LPL (O'Brien et coll., 1992; Jonasson et coll., 1987). Après sa synthèse, la LPL est transportée par un mécanisme encore inconnu à la surface des capillaires sanguins où elle se fixe aux héparans sulfates des protéoglycans (HSPGs) de l'endothélium (Camps et coll., 1990).

Olivecrona et Bengtsson-Olivecrona (1990) ont rapporté que de faibles quantités de LPL sont présentes dans le plasma humain. La masse de la LPL plasmatique est beaucoup plus importante que son activité correspondante, suggérant que la majeure partie de l'enzyme dans le compartiment plasmatique soit catalytiquement inactive, probablement sous forme monomérique (Vilella et coll., 1993; Olivecrona et coll., 1995). Une étude récente par Karpe et coll. (1998) rapporte que les tissus musculaire et adipeux sécrètent directement la LPL dans le plasma et que la majeure partie de l'enzyme sécrétée est inactive. La LPL plasmatique n'est pas en équilibre avec la LPL fixée à l'endothélium vasculaire; elle reflète plutôt un flux continu de l'enzyme des sites de synthèse dans les tissus périphériques vers les sites de dégradation dans le foie (Olivecrona et Bengtsson-Olivecrona, 1990; Olivecrona et coll., 1995). L'héparine augmente énormément la masse de la LPL plasmatique (Karpe et coll., 1992; Watson et coll., 1995; Chevreuil et coll., 1993a). Olivecrona et Olivecrona (1995) ont rapporté que l'activité de la LPL post-héparine varie considérablement entre les individus normaux. L'activité de la LPL plasmatique augmente après la consommation d'un repas riche en gras (Karpe et coll., 1992) ou pendant l'infusion d'une émulsion lipidique (Peterson et coll., 1990; Hultin et coll., 1992). Il a été suggéré que la liaison des chylomicrons et des gouttelettes lipidiques à la LPL entraîne le détachement de l'enzyme des sites endothéliaux et son passage dans le plasma. Toutefois, l'absence de corrélation entre l'augmentation des triglycérides plasmatiques et celle de la LPL plasmatique suggèrent que les acides gras, plutôt que les lipoprotéines, puissent causer la relâche de la LPL dans le plasma (Karpe et coll., 1992; Peterson et coll., 1990; Watson et coll., 1995).

I.2.1.1. Propriétés enzymatiques de la LPL

La LPL joue un rôle majeur dans le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides, soit les VLDL et les chylomicrons (Olivecrona et Bengtsson-Olivecrona, 1993). L'action hydrolytique de la LPL entraîne, par clivage des liaisons esters des triglycérides, la formation de monoglycérides et de diglycérides et la libération d'acides gras utilisés comme source d'énergie par les cellules musculaires et cardiaques, ou stockés par les cellules adipeuses (Auwerx et coll., 1992). Par cette action, la LPL convertit également les chylomicrons en résidus et déclenche la cascade requise pour la conversion des VLDL en LDL (Chappell et Medh, 1998). Après hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycérides, la LPL reste associée, sous sa forme dimérique, aux résidus de ces lipoprotéines (Zambon et coll., 1996). La quantité de LPL associée *in vivo* aux résidus de lipoprotéines est difficilement déterminable, mais ne semble pas excéder une molécule de LPL par particule de lipoprotéines (Beisiegel et Heeren, 1997).

Alors que plusieurs évidences démontrent le rôle de la LPL dans le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides, les résultats de plusieurs études suggèrent que l'activité de cette enzyme ne constitue pas l'étape limitante majeure de ce processus. Les arguments en faveur d'un rôle majeur de la LPL dans le métabolisme des triglycérides incluent l'observation selon laquelle l'augmentation de l'activité de la LPL induite par la surexpression de la LPL (Shimada et coll., 1993; Liu et coll., 1994; Zsigmond et coll., 1994) ou par l'administration de certains médicaments dont le NO-1886 (Tsutsuni et coll., 1995) et les fibrates (Föger et coll., 1994) diminue les niveaux plasmatiques de triglycérides, améliore la capacité de tolérance à une charge lipidique, et augmente les niveaux de HDL. Tel que mentionné précédemment, il ne semble cependant pas que l'activité

de la LPL soit limitante pour le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides. Chevreuil et coll. (1993) ont observé que l'administration d'héparine entraîne une augmentation de l'activité de la LPL plasmatique et une accélération subséquente de la lipolyse et de la clairance des résidus de chylomicrons chez le rat. Les lipoprotéines séjournant en grande partie dans la circulation où il y a peu ou pas de LPL, ces données suggèrent que le facteur limitant du catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides soit leur accès à la LPL fixée à l'endothélium vasculaire (Olivecrona et Olivecrona, 1995). À ce propos, Karpe et Hultin (1995) ont démontré l'existence d'une compétition entre des gouttelettes lipidiques et les VLDL plasmatiques pour la liaison aux sites lipolytiques endothéliaux, confirmant ainsi les travaux antérieurs de Brunzell et coll. (1973) rapportant une compétition entre les chylomicrons et les VLDL pour la lipolyse au niveau de l'endothélium vasculaire. Si l'activité de la LPL était l'étape limitante dans le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides, on devrait s'attendre à une forte corrélation entre l'activité de la LPL et les niveaux de triglycérides plasmatiques. Or, les résultats de plusieurs études rapportent soit une faible, soit une absence de corrélation entre ces deux variables et suggèrent que les facteurs métaboliques soient plus importants que l'activité de la LPL comme facteurs limitants de lipolyse des triglycérides (Seed et coll., 1994; Jansen et coll., 1994; St-Armand et coll., 1995; Campos et coll., 1995; Taskinen et coll., 1995; Tornvall et coll., 1995). Par ailleurs, l'observation selon laquelle les sujets présentant une mutation hétérozygote pour le gène de la LPL ont des niveaux lipidiques normaux, mais ont tendance à développer une hyperlipidémie lorsqu'exposés à des situations de stress métabolique telles que l'obésité (Julien et coll., 1997) et la grossesse (Ma et coll., 1994) suggèrent que l'activité de la LPL ne soit pas l'étape limitante du métabolisme des triglycérides.

I.2.1.2. Propriétés structurales de la LPL

De nombreuses évidences indiquent que la LPL stimule *in vitro*, indépendamment de son activité lipolytique, la liaison et la captation cellulaire des lipoprotéines incluant les chylomicrons, les VLDL, les LDL, et les HDL (Beisiegel et coll., 1991; Eisenberg et coll., 1992; Mulder et coll., 1992; Rumsey et coll., 1992). Toutefois, il existe très peu de données sur le rôle structural de la LPL dans la captation des lipoprotéines *in vivo*. Dans une étude réalisée chez le rat, Skottova et coll. (1995) ont rapporté que la LPL augmente la clairance des résidus de chylomicrons lorsqu'elle est injectée directement au foie ou lorsqu'elle est ajoutée aux chylomicrons dans le liquide de perfusion. Ces résultats démontrent que la clairance des chylomicrons ne dépend pas seulement de l'activité lipolytique de la LPL, mais que la LPL augmente aussi leur clairance indépendamment de son activité catalytique. Très récemment, Merkel et coll. (1998) ont apporté une évidence directe du rôle physiologique de la LPL dans la captation des lipoprotéines *in vivo*. En effet, ces auteurs ont démontré que l'expression de LPL catalytiquement inactive dans les muscles de souris transgéniques augmente la captation des VLDL par le tissu musculaire.

L'effet de la LPL dans la captation des lipoprotéines nécessite que l'enzyme se lie simultanément aux HSPGs, aux lipoprotéines, et aux récepteurs cellulaires. La liaison de la LPL aux HSPGs de la surface cellulaire a été démontrée par plusieurs groupes (Eisenberg et coll., 1992; Ji et coll., 1995; Beisiegel et coll., 1994; Obunike et coll., 1994). Cette liaison est indispensable pour l'effet de la LPL sur le catabolisme des lipoprotéines, cet effet étant inhibé par le traitement des cellules à l'héparinase (Chappell et coll., 1993; Eisenberg et coll., 1992). La LPL étant présente dans le plasma en association avec les lipoprotéines, il a été suggéré que le complexe LPL-lipoprotéines

puisse se fixer directement aux HSPGs de la surface cellulaire (Vilella et coll., 1993; Olivecrona et Olivecrona, 1995; Carrero et coll., 1996; Choi et coll., 1995).

Les récepteurs cellulaires liant la LPL incluent tous les membres de la famille du récepteur des LDL étudiés à ce jour, c'est-à-dire le récepteur des LDL, le "LDL receptor-related protein" (LRP), le récepteur Gp330, et le récepteur des VLDL (Chappell et Medh, 1998). Le LRP est impliqué dans l'induction par la LPL de la captation et de la dégradation cellulaire des chylomicrons (Beisiegel et coll., 1991), des VLDL (Chappell et coll., 1993), et des β -VLDL (Willnow et coll., 1992). Le site de liaison de la LPL au LRP a été localisé dans le domaine carboxyl terminal de la molécule à l'intérieur des résidus 313 à 448 par Williams et coll. (1994) et à l'intérieur des résidus 380 à 425 par Nykjaer et coll. (1994). Krapp et coll. (1995) ont proposé, quant à eux, les résidus 390 à 421 comme étant responsables de l'interaction de la LPL avec le LRP. Il existe une controverse au sujet de la forme de la LPL susceptible de lier les lipoprotéines au LRP. Eisenberg et coll. (1992) ont suggéré que la forme monomérique de la LPL puisse être capable de lier les lipoprotéines et de favoriser leur interaction avec la surface cellulaire. Cette hypothèse a été confirmée par Williams et coll. (1994) qui ont démontré que la forme monomérique de la LPL est capable de médier la liaison des lipoprotéines au LRP. Au contraire, Nykjaer et coll. (1993) et Krapp et coll. (1995) ont démontré que seule la forme dimérique permet d'augmenter la liaison des lipoprotéines au LRP. Nykjaer et coll. (1994) ont aussi montré que la LPL monomérique se lie avec dix fois moins d'affinité au LRP que la forme dimérique et ont observé que la LPL monomérique est capable de concurrencer la LPL dimérique pour la liaison au LRP et d'inhiber, par conséquent, l'effet de la LPL dimérique sur la liaison et la captation cellulaire des lipoprotéines. Dans l'ensemble, ces données

suggèrent que la quantité de LPL monomérique présente dans le plasma puisse constituer un paramètre important dans le catabolisme des résidus de lipoprotéines.

Il a été démontré que la LPL stimule le catabolisme des LDL (Medh et coll., 1996) et des VLDL (Aviram et coll., 1993; Medh et coll., 1996; Mulder et coll., 1993) via le récepteur des LDL. Medh et coll. (1996) ont observé que, contrairement à son effet sur les VLDL, la LPL a un effet moins prononcé sur le catabolisme des LDL, suggérant que l'enzyme puisse stimuler davantage la liaison des lipoprotéines médiée par l'apo E que celle médiée par l'apo B100. Ces données sont consistantes avec le fait que les lipoprotéines riches en triglycérides sont les meilleurs substrats de la LPL et que l'apo E constitue le médiateur principal de la clairance des chylomicrons et des VLDL remnants (Chappell et Medh, 1998).

Le récepteur des VLDL est principalement exprimé dans les tissus musculaire, adipeux, et cardiaque (Kwok et coll., 1997; Olivecrona et Olivecrona, 1995). La transfection de cellules déficientes en LRP avec le récepteur des VLDL augmente leur capacité d'internaliser et de dégrader la LPL (Argraves et coll., 1995). De plus, les cellules ovariennes de hamster chinois co-transfectées avec le récepteur des VLDL et la LPL lient et dégradent les VLDL plus efficacement que les cellules transfectées avec le récepteur des VLDL seul (Takahashi et coll., 1995). Les données récentes de Merkel et coll. (1998) suggèrent que l'interaction de la LPL avec le récepteur des VLDL augmente la captation des VLDL dans les muscles de souris transgéniques.

Des études *in vitro* ont enfin démontré que la LPL se lie au récepteur Gp330 (Willnow et coll., 1992; Kounnas et coll., 1993). Selon Kounnas et coll. (1993), l'analogie de structure entre le récepteur Gp 330 et le LRP suggère que le récepteur Gp330 puisse faciliter la clairance des lipoprotéines associées à la LPL dans le plasma. Cette hypothèse n'a toutefois pas encore été vérifiée *in vivo*.

I.2.2. Organisation et conservation du gène

La séquence d'acide desoxyribonucléique (ADN) codant pour la LPL a été clonée dans un certain nombre d'espèces incluant l'humain (Kirchgessner et coll., 1989; Deeb et Peng, 1989; Oka et coll., 1990), la poule (Cooper et coll., 1992), le cochon d'Inde (Enerbäck et coll., 1987), et le bovin (Zechner et coll., 1991). Chez l'humain, le gène de la LPL est localisé sur le bras court (p22) du chromosome 8. Il est long d'environ 30 kilobases (kb) et comporte dix exons et neuf introns (Deeb et Peng, 1989). Le premier exon du gène de la LPL porte une région non codante, le peptide signal, et code pour les deux premiers acides aminés de la protéine mature, tandis que les autres acides aminés sont codés par les exons 2 à 9. L'exon 10, long de 1948 nucléotides, code pour la dernière base du codon stop qui est transcrit mais non traduit (Oka et coll., 1990; Wion et coll., 1987).

L'homologie de séquence de la protéine LPL est de l'ordre de 90% entre les mammifères et de plus de 83% entre les oiseaux et les mammifères (Enerbäck et Gimble, 1993). Au niveau de l'ADN complémentaire, l'homologie de séquence du gène est de 77 à 82% entre les mammifères et d'environ 61% entre ceux-ci et les oiseaux (Enerbäck et Gimble, 1993). Braun et Severson (1992)

ont montré que la LPL est conservée à 90% entre l'humain et l'espèce bovine, la souris, et le cochon d'Inde.

Les mutations naturelles du gène de la LPL sont responsables de nombreuses anomalies métaboliques. En 1996, on rapportait plus de 70 mutations naturelles du gène de la LPL dans le monde entier (Murthy V et coll., 1996; Santamarina-Fojo, 1992; Lalouel et coll., 1992; Foubert et coll., 1996; Hayden et coll., 1991). La majorité des mutations identifiées sont des mutations faux sens, situées dans les exons 3, 4, 5, 6, et entraînant au niveau protéique la substitution d'un acide aminé par un autre et l'expression d'une molécule de LPL inactive (Foubert et coll., 1996). Il est important de mentionner que ces exons de la région centrale codent pour les domaines essentiels de la LPL et que leur degré de conservation inter-espèces est maximal (Foubert et coll., 1996). Le déficit homozygote en LPL est responsable de l'hyperchylomicronémie familiale, une dyslipidémie rare dont la fréquence est d'environ 1 sujet sur 1 million et qui est caractérisée essentiellement par l'accumulation de chylomicrons et de VLDL dans le plasma (Foubert et coll., 1996). On estime que la fréquence du déficit hétérozygote s'élève à 1/500 (Brunzell, 1989). Il faut signaler ici la fréquence exceptionnellement élevée de mutations du gène de la LPL chez les Canadiens-Français du Québec. Deux mutations majeures ont été observées dans cette population: les mutation 188 et 207. Les analyses de distribution géographique indiquent que la mutation 188 est très fréquente dans l'Ouest du Québec alors que la mutation 207 est communément rencontrée dans le Nord-Est de la province (Bergeron et coll., 1992; Normand et coll., 1992). La fréquence de porteurs hétérozygotes pour les différentes mutations du gène de la LPL peut atteindre 1/48 et 1/107 dans l'Est et dans l'Ouest du Québec, respectivement (Julien et coll., 1994). L'incidence du déficit homozygote dans le Nord-Est

du Québec a été estimée à au-moins un sujet sur 10000 (Julien et coll., 1994). La fréquence élevée des mutations de la LPL au Québec aurait pu influencer les résultats de certaines expériences décrites dans cette thèse, notamment celles testant l'effet du milieu conditionné des macrophages humains sur la prolifération des CMLs. Cette possibilité semble devoir être exclue par le fait que les donneurs de monocytes étaient recrutés parmi une population à caractère très largement multiethnique.

I.2.3. Structure et domaines fonctionnels de la LPL

La molécule de LPL est constituée d'un domaine NH₂-terminal (acides aminés 1 à 312) et d'un domaine COOH-terminal (acides aminés 313 à 448) (Santamarina-Fojo, 1994; Wong et coll., 1994). Le site catalytique de la LPL (Ser132, Asp156, His241) est situé dans le domaine NH₂-terminal de la molécule (Santamarina-Fojo, 1994). Ce site est placé au fond d'une poche hydrophobe recouverte par un "couvercle" qui en bloque l'accès. Ce "couvercle" est constitué d'une boucle hydrophile formée par un pont disulfure reliant les acides aminés cystéines en position 216 et 239, et dont le déplacement permet l'interaction avec le substrat lipidique et le déclenchement de l'activité lipasique (Dugi et coll., 1992). Le segment comprenant l'Asn125 et Gly142 pourrait constituer le site de liaison du substrat lipidique. On retrouve également dans le domaine NH₂-terminal le site de liaison de l'apo CII (Foubert et coll., 1996).

Des études de mutagenèse dirigée (Ma et coll., 1994) et celles utilisant des chimères LPL-lipase hépatique (Wong et coll., 1991; Santamarina-Fojo, 1994) ont mis en évidence l'importance du domaine NH₂-terminal de la LPL dans sa liaison aux HSPGs exprimés à la surface de

l'endothélium vasculaire. Par contre, le rôle du domaine COOH-terminal de la LPL dans sa liaison aux HSPGs n'est pas encore bien déterminé. Alors que des études utilisant des chimères LPL-lipase hépatique (Wong et coll., 1991; Santamarina-Fojo, 1994) ont démontré l'implication de 50 acides aminés C-terminaux dans la liaison de la LPL aux HSPGs, des études de mutagenèse dirigée contre cette région n'ont pas révélé de baisse d'affinité de la liaison de la LPL aux HSPGs (Ma et coll., 1994).

Des études utilisant des chimères LPL-lipase hépatique et des anticorps spécifiques ont pour leur part démontré l'importance du domaine COOH-terminal dans l'interaction initiale et la spécificité de liaison de la LPL avec les lipoprotéines (Wong et coll., 1994).

Santamarina-Fojo (1994) a proposé un modèle d'action de la LPL qui peut se résumer comme suit: la LPL sous sa forme homodimérique inactive, avec les deux unités "tête bêche" et n'exposant pas le site catalytique hydrophobe, serait rendue active après l'interaction du domaine COOH-terminal avec les lipoprotéines riches en triglycérides. Cette interaction conduirait à une modification de la conformation de la LPL avec l'ouverture du "couvercle" et l'exposition du site catalytique.

I.2.4. Mécanismes de régulation de la LPL

I.2.4.1. Régulation transcriptionnelle

Plusieurs études ont démontré la présence d'éléments *cis* dans le promoteur du gène de la LPL. Enerbäck et Gimble (1993) ont rapporté que les éléments *cis* présents dans presque toutes les

espèces incluent l'octamère 1" (Oct-1), les éléments du récepteur aux glucocorticoïdes (GRE), l'élément spécifique aux lipides (FSE2), et l'élément répondant à la thyroïde (TRE). Les éléments AP1, AP2, Sp1, et LP α/β ne sont rencontrés quant à eux que dans quelques espèces. On suggère que les différences existant entre ces éléments puissent expliquer les variations dans l'expression tissulaire spécifique de la LPL (Enerbäck et Gimble, 1993).

Plusieurs chercheurs ont utilisé des essais de liaison d'ADN et de transfection pour déterminer le rôle des éléments *cis* dans la régulation du gène de la LPL (Hua et coll., 1991; Previato et coll., 1991; Enerbäck et coll., 1992; Currie et coll., 1992). Ces auteurs ont identifié une protéine, le facteur protéique Oct-1, dont la reconnaissance par la séquence d'Oct-1 est nécessaire pour la transcription du gène de la LPL. À ce propos, Previato et coll. (1991) ont montré que l'introduction d'une mutation dans la séquence d'Oct-1 diminue significativement la transcription du gène de la LPL. Par ailleurs, Barcellini-Couget et coll. (1993) ont utilisé la technique d'oligonucléotides anti-sens pour démontrer qu'une composante de l'élément *cis* AP-1, le c-fos, est impliquée dans la régulation transcriptionnelle de la LPL.

Très récemment, Schoonjans et coll. (1996) ont démontré que les activateurs des "peroxisome proliferator-activated receptor" (PPAR) alpha et gamma régulent la transcription du gène de la LPL adipocytaire en stimulant la liaison du complexe PPAR α ou γ -récepteur de l'acide rétinoïque (RXR) au "peroxisome proliferator responsive element" (PPRE) du promoteur du gène de la LPL.

I.2.4.2. Régulation post-transcriptionnelle

I.2.4.2.1. Stabilité du messager

Il existe très peu de données sur la stabilité de l'acide ribonucléique messager (ARNm) de la LPL. White et coll. (1988) ont rapporté que la LPS diminue la stabilité de l'ARNm de la LPL des monocytes/macrophages humains. Une diminution d'environ 50% de la stabilité de l'ARNm de la LPL a été observée après traitement des monocytes/macrophages humains avec l'IFN- γ (Jonasson et coll., 1990). Brault et coll. (1992) ont suggéré que la richesse en adénosine et en tyrosine de l'exon 10 puisse contribuer à la stabilité de l'ARNm de la LPL. Enerbäck et Gimble (1993) ont estimé pour leur part que l'analyse de la région 3' non traduite de l'ARNm de la LPL et l'étude de son interaction avec les protéines cellulaires sont nécessaires pour déterminer les mécanismes pouvant altérer la demi-vie de l'ARNm de la LPL. Très récemment, Ranganathan et coll. (1997) ont effectivement démontré que la traduction de la LPL adipocytaire est régulée par une protéine activée par les catécholamines et se liant à la région 3' de l'ARNm. Il est possible que la phosphorylation de cette protéine par la PKC puisse être impliquée dans la traduction de la LPL (Ranganathan et coll., 1998).

I.2.4.2.2. Glycosylation

La glycosylation joue un rôle important dans la synthèse de la LPL, car elle est indispensable à la maturation et à la sécrétion de la protéine active (Bensadoun, 1991; Braun et Severson, 1992). Des études utilisant des inhibiteurs du transport intracellulaire des protéines ont permis de montrer que le processus de glycosylation se fait en plusieurs étapes. Il commence dans le réticulum endoplasmique pour ensuite se poursuivre dans les différents compartiments de l'appareil de Golgi

(Vannier et coll., 1985; Olivecrona et coll., 1987). Dans chacun des compartiments, différentes enzymes clivent ou ajoutent à la protéine différents résidus incluant le glucose, le mannose, le galactose, l'acide galacturonique, et l'acide sialique conduisant à la formation de chaînes d'oligosaccharides complexes (Braun et Severson, 1992). La LPL possède trois sites de glycosylation: Asn-43, Asn-257, et Asn-359 (Semb et Olivecrona, 1989; Semenkovich et coll., 1990). Toutefois, seul le site Asn-43 est important pour l'activité et la sécrétion de la LPL (Ben-Zeev et coll., 1994; Semenkovich et coll., 1990).

I.2.4.2.3. Liaison de la LPL aux protéoglycans

Après sa sécrétion, la LPL se fixe par une liaison ionique non spécifique aux protéoglycans exprimés à la surface des cellules (Camps et coll., 1990; Foubert et coll., 1996). On distingue plusieurs types de protéoglycans, ceux exprimés et retrouvés à la surface des cellules endothéliales et des MDMs humains étant essentiellement des HSPGs (Olivecrona et coll., 1983; Shimada et coll., 1981; Edwards et coll., 1995). Une fois liée aux HSPGs, la LPL peut être relâchée ou internalisée dans la cellule où elle sera soit dégradée dans le compartiment lysosomal soit recyclée à la surface de la cellule (Cisar et coll., 1989; Saxena et coll., 1990). Les cellules endothéliales et les fibroblastes ne dégradent pas la LPL, ce qui indique que l'enzyme est préservée pour sa fonction extracellulaire, c'est-à-dire l'hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycérides (Eckel, 1989). La relâche, le recyclage, ou la dégradation de la LPL liée à la surface cellulaire représentent des moyens très efficaces de régulation des niveaux plasmatiques de LPL (Cisar et coll., 1989; Olivecrona et coll., 1993; Saxena et coll., 1990). Plusieurs études ont suggéré que les HSPGs puissent être attachés à la cellule par une molécule de glycosyl phosphatidylinositol (GPI) (Chan et coll., coll., 1988; Chajek-

Shaul et coll., 1989; Braun et Severson, 1991). Toutefois, l'incapacité de la phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC) de réduire la liaison de la LPL à la surface des macrophages et des cellules endothéliales suggère que ce mécanisme ne soit pas présent dans ces cellules (Chajek-Shaul et coll., 1989; Saxena et coll., 1991).

Langlois et coll. (1989) et Sweetser et coll. (1986) ont rapporté la présence dans la molécule de LPL d'une séquence similaire à celle de la famille des protéines liant les acides gras. Plus tard, Edwards et coll. (1994) ont démontré la présence de quatre à six sites de liaison des acides gras sur la molécule de LPL. Il a été rapporté que la présence d'une grande concentration d'acides gras libres dans le plasma entraîne la relâche de la LPL liée à l'endothélium vasculaire (Saxena et coll., 1989; Saxena et Goldberg, 1990). Ce mécanisme permettrait de prévenir une surcharge d'acides gras dans la cellule dans des conditions de lipolyse excessive (Saxena et coll., 1989). Il a été suggéré que les acides gras puissent réguler la relâche de la LPL de l'endothélium vasculaire par plusieurs mécanismes incluant le déplacement compétitif (Enerbäck et Bjursell, 1989), l'inhibition de l'activité de la LPL et la réduction de l'activité de l'apo CII (Olivecrona et Bengtsson, 1984).

I.2.4.2.4. Interaction avec l'apo CII

Comme nous l'avons souligné précédemment, la LPL requiert la présence de l'apo CII pour acquérir son activité enzymatique (Flier et Underhill, 1989; Enerbäck et Gimble, 1993).

I.2.5. Régulateurs physiologiques de la LPL

I.2.5.1. L'état de jeûne et l'état post-prandial

On ne dispose pas actuellement de données sur les effets de l'état de jeûne et de l'état post-prandial sur la régulation de la LPL monocytaire/macrophagique. Par contre, on connaît très bien les effets de ces deux états sur la LPL produite par le tissu adipeux et le muscle cardiaque. En période post-prandiale, l'activité de la LPL augmente significativement dans le tissu adipeux alors qu'elle diminue dans le muscle cardiaque. À jeun, l'effet contraire se produit: l'activité de la LPL est supprimée dans le tissu adipeux et augmente dans le muscle cardiaque (Farese et coll., 1991; Olivecrona et coll., 1995). Alors que le mécanisme responsable de la suppression de l'activité de la LPL dans le tissu adipeux n'est pas connu, Olivecrona et coll. (1995) suggère que l'augmentation de l'activité de la LPL, au niveau du coeur, puisse être régulée par l'échange de la LPL entre le compartiment sanguin et les sites endothéliaux. Les différences dans le niveau d'activité de la LPL à l'état nourri et à l'état de jeûne reflètent les besoins énergétiques de l'organisme (Olivecrona et coll., 1995). En effet, le tissu adipeux stocke les graisses à l'état nourri, période pendant laquelle le muscle cardiaque utilise le glucose comme source première d'énergie. En période de jeûne, il se produit une lipolyse des triglycérides dans le tissu adipeux pour fournir l'énergie nécessaire à l'organisme (Chajek-Shaul et coll., 1985; Olivecrona et coll., 1995). Pendant ce temps, le muscle cardiaque modifie sa source principale d'énergie en délaissant le glucose pour les acides gras (Chajek-Shaul et coll., 1985). Plusieurs études ont démontré que les états post-prandial et de jeûne modifient peu les niveaux d'ARNm et les taux de synthèse de la LPL, suggérant que la régulation de l'activité de la LPL par ces états puissent impliquer des mécanismes post-translationnels (Semb

et Olivecrona, 1986; Semb et Olivecrona, 1989; Ong et Kern, 1989; Enerbäck et coll., 1988; Doolittle et coll., 1990).

Des études récentes suggèrent également une régulation nutritionnelle de la LPL plasmatique. Coppack et coll. (1996) ont rapporté que le tissu musculaire sécrète la LPL active dans le plasma à l'état post-prandial et à l'état de jeûne, alors que le tissu adipeux sécrète une faible quantité de LPL active à l'état post-prandial mais pas de LPL active à l'état de jeûne. Ces résultats sont surprenants quand on sait que l'activité de la LPL est plus élevée dans le tissu adipeux que dans le tissu musculaire. Les travaux récents de Karpe et coll. (1998) ont jeté une lumière nouvelle sur la régulation des concentrations de la LPL plasmatique. Ces auteurs ont démontré que les tissus musculaire et adipeux sécrètent tous deux la LPL dans le plasma à l'état post-prandial et à l'état de jeûne. Toutefois, ils ont noté une différence dans la sécrétion de la LPL par ces tissus. Alors que le tissu musculaire sécrète régulièrement la LPL active dans le plasma, le tissu adipeux conserve la LPL active et sécrète une importante quantité de LPL inactive. Le mécanisme par lequel le tissu musculaire sécrète la LPL active dans le plasma n'est pas encore connu. La majeure partie de la LPL dans le tissu adipeux se trouvant sous forme inactive (Bergö et coll. 1996), il est possible que cette LPL inactive soit relâchée dans le plasma pour une éventuelle dégradation dans le foie afin de permettre son renouvellement (Karpe et coll., 1998).

I.2.5.2. Régulateurs hormonaux et nutritionnels

La régulation hormonale de la LPL macrophagique est considérablement différente de celle observée dans d'autres tissus, notamment le tissu adipeux et le muscle cardiaque.

I.2.5.2.1. Les stéroïdes

La régulation de la LPL macrophagique par les glucocorticoïdes a fait l'objet de nombreuses études. Il a été démontré que la dexaméthasone inhibe l'activité (Goldman, 1989; Goldman, 1990) et réduit la sécrétion de la LPL (Behr et Kraemer, 1986) par les macrophages murins. Il semble que l'augmentation des niveaux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) induite par la dexaméthasone soit responsable de l'inhibition de la sécrétion de la LPL par les macrophages murins (Melmed et coll., 1983). En effet, l'AMPc stimule la lipase sensitive hormonale, ce qui entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire des acides gras libres et l'inhibition de la sécrétion de la LPL (Khoo et coll., 1981; Khoo et coll., 1984). Au contraire, la dexaméthasone augmente la sécrétion et l'activité de la LPL par les monocytes/macrophages humains (Kraemer, 1992; Domin et coll., 1991; Auwerx et coll., 1989). L'effet de la dexaméthasone augmente avec le stade de différenciation des macrophages, l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes augmentant avec la maturation de ces cellules (Domin, 1991).

Les niveaux de LPL adipocytaire sont plus élevés chez les rats femelles que chez les rats mâles et des études *in vivo* suggèrent une implication des stéroïdes sexuels (Eisenbäck et Gimble, 1993). L'administration de progestérone à des rats femelles entraîne une augmentation significative de l'activité de la LPL dans le tissu adipeux paramétrial; au contraire, une réduction de l'activité de la LPL de l'ordre de 60% est observée après administration d'oestradiol (Gray et Wade, 1980; Pedersen et coll., 1992). Des études parallèles réalisées chez des rats mâles ont montré un effet similaire de l'oestradiol sur l'activité de la LPL dans le tissu adipeux épidymanal, mais aucun effet de la progestérone (Gray et coll., 1980). Il a été démontré que la progestérone augmente l'activité de

la LPL dans les adipocytes in vitro alors que le 17- β estradiol n'exerce aucun effet (Xu et Björn, 1987). En se basant sur des essais de transfection du gène de la LPL, Peinado-Onsurbe et coll. (1992) ont suggéré que la régulation de l'activité de la LPL adipocytaire par la progestérone puisse se faire au niveau transcriptionnel.

1.2.5.2.2. Insuline et IGF-1

Alors qu'ils exercent un effet stimulant sur la synthèse et l'activité de la LPL adipocytaire (Appel et Fried, 1992; Kraemer et coll., 1998; Oliver et Rogers, 1993; Ewart et coll., 1997), l'insuline et l'IGF-1 n'ont aucun effet sur la LPL macrophagique (Behr et Kraemer, 1986). Dans une étude utilisant des souris déficientes en insuline, Behr et Kraemer (1988) ont observé que l'administration d'insuline à ces souris affecte peu la sécrétion de la LPL macrophagique. Ils en ont par conséquent conclu que l'insuline ne régule pas directement la sécrétion de la LPL par les macrophages et ont suggéré que le diabète puisse modifier la sécrétion de la LPL macrophagique par des changements secondaires à la production d'effecteurs immunologiques. Alors qu'elle augmente la synthèse de la LPL adipocytaire de 42 à 48%, l'insuline n'a aucun effet sur les niveaux d'ARNm ou le taux de transcription de la LPL adipocytaire (Samuelsson et coll., 1991). Ces données suggèrent que l'effet de l'insuline sur les niveaux de la LPL adipocytaire puisse être régulé au niveau post-transcriptionnel (Semenkovich et coll., 1989).

Des études in vitro ont montré que l'exposition des adipocytes 3T3-L1 à l'insuline cause la relâche de la LPL dans le milieu (Eckel et coll., 1978; Spooner et coll., 1979). Il a été proposé que l'effet de l'insuline sur la relâche de la LPL liée à la membrane cellulaire puisse se faire par

l'intermédiaire de la PI-PLC (Chan et coll., 1988). Cette suggestion découle de l'observation selon laquelle le traitement des cellules 3T3-L1 avec l'insuline ou la PI-PLC aboutit à un profil identique de libération de la LPL adipocytaire. La PI-PLC clive le lien GPI qui lie plusieurs molécules incluant les HSPGs à la surface cellulaire (Low, 1989). Comme nous l'avons souligné précédemment, la LPL n'est pas liée à la surface du macrophage par le lien GPI. Cela pourrait expliquer l'incapacité de l'insuline d'augmenter la relâche de la LPL macrophagique.

1.2.5.2.3. Autres hormones

Les études réalisées avec d'autres hormones ont montré que très peu d'entre elles affectent la régulation de la LPL macrophagique. Il a été démontré que la thyroxine n'a aucun effet sur la sécrétion de la LPL macrophagique (Behr et Kraemer, 1986). Il n'existe pas de données sur l'effet de l'hormone de croissance, de la prolactine et des catécholamines sur la production macrophagique de LPL. Par contre, il est connu que ces hormones contrôlent la production de la LPL par le tissu adipeux. La thyroxine induit une augmentation de la synthèse et de l'activité de la LPL macrophagique (Ong et coll., 1992; Saffari et coll., 1992). L'hormone de croissance augmente la transcription, les niveaux d'ARNm et l'activité de la LPL adipocytaire (Pradines-Figuère et coll., 1990). La prolactine, quant à elle, augmente l'activité et les niveaux de l'ARNm de la LPL dans les glandes mammaires (Hang et Rillema, 1997; Spooner et coll., 1979), mais induit une légère diminution de son activité dans le tissu adipeux (Hamosh et coll., 1970). Finalement, il a été rapporté que les catécholamines diminuent la synthèse et l'activité de la LPL adipocytaire (Ashby et coll., 1978; Ong et coll., 1992).

1.2.5.2.4. Les cytokines

L'effet de diverses cytokines sur la régulation de la LPL tant adipocytaire que macrophagique a fait l'objet de nombreuses études. Il a été rapporté que l'IL-1 inhibe jusqu'à 80% l'activité de la LPL produite par les adipocytes murins (Gimble et coll., 1989; Price et coll., 1986; Grégoire et coll., 1992). Cette inhibition d'activité est associée à une diminution de la synthèse de la LPL (Price et coll., 1986). L'IL-1, au contraire, n'a aucun effet sur l'activité de la LPL produite par les monocytes/macrophages humains, à moins que cette lymphokine soit ajoutée immédiatement après la mise en culture des cellules (Querfeld et coll., 1990). L'IFN- γ inhibe jusqu'à 80% l'activité de la LPL adipocytaire (Patton et coll., 1986; Grégoire et coll., 1992). Cette cytokine diminue jusqu'à 50% l'activité et la synthèse de la LPL sécrétée par les monocytes/macrophages humains (Jonasson et coll., 1990). De nombreuses études ont rapporté l'effet inhibiteur du TNF α sur l'activité de la LPL adipocytaire (Kern et coll., 1995; Kern, 1997; Fried et Zechner, 1989). Morin et coll. (1995) ont démontré que le TNF α inhibe la transcription du gène de la LPL en empêchant la liaison d'au moins deux protéines nucléaires, incluant le facteur nucléaire Y (NF-Y), au promoteur du gène. L'IL-6 et le facteur inhibiteur de leucémie (LIF), deux protéines dont les récepteurs transmembranaires contiennent la protéine gp130, diminuent l'activité de la LPL dans les adipocytes 3T3-L1 (Greenberg et coll., 1992).

White et coll. (1988) ont démontré que la LPS diminue l'activité de la LPL sécrétée par les monocytes/macrophages humains. Étant donné que la LPS stimule la production de TNF α par les macrophages et que cette cytokine inhibe la production de LPL par les cellules 3T3-L1, ces auteurs ont examiné la possibilité que le TNF α puisse médier l'effet inhibiteur de la LPS sur la production

de LPL par les macrophages humains. Le traitement des macrophages avec du TNF α humain recombinant à des doses allant jusqu'à 1000 U/ml n'a eu aucun effet sur l'activité de la LPL macrophagique. De plus, l'effet inhibiteur de la LPS sur la LPL n'a pu être bloqué par un anticorps monoclonal anti-TNF α , suggérant par conséquent une action inhibitrice directe de la LPS (White et coll., 1988).

Tengku-Muhammad et coll. (1996) ont examiné l'effet de plusieurs cytokines sur la régulation de la LPL dans la lignée macrophagique J774.2. Ils ont observé que l'exposition de ces macrophages à l'IL-1, l'interleukin-11 (IL-11), l'IFN γ et le TNF α aboutit à une diminution dose-dépendante de l'activité de la LPL, de son niveau d'ARNm et du contenu en LPL des macrophages. Au contraire, l'IL-6 et le LIF n'affectent pas l'expression de la LPL (Tengku-Muhammad et coll., 1996). Très récemment, le même groupe a examiné l'effet d'une combinaison de cytokines sur la régulation de la LPL dans les macrophages J774.2 (Tengku-Muhammad et coll., 1998). Ils ont observé que le degré de suppression de l'activité de la LPL induite par les combinaisons de IL-1 et IL-11, IL-1 et TNF α , IL-11 et TNF α , et IL-11 et IFN γ est considérablement moins élevé que celui attendu en cas d'effet additif de ces cytokines. Au contraire, la co-exposition des cellules à IFN γ et LIF, IL-6 et LIF, et IFN γ et TNF α a entraîné une suppression synergistique de l'activité de la LPL. La réduction maximale de l'activité de la LPL et le degré de synergisme maximal sont produits avec la combinaison IFN γ et TNF α (Tengku-Muhammad et coll., 1998). La synergie entre ces deux cytokines est aussi observée lorsque les cellules sont d'abord exposées à l'IFN γ , lavées, puis stimulées avec le TNF α . De plus, la réduction de l'activité de la LPL par la combinaison TNF α et IFN γ est associée à une diminution comparable des niveaux d'ARNm de la LPL, suggérant que les

changements dans l'activité de l'enzyme puissent être régulés au niveau transcriptionnel (Tengku-Muhammad et coll., 1998). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que la combinaison de cytokines plutôt que la présence ou l'absence d'une cytokine spécifique puisse jouer un rôle important dans la régulation de la LPL macrophagique.

1.2.5.2.5. Les prostaglandines

De Sanctis et coll. (1994) ont rapporté qu'en présence de PGE_2 , les macrophages murins démontrent une diminution significative de la sécrétion ainsi que des niveaux d'ARNm de la LPL. Ces auteurs ont aussi montré une augmentation considérable de la production d'AMPc par les macrophages traités avec la PGE_2 . Le traitement direct des macrophages avec l'AMPc a entraîné une diminution des niveaux d'ARNm et de l'activité de la LPL (De Sanctis et coll., 1994). Ces données corroborent ainsi celles de Behr et Kraemer (1986) et Melmed et coll. (1983) rapportant que les substances qui augmentent la concentration intracellulaire d'AMPc inhibent la sécrétion de la LPL. Il est connu que les macrophages sécrètent des prostaglandines en présence de LPS (Kawada et coll., 1992; Victorov et Hoek, 1995; Delong et coll., 1999). Dans le but de tester la possibilité que la production de PGE_2 puisse être responsable de l'inhibition de la sécrétion de la LPL causée par la LPS, De Sanctis et coll. (1994) ont traité les macrophages murins avec de l'indométhacine, une substance qui bloque la voie de synthèse des prostaglandines, avant l'exposition des cellules à la LPS. Leurs résultats démontrant une diminution de l'effet inhibiteur de la LPS en présence d'indométhacine suggèrent que les prostaglandines soient des inhibiteurs puissants de l'expression du gène de la LPL et médient partiellement l'effet inhibiteur de la LPS sur la sécrétion de LPL macrophagique.

I.2.5.2.6. Les oxystérols

Les oxystérols sont des molécules biologiquement actives libérées lors de l'oxydation des LDL. La présence d'oxystérols dans la lésion athérosclérotique humaine a été documentée (Chisolm et coll., 1994; Mattsson Hultén et coll., 1996; O'Brien et coll., 1996). L'incubation des MDMs humains avec le 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OH) et le 25-hydroxycholestérol (25-OH) réduit de manière dose dépendante les niveaux d'ARNm et l'activité de la LPL (Mattsson Hultén et coll., 1996). Au contraire, les niveaux d'ARNm de la LPL sont inchangés par l'exposition des macrophages au cholestérol, 7 α -hydroxycholestérol, 7-cétocholestérol, 5,6 α epoxycholestérol, cholestane-3 β -5 α -6 β -triol, 24-hydroxycholestérol ou le 27-hydroxycholestérol. Toutefois, le cholestane-3 β -5 α -6 β -triol et le 27-hydroxycholestérol diminuent l'activité de la LPL macrophagique (Mattsson Hultén et coll., 1996).

Stengel et coll. (1998) ont examiné l'effet du degré d'oxydation des LDL sur la sécrétion et les niveaux d'ARNm de la LPL des MDMs humains. Ces auteurs ont observé que les LDL natives, les LDL acétylées, et les LDL oxydées pendant moins de 6 heures (LDL moyennement oxydées) n'affectent pas l'expression de la LPL macrophagique. Par contre, l'exposition des macrophages aux LDL fortement oxydées (oxydation > 6 heures) entraîne une diminution significative de l'activité et des niveaux d'ARNm de la LPL. Stengel et coll. (1998) ont en outre observé que 1) parmi les oxystérols formés au cours de l'oxydation des LDL, seul le 7 β -OH induit une faible réduction de l'activité de la LPL, et 2) la LysoPC, dont la concentration augmente avec le degré d'oxydation des LDL, induit une forte réduction de l'activité et des niveaux d'ARNm de la LPL. Cette dernière observation suggère que la LysoPC puisse jouer un rôle important dans l'inhibition de l'expression

de la LPL par les macrophages humains (Stengel et coll., 1998). Par ailleurs, en incubant les macrophages dans les mêmes conditions que celles de Mattsson Hultén et coll. (1996), c'est-à-dire dans un milieu contenant 10% de sérum humain et 10% de sérum foetal de veau (FCS), Stengel et coll. (1998) ont observé que le 25-OH induit également une diminution significative de l'activité de la LPL. Ces auteurs suggèrent que la différence de réponse de la LPL macrophagique au 25-OH soit due à l'addition de FCS dans le milieu, introduisant par ce fait des facteurs de croissance susceptibles de potentialiser l'effet du 25-OH.

I.2.5.2.7. Le PDGF et le M-CSF

Le PDGF existe sous trois isoformes, soient PDGF-AA, PDGF-BB, et PDGF-AB (Hafizi et coll., 1998; Oikawa et coll., 1994). Le PDGF-BB est le principal isoforme sécrété par les macrophages humains (Ross et coll., 1990). Ayant observé que la différenciation des monocytes humains en macrophages est associée à l'expression des récepteurs au PDGF, Inaba et coll. (1995) ont examiné le rôle du PDGF-BB dans l'expression de la LPL macrophagique. Ils ont noté que l'incubation des macrophages humains avec le PDGF-BB augmente l'activité de la LPL de manière dose et temps dépendante. De plus, ils ont montré que le PDGF-BB augmente la synthèse "de novo" de l'ARNm de la LPL et que son action est médiée par l'activation de la PKC. Le PDGF-BB agirait sur l'expression de la LPL en stimulant la prolifération, la différenciation, et la maturation des monocytes/macrophages humains (Inaba et coll., 1995).

Le M-CSF stimule la synthèse de la LPL par les macrophages humains et les macrophages alvéolaires de rats (Inaba et coll., 1995). De leur côté, Mori et coll. (1991) ont démontré que le M-

CSF augmente la synthèse d'ARNm de la LPL et la sécrétion de l'enzyme. Ils ont aussi observé que le M-CSF stimule la maturation et la différenciation des macrophages humains et alvéolaires de rats. Ces données suggèrent que le M-CSF puisse agir, comme le PDGF-BB, sur l'expression de la LPL par sa capacité de stimuler la prolifération, la différenciation et la maturation des macrophages (Inaba et coll., 1995; Mori et coll., 1991).

I.2.5.2.8. Les nutriments

L'acide rétinoïque inhibe *in vitro* l'activité de la LPL adipocytaire (Oliver et Rogers, 1993). En outre, il supprime l'augmentation de l'activité de la LPL adipocytaire induite par l'insuline. Cette suppression de l'activité de la LPL corrèle avec une diminution de la synthèse de la protéine sans changement dans la stabilité de l'ARNm (Oliver et Rogers, 1993). Des résultats similaires sont obtenus avec les macrophages murins (Goldman, 1990). Ces observations suggèrent que l'effet de l'acide rétinoïque sur l'expression de la LPL puisse se réaliser au niveau post-transcriptionnel. Il a été postulé que les effets de l'acide rétinoïque puissent être secondaires à son effet régulateur sur la production de TGF- β (Defacque et coll., 1999; Petruschke et coll., 1994), ce dernier inhibant l'activité et le niveau d'ARNm de la LPL dans les adipocytes murins (Friedman et coll., 1995; Friedman et coll., 1991).

Les AGPI n-3 augmentent l'activité de la LPL plasmatique pré-et post-héparine aussi bien chez les patients hypertriglycéridémiques que chez les individus normaux (Harris et coll., 1997; Zampelas et coll., 1994). Cet effet se traduit par une diminution des niveaux de triglycérides plasmatiques à l'état post-prandial (Zampelas et coll., 1994). Il a été rapporté que les AGPI n-3

augmentent les niveaux d'ARNm de la LPL dans le tissu adipeux des patients diabétiques (Luo et coll., 1998). Par ailleurs, Renier et coll. (1993) ont observé que les macrophages prélevés de souris nourries par une diète enrichie en huile de poisson ont une expression et une production de LPL diminuées. Le mécanisme responsable de l'effet de l'huile de poisson sur la production de la LPL macrophagique n'est pas connu. Il est toutefois possible que l'effet de cette huile soit lié à sa capacité de diminuer la taille et le contenu en lipides neutres des lipoprotéines, et/ou le nombre de particules de VLDL sécrétées (Parks et Rudel, 1990).

Très récemment, Sartippour et coll. (1998) ont démontré que le glucose stimule l'expression et la production de la LPL par les macrophages murins et humains. Ces auteurs ont démontré que le glucose exerce son effet au niveau de la transcription du gène de la LPL et que cet effet est médié partiellement par la protéine *c-fos*. Bien que la régulation de la LPL macrophagique ne soit pas encore suffisamment étudiée chez les patients diabétiques, ces données suggèrent que l'hyperglycémie puisse augmenter la synthèse de la LPL par les macrophages dans la paroi vasculaire et que cette altération puisse contribuer au développement de l'athérosclérose associée au diabète.

1.2.6. Rôle de la LPL dans la biologie des macrophages

Le rôle physiologique de la sécrétion de la LPL par les macrophages n'est pas bien compris. Le fait que les macrophages en prolifération expriment des niveaux élevés de LPL alors que les macrophages matures, non proliférants n'en expriment que peu suggère un rôle de la LPL dans l'approvisionnement énergétique de la cellule durant la période de multiplication cellulaire et lors d'états caractérisés par une augmentation des demandes métaboliques (Goldman et Sopher, 1989).

Il est possible que la sécrétion de la LPL par les macrophages puisse permettre l'hydrolyse des triglycérides locaux et la production d'acides gras, ceux-ci constituant une source énergétique pour ces cellules (Newsholme et coll., 1987).

I.2.7. Effets potentiels de la LPL dans le processus athérosclérotique

La mise en évidence de la sécrétion de la LPL par les MDMs humains et les CMLs dans la lésion athéromateuse (O'Brien et coll., 1992; Yla-Herttuala et coll., 1991) a suggéré un rôle de cette enzyme dans le développement de l'athérosclérose. Cette hypothèse a été renforcée par l'étude de Renier et coll. (1993) démontrant que les macrophages isolés de souris susceptibles à l'athérosclérose surexpriment la LPL comparativement aux macrophages isolés de souris résistantes à l'athérosclérose. Bien que la LPL puisse exercer un effet périphérique antiathérogénique, de nombreuses évidences suggèrent que l'enzyme sécrétée dans la paroi vasculaire puisse promouvoir, par ses propriétés enzymatiques et structurales, le développement de l'athérosclérose (Tableau 2).

I.2.7.1. Effet pathologique de la LPL sur la paroi artérielle

En hydrolysant les triglycérides des chylomicrons et des VLDL, la LPL plasmatique entraîne la production d'acides gras libres (AGLs) et de lysolecithine. Ces produits hydrolytiques peuvent stimuler, au niveau de la paroi artérielle, l'expression de certains facteurs de croissance et de molécules d'adhésion impliqués dans le processus athérogénique (Goldberg, 1996). Les AGLs peuvent aussi compromettre la fonction de barrière de l'endothélium vasculaire, favorisant une infiltration de lipoprotéines athérogéniques (Hennig et coll, 1984; Rutledge et coll., 1997). De plus, la production induite par la LPL des résidus de lipoprotéines (VLDL et chylomicrons remnants) peut,

Tableau 2. Arguments plaidant en faveur ou contre un rôle de la LPL dans l'athérogenèse (Olivecrona et Olivecrona, 1995).

Propriétés anti-athérogéniques de la LPL:

- promotion d'un profil lipidique non-athérogénique par la lipolyse effective des lipoprotéines riches en triglycérides;
- stimulation de la clairance hépatique des lipoprotéines et des résidus de chylomicrons;
- genèse de substrats nécessaires à la formation des HDL;
- diminution de la nécessité d'un efflux secondaire de lipoprotéines hépatiques par l'apport de lipides aux tissus extra-hépatiques;
- induction de l'expression de la NO synthase dans les macrophages;
- possible contribution dans la clairance des lipides extracellulaires originant des tissus endommagés.

Propriétés pro-athérogéniques de la LPL

- transformation des lipoprotéines riches en triglycérides larges et non athérogéniques en résidus athérogéniques;
- production de LDL;
- médiation de la liaison de diverses lipoprotéines aux HSPGs exprimés à la surface cellulaire et à la matrice extracellulaire;
- augmentation de peroxydation des lipoprotéines par leur rétention dans la matrice extracellulaire;
- stimulation de la captation des lipoprotéines par les macrophages;
- médiation du transfert de cholestérol et des esters de cholestérol des lipoprotéines vers les cellules, indépendamment de son activité enzymatique;
- compétition entre les formes monomérique et dimérique de la LPL pour leur liaison aux récepteurs cellulaires.

en augmentant leur concentration au niveau de la surface artérielle, faciliter leur infiltration dans la paroi vasculaire (Goldberg, 1996).

I.2.7.2. Rôle de la LPL dans la rétention des lipoprotéines

Plusieurs études ont démontré que la LPL augmente la rétention des lipoprotéines à la matrice extracellulaire et aux HSPGs exprimés à la surface des cellules (Makoveichuk et coll., 1998; Williams et coll., 1995; Saxena, 1993; Auebarch, 1996; Eisenberg, 1992). Très récemment, Rutledge et coll. (1997), utilisant un modèle d'artère de hamster perfusée, ont montré que la LPL associée aux glycosaminoglycans de la paroi artérielle se lie aux LDL, augmente la rétention de ces lipoprotéines et diminue leur efflux de la paroi artérielle. Par ailleurs, Tabas et coll. (1993) ont rapporté un effet combiné de la LPL et de la sphingomyelinase (SMase) sur l'augmentation de la liaison des LDL et de la Lp(a) à la matrice extracellulaire. Ces auteurs ont suggéré que cet effet puisse contribuer de manière considérable au développement du processus athérogénique, des concentrations élevées de LDL et de Lp(a) étant associées à une augmentation des risques de maladies coronariennes (Armstrong et coll., 1986).

Par son effet sur la rétention des LDL à la matrice sous-endothéliale, la LPL pourrait aussi favoriser indirectement le recrutement des monocytes dans la paroi artérielle. En effet, les LDL faiblement modifiées stimulent la synthèse de substances chimiotactiques des monocytes par les cellules endothéliales et les CMLs (Cushing et coll., 1990). Les LDL fortement oxydées ont pour leur part une activité chimiotactique directe envers les monocytes et les lymphocytes T (Quinn et

coll., 1987; McMurray et coll., 1993) et stimulent l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (Kume et coll., 1992).

1.2.7.3. Rôle de la LPL dans la captation des lipoprotéines par les macrophages et les cellules musculaires lisses

En facilitant la rétention des lipoprotéines athérogéniques dans la matrice sous-endothéliale, la LPL peut contribuer à leur accumulation dans les macrophages et les CMLs et, par conséquent, à la formation de cellules spumeuses, présentes de manière caractéristique dans les stries lipidiques (Hendricks et coll., 1996; Stein et coll., 1993) (Fig. 3). La LPL pourrait faciliter la captation des lipoprotéines par les macrophages par deux voies: une voie médiée par les récepteurs cellulaires et une voie indépendante de ceux-ci.

Eisenberg et coll. (1992) ont suggéré que la LPL, en facilitant l'interaction entre les HSPGs et les lipoprotéines, puisse rapprocher les lipoprotéines de la surface cellulaire et ainsi faciliter le transfert des particules lipoprotéiniques aux récepteurs cellulaires. Plusieurs études ont rapporté que la conversion induite par la LPL des chylomicrons et des VLDL en particules résiduelles aboutit à l'augmentation de leur captation par les macrophages (Lindqvist et coll., 1983; Ostlund-Lindqvist, 1983; Bates et coll., 1984). Selon Kraemer (1992), cet effet de la LPL pourrait être dû à au moins deux facteurs: 1) le changement dans la conformation des apoprotéines induit par la lipolyse des triglycérides, changement aboutissant à une augmentation de l'affinité des particules résiduelles pour le récepteur des LDL, et 2) l'augmentation d'affinité des particules résiduelles pour le récepteur des LDL suite à la perte d'apoC-II pendant la lipolyse (Windler et coll., 1980). Il a aussi été démontré

que l'hydrolyse des triglycérides des LDL par la LPL augmente considérablement la captation des LDL par les macrophages (Aviram et coll., 1988).

La captation des lipoprotéines par les macrophages par la voie indépendante des récepteurs cellulaires peut se produire par la phagocytose d'agrégats de lipoprotéines ou de complexes constitués de lipides, de protéines, et d'éléments de la matrice extra-cellulaire (Brown et Goldstein, 1983). Rumsey et coll. (1992) ont démontré que les macrophages ont la capacité de dégrader les résidus de chylomicrons par phagocytose (Rumsey et coll., 1992). Ces auteurs ont proposé l'existence d'un mécanisme similaire pour la dégradation des LDL natives par les macrophages. Plus spécifiquement, ils ont suggéré que les LDL natives puissent être internalisées avec la LPL et les HSPGs de la surface cellulaire. Outre leur capacité de phagocytose, les macrophages peuvent accumuler des lipides grâce à l'action hydrolytique de la LPL. En effet, les acides gras libérés au

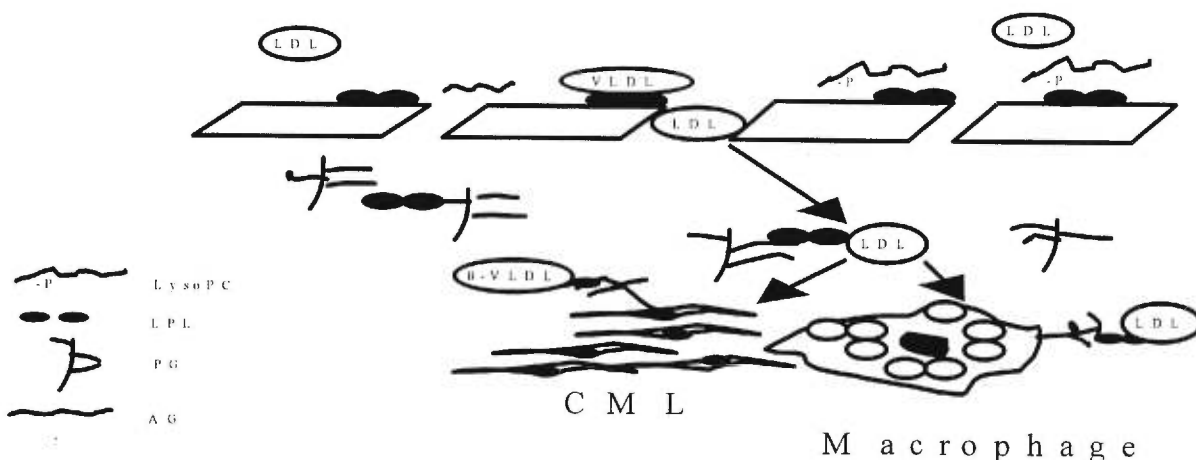


Figure 3. Effets de la LPL sur la paroi artérielle et sur la captation des lipoprotéines par les macrophages et les CMLS. En hydrolysant les triglycérides des VLDL et des chylomicrons, la LPL plasmatique entraîne la production d'acides gras (AG) et de lysolecithine (Lyso) pouvant altérer la fonction de barrière de l'endothélium vasculaire et favoriser l'infiltration de lipoprotéines athérogéniques. En augmentant la rétention de ces lipoprotéines à la matrice sous-endothéliale, la LPL stimule leur captation par les MDMs et les CMLs et la formation de cellules spumeuses.

cours de l'hydrolyse des chylomicrons et des VLDL peuvent être captés et réestérifiés par les macrophages, induisant dès lors une accumulation des triglycérides dans les cellules (Mamo et coll., 1996; Lindqvist et coll., 1983; Ostlund-Lindqvist et coll., 1983).

La LPL contribue à l'accumulation des lipoprotéines dans les CMLs par des mécanismes spécifiques. Elle augmente notamment la liaison des β -VLDL aux HSPGs présents à la surface des

CMLs (Stein et coll., 1993). Le complexe ainsi formé pourrait soit être capté dans son ensemble par endocytose par les CMLs, soit permettre uniquement le transfert des esters de cholestérol des β -VLDL aux CMLS (Stein et coll., 1993). La LPL sécrétée par les macrophages peut aussi régir le transfert des esters de cholestérol présents dans l'athérome vers les CMLS. En facilitant ce processus, la LPL fonctionnerait comme une protéine de transfert (Stein et coll., 1994).

I.3. Hypothèses de travail

De nombreuses évidences indiquent que les monocytes/macrophages humains jouent un rôle important dans la formation de la lésion athérosclérotique. L'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire est un des événements précoces de l'athérogenèse (Schwartz et coll., 1991). Ce processus est suivi de la migration des monocytes dans l'intima de la paroi artérielle et de leur transformation en macrophages (Butcher, 1991; Valente, 1992). Le processus de différenciation des monocytes humains en macrophages est associé au développement de plusieurs nouvelles fonctions incluant la capacité de sécréter la LPL (Chait et coll., 1982; Mahoney et coll., 1982) et de répondre de manière accrue à divers agents activateurs (Gessani et coll., 1993).

La LPL se lie aux protéoglycans de la matrice extracellulaire et à ceux exprimés à la surface de diverses cellules incluant les cellules endothéliales, les monocytes/macrophages, et les CMLs (Tabas et coll., 1995; Shimada et coll., 1981; Edwards et coll., 1995; Sivaram et coll., 1992; O'Brien et coll., 1994). L'augmentation de la concentration des protéoglycans à la surface cellulaire au cours de la différenciation des monocytes en macrophages (Edwards et coll., 1995) explique la capacité accrue des MDMs, comparativement à celle démontrée par les monocytes, à lier la LPL.

Alors que la LPL semble, en favorisant l'élimination de lipoprotéines plasmatiques, avoir un rôle anti-athérogénique, de nombreuses évidences suggèrent que l'enzyme exerce un effet pro-athérogénique au niveau de la paroi artérielle. La LPL est impliquée dans la rétention des lipoprotéines dans la paroi vasculaire (Williams et coll., 1995; Saxena, 1993) ainsi que dans leur captation par les macrophages (Hendricks et coll., 1996) et les CMLS (Stein et coll., 1993;

Eisenberg, 1992). Renier et coll. (1993) ont observé qu'une production élevée de LPL macrophagique dans le modèle murin est associée à une susceptibilité accrue à l'athérosclérose. Ces auteurs ont aussi montré que la LPL induit l'expression et la production de $\text{TNF}\alpha$ par les macrophages murins en induisant l'activation de la PKC (Renier et coll., 1994a, 1994b). Le $\text{TNF}\alpha$ favorisant le développement de l'athérosclérose, ces auteurs ont suggéré que l'effet inducteur de la LPL sur la production de $\text{TNF}\alpha$ puisse représenter un nouveau mécanisme par lequel l'enzyme contribue au développement de cette maladie.

La migration et la prolifération des CMLs vasculaires sont des caractéristiques essentielles de l'athérogenèse. Il a été démontré que la PKC médie la prolifération des CMLs en réponse à plusieurs stimuli (Lee et Severson, 1994; Haller et coll., 1995). L'observation selon laquelle la LPL induit l'activation de la PKC dans les macrophages murins (Renier et coll., 1994b) suggère qu'elle puisse exercer le même effet dans les CMLs.

Le but de notre projet de recherche est d'examiner le rôle proathérogénique de la LPL au niveau vasculaire.

Les hypothèses de notre travail sont que:

- 1) La LPL augmente l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales en se liant aux HSPGs exprimés à la surface de ces cellules;
- 2) La LPL est une molécule de signalisation capable de réguler l'expression génique des monocytes et des MDMs humains;

3) La LPL stimule directement ou indirectement la prolifération des CMLs en activant la PKC ou en augmentant la sécrétion par les MDMs des facteurs mitogéniques pour les CMLs.

Les objectifs spécifiques de notre travail sont:

- 1) de caractériser le rôle de la LPL dans l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales en examinant la capacité de la LPL liée aux cellules endothéliales de promouvoir l'adhésion des monocytes humains à l'endothélium;
- 2) d'étudier l'effet direct de la LPL sur l'activation des monocytes et des MDMs humains en mesurant l'expression et la production de $TNF\alpha$ par les monocytes humains fraîchement isolés et les MDMs traités par la LPL;
- 3) d'examiner le rôle de la LPL dans la prolifération des CMLs en mesurant l'effet direct et indirect, c'est-à-dire médié par la relâche de cytokines macrophagiques, de la LPL sur la prolifération des CMLs.

II. RÉSULTATS

II. 1. Premier article

J Lipid Res. 1997;38:1722-1729.

LIPOPROTEIN LIPASE ENHANCES HUMAN MONOCYTE ADHESION TO AORTIC
ENDOTHELIAL CELLS.

Jean-Claude Mamputu, Anne-Cécile Desfaits, and Geneviève Renier.

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

Short title: Lipoprotein lipase increases monocyte adhesion to endothelium.

Key words: Lipoprotein lipase - Monocyte adhesion - Endothelium - Atherosclerosis

Abbreviations: LPL, lipoprotein lipase; BAEC, bovine aortic endothelial cells; BSA, bovine serum albumin; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; VLDL, very low density lipoproteins; HSPG, heparan sulfate proteoglycans; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; DMEM, Dulbecco's minimal essential medium; FCS, fetal calf serum; LPS, lipopolysaccharide; HBSS, Hanks' balanced salt solution; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphated buffered salt solution; MPO, myeloperoxidase.

ABSTRACT

LPL-mediated lipolysis of VLDL has been demonstrated to increase U937 monocyte adhesion to endothelial cells. In the present study, we evaluated the ability of LPL to enhance human monocyte adhesion to bovine aortic endothelial cells (BAEC) in the absence of exogenous lipoproteins. Exposure of BAEC to 1 $\mu\text{g/ml}$ LPL at 37°C resulted in a significant increase in monocyte adhesion over control values. Addition of VLDL in the culture media further enhanced the LPL effect. A significant increase in monocyte adhesion was also observed when BAEC were incubated with LPL at 4°C. Heparin or heparinase treatment of BAEC totally abolished the LPL stimulatory effect on monocyte adhesion. In addition, incubation of monocytes with heparinase suppressed the ability of LPL to stimulate monocyte adhesion to endothelial cells. These treatments also markedly decreased LPL binding to the monocyte and endothelial cell surfaces. In contrast to native LPL, heat inactivated or phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)-treated LPL did not increase monocyte adhesion to BAEC. Finally, incubation of LPL in the presence of the 5D2 antibody resulted in a total suppression of the LPL-induced monocyte adhesion to BAEC. Taken together, these data demonstrate that LPL activity plays an important role in LPL-induced monocyte adhesion and that LPL binding to heparan sulfate proteoglycans expressed on both monocytes and endothelial cells surfaces is required for the enhanced monocyte adhesion. These results suggest a new mechanism by which LPL may promote the development of atherosclerosis, that of facilitating monocyte adhesion to the endothelium.

INTRODUCTION

Lipoprotein lipase (LPL) is the key enzyme responsible for the hydrolysis of triglycerides present in chylomicrons and VLDL. It is normally synthesized by adipose cells, smooth muscle cells and macrophages (1). After intracellular processing, LPL is transferred to binding sites at the luminal surface of vascular endothelium where it is bound to heparan sulfate proteoglycans (HSPG) (2). Depending on its location, LPL has been suggested to have a dual role in regard to atherogenesis (3). While by facilitating the hepatic uptake of atherogenic lipoproteins, LPL seems to exert some important anti-atherogenic properties, it may act in the arterial wall as an atherogenic protein. Indeed, it has been shown that LPL, by stimulating the cellular binding and uptake of atherogenic lipoproteins by different vascular cell types, including smooth muscle cells and macrophages, contributes to lipid accumulation within these cells (4, 5). In addition, besides its effect on arterial lipid metabolism, LPL also acts as an activator of macrophage function, inducing tumor necrosis factor alpha (TNF α) and nitric oxide production (6, 7).

Monocyte-endothelial cell interactions play a crucial role in the pathogenesis of atherosclerosis. Enhanced adhesion of monocytes to aortic endothelium is believed to represent one of the earliest events in atherogenesis (8). It has been demonstrated that lipolysis of VLDL by LPL at the endothelial cell surface markedly enhances monocyte adhesion to endothelium (9). Since LPL binds to HSPG expressed on both monocytes (10) and endothelial cells, we examined in the present study the possibility that these LPL heparin binding properties may facilitate monocyte-endothelial cell interactions. Our results which demonstrate that LPL binding to heparin-sensitive sites on these cells surfaces enhances human monocyte adhesion to endothelial cells suggest a new mechanism by which LPL may promote atherogenesis.

MATERIALS AND METHODS

REAGENTS

Dulbecco's minimal essential medium (DMEM), and L-glutamine were purchased from ICN Biomedicals Inc. (Costa Mesa, CA). Fetal calf serum (FCS) was obtained from Hyclone Laboratories Inc. (Logan, UT). Penicillin-streptomycin was purchased from Flow (Mc Lean, VA). Bovine serum albumin (BSA) fatty acid poor, endotoxin-free, fraction V, was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). Bovine LPL, heparin, heparinase III, human VLDL, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and lipopolysaccharide (LPS) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). LPL was dialysed against saline before use. Hanks' balanced salt solution (HBSS), polymyxin B sulfate and RPMI-1640 medium were purchased from Gibco (Grand Island, NY). The monoclonal antibody 5D2, generated against bovine LPL was kindly provided by Dr. JD Brunzell (University of Washington, Seattle, WA).

ENDOTHELIAL CELL CULTURES

Bovine aortic endothelial cells (BAEC) (19th passage) were grown to confluence in DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (DMEM-FCS) at 37°C in 5% CO₂/95% air atmosphere for 6 days. The cells were then trypsinized and subcultured in 96 -well culture plates (Costar) for 48 hours, at which time cell confluence was reached. In all experiments, cells were used between the 20th and the 24th passage.

ISOLATION OF HUMAN MONOCYTES

Human monocytes were isolated from 100 ml anticoagulated (heparin sodium) whole blood collected from non smoker healthy donors. First, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were

obtained by density centrifugation using Ficoll (Nycomed Pharma As, Oslo, Norway). The cells collected from the interface were washed three times with HBSS, and allowed to aggregate in the presence of FCS. After further purification by rosetting technique and density centrifugation, recovery of highly purified monocytes (85-90 %), as assessed by FCAS analysis, was obtained. Human monocytes were resuspended in FCS-free RPMI medium supplemented with penicillin-streptomycin.

ADHESION ASSAY

On the day of the assay, BAEC culture medium was gently removed and the cells were washed twice with 200 μ l of fresh FCS-free DMEM. The medium was then changed to DMEM containing 3 % BSA and 100 ng/ml polymyxin B sulfate. Native or denaturated LPL (1 μ g/ml) was allowed to bind to BAEC for 1 h at 37°C. In some experiments, BAEC were incubated with heparin (50 U/ml) for 5 minutes at room temperature to remove LPL bound to their surface. In other experiments, BAEC were incubated with medium containing 2.5 U/ml heparinase for 1 h prior to LPL binding assay. Finally, in the experiments where the effect of the anti-LPL antibody was studied, LPL was incubated in the presence of the 5D2 anti-LPL antibody (10 μ g/ml) before being allowed to bind to BAEC. At the end of the incubation period, the cells were washed twice with 200 μ l of phosphated buffered saline (PBS) to remove unbound LPL. Two hundred thirty thousand highly purified human monocytes were then added to the wells and allowed to adhere to BAEC for 2 h. Non-adherent monocytes were removed by washing the cells with warm PBS (pH 6.0). Monocyte adhesion to BAEC was quantitated by measuring monocyte myeloperoxidase (MPO) activity as previously described by Wang et al (11)

LPL BINDING TO ENDOTHELIAL CELLS AND MONOCYTES.

LPL binding to endothelial cells and monocytes was determined by incubating LPL in presence of these cells for 1h at 37°C. At the end of the incubation period, the medium was removed and the cells were washed twice with HBSS. Bound LPL was released by adding 50 U/ml of heparin in PBS for 5 min. LPL activity in the media and in the heparin-released fractions were determined using the kit "Confluolip" from Progen (Heidelberg, Germany). Binding of PMSF-treated LPL to endothelial cells was determined by Western blotting using the 5D2 anti-LPL antibody as previously described (12).

DETERMINATION OF CELL VIABILITY AND TOTAL PROTEIN CONTENT

Cell viability following heparinase treatment was estimated using trypan blue exclusion and was consistently found to be higher than 95%. After extensive dialysis against saline, total protein content of the purified LPL preparation was measured according to the method of Bradford (13) using a colorimetric assay (Biorad, Mississauga, ONT), and BSA as standard.

DETERMINATION OF ENDOTOXIN CONTENT

Endotoxin content of the LPL preparation (1 µg/ml), was determined by the Limulus amoebocyte lysate assay (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and was consistently found to be lower than 6 pg/ml.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis of the results was performed using the unpaired Student's t test. Results are expressed as mean values ± SEM.

RESULTS

Effect of LPL on monocyte adhesion to endothelial cells.

Confluent endothelial cell monolayers were incubated with LPL (1 $\mu\text{g/ml}$) for 1 h at 37°C prior to the addition of freshly isolated human monocytes. Treatment of endothelial cells with LPL led to a marked increase (163 % over control values, $P < 0.001$) in human monocyte adhesion (Fig. 1, panel a). A 2.4 fold increase in monocyte adhesion to endothelial cells was also observed after exposure of the cells to 10 ng/ml LPS, used in these experiments as positive control (Fig. 1, panel a). A similar stimulatory effect of LPL on monocyte adhesion was also observed when incubation of BAEC with LPL was performed at 4°C (156% over control values, $P < 0.02$) (Fig.1, panel b).

To address the possibility that, under our experimental conditions, an LPL-generated hydrolytic product could be responsible for the stimulatory effect of LPL on monocyte adhesion, we next measured monocyte adhesion to endothelial cells bound with LPL in the presence or absence of VLDL. As shown in Fig. 2, addition of VLDL to the culture media led to a further and significant increase in LPL-induced monocyte adhesion (monocyte adhesion (% over control values): LPL:140 \pm 4%; LPL+VLDL:185 \pm 2%, $P < 0.05$).

Effect of heparin treatment of endothelial cells on LPL-induced monocyte adhesion.

To determine whether LPL binding to the endothelial cell surface is required for the stimulatory effect of LPL on monocyte adhesion, LPL-treated endothelial cells were incubated in the presence of heparin to remove endothelial cell surface associated LPL and LPL activity was measured in the heparin-released fractions. Under these experimental conditions, incubation with heparin resulted in the release of 70% of bound LPL activity (data not shown) and a complete

abrogation of the stimulatory effect of LPL on monocyte adhesion was observed (Fig. 3). Heparin treatment did not affect LPS-stimulated monocyte adhesion (LPS-stimulated monocyte adhesion (% over control values): control: $180\pm 8\%$; heparin: $161\pm 5\%$). These data demonstrate that LPL binding to heparin-sensitive sites on the endothelial cells is required for its stimulatory effect on monocyte adhesion.

Effect of heparinase treatment of endothelial cells and monocytes on LPL-induced monocyte adhesion.

To investigate whether removal of HSPG expressed on endothelial cells may affect LPL-induced monocyte adhesion, endothelial cells were pretreated with heparinase (2.5 U/ml) for 1 h at 37°C before the addition of LPL (1 $\mu\text{g/ml}$). Pretreatment of endothelial cells with heparinase resulted in a 4-fold increase of LPL in the medium (data not shown) and totally abolished the LPL-induced increase in monocyte adhesion (Fig. 4). In contrast, no effect of heparinase treatment on LPS-stimulated monocyte adhesion was observed (LPS-stimulated monocyte adhesion (% over control values): control: $180\pm 8\%$; heparinase: $168\pm 5\%$).

To document the role of HSPG expressed on monocytes in LPL-induced monocyte adhesion to endothelial cells, human monocytes were pretreated with heparinase (0.01 U/ml) for 30 minutes at 37°C before being allowed to bind BAEC. Treatment of monocytes with heparinase led to a marked reduction of LPL binding to these cells (data not shown) and totally suppressed the ability of LPL to enhance monocyte adhesion to endothelial cells (Fig. 5). Taken together, these observations indicate that both endothelial and monocyte cell-surface proteoglycans are obligatory participants in the stimulatory effect of LPL on monocyte adhesion.

Effect of denaturated LPL on monocyte adhesion.

To assess whether the structural characteristics of LPL are involved in LPL-induced monocyte adhesion to endothelial cells, the effect of denaturated LPL on monocyte adhesion was next evaluated. Heat-inactivated LPL was obtained by boiling the enzyme for 30 minutes. Treatment of BAEC with boiled LPL did not result in any enhancement of human monocyte adhesion to endothelium (Fig. 6), suggesting that the ability of LPL to stimulate monocyte adhesion is closely linked to the integrity of its native conformation.

To evaluate whether loss of LPL activity also affects the ability of LPL to stimulate monocyte adhesion, irreversible inhibition of the enzyme was obtained by incubating LPL (1 $\mu\text{g/ml}$) in presence of 1mM PMSF. We found that PMSF-treated LPL was totally ineffective to increase monocyte adhesion to endothelium (Fig.6). A 90% decrease in LPL binding capacity to endothelial cells, as assessed by western blotting and LPL mass determination, was also observed after PMSF treatment of the enzyme (data not shown).

Effect of the anti-LPL monoclonal antibody 5D2 on LPL-induced monocyte adhesion.

To assess the specificity of the effect of LPL on monocyte adhesion and to further document the structural characteristics of LPL which may account for the stimulatory effect of this enzyme on monocyte adhesion, additional experiments were performed in the presence of the monoclonal antibody 5D2 which recognizes an epitope located in the C-terminal domain of LPL. Pretreatment of LPL with 10 $\mu\text{g/ml}$ of this anti-LPL antibody totally suppressed LPL-induced monocyte adhesion to endothelial cells (Fig. 7), although it did not affect the LPS-induced monocyte adhesion (LPS-stimulated monocyte adhesion (% over control values): control: $180\pm 8\%$; anti-LPL: $172\pm 5\%$).

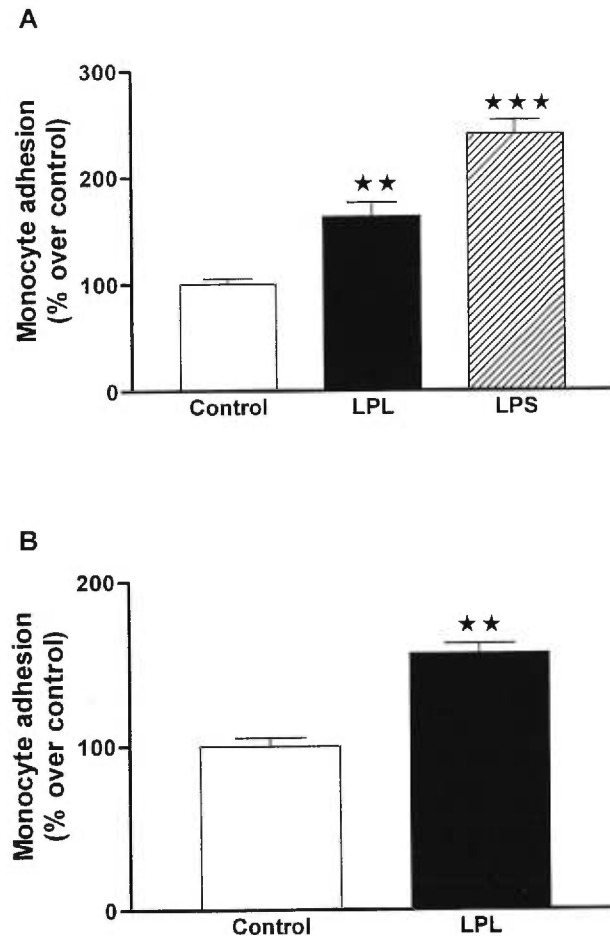


Figure 1. Effect of native LPL on human monocyte adhesion to endothelial cells.

Confluent monolayers of BAEC were bound with LPL (1 $\mu\text{g/ml}$) for 1 hour at 37°C (panel a) or at 4°C (panel b). At the end of the incubation period, cells were washed and monocytes were added to BAEC to determine adhesion. In some experiments, BAEC were incubated in the presence of LPS (10 ng/ml), used as positive control. Data are expressed as percentage of adherent control monocytes and represent the mean \pm SEM of 7 (panel a) and 3 (panel b) independent experiments. **, $P < 0.02$ vs control; ***, $P < 0.001$ vs control.

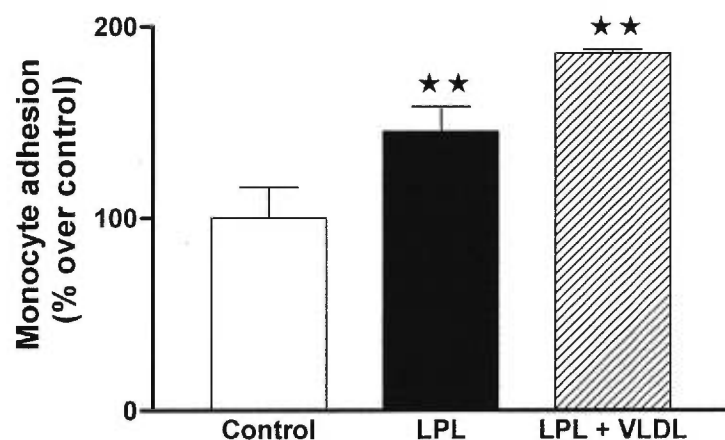


Figure 2. Effect of VLDL on LPL-induced human monocyte adhesion to endothelial cells.

Confluent monolayers of BAEC were bound with LPL (1 $\mu\text{g/ml}$) and further incubated in the presence or absence of VLDL (20 μg protein/ml) at 37°C for 24h. At the end of the incubation period, cells were washed and monocytes were added to BAEC to determine adhesion. Data are expressed as percentage of adherent control monocytes and represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments. *, $P < 0.05$ vs LPL alone; ***, $P < 0.001$ vs control.

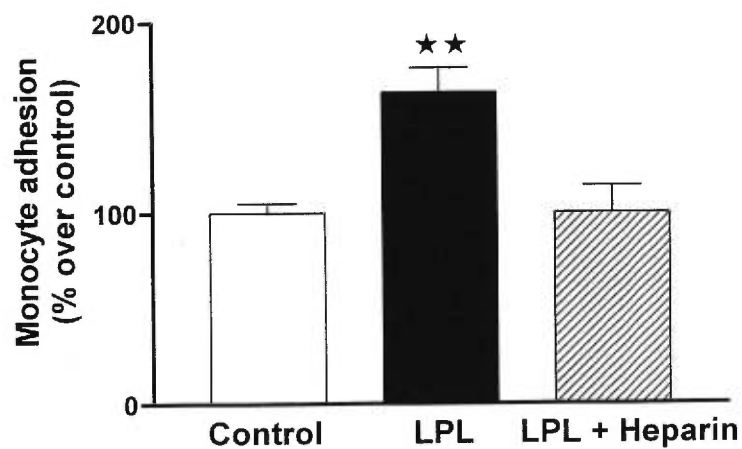


Figure 3. Inhibition of LPL-induced human monocyte adhesion to BAEC by heparin.

Confluent monolayers of BAEC were bound with LPL (1 $\mu\text{g/ml}$) for 1 hour at 37°C. At the end of the incubation period, heparin (50 U/ml) was added to the wells for 5 minutes. Cells were then washed and incubated in the presence of human monocytes to determine adhesion. Data are expressed as percentage of adherent control monocytes and represent the mean \pm SEM of 7 independent experiments. ***, $P < 0.001$ vs control.

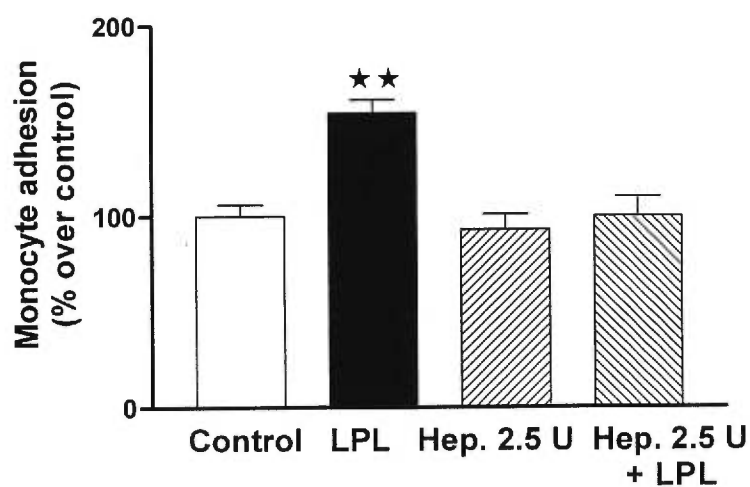


Figure 4. Effect of heparinase treatment of endothelial on monocyte adhesion. Confluent monolayers of endothelial cells were treated with heparinase (2.5 U/ml) for 1 hour at 37°C and after extensive washing were incubated for 1 hour with LPL. At the end of the incubation period, cells were washed and monocytes were added to BAEC to determine adhesion. Data are expressed as percentage of adherent control monocytes and represent the mean \pm SEM of 5 independent experiments. **, $P < 0.02$ vs control.

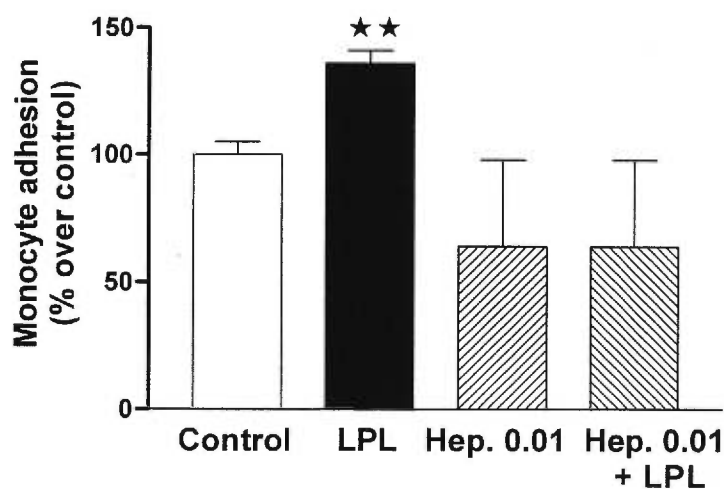


Figure 5. Effect of heparinase treatment of human monocytes on their adhesion to LPL-treated endothelial cells. Freshly isolated monocytes were incubated with heparinase (0.01 U/ml) for 30 minutes at 37°C. At the end of the incubation period, monocytes were washed and added to LPL-treated endothelial cells for 1 hour at 37°C to determine adhesion. Data are expressed as percentage of adherent control monocytes and represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments. **, $P < 0.02$ vs control.

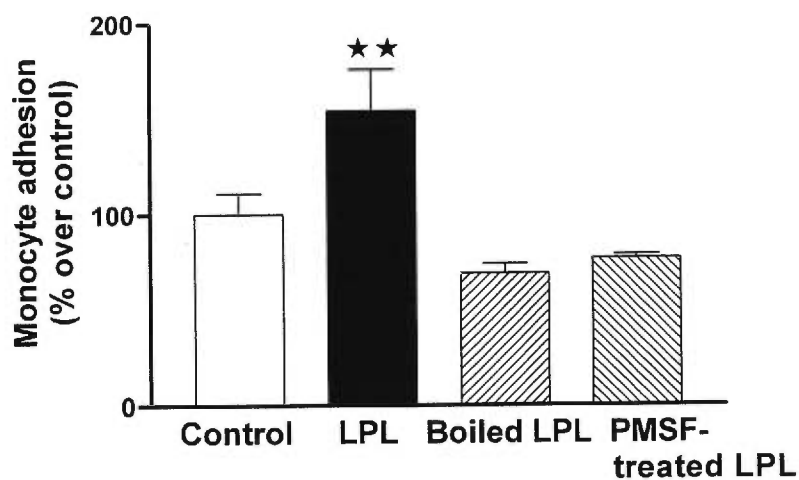


Figure 6. Effect of denaturation of LPL on monocyte adhesion. Boiled and PMSF (1mM) -treated LPL (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were bound to confluent monolayers of BAEC for 1 hour at 37°C. At the end of the incubation period, cells were washed and monocytes were added to BAEC to determine adhesion. Data are expressed as percent of adherent control monocytes and represent the mean \pm SEM of 5 independent experiments. **, $P < 0.02$ vs control.

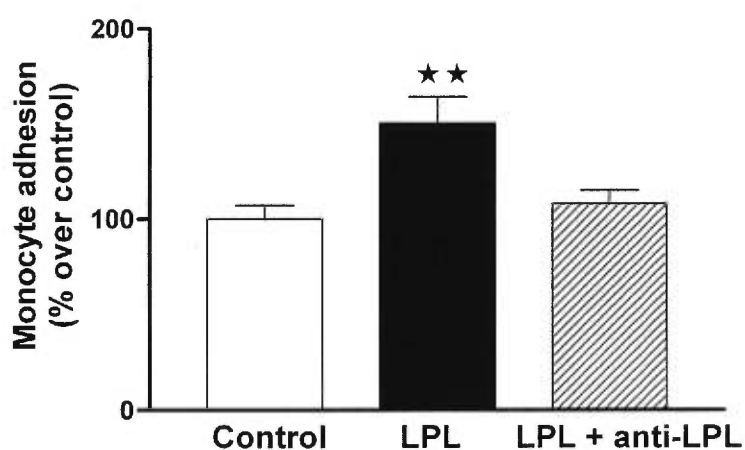


Figure 7. Effect of anti-LPL antibody on LPL-induced human monocyte adhesion to endothelial cells. LPL (1 $\mu\text{g/ml}$) was incubated in the presence of the 5D2 anti-LPL monoclonal antibody (10 $\mu\text{g/ml}$) prior being added to BAEC. After a one hour incubation period at 37°C, cells were washed and monocytes were added to BAEC to determine adhesion. Data are expressed as percentage of adherent control monocytes and represent the mean \pm SEM of 5 independent experiments.

** , $P < 0.02$ vs control.

DISCUSSION

It has been previously shown that LPL-mediated lipolysis of VLDL at the endothelial cell surface increases the adhesion of U937 monocytes to aortic endothelial cells (9). This effect has been proposed to be due to the hydrolytic activity of the enzyme and to correlate with the generation of LPL-derived lipolytic products (9). The present study demonstrates that incubation of aortic endothelial cells with LPL, in the absence of any added exogenous lipoproteins, also leads to enhanced human monocyte adhesion to endothelium. Results generated in this work point to the conclusion that the activity of the lipase plays an important role in the LPL-induced monocyte adhesion even in the absence of exogenous substrate, and more so in its presence. Indeed, we found that inhibitors of the enzymatic activity of LPL block the induced monocyte adhesion to endothelial cells and that addition of exogenous lipoproteins to the incubation medium further enhances the LPL stimulatory effect.

Previous studies have shown that heparin treatment decreases LPL binding to the endothelial cell surface (14). Degradation of endothelial cell surface HSPG with heparinase has also been found to reduce LPL binding to these cells (15). Evidence that the stimulatory effect of LPL on monocyte adhesion requires LPL interaction with HSPG expressed on endothelial cells is 3-fold. First, we found that LPL detachment from the endothelium by heparin completely abolishes the ability of LPL to enhance monocyte adhesion. Second, we demonstrated that heparinase-induced degradation of endothelial cell surface HSPG suppresses the LPL-induced monocyte adhesion. Third, we observed that LPL inactivation, which is known to reduce LPL binding to HSPG (16), results in a total abrogation of the enhancing effect of LPL on monocyte adhesion. LPL binding to HSPG expressed on the monocyte cell surface has been previously reported by Edwards et al (10). Our data which

demonstrate that heparinase treatment of monocytes also prevents LPL-induced monocyte adhesion clearly indicate that LPL binding to HSPG expressed on these cells is involved in the LPL effect on monocyte adhesion.

The monoclonal anti-LPL antibody 5D2 has been used for analysis of structure-function relationships of LPL (12, 17). Its epitope on LPL has been mapped in the C-terminal domain, particularly within residues 396-405, Ala 400 having been shown to be the critical amino acid residue conferring epitope specificity (18). The C-terminal domain of LPL has been suggested to contain both a lipid and a heparin/heparan sulfate-binding regions (17, 19). While the role of the lipid-binding region in the initial interaction and binding specificity of LPL with lipoprotein particles has been demonstrated in some investigations (20, 21), the role of the C-terminal domain in the binding of LPL to HSPG is still controversial (22, 23). Our results demonstrate unequivocally that the anti-LPL antibody 5D2 abolishes LPL-induced monocyte adhesion to endothelial cells. One possible explanation for this effect is that this antibody, by inhibiting LPL activity, may have blocked LPL binding to cell-surface proteoglycans in these experiments. This hypothesis is supported by the finding of Chappell et al (24) who found that another monoclonal antibody against LPL (MAB-7) totally prevents LPL-induced catabolism of lipoproteins and who proposed, on the basis of this observation, that anti-LPL antibodies could block LPL binding to cell-surface proteoglycans. However, arguing against this possibility, is the recent observation of Wong et al who reported that the 5D2 antibody-reacted LPL and the native LPL do not differ in their heparin affinity, and who therefore suggested that the epitope of the 5D2 antibody is distinct from the heparin-binding region of the molecule (17). From these results, it clearly appears that further studies are needed to elucidate the mechanism(s) that are involved in the suppressive effect of the 5D2 antibody on LPL-

stimulated monocyte binding. Direct evidences that the 5D2 antibody-treated LPL binds as effectively to HSPG as native LPL would be in this regard of particular interest.

The results presented here indicate that LPL enhances human monocyte adhesion to endothelial cells both in the presence and absence of exogenous lipoproteins. These observations indicate that LPL-mediated lipolysis of lipoproteins may not represent the sole mechanism responsible for the stimulatory effect of LPL on monocyte adhesion to endothelium. Although very difficult to prove, one may suggest that LPL may exert its effect by hydrolysing another substrate. Another possibility is that LPL may act as a protein bridge between monocytes and endothelial cells. Supporting this hypothesis are our data demonstrating that LPL also enhances monocyte adhesion even when bound at 4°C at the endothelial cell surface. Heparinase, by preventing LPL binding to HSPG expressed on these cell surfaces, may avoid the formation of such a bridge.

A crucial question that emerges from the present study is whether LPL-induced monocyte adhesion is of physiological importance. The physiological level of LPL in postheparin plasma approximates 200ng/ml in normal subjects (25). Considering that, in our system, approximately ten percent of added exogenous LPL binds *in vitro* to endothelial cells, the effective LPL concentration that stimulates monocyte adhesion may be evaluated to 100 ng/ml, i.e. within the physiological range of LPL levels. It is thus possible that under physiological conditions the endothelial cell surface associated LPL may facilitate the interaction of monocytes with the endothelium. We believe, however, that our observation may be most particularly relevant to some pathological situations, such as atherosclerosis, where lesion macrophages produce substantial amounts of LPL and where monocytes are attracted in large numbers towards the subendothelial matrix. Under this condition, macrophage LPL production in the arterial wall may represent a major source of LPL for the endothelial cells which do not synthesize this enzyme. The resulting enhanced

LPL expression on the endothelial cell surface, by facilitating monocyte binding to endothelium, may contribute to the progression of the atherogenic process.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr J.D. Brunzell (University of Washington, Seattle) for providing the 5D2 monoclonal anti-LPL antibody. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada and from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

REFERENCES

1. O'Brien KD, Gordon D, Deeb S, Ferguson M, Chait A. Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1992;89:1544-1550.
2. Saxena U, Klein MG, Goldberg IJ. Identification and characterization of the endothelial cell surface lipoprotein lipase receptor. *J Biol Chem.* 1991;266:17516-17521.
3. Williams KJ, Fless GM, Petrie KA, Snyder ML, Brocia RW, Swenson TL. Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein(a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. Roles for low density lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem.* 1992;267:13284-13292.
4. Rumsey SC, Obunike JC, Arad Y, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase-mediated uptake and degradation of low density lipoproteins by fibroblasts and macrophages. *J Clin Invest.* 1992;90:1504-1512.
5. Kraemer FB. Role of lipoprotein lipase and apolipoprotein lipase E secretion by macrophages in modulating lipoprotein uptake. Possible role in acceleration of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes* 1992;41:77-80.
6. Renier G, Skamene E, DeSanctis JB, Radziock D. Induction of tumor necrosis factor α gene expression by lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* 1994;35:271-278.
7. Renier G, Lambert A. Lipoprotein lipase synergizes with interferon gamma to induce macrophage nitric oxide synthetase mRNA expression and nitric oxide production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:392-399.

8. Fagged A, Robs R, Hacker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. 1. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 1984;4:323-340.
9. Saxena U, Kulkarni NM, Ferguson E, Newton RS. Lipoprotein lipase-mediated lipolysis of very low density lipoproteins increases monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;189:1653-1658.
10. Edwards IJ, Xu H, Obunike JC, Golberg IJ, Wagner WD. Differentiated macrophages synthesize a heparan sulfate proteoglycan and oversulfate chondroitin sulfate proteoglycan that bind lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:400-409.
11. Wang J, Beekhuizen H, van Furth R. Surface molecules involved in the adherence of recombinant interferon-gamma (rIFN-gamma)-stimulated human monocytes to vascular endothelium cells. *Clin Exp Immunol.* 1994;95:263-269.
12. Peterson J, Fujimoto WY, Brunzell JD. Human lipoprotein lipase: relationships of activity, heparin affinity, and conformation as studied with monoclonal antibodies. *J Lipid Res.* 1992;33:1165-1170.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
14. Sivaram P, Klein MG, Goldberg IJ. Identification of a heparin-releasable lipoprotein lipase binding protein from endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992;267:16517-16522.

15. Shimada K, Gill PJ, Silbert JE, Douglas WHJ, Fanburg BL. Involvement of cell surface heparin sulfate in the binding of lipoprotein lipase to cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest.* 1981;68:995-1002.
16. Saxena U, Klein MG, Goldberg IJ. Transport of lipoprotein lipase across endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:2254-2258.
17. Wong H, Davis RC, Thuren T, Goers JW, Nikazy J, Waite M, Schotz MC. Lipoprotein lipase domain function. *J Biol Chem.* 1994;269:10319-10323.
18. Liu MS, Ma Y, Hayden MR, Brunzell JD. Mapping of the epitope on lipoprotein lipase recognized by a monoclonal antibody (5D2) which inhibits lipase activity. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1128:113-115.
19. Davis RC, Wong H, Nikazy J, Wang K, Han Q, Schotz MC. Chimeras of hepatic lipase and lipoprotein lipase. Domain localization of enzyme-specific properties. *J Biol Chem.* 1992;267:21499-21504.
20. Kobayashi J, Nishida T, Ameis D, Stahnke G, Schotz MC. A heterozygous mutation (The codon for Ser 447---a stop codon) in lipoprotein lipase contributes to a defect in lipid interface recognition in case with type I hyperlipidemia. *Biochem Biophys Commun.* 1992;182:70-77.
21. Wong H, Davis RC, Nikazy J, Seebart KE, Schotz MC. Domain exchange: Characterization of a chimeric lipase and lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:11290-11294.
22. Santamarina-Fojo S, Dugi KA. Structure, function and role of lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 1994;5:117-125.

23. May Y, Henderson HE, Liu MS et al. Mutagenesis in four candidate heparin binding regions and identification of residues affecting heparin binding of human lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* 1994;35:2049-2059.
24. Chappell DA, Glenna LF, Waknitz MA, Muhonen LE, Pladet MW, Iverius PH, Strickland DK. Lipoprotein lipase induces catabolism of normal triglyceride-rich lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor in vitro. A process facilitated by cell-surface proteoglycans. *J Biol Chem.* 1993;268:14168-14175.
25. Babirak SP, Iverius P-H, Fujimoto WY, Brunzell JD. Detection and characterization of the heterozygote lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 1989;9:326-334.

II.2. Deuxième article

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19:1405-1411.

DIFFERENTIATION OF HUMAN MONOCYTES TO MONOCYTE-DERIVED
MACROPHAGES IS ASSOCIATED WITH INCREASED LIPOPROTEIN LIPASE-INDUCED
TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA EXPRESSION AND PRODUCTION.
A PROCESS INVOLVING CELL SURFACE PROTEOGLYCAN AND PROTEIN KINASE C.

Jean-Claude Mamputu, Geneviève Renier.

CHUM Research Center, Notre-Dame Campus, Department of Nutrition, University of Montreal,
Montreal, Quebec, Canada.

Short title: TNF α mRNA expression in in human mononuclear cells.

Reprint requests to:

Dr. Geneviève Renier
CHUM Research Center, Notre-Dame Campus
J.A. de Seve Pavilion, 3rd floor, door Y3622
1560 Sherbrooke Street East
Montreal, Quebec, H2L 4M1
Phone: (514) 281-6000, extension 6895
FAX: (514) 896-4701
E-MAIL: renierg@ere.umontreal.ca

ABSTRACT

The aim of the present study was to (1) evaluate the responsiveness of human mononuclear cells to lipoprotein lipase (LPL), as assessed by tumor necrosis factor α (TNF α) production, during the process of differentiation of monocytes to macrophages, and (2) determine the mechanisms by which LPL exerts its effect on these cells. Treatment of human monocytes with purified endotoxin-free bovine LPL (1 μ g/mL) resulted in a 161 ± 15 % increase in TNF α production over control values ($P < 0.01$). A further increase in TNF α production was observed after treatment of monocyte-derived macrophages (MDMs) with LPL (490 ± 81 % over control values, $P < 0.01$). Increased TNF α mRNA expression and PKC activity were also observed in LPL-treated human monocytes and MDMs. These LPL effects were abrogated by the specific protein kinase C inhibitor calphostin C (1 μ mol/L). Although heparinase totally abolished LPL-induced TNF α production in human monocytes, this agent did not significantly inhibit LPL effect in human MDMs. In contrast, treatment of MDMs with chondroitinase suppressed LPL-induced TNF α production. Taken together, these data suggest that (1) differentiation of human monocytes to MDMs is associated with increased LPL-induced TNF α mRNA expression and production, (2) a PKC-dependent pathway is involved in the induction of TNF α by LPL in these cells, and (3) LPL effect is mediated by cell surface proteoglycans. As MDMs secrete LPL in the vascular wall, we propose that LPL, by acting as an autocrine activator of MDM function, may contribute to the high level of TNF α found in the atheromatous lesion.

Key words: lipoprotein lipase ■ tumor necrosis factor-alpha ■ human mononuclear cells ■ proteoglycans ■ protein kinase C

Lipoprotein lipase (LPL) is a key enzyme in the catabolism of triglycerides -rich lipoproteins.¹ LPL exerts this effect at the vascular endothelium where it is bound to heparan sulfate proteoglycans (HSPGs).² LPL is synthesized within the atherosclerotic lesion by monocyte-derived macrophages (MDMs) and smooth muscle cells (SMCs).³ It has been suggested that LPL, depending on its location, has a dual role with regard to the atherogenic process.⁴ Although it may act as an anti-atherogenic protein at the periphery where it stimulates the hepatic uptake of atherogenic lipoproteins,⁴ LPL may exert some atherogenic functions in the arterial wall by favoring lipid accumulation within SMCs and MDMs.^{5,6} Besides its effect on arterial lipid metabolism, LPL has been shown to enhance human monocyte adhesion to aortic endothelial cells^{7,8} and to induce tumor necrosis factor-alpha (TNF α) and nitric oxide production by murine macrophages.^{9,10}

TNF α is a pleiotropic macrophage secretory product involved in the modulation of many immune and extrinsic functions.^{11,12} Accumulating evidences suggest that TNF α exerts potent proatherogenic effects. TNF α induces the expression of cell-adhesion molecules,^{13,14} and stimulates leukocyte adhesion to endothelial cells¹⁵ and chemotaxis.¹⁶ TNF α also stimulates new vessel formation¹⁷ and induces haemorrhagic necrosis,¹⁸ features characteristic of evolving atheroma. This cytokine also promotes tissue factor-like procoagulant activity and suppresses endothelial cell surface anticoagulant activity¹⁹ and is synthesized by MDMs and SMCs in human atheroma.²⁰

Migration of blood monocytes and differentiation of these cells to macrophages in the subendothelial space is a cardinal feature of atherosclerosis. Functional changes occurring during monocyte differentiation to lesion macrophages, including enhanced responsiveness to activating factors and increased production of cytokines²¹ could favor the development and progression of atherosclerosis. We have documented that LPL stimulates TNF α production by murine macrophages.⁹ In addition, others have reported that differentiated macrophages exhibit enhanced

ability to secrete and bind LPL.²² Based on these observations, the present study was conducted to investigate the responsiveness of human mononuclear cells to LPL, as assessed by TNF α production, during the process of differentiation of monocytes to macrophages, as this may be linked to the pathogenesis of human atherosclerosis.

METHODS

Reagents

RPMI-1640 medium, Hanks' balanced salt solution (HBSS), TriZOL reagent, polymyxin B sulfate, and protein kinase C (PKC) assay activity kit were purchased from Gibco BRL. FCS was obtained from Hyclone Laboratories Inc.. Heparinase III, chondroitinase ABC, 4 β -phorbol 12 β -myristate 13 α -acetate (PMA), and affinity-purified bovine LPL were obtained from Sigma Chemical Co. Before use, LPL was dialysed against saline, using 10,000 MWCO Slide-A-Lyzer dialysis cassettes purchased from Pierce. Penicillin-streptomycin was obtained from Flow. Calphostin C and 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methyl-piperazine hydrochloride (H7) were purchased from Calbiochem.

Determination of Endotoxin Concentration

LPL preparation was purified by using an endotoxin removal resin from Associates of Cape Cod. Endotoxin content of the medium and LPL preparation (1 μ g/ml) was determined by the Limulus amoebocyte lysate assay (Sigma) and was consistently found to be < 6 pg/ml. Treatment of human monocytes and MDMs from all blood donors with LPS 6 pg/ml did not induce any TNF α production or TNF α mRNA expression. Moreover, addition of an LPS inhibitor, polymyxin B

sulfate(100 µg/ml), to the culture medium did not inhibit LPL-induced TNF α production by human monocytes and MDMs.

Isolation of Human Monocytes

Human monocytes were isolated from 100 ml anticoagulated (heparin sodium) whole blood collected from nonsmoker healthy male and female donors as previously described.²³ First, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by density centrifugation using Ficoll (Nycomed Pharma As). The cells collected from the interface were washed three times with Hanks'balanced salt solution and allowed to aggregate in the presence of FCS. After further purification by rosetting technique and density centrifugation, recovery of highly purified monocytes (85-90 %), as assessed by fluorescence-activated cell sorter analysis, was obtained. Human monocytes were resuspended and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 1% (vol/vol) penicillin-streptomycin, 10% (vol/vol) autologous human serum (HS), and 100 µg/ml polymyxin B sulfate.

Culture of Human MDMs

Freshly isolated human monocytes were grown in 24-well culture plates (Falcon, Becton) in RPMI 1640 medium containing 1% (vol/vol) penicillin-streptomycin, 10% (vol/vol) HS, and 100 µg/ml polymyxin B sulfate. The cells were incubated at 37°C in 5% CO₂/95% air atmosphere. The medium was replaced every 3 days and the cells were used for experiments within 7-10 days of plating.

Determination of Cell Viability and Total Protein Content

Cell viability after treatment with PKC inhibitors was assessed by using trypan blue exclusion. Viability was found to be > 90%. After extensive dialysis against saline and purification, total protein content of the LPL preparation was measured according to the method of Bradford²⁴ using a colorimetric assay (Bio-Rad) and BSA as standard.

Measurement of TNF α Protein

A double-sandwich ELISA (R & D Systems) was used to determine the quantity of human TNF α secreted by monocytes and MDMs after 24 h exposure to LPL 1 μ g/ml alone or in combination with appropriate agents.

RNA Isolation and cDNA Preparation

Human monocytes and MDMs (1.5×10^6) were treated with appropriate agents in 24-well culture plates. The cells were lysed with TriZOL reagent, and cytoplasmic RNA was extracted from the cells by an improvement of the acid-phenol technique of Chomczynski and Sacchi,²⁵ precipitated and resuspended in diethyl pyrocarbonate water. cDNA was synthesized from RNA by incubating total cellular RNA with 0.1 μ g oligo(dT) (Pharmacia) for 5 min at 98°C. The mixture was then incubated for 60 min at 37°C and for 10 min at 99°C in reverse transcription mixture (Boehringer Mannheim).

Measurement of TNF α mRNA Expression

To compare the level of transcription of the TNF α gene in different samples, the levels of TNF α mRNA in untreated and LPL-treated monocytes and MDMs were assessed by PCR.

cDNA was amplified by using two synthetic primers specific for human TNF α (5'-CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG-3') (5'-CCTTGGTCTGGTAGGAGAGACG-3) in the PCR reaction mixture (Boehringer Mannheim). Two synthetic primers specific for the house keeping gene human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), (5'-CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG-3') (5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG-3'), were used to amplify cDNA. A 325-bp human TNF α cDNA fragment and a 456-bp human GAPDH cDNA fragment were amplified enzymatically in separate tubes by 30 repeated cycles at 98°C for 40 seconds, 60°C for 40 seconds, 72 °C for 90 seconds in a programmable thermal controller (PTC-100, MJ Research Inc.). The reaction product was visualized by electrophoresis on 1% agarose gel containing ethidium bromide. ϕ X-174 RFA DNA-HaeIII digest (Pharmacia) was run in parallel to generate size markers. The gel was then examined on a UV light box and analyzed for integrated absorbance with an image-analysis scanning system (Alpha Imager 2000, Packard Instrument Company).

Measurement of PKC Activity

A PKC assay kit (Gibco BRL) was used to measure PKC activity in cytosolic and particulate fractions of human monocytes and MDMs. In brief, adherent human monocytes and MDMs were recovered and homogenized (Dounce; 15 strokes) in 500 μ l of ice-cold buffer A (20 mmol/l Tris, pH 7.5, 0.5 mmol/l EDTA, 0.5 mmol/l EGTA, 25 μ g/ml aprotinin, and 25 μ g/ml leupeptin). The membrane and cytosolic fractions were separated by ultracentrifugation (100 000 g for 30 minutes at 4°C). After recovery of high-speed supernatants containing cytosolic PKC, the corresponding membrane pellets were homogenized in 500 μ L of buffer A containing 0.5 % Triton X-100. The enzyme from both fractions was partially purified through DE52 chromatography

columns. After removal of unbound proteins by washing the columns with buffer B (20 mmol/L Tris, pH 7.5, 0.5 mmol/L EDTA, and 0.5 mmol/L EGTA), fractions containing PKC were eluted with buffer C (20 mmol/L Tris, pH 7.5, 0.5 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L EGTA, 10 mmol/L β -mercaptoethanol, and 0.2 mol/L NaCl). Eluates were analyzed for PKC activity, following the optimum conditions of the assay, by measuring the incorporation of ^{32}P into the synthetic peptide Ac-MBP(4-14). The specificity of the assay was determined by subtracting the radioactivity obtained in the presence of the pseudosubstrate inhibitor PKC (19-36) from total radioactivity of the assay. Data are expressed as percentage considering the control as 100% activity.

Statistical Analyses

Data were analyzed by Student's t test for single comparisons and by Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons. Results are expressed as mean \pm SEM values.

RESULTS

Effect of LPL on TNF α production by Human monocytes and MDMs

Incubation of freshly isolated human monocytes with LPL (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h at 37°C resulted in a significant increase in TNF α production ($161 \pm 15\%$ over control values, $P < 0.01$) (Figure 1A). A further increase in TNF α production was observed following treatment of human MDMs with LPL ($490 \pm 81\%$ over control values, $P < 0.01$) (Figure 1B).

To determine whether LPL-induced lipolysis of lipoproteins is involved in the increase in TNF α production, human monocytes were also incubated, in some experiments, with LPL (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the absence of exogenous lipoproteins for 24 h at 37°C. Culture of these cells in serum-free medium led to a similar 2-fold increase in LPL-induced TNF α production (data not shown).

Effect of PKC Inhibitors on LPL-Induced TNF α Production by Human Monocytes and MDMs

To determine the intracellular signalling involved in LPL-induced TNF α production, human monocytes and MDMs were pretreated with PKC inhibitors for 1h before being exposed to LPL for an additional 24hour period. Exposure of monocytes and MDMs to the specific inhibitor calphostin C (1 μ mol/L) completely abolished LPL-induced TNF α production (Figure 1A and 1B). A similar inhibitory effect of the PKC inhibitor H7 (20 μ mol/L) on LPL-induced TNF α secretion by monocytes and MDMs was also observed (Figure 2A and 2B).

Effect of LPL on Human Monocyte and MDM TNF α mRNA Expression

To investigate the molecular mechanisms responsible for LPL-induced TNF α production by human monocytes and MDMs, the levels of TNF α mRNA in LPL-treated and untreated cells were assessed by PCR. LPL (1 μ g/mL) induced a significant 1.4 ± 0.1 -fold increase in TNF α mRNA expression over control values in human monocytes ($P < 0.05$) (Figure 3A). A further increase in TNF α mRNA expression (2.5 ± 0.2 -fold increase over control values, $P < 0.01$) was observed following treatment of human MDMs with LPL (Figure 3B). Pretreatment of both human monocytes and MDMs with calphostin C (1 μ mol/l) inhibited LPL-induced TNF α mRNA expression (Figure 3A and 3B).

Effect of LPL on Human Monocyte and MDM PKC Activation

Because LPL-induced TNF α expression appeared to require an active PKC, we next examined the direct effect of LPL on PKC activity. A maximal increase in PKC activity in the membrane fraction of human monocytes (1.3 ± 0.1 -fold increase over control values, $P < 0.05$) and MDMs (2.1 ± 0.4 -fold increase over control values, $P < 0.05$) was observed after a 10 minute

exposure of human mononuclear cells to LPL (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figure 4A and 4B). The increase in PKC activity in the membrane fractions of these cells was associated with a significant decrease in the PKC activity in the cytosol. Treatment of human monocytes and MDMs with calphostin C (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) totally suppressed LPL-induced membrane PKC activity (Figure 4A and 4B).

To further establish the involvement of PKC in LPL-stimulated $\text{TNF}\alpha$ production, we evaluated the effect of PKC depletion by PMA on the induction of $\text{TNF}\alpha$ production by LPL. Overnight treatment of human monocytes with 100 ng/mL of PMA dramatically reduced both membrane PKC activity (% over control values: medium: $100 \pm 2\%$; LPL: $130 \pm 7\%$; PMA: $91 \pm 4\%$; PMA + LPL: $85 \pm 3\%$) and $\text{TNF}\alpha$ secretion (% over control values: medium: $100 \pm 4\%$; LPL: $156 \pm 12\%$; PMA: $85 \pm 9\%$; PMA + LPL: $90 \pm 7\%$).

Effect of Heparinase and Chondroitinase on LPL-Induced $\text{TNF}\alpha$ Production by Human Monocytes and MDMs

To investigate the role of cell surface proteoglycans in the stimulatory effect of LPL on $\text{TNF}\alpha$ production by human monocytes and MDMs, these cells were pretreated or not for 1h at 37°C with heparinase (1 U/mL) or chondroitinase ABC (1 U/mL), washed three times with PBS, and then exposed to LPL (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24h at 37°C . Although heparinase treatment resulted in a complete abrogation of LPL-induced $\text{TNF}\alpha$ production by human monocytes (Figure 5A), it did not significantly reduce LPL-induced $\text{TNF}\alpha$ secretion by MDMs (Figure 5B). In contrast, treatment of MDMs with chondroitinase totally suppressed LPL-induced $\text{TNF}\alpha$ production (Figure 5C).

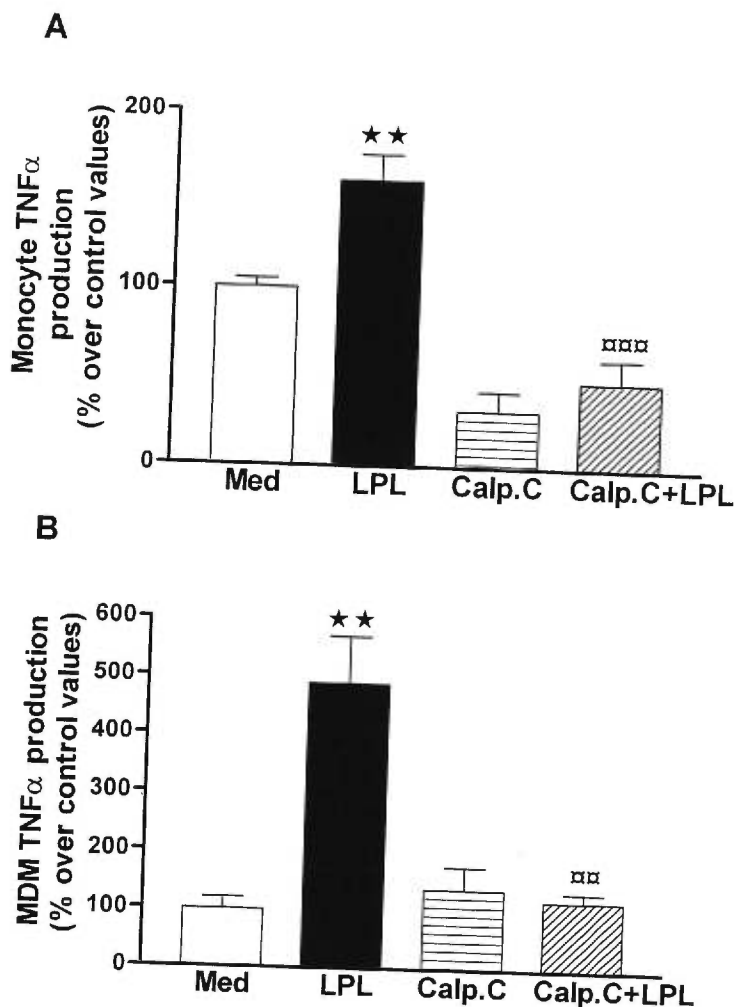


Figure 1. Effect of LPL on TNF α production by human monocytes and MDMs; Inhibitory effect of calphostin C. Freshly isolated human monocytes (A) or cultured MDMs (B) (1×10^6 cells/ml) were treated for 24 h at 37° C with or without LPL (1 μ g/ml) in the presence or absence of 1 μ mol/l calphostin C (Calp.C). At the end of the incubation period, the culture media were collected, centrifuged, and stored at -20° C. TNF α levels in the culture media were determined by ELISA. Values represent mean \pm SEM of 4 separate experiments. **, P < 0.01 vs medium (med); □□, P < 0.01 vs LPL; □□□ P < 0.001 vs LPL.

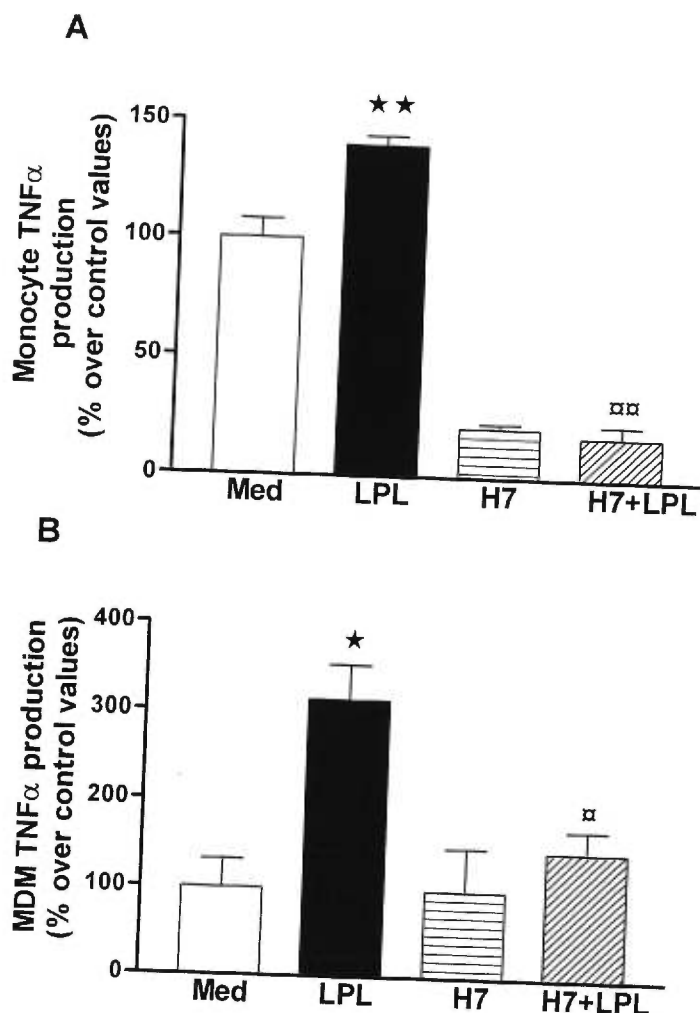


Figure 2. Effect of H7 on LPL-induced TNF α production by human monocytes and MDMs.

Freshly isolated human monocytes (A) or cultured MDMs (1×10^6 /ml) (B) were treated or not with H7 (20 μ mol/l) for 1 h at 37 $^\circ$ C. The cells were then incubated for 24 h in the presence or absence of LPL (1 μ g/ml) for 24 h. At the end of the incubation period, the culture media were collected, centrifuged, and stored at -20 $^\circ$ C. TNF α levels in the culture media were determined by ELISA. Values represent mean \pm SEM of 4 separate experiments. *, $P < 0.05$ vs medium (med); **, $P < 0.01$ vs medium; \square , $P < 0.05$ vs LPL; $\square\square$, $P < 0.01$ vs LPL.

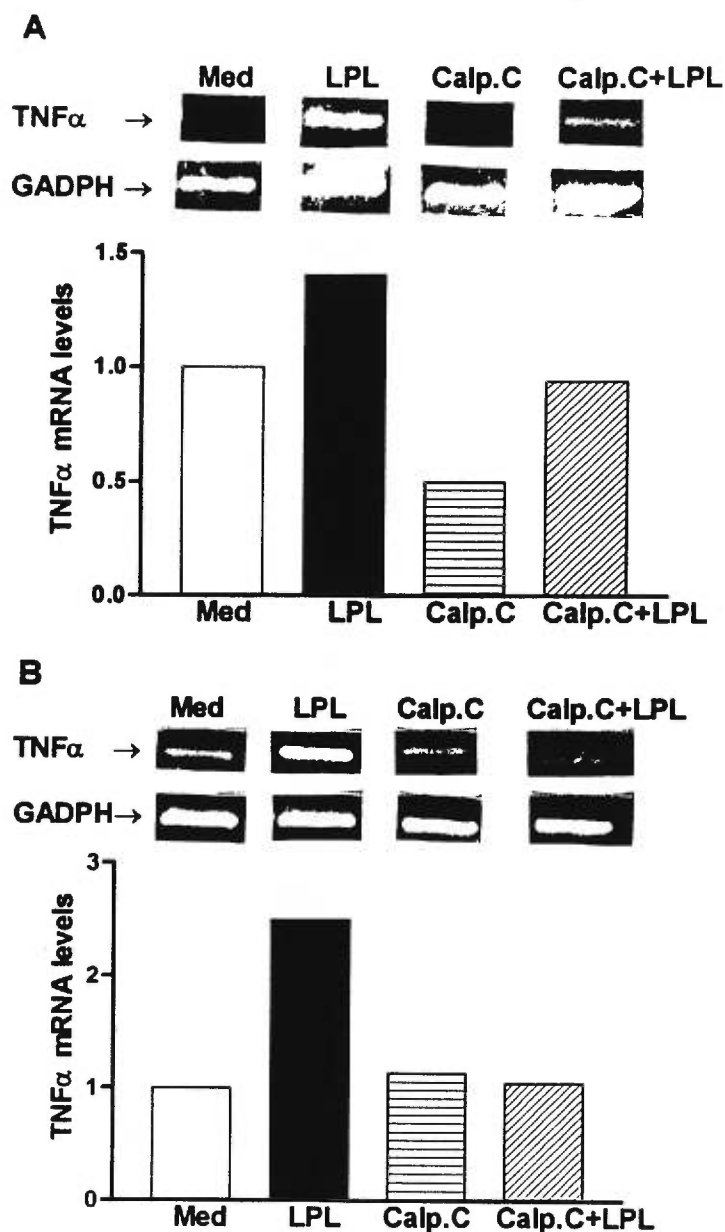


Figure 3. Effect of LPL on human monocytes and MDM TNF α mRNA expression. Freshly isolated human monocytes (A) and MDMs (B) (1.5×10^6 /ml) were treated or not with $1 \mu\text{mol/l}$ calphostin C (Calp.C) for 1 h at 37°C . The cells were then incubated for 3 h in the presence or absence of LPL ($1 \mu\text{g/ml}$). Total RNA was extracted as described in Materials and Methods and the levels of TNF α and GAPDH mRNA expression were assessed by semi-quantitative PCR (upper panel). TNF α mRNA levels (in arbitrary units), normalized to the levels of GAPDH mRNA expression are presented in the lower panel. Data represent the results of one representative experiment out of three.

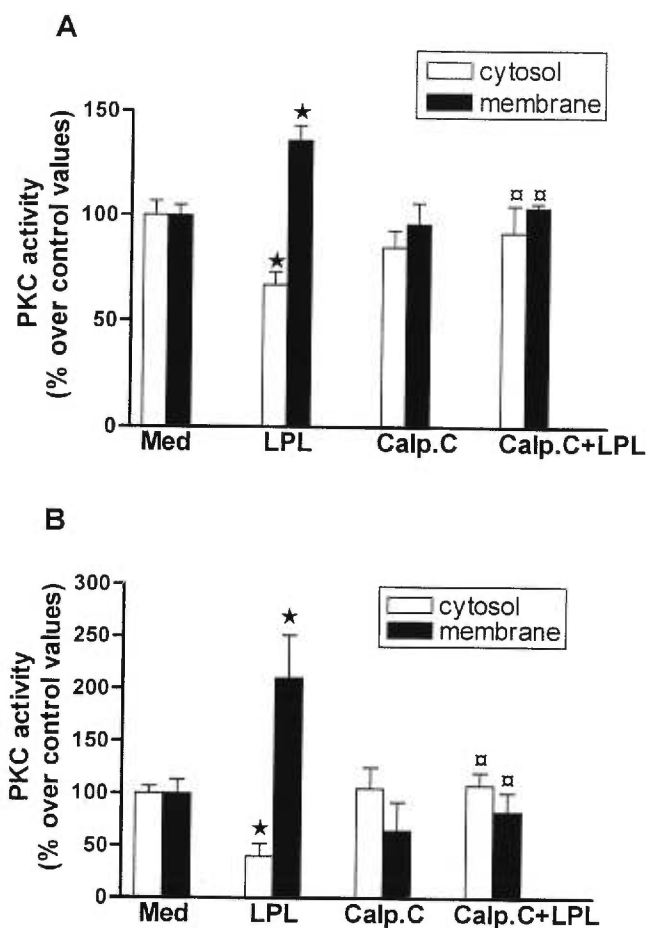


Figure 4. Effect of LPL on human monocytes and MDM PKC activity. Freshly isolated human monocytes (panel A) and cultured MDMs (panel B) (2×10^6 /ml) were treated or not with $1 \mu\text{mol/l}$ calphostin C (Calp.C) for 1 h at 37°C . The cells were then incubated for 10 min in the presence or absence of LPL ($1 \mu\text{g/ml}$). PKC activity in cytosolic and particulate fractions were determined as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SEM of 3 separate experiments. *, $P < 0.05$ vs medium (med); \square , $P < 0.05$ vs LPL.

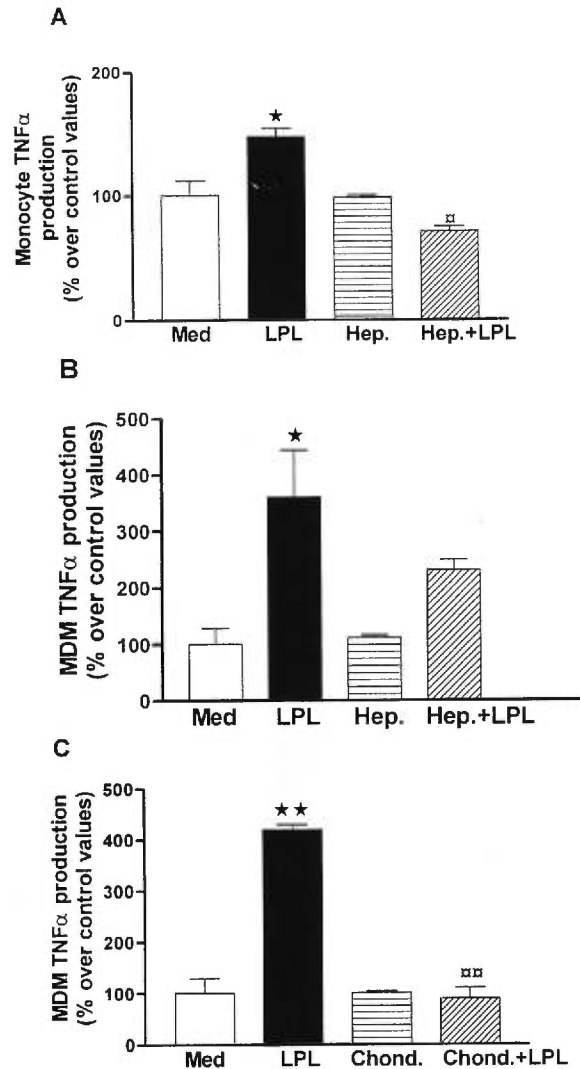


Figure 5. Effect of heparinase and chondroitinase on LPL-induced TNF α production by human monocytes and MDMs. Freshly isolated human monocytes (A) were treated for 1 h with 1U/ml heparinase (Hep.) and cultured MDMs (B and C) (1×10^6 /ml) were treated for 1 h with either 1U/ml heparinase (Hep.) or 1 U/ml chondroitinase (chond.). The cells were then washed three times with PBS and incubated for 24 h in the presence or absence of LPL (1 μ g/ml). At the end of the incubation period, the culture media were collected, centrifuged, and stored at - 20 $^\circ$ C. TNF α levels in the culture media were determined by ELISA. Values represent mean \pm SEM of 4 separate experiments. *, P < 0.05 vs medium (med); **, P < 0.01 vs medium; \square , P < 0.05 vs LPL; $\square\square$, P < 0.01 vs LPL.

DISCUSSION

Accumulating evidences support the concept that LPL acts in the vascular wall as an atherogenic protein. The pro-atherogenic properties of LPL have been attributed mainly to its ability to favor the retention of lipoproteins in the vascular wall^{26,27} and to promote lipid accumulation within lesion macrophages.^{28,29} We previously suggested that LPL may contribute to the development of human atherosclerosis by a new mechanism, that of inducing the release of macrophage TNF α in the arterial wall.⁹ To further test this possibility, we determined in the present study the responsiveness of human mononuclear cells to LPL, as assessed by TNF α production, during the process of differentiation of monocytes to macrophages.

The present study demonstrates that incubation of human monocytes and MDMs with LPL leads to enhanced TNF α production. These results, together with our previous observations in murine macrophages, further establish the role of LPL in the control of mononuclear cell activation. Our observation that human monocyte differentiation to macrophages is associated with increased responsiveness to LPL, as assessed by TNF α production, supports the hypothesis that LPL, by activating lesion macrophage function, may promote atherogenesis. Our finding that LPL stimulates TNF α production both in the presence and absence of exogenous lipoproteins, also suggest that the lipolytic properties of LPL are not essential for the modulatory effect of LPL on monocytic cell function.

It is well established that TNF α gene expression is tightly regulated both at the transcriptional and posttranscriptional levels.^{30,31} Determination of TNF α mRNA levels in LPL-treated human monocytes and MDMs clearly demonstrates an induction of TNF α gene expression in these cells. Although the limited amount of biological material extracted from human cells did not allow us either to perform run-on experiments or to evaluate TNF α mRNA stability, our previous

finding that LPL increases the steady-state levels of TNF α mRNA in murine macrophages by both transcriptional and posttranscriptional mechanisms⁹ suggests that similar mechanisms may be responsible for LPL-induced TNF α mRNA expression in human mononuclear cells.

Available evidence indicates that triggering transmembrane signalling leads to cytokine secretion and monocyte/macrophage activation. In particular, PKC activation has been shown to play a central role in the regulation of monocyte/macrophage TNF α expression and production in response to various stimuli.³²⁻³⁴ Because each of the methods used for studying PKC presents specific limitations, we assessed in the present study the involvement of PKC activation in LPL-treated human monocytes and MDMs by complementary methods. In accordance with our previous data obtained with murine macrophages,⁹ our results demonstrate that LPL induces, in both human monocytes and MDMs, PKC translocation from the cytosol to the membrane. Our finding that PKC redistribution to the particulate cell fraction is greater in LPL-treated human MDMs than in monocytes and parallels that of LPL-induced TNF α secretion in these cells, suggests that LPL-induced PKC translocation in monocytes/macrophages correlates with PKC activation and cell activation. Further evidence for a role of PKC in mediating LPL-induced TNF α production in human monocytic cells is provided by our experiments showing that PKC depletion by PMA and pharmacological inhibition of PKC by calphostin C and H7 totally inhibit LPL-induced monocyte and MDM TNF α production. Because these two PKC inhibitors interact with the calcium-dependent regulatory domain of PKC, this latter observation suggests that classic, calcium-dependent PKC isoforms could be preferentially activated in LPL-treated monocytes and MDMs. This possibility is further supported by the observation that PKC- α and β , which require Ca²⁺ binding for activation, are the two predominant isoforms found in human monocytes.³² Besides its role in macrophage function, PKC activation also regulates several vascular functions such as vascular permeability,³⁵

contractility,³⁶ cellular proliferation,³⁷ basement membrane synthesis³⁸, and signal transduction mechanisms for hormones³⁹ and growth factors.⁴⁰ Whether LPL, by inducing PKC activation, may regulate some of these functions is presently unknown and will be the subject of future studies.

Two plasma membrane molecules that behave as LPL-binding proteins have been identified in human monocytes and MDMs. These include cell surface PGs, HSPGs, and chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs),²² and the α 2MR/LRP receptor (α 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein).⁴¹ Differentiation of human monocytes into macrophages has been shown to be associated with a dramatic increase in cell surface HSPG and by the production of CSPG. These differentiation-related changes have been linked to the greater ability of differentiated macrophages to bind LPL, compared to monocytes.²² Our results, which show that heparinase treatment of human monocytes totally inhibits LPL-induced TNF α production, demonstrate that LPL binding to the monocytic cell surface HSPG is required for its effect on TNF α production. In contrast, our observations that chondroitinase but not heparinase effectively suppresses LPL-induced TNF α production by MDMs clearly indicate that CSPG expressed on MDM cell surface mediate the induction of TNF α production by LPL. Because expression of CSPGs on the differentiated macrophage cell surface is associated with enhanced LPL binding,²² our results suggest that differentiation-associated changes in LPL binding capacity could be responsible for the increased human MDM responsiveness to LPL that we reported in the present study. In addition, our observation that LPL induces PKC activation in MDMs also supports the possibility that CSPGs expressed on human MDMs may play a role in the modulation of second messengers.

Overall, this study demonstrates that differentiation of human monocytes into macrophages is associated with increased responsiveness to LPL, as assessed by TNF α production. Although the *in vivo* relevance of our observations remains uncertain, one may postulate that during

the atherosclerotic process, the massive accumulation of MDMs and SMCs which both produce LPL and the local expression in the arterial wall of LPL stimulatory factors could generate sufficiently high local LPL concentrations to modulate macrophage function. LPL secreted in the vascular wall may, by activating lesion macrophage function or even newly migrating human monocytes, contribute to the high level of TNF α found in the atheromatous lesion. Such an LPL effect may contribute to the development and progression of the atherogenic process.

Acknowledgments

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

REFERENCES

1. Olivecrona T, and Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Curr Opin Lipidol*. 1993;4:187-196.
2. Saxena U, Klein MJ, Goldberg IJ. Identification and characterization of the endothelial cell surface lipoprotein lipase receptor. *J Biol Chem*. 1991;266:17516-17521.
3. O'Brien KD, Gordon D, Deeb S, Ferguson M, and Chait A. Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1992;89:1544-1550.
4. Williams KJ, Fless GM, Petrie KA, Snyder ML, Brocia RW, Swenson TL. Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein(a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. Roles for low density lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*. 1992;267:13284-13292.
5. Rumsey SC, Obunike JC, Arad Y, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase-mediated uptake and degradation of low density lipoproteins by fibroblasts and macrophages. *J Clin Invest*. 1992;90:1504-1512.
6. Kraemer FB. Role of lipoprotein lipase and apolipoprotein lipase E secretion by macrophages in modulating lipoprotein uptake. Possible role in acceleration of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes* 1992;41:77-80.
7. Mamputu JC, Desfaits AC, Renier G. Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *J Lipid Res*. 1997;38:1722-1729.
8. Obunike JC, Paka S, Pillarisetti S, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase can function as a monocyte adhesion protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1414-1420.

9. Renier G, Skamene E, DeSanctis JB, Radziock D. Induction of tumor necrosis factor α gene expression by lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* 1994;35:271-278.
10. Renier G, Lambert A. Lipoprotein lipase synergizes with interferon gamma to induce macrophage nitric oxide synthetase mRNA expression and nitric oxide production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:392-399.
11. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF- a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:625-655.
12. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor, new insights into the molecular mechanisms of its actions. *J Biol Chem.* 1991;266:7313-7316.
13. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Lühowskyj S, Chiroso G, Lobb R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule I, a cytokine-induced endothelial protein that binds lymphocytes. *Cell* 1989;59:1203-1211.
14. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendick DL, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. Identification of an inducible endothelial-leucocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sc USA.* 1987;84:9238-9242.
15. Cavender D, Saegusa Y, Ziff M. Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumour necrosis factor. *J Immunol.* 1987;139:1855-1860.
16. Ming WJ, Bersani L, Mantovani A. Tumour necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 1987;138:1469-1474.
17. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shiverly V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature.* 1987;329:630-632.

18. Watanabe N, Niitsu Y, Umeneo H, Kuriyama H, Neda H, Yamauchi N, Maeda M, Urushizaki I. Toxic effect of tumor necrosis factor on tumor vasculature in mice. *Cancer Res.* 1988;48:2179-2183.
19. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci.* 1986;83:4533-4537.
20. Barath P, Fishbien MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Detection and localisation of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am J Cardiol.* 1990;65:297-302.
21. Gessani S, Testa U, Varano B, Di Marzio P, Borghi P, Conti L, Barberi T, Tritarelli E, Martucci R, Seripa D, Peschle C, Belardelli P. Enhanced production of LPS-induced cytokines during the differentiation of human monocytes to macrophages. Role of LPS receptors. *J Immunol.* 1993;151:3758-3766.
22. Edwards IJ, Xu H, Obunike JC, Golberg IJ, Wagner WD. Differentiated macrophages synthesize a heparan sulfate proteoglycan and oversulfate chondroitin sulfate proteoglycan that bind lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:400-409.
23. Mentzer SJ, Guyre PM, Burakoff SJ, Faller DV. Spontaneous aggregation as a mechanism for human monocyte purification. *Cell Immunol.* 1986;101:312-319.
24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.

25. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159.
26. Tabas I, Li Y, Brocia RW, Xu SW, Swenson TL, Williams KJ. Lipoprotein lipase and sphingomyelinase synergistically enhance the association of atherogenic lipoproteins with smooth muscle cells and extracellular matrix. A possible mechanism for low density lipoprotein and lipoprotein (a) retention and macrophage foam cell formation. *J Biol Chem.* 1983;268:20419-2032.
27. Saxena U, Klein MG, Vanni TM, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase increases low density lipoprotein retention by subendothelial cell matrix. *J Clin Invest.* 1992;89:373-380.
28. Ishibashi S, Yamada N, Shimano H, Mori N, Mokuno H, Gotohda T, Kawakami M, Murase T, Takaku F. Apoprotein E and lipoprotein lipase secreted from human monocyte-derived macrophages modulate very low density lipoprotein uptake. *J Biol Chem.* 1990;265:3040-3047.
29. Aviram M, Bierman EL, Chait A. Modification of low density lipoprotein by lipoprotein lipase or hepatic lipase induces enhanced uptake and cholesterol accumulation in cells. *J Biol Chem.* 1990;263:15416-15422.
30. Shakhov A N, Collart MA, Vassali P, Nedospasov SA, Jongeneel CV. κ B-Type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor α gene in primary macrophages. *J Exp Med.* 1990;171:35-47.
31. Han J, Brown T, Beutler B. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/TNF biosynthesis at the transcriptional level. *J Exp Med.* 1990;171:465-475.
32. Chang ZL, Beezhold DH. Protein kinase C activation in human monocytes: regulation of PKC isoforms. *Immunology.* 1993;80:360-366.

33. Liu MK, Herrera-Velit P, Brownsey RW, Reiner NE. CD-14 dependent activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1994;153:2642-2652.
34. Liu MK, Brownsey RW, Reiner NE. Gamma interferon induces rapid and coordinate activation of mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase) and calcium-independent protein kinase C in human monocytes. *Inf Immunity.* 1994;62:2722-2731.
35. Gruden G, Thomas S, Burt D, Lane S, Chusney G, Sacks S, Viberti G. Mechanical stretch induces vascular permeability factor in human mesangial cells: mechanisms of signal transduction. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94:12112-12116.
36. Karibe A, Watanabe J, Horigushi S, Takeuchi M, Suzuki S, Funakoshi M, Katoh H, Keitoku M, Satoh S, Shirato K. Role of cytosolic Ca²⁺ and protein kinase C in rat small arteries. *Am J Physiol.* 1997;272:H1165-1172.
37. Wang S, Desai D, Wright G, Niles RM, Wright GL. Effects of protein kinase C alpha overexpression on A7r5 small muscle cell proliferation and differentiation. *Exp Cell Res.* 1997;236:117-126.
38. Ishi H, Koya D, King GL. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med.* 1998;76:21-31.
39. Ganesan S, Calle R, Zawalich K, Greenawall K, Zawalich W, Shulman GI, Rasmussen H. Immunocytochemical localization of α -protein kinase C in rat pancreatic β -cells during glucose-induced insulin secretion. *J Cell Biol.* 1992;119:313-324.

40. Hong Y, Dumenil D, van der Loo B, Goncalves F, Vainchenker W, Erusalimsky JD. Protein kinase C mediates the mitogenic action of thrombopoietin in c-Mpl-expressing UT-7 cells. *Blood*. 1998;91:813-822.
41. Nykjaer A, Bengtsson-Olivecrona G, Lookene A, moestrup SK, Petersen CM, Weber W, Beisiegel O, Gleman J. The α 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds lipoprotein lipase and beta-migrating very low density lipoprotein associated with the lipase. *J Biol Chem*. 1993;268:15048-15055.

II.3. Troisième article

Atheroscler Thromb Vasc Biol.1999, in revision

PROLIFERATIVE EFFECT OF LIPOPROTEIN LIPASE ON HUMAN VASCULAR
SMOOTH MUSCLE CELLS

Jean-Claude Mamputu, Geneviève Renier.

CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital, Department of Nutrition, University of Montreal,
Quebec, Canada.

Short title: LPL stimulates VSMC proliferation.

Reprints requests to:

Dr. Geneviève Renier
CHUM Research Center, Notre-Dame Campus
J.-A. De Seve Pavilion, door Y 3622
1560 Sherbrooke Street East
Montreal, Quebec
Canada H2L 4M1
Phone: (514) 281-6000, extension 6895
FAX: (514) 896-4701
E-mail: renierg@ere.umontreal.ca

ABSTRACT

Vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation is a key event in the development and progression of atherosclerotic lesions. Accumulating evidence suggests that lipoprotein lipase (LPL) produced in the vascular wall may exert proatherogenic effects. The aim of the present study was to examine the effect of LPL on VSMC proliferation. Incubation of growth-arrested human VSMCs with purified endotoxin-free bovine LPL (1 $\mu\text{g/ml}$), in the absence of any added exogenous lipoproteins, induced VSMC proliferation (192% over control values, $P < 0.01$). Addition of very low density lipoproteins to the culture media did not further enhance LPL effect. Heat-inactivation of LPL or immunoneutralization of the lipase by the monoclonal 5D2 antibody suppressed the LPL stimulatory effect on VSMC growth. Moreover, preincubation of VSMCs with the specific protein kinase C inhibitors, calphostin C and chelerythrine, totally abolished LPL-induced VSMC proliferation. In LPL-treated VSMCs, a significant increase in PKC activity was observed. Treatment of VSMCs with heparinase III (1 U/ml) totally inhibited LPL-induced human VSMC proliferation. Exposure of growth-arrested VSMCs to conditioned media from unstimulated human monocyte-derived macrophages (MDMs) significantly induced VSMC proliferation ($172 \pm 19\%$ over control values, $P < 0.01$). While treatment of VSMCs with heparinase totally suppressed this proliferative effect, immunoneutralization of MDM conditioned media with antibodies against LPL or platelet-derived growth factor did not abolish the growth response of VSMCs to MDM supernatants. Overall, our data indicate that LPL exerts a direct stimulatory effect on VSMC proliferation. This effect requires PKC activation and LPL binding to heparan sulfate proteoglycans expressed on VSMC surface.

Supplementary key words: Lipoprotein lipase - Vascular smooth muscle cell - Protein kinase C - proteoglycans - Atherosclerosis.

INTRODUCTION

Lipoprotein lipase (LPL) is the key enzyme for the hydrolysis and removal of chylomicrons and very low density lipoproteins (VLDL) from the circulation.¹ LPL acts on triglyceride-rich lipoproteins at the vascular endothelium where it is bound to heparan sulfate proteoglycans (HSPGs).² LPL is synthesized by a variety of cells including adipocytes, myocytes, and mammary epithelial cells.³⁻⁶ The enzyme is also produced by monocyte-derived macrophages (MDMs) and vascular smooth muscle cells (VSMCs), two prominent cellular components of the atherosclerotic lesion.⁷⁻⁹ Although plasma LPL activity tends to drive lipoprotein metabolism in a nonatherogenic direction,¹⁰⁻¹² LPL produced in the vascular wall may act as a proatherogenic protein. Indeed, LPL has been shown to mediate uptake of lipoprotein particles by vascular cells,¹³⁻¹⁵ to promote lipoprotein retention to the extracellular matrix^{16,17} and to induce the expression of the proatherogenic cytokine tumor necrosis factor- α (TNF α).¹⁸ Furthermore, recent studies indicate that LPL may function as a monocyte adhesion protein.^{19,20}

VSMC migration and proliferation are typical features of intimal hyperplasia and atherogenesis.²¹ These biological processes are mediated by cytokines and growth factors released by infiltrating inflammatory cells and neighbouring endothelial cells.²² Proliferative response of VSMCs to various stimuli involves protein kinase C (PKC) activation.²³⁻²⁵ In the light of our previous study demonstrating that LPL activates PKC in human mononuclear cells,¹⁸ the present study was conducted to investigate whether LPL may exert a direct stimulatory effect on VSMC proliferation and to determine the mechanisms responsible for this effect.

METHODS

Reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and Coomassie Brilliant Blue were purchased from ICN Biomedicals Inc (Costa Mesa, CA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Wisent Inc. (St-Bruno, QC) Penicillin-streptomycin was purchased from Flow (Mc Lean, VA). Affinity-purified bovine LPL, lipopolysaccharide (LPS) and human VLDL were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). RPMI-1640 medium, phosphate buffered salt solution (PBS), polymyxin B sulfate, Hank's balanced salt solution (HBSS), and protein kinase C (PKC) assay kit were purchased from GibcoBRL (Grand Island, NY). Ethanol, methanol, and acetic acid were obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ). Perchloric acid was purchased from BDH (Toronto, ON). Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB, basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor beta (TGF β), and antibodies against these antigens were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). The monoclonal anti-LPL antibody 5D2 (MAb 5D2) was obtained from the University of Washington, Seattle. [Methyl-³H]-thymidine was obtained from NEN Life Science Products (Mississauga, ON). The silver stain plus kit was purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The chemiluminescence Western blotting kit was obtained from Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ).

Determination of the LPL preparation purity

The LPL preparation was dialysed against saline, using 10,000 x MWCO Slide-A-Lyzer dialysis cassettes from Pierce (Rockford, IL). The enzyme preparation was next filtered using an endotoxin removal resin from Associates of Cape Cod (Falmouth, MA). The purity of the LPL preparation was assessed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-

PAGE) using 4-12% gradient gels. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue or silver according to the manufacturer's instructions. The purity of the enzyme preparation was also tested by Western blot analysis, using MAb 5D2. Because LPL was isolated by heparin-sepharose chromatography from milk which may contain some heparin-binding growth factors,²⁶ the purity of the LPL preparation was further established by Western blotting, using antibodies against heparin-binding growth factors that might be present in the LPL preparation after the extensive dialysis with 10,000 x MWCO Slide-A-Lyzer dialysis cassettes. Briefly, after electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked for 3 hours at room temperature with PBS containing Tween 20 0.1% and 5% dry milk. After being washed, the membranes were incubated overnight at 4°C with the appropriate concentration of the primary antibody in PBS-Tween 20 0.1%. At the end of the incubation period, the membranes were washed and incubated with a 1:1000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG for 1 hour at room temperature. Blots were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia).

Endotoxin content of all media and of the LPL preparation (1 µg/ml) was determined by the Limulus amoebocyte lysate assay (Sigma Chemical Co) and was consistently found to be lower than 10 pg/ml. Treatment of VSMCs from all donors with LPS 10 pg/ml did not induce cell proliferation. Moreover, addition of an LPS inhibitor, polymyxin B sulfate (100 µg/ml) did not inhibit LPL-induced VSMC proliferation.

VSMC isolation and culture

Human VSMCs were isolated from saphenous veins obtained after bypass surgery, following informed consent of the patients. Primary human cells were grown in DMEM

supplemented with 20% (vol/vol) FBS and 1% (vol/vol) penicillin-streptomycin. Cell purity of human explant preparations (passage 2 to 5) was determined using α -actin immunostaining. Briefly, VSMCs were cultured in chamber slides, washed twice with PBS, and fixed for 10 minutes at 4°C in cold methanol. After further washing, fixed cells were incubated for 30 minutes at room temperature with PBS containing 10% FBS. Chamber slides were then incubated at 37°C for 2 hours with a monoclonal anti- α -smooth muscle actin antibody (Sigma) diluted in 1% FBS-PBS (1/100), followed by incubation in the dark for 1 hour at 37°C with the secondary goat anti-rabbit IgG antibody. After PBS washing, nuclei were stained for 15 minutes with 0.01% Hoechst solution (Sigma). After successive washes, slides were mounted with Fluorsave Reagent (Calbiochem, Lajolla, CA) and then observed with an epifluorescence microscope.

VSMC proliferation assay

Human VSMCs were trypsinized and cultured at a density of 7,500 cells/cm² in DMEM supplemented with 1% (vol/vol) penicillin-streptomycin and 20% (vol/vol) FBS in 24-well plates (Falcon, Becton Dickinson). After 24 hours, cultured cells were washed with PBS and growth-arrested for 48 hours by serum deprivation. VSMCs cultured in serum-free DMEM were then treated with the appropriate experimental agent(s) for 24 hours and incubated in the presence of sterile [methyl-³H]-thymidine (5 μ Ci/ml) for an additional 48 hour-period. Non-incorporated [³H]-thymidine was removed by washing with cold PBS. Cells were next fixed with cold ethanol-acetic acid solution (3:1) for 10 minutes at 4°C, washed twice and incubated with perchloric acid 0.5 N for 15 minutes at 4°C. After further washing, VSMCs were incubated with perchloric acid 0.5 N for 30 minutes at 80°C and allowed to detach. The level of [³H]-thymidine incorporation was determined by scintillation counting (Packard, Mississauga, ON).

Measurement of PKC activity

Adherent human VSMCs were recovered and homogenized (Dounce; 15 strokes) in 500 μ l of ice-cold buffer A (20 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 25 μ g/ml aprotinin, and 25 μ g/ml leupeptin). The membrane and cytosolic fractions were separated by ultracentrifugation (100,000 g for 30 minutes at 4°C). After recovery of high speed supernatants containing cytosolic PKC, the corresponding membrane pellets were homogenized in 500 μ l of buffer A containing 0.5 % Triton X-100. The enzyme from both fractions was partially purified through DE52 chromatography columns. After removal of unbound proteins by washing the columns with buffer B (20 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, and 0.5 mM EGTA), fractions containing PKC were eluted with buffer C (20 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM β -mercaptoethanol, and 0.2 M NaCl). Eluates were analyzed for PKC activity, following the optimum conditions of the assay, by measuring the incorporation of 32 P into the synthetic peptide Ac-myelin basic protein(4-14). The specificity of the assay was determined by subtracting the radioactivity obtained in the presence of the pseudosubstrate inhibitor PKC (19-36) from total radioactivity of the assay. Data were expressed as percentages considering the control as 100% activity.

Isolation of human monocytes and culture of human monocyte-derived macrophages (MDMs)

Human monocytes were isolated from 100 ml anticoagulated (heparin sodium) whole blood collected from non smoker healthy male and female donors as previously described.²⁷ First, peripheral blood mononuclear cells were obtained by density centrifugation using Ficoll (Nycomed Pharma As, Oslo, Norway). The cells collected from the interface were washed three times with HBSS, and allowed to aggregate in the presence of FBS. After further purification by rosetting

technique and density centrifugation, recovery of highly purified monocytes (85-90%), as assessed by fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis, was obtained. Differentiation of monocytes into macrophages was obtained by culturing the cells in 24-well plates in RPMI 1640 medium supplemented with 1% (vol/vol) penicillin-streptomycin, and 20% (vol/vol) autologous human serum. The cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂, 95% air atmosphere. The medium was replaced at days 4 and 9 of culture. At day 9, the medium was changed to serum-free RPMI and supernatants from MDMs were collected after a 24 hour incubation period.

Determination of cell viability and total protein content

Cell viability after treatment with experimental agents was assessed by using trypan blue exclusion. Viability was found to be higher than 90%. After extensive dialysis against saline and purification, total protein content of the LPL preparation was measured according to the method of Bradford²⁸ using a colorimetric assay (Bio-Rad) and bovine serum albumin as standard.

Statistical analyses

Data were analysed by Student's *t* test for single comparisons and by one way analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons. Results are expressed as means ± SEM values.

RESULTS

Direct effect of LPL on human VSMC proliferation

Treatment of growth-arrested VSMCs with exogenous LPL (1 µg/ml), in the absence of any added exogenous lipoproteins, induced a significant increase in cell proliferation (192 ± 20%

over control values, $P < 0.001$) (Figure 1A). Addition of VLDL (20 μg protein/ml) to the incubation medium did not further enhance the LPL stimulatory effect on VSMC growth ($164 \pm 8\%$ over control values, $P < 0.001$) (Figure 1A). To investigate whether LPL activity is required for the LPL effect on VSMC proliferation, the enzyme was heat-inactivated or immunoneutralized with the monoclonal anti-LPL antibody 5D2. Heat-inactivation or immunoneutralization of LPL abolished its effect on VSMC proliferation (Figure 1B). To determine whether an enzyme structurally related to LPL may induce VSMC proliferation, growth-arrested VSMCs were also treated, in some experiments, with pancreatic lipase (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). We found that pancreatic lipase was as effective as LPL in inducing VSMC (data not shown).

The purity of the LPL preparation used in the present study was assessed by SDS-PAGE. Silver and Coomassie Brilliant Blue staining of the gels showed a single major band in the molecular weight range expected of monomeric lipase (M_r 55 kDa) (Figure 2A and 2B, respectively). Because LPL was isolated from bovine milk by heparin-sepharose affinity chromatography, the presence of smooth muscle cell mitogenic heparin-binding growth factors which are predominant in milk²⁶ and which could therefore contaminate our LPL preparation after the extensive dialysis using a 10,000 MWCO membrane was assessed by immunoblots. As shown in Figure 2C, 2D, and 2E, PDGF, TGF β , and FGFb proteins were not detected on immunoblots. Western blot analysis using MAb 5D2 showed an immunoreactive band of 55 kDa (Figure 2F).

To further test whether LPL-induced VSMC proliferation could be due to possible traces of heparin-binding growth factors in our LPL preparation, we also examined the effect of LPL on VSMC proliferation in the presence or absence of antibodies against PDGF, bFGF, and TGF β . Addition of these antibodies to the incubation medium did not abrogate the LPL-induced VSMC proliferation (Table 1).

Effect of PKC inhibitors on LPL-stimulated VSMC proliferation

To investigate whether PKC activation is involved in LPL-induced VSMC proliferation, the effect of the specific PKC inhibitors calphostin C (1 μ M) and chelerythrine (0.5 μ M) on LPL-induced VSMC proliferation was next evaluated. Preincubation of VSMCs with these two PKC inhibitors suppressed the LPL-stimulated VSMC growth (Figure 3A and 3B).

Effect of LPL on human VSMC PKC activity

Since the LPL-induced VSMC proliferation appeared to involve PKC activation, we also measured the direct effect of LPL on PKC activity in VSMCs. A maximal increase in PKC activity in the membrane fraction of human VSMCs (6-fold increase over control values, $P < 0.01$) was observed after a 30 minute exposure of VSMCs to LPL (1mg/ml) (Figure 4). The increase in PKC activity in the membrane fractions of these cells was associated with a small and not significant increase in the PKC activity in the cytosol (Figure 4).

Effect of heparinase on LPL-induced VSMC proliferation

To establish the role of HSPGs expressed on the VSMC surface in the LPL-induced VSMC proliferation, VSMCs were pretreated with heparinase (1U/ml) for 1 hour at 37°C before being incubated with LPL. As shown in Figure 5, heparinase treatment of VSMCs totally abolished the LPL-induced VSMC proliferation.

Effect of MDM conditioned media on human VSMC proliferation

Since LPL is constitutively produced by human MDMs, we next tested whether LPL secreted by cultured human MDMs may induce VSMC proliferation. Addition of supernatants from

unstimulated human MDMs to VSMCs led to a significant induction of VSMC proliferation ($172 \pm 19\%$ over control values, $P < 0.01$) (Figure 6). Pretreatment of VSMCs with heparinase (1U/ml) suppressed the stimulatory effect of these supernatants on VSMC proliferation (Figure 6). To investigate whether LPL secreted by human MDMs mediates the proliferative effect of unstimulated MDM conditioned media, supernatants harvested from cultured MDMs were immunoneutralized with the MAb 5D2 anti-LPL antibody before being added to VSMCs. Under these experimental conditions, no reduction in the proliferative response of VSMCs to MDM conditioned media was observed (Figure 6). Treatment of growth-arrested VSMCs with exogenous LPL, at a concentration equivalent to the amount of LPL immunoreactive mass measured in the culture medium of unstimulated human MDMs, i.e. 40ng/ml, also failed to stimulate cell proliferation (data not shown). To verify whether platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), an heparin-binding protein secreted by MDMs^{29,30} may be responsible for the stimulatory effect of MDM conditioned media on VSMC proliferation, supernatants harvested from MDMs were preincubated with 100ng/ml anti-human PDGF-BB antibody. Incubation of growth-arrested VSMCs with anti-PDGF immunoneutralized supernatants resulted in a slight but not significant reduction in VSMC proliferation (VSMC proliferation (% over control values): MDM conditioned media: $240 \pm 30\%$; anti-PDGF-treated MDM conditioned media: $209 \pm 17\%$, $P > 0.05$) (data not shown).

TABLE 1. Effect of anti-PDGF, -bFGF, and -TGF β antibodies on LPL-induced VSMC proliferation

	VSMC proliferation (% over control values)
Medium	100 \pm 3
LPL 1 μ g/ml	182 \pm 24 **
LPL + anti-PDGF 250 ng/ml	167 \pm 11 **
LPL + anti-bFGF 250 ng/ml	175 \pm 21 **
LPL + anti-TGF β 1 μ g/ml	196 \pm 8 **
LPL + anti-PDGF,-bFGF,-TGF β	185 \pm 19 **

Data represent mean \pm SEM of percent increase over control values and are derived from three independent experiments. **, P < 0.01 versus medium.

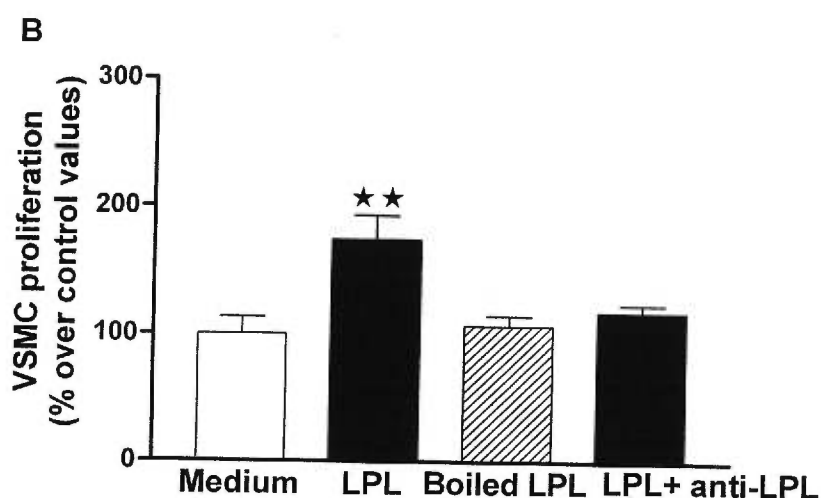


Figure 1. LPL stimulates human VSMC proliferation. **A:** VSMCs cultured in serum-free DMEM were incubated for 24h with LPL alone (1 $\mu\text{g/ml}$) or with LPL and VLDL (20 $\mu\text{g protein/ml}$). **B:** Growth-arrested VSMCs were incubated for 24h with LPL alone (1 $\mu\text{g/ml}$), boiled LPL (1 $\mu\text{g/ml}$) or MAb 5 D2-treated LPL (LPL+anti-LPL). At the end of this incubation period, [methyl- ^3H]-thymidine (5 $\mu\text{Ci/ml}$) was added to the medium and the culture of VSMCs was pursued for an additional 48 h period. VSMC proliferation was assessed by [^3H] thymidine incorporation into DNA as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SEM values of 4 (A) and 5 (B) independent experiments. ***, $P < 0.001$ versus medium.

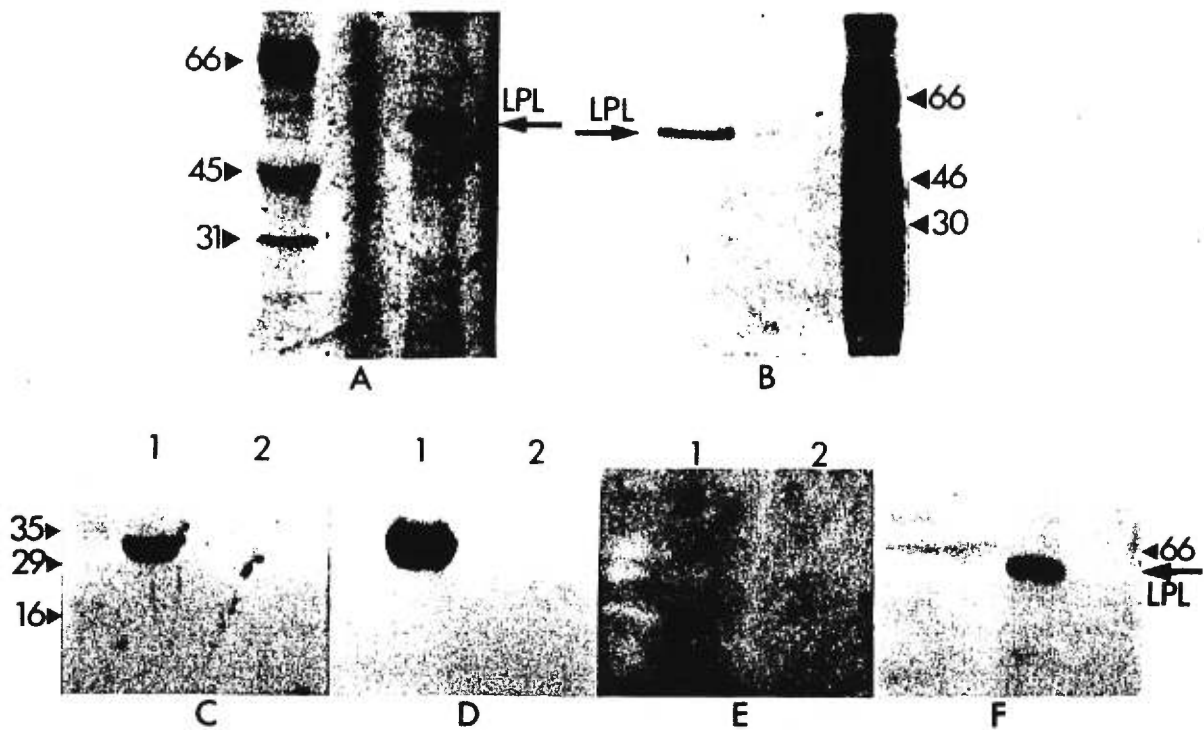


Figure 2. SDS-PAGE and Western blot of the LPL preparation. One microgram of the LPL preparation was applied to SDS-PAGE using 4-12% gels. After electrophoresis, the gels were either stained using silver (A) or Coomassie Brilliant Blue (B), or transferred to nitrocellulose membranes for Western blot analysis using antibodies against PDGF(C), TGF β (D), bFGF(E), and LPL (F). The band corresponding to LPL protein after Coomassie Blue or silver staining of the gels is indicated by arrows; lane 1 represents PDGF 50 ng (C), TGF β 125 ng (D), and bFGF 250 ng (E), used as positive controls; lane 2 represents the LPL preparation (1 μ g). The position of molecular weight SDS-PAGE standards in kDa is indicated by arrows.

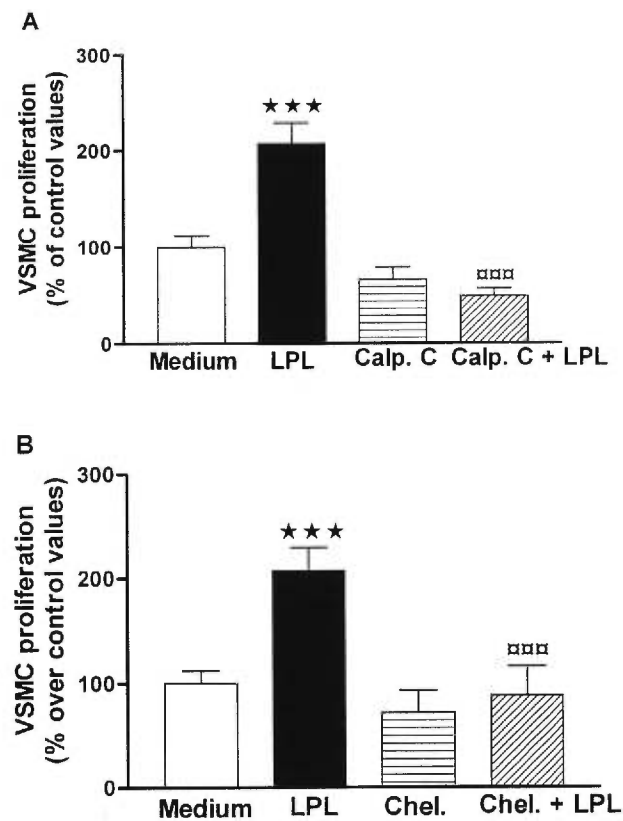


Figure 3. Effect of PKC inhibitors on LPL-stimulated human VSMC proliferation. Growth-arrested human VSMCs were treated or not with calphostin C (1 μ M) (**A**) or chelerythrine (0.5 μ M) (**B**) for 1 h at 37°C, then incubated for 24 h with LPL (1 μ g/ml). At the end of this incubation period, [methyl- 3 H]-thymidine (5 μ Ci/ml) was added to the medium and the culture of VSMCs was pursued for an additional 48 h period. VSMC proliferation was determined by [3 H] thymidine incorporation into DNA as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SEM values of 4 independent experiments. ***, $P < 0.001$ versus medium; □□□, $P < 0.001$ vs LPL.

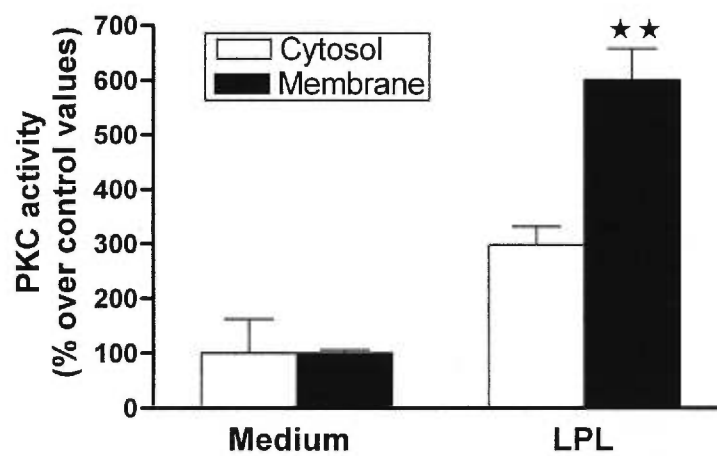


Figure 4. Effect of LPL on human VSMC PKC activity. Growth-arrested human VSMCs were incubated for 30 min in the presence or absence of LPL (1 $\mu\text{g/ml}$). PKC activity in cytosolic and particulate fractions was determined as described in "Materials and Methods". Data represent mean \pm SEM values of 3 independent experiments. **, $P < 0.01$ versus medium.

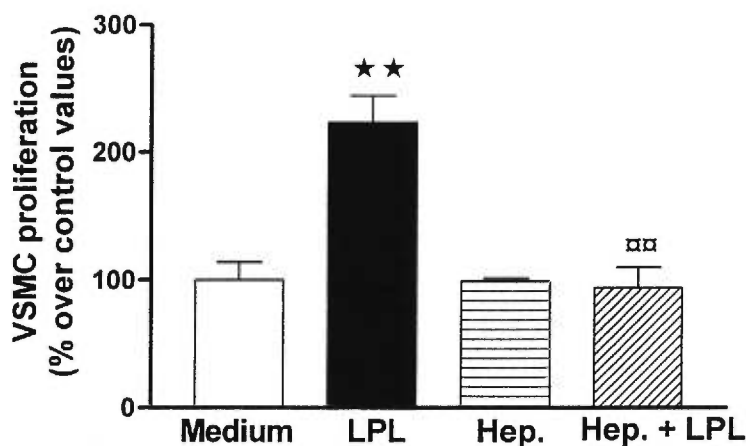


Figure 5. Effect of heparinase on LPL-induced human VSMC proliferation. Growth-arrested human VSMCs were treated or not with heparinase (Hep.) (1 U/ml) for 1 h at 37°C. The cells were then washed 3 times with PBS and incubated for 24 h in serum-free medium in the presence or absence of LPL (1 µg/ml). At the end of this incubation period, [methyl-³H]-thymidine (5µCi/ml) was added to the medium and the culture of VSMCs was pursued for an additional 48 h period. VSMC proliferation was determined by [³H] thymidine incorporation into DNA as described in Materials and Methods. Data represent mean ± SEM values of 3 independent experiments. **, P < 0.01 versus medium; □□, P < 0.01 vs LPL.

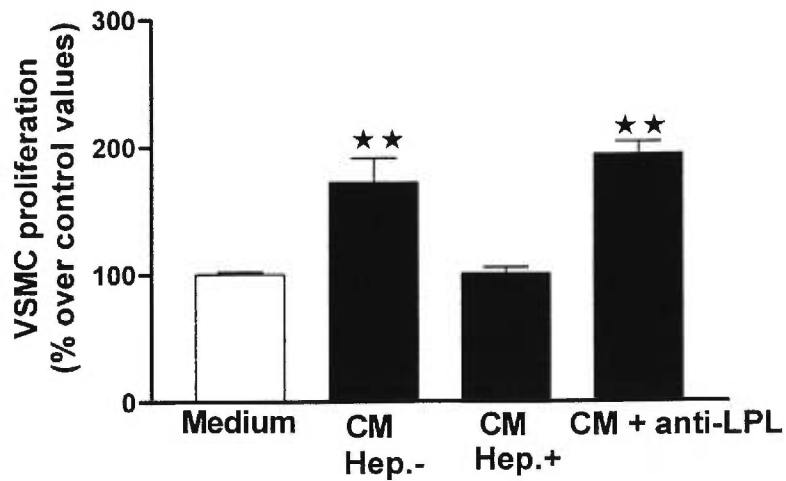


Fig. 6. Effect of MDM conditioned media on human VSMC proliferation. **A:** Human MDMs were cultured for 9 days in RPMI medium supplemented with 20% autologous human serum. The cells were then incubated for 24 hours in serum-free medium. Supernatants from MDMs (CM) were next collected, centrifuged, and added for 24 hours to untreated (CM Hep.-) or heparinase (CM hep.+) -treated growth-arrested human VSMCs. **B:** MDM CM were immunoneutralized with MAb 5D2 (CM + anti-LPL) before being added to growth-arrested human VSMCs. At the end of this incubation period, [methyl-³H]-thymidine (5 μ Ci/ml) was added to the medium and the culture of VSMCs was pursued for an additional 48 hour-period. VSMC proliferation was determined by [³H] thymidine incorporation into DNA as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SEM values of 7 independent experiments. **, P < 0.01 versus medium.

DISCUSSION

The present study demonstrates for the first time that LPL exerts a direct stimulatory effect on human VSMC proliferation. Our results demonstrating that heat-inactivation of LPL and immunoneutralization of the enzyme with MAb 5D2 suppress the effect of LPL on VSMC growth indicate that lipase activity plays an important role in the effect of LPL on VSMC proliferation. The importance of lipase activity in the stimulatory effect of LPL on VSMC proliferation is further denoted by our finding that pancreatic lipase, a member of the lipase gene family, effectively stimulates VSMC proliferation. Given the key role of fatty acids in the regulation of VSMC function (31-33), LPL could theoretically promote VSMC proliferation through fatty acids derived from its lipolytic action on triglyceride-rich lipoproteins. Our data showing that LPL induces VSMC proliferation in the absence of exogenous lipoproteins and that addition of exogenous lipoproteins to the incubation medium does not further enhance the LPL stimulatory effect do not support this hypothesis. However, one cannot rule out that LPL may exert its effect by hydrolyzing another substrate such as membrane phospholipids. Our results demonstrating that MAb 5D2 inhibits LPL-induced VSMC proliferation clearly demonstrate the specificity of the LPL effect on VSMC proliferation. These results and those generated by SDS-PAGE, Western blotting and immunoneutralization of heparin-binding growth factors in the LPL preparation further support the major role of the enzyme in the proliferative response of VSMCs.

LPL binds with high affinity to several receptors expressed on the VSMC surface. These receptors include the alpha2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein (α 2MR/LRP), the VLDL receptor (VLDLR) and HSPGs (34-36). Our finding that treatment of VSMCs with heparinase suppresses LPL-induced VSMC proliferation suggests that LPL binding to HSPGs expressed on the VSMC surface is essential for its effect on cell proliferation. However, as the

formation of a proteoglycan-rich pericellular matrix may be involved in VSMC proliferation (37), inhibition of VSMC growth by heparinase treatment of the cells could also be due to alteration of the extracellular matrix integrity. Recently, Silver et al. (38) have shown that locally-delivered heparinase reduced medial vascular smooth muscle cell proliferation induced by balloon catheter injury in rat carotid arteries. Furthermore, these authors found that heparinase inhibited both PDGF-BB and bFGF-mediated increase in rat VSMC proliferation (38), thus confirming that HSPGs also act as co-receptors for growth factors involved in the stimulation of arterial cell proliferation (39, 40) The role of α 2MR/LRP and VLDLR to the effect of LPL on VSMC proliferation will be examined in future investigations.

The PKC signal transduction pathway plays a central role in many VSMC functions, including cell proliferation (23-25, 41). It has been recently demonstrated that bacterial phospholipase C, an enzyme competing with LPL for binding to VSMCs, activates PKC in VSMCs (42). Our data showing that LPL induces PKC activation in VSMCs suggest that the enzyme may promote the growth of these cells by stimulating this signaling pathway. The involvement of PKC activation in the direct stimulation of VSMC proliferation by LPL is strengthened by our observation that pharmacological inhibition of PKC by specific PKC inhibitors, including calphostin C and chelerythrin, completely suppresses LPL-induced VSMC proliferation. The PKC isoforms alpha, beta-1, beta-2, delta, and epsilon have been identified in human VSMCs (43). It has been shown that the PKC isoforms alpha and beta-1 are primarily located in the soluble fraction of the cell and translocate to the particulate fraction upon 12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate stimulation, whereas the isoforms beta-2, delta, and epsilon are found primarily in the particulate fraction (43). Our results showing that LPL induces the translocation of PKC from the cytosol to the particulate fraction in human VSMCs suggest that LPL-induced VSMC proliferation may involve the

translocation of the $[Ca^{2+}]$ -sensitive PKC isoforms alpha and beta-1. This possibility is further supported by our results demonstrating that calphostin C which interacts with the calcium-dependent regulatory domain of PKC suppresses LPL-induced VSMC proliferation. The contribution of individual PKC isoforms in LPL-induced human VSMC proliferation will be investigated in further studies.

Cultured human MDMs constitutively secrete LPL (7, 8). Based on our finding that treatment of cultured VSMCs with exogenous LPL leads to VSMC growth, we next tested whether LPL produced by cultured MDMs may induce VSMC proliferation. Results generated in this work demonstrate that supernatants from unstimulated MDMs effectively induce VSMC proliferation and that this effect is abolished by heparinase treatment of VSMCs. These observations indicate that macrophage-derived heparin-binding growth factors mediate the proliferative effect of MDM conditioned media on VSMC growth. VSMC growth regulatory molecules constitutively secreted by macrophages that bind to cell surface HSPGs include LPL and PDGF. Our data which show that treatment of VSMCs with exogenous LPL, at the concentration found in the culture medium of MDMs, does not lead to VSMC growth clearly demonstrate that LPL secreted by MDMs may not account for the proliferative effect of MDM conditioned media on VSMC under our experimental conditions. Moreover, our finding that treatment of MDM supernatants with an antibody against PDGF-BB only partially reduced the VSMC growth-stimulatory effect of MDM conditioned media indicates that, besides PDGF, other heparin-binding bioactive substance (s) released from cultured MDMs contribute to the proliferative effect of MDM conditioned media on VSMC. Whether such effect involves coordinated secretion of multiple growth factors is presently investigated.

Although the implications of our in vitro observations to atherosclerosis remain unclear, several lines of evidence suggest that LPL may regulate VSMC growth in the vascular wall. First,

it has been demonstrated that MDMs and VSMCs secrete LPL within atherosclerotic lesions (44, 45). Second, association of the enzyme with the VSMC cell surface has been documented (46). Third, LPL has been shown to interact with the extracellular matrix where it enhances the retention of atherogenic lipoproteins (47). The lipase capable of stimulating VSMC proliferation may therefore derived from either newly secreted LPL or LPL bound to extracellular matrix. While LPL from MDMs may exert a paracrine effect by inducing the proliferation of neighboring VSMCs, LPL secreted by VSMCs may induce VSMC proliferation in an autocrine manner. Whether sufficient LPL is present in the vicinity of the artery wall for local regulation of VSMC function remains however to be determined.

In summary, our study demonstrates that LPL exerts a direct stimulatory effect on human VSMC proliferation and that this effect requires PKC activation and LPL binding to HSPG expressed on VSMC cell surface. These results and the previous observation that LPL induces the proliferation of NK cells (48), support a new role for LPL, that of acting as a growth factor.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Medical Research Council of Canada and from the Heart and Stroke Foundation of Canada. The authors thank Dr. J.D. Brunzell (University of Washington, Seattle) for providing the Mab 5D2 antibody, and Dr. Luc Lévesque (Angiogene, Montreal) for providing primary cultures of human VSMCs.

REFERENCES

1. Auwerx, J., P. Leroy, and K. Schoonjans. 1992. Lipoprotein lipase: recent contributions from molecular biology. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 29: 243-268.
2. Shimada, K., P.J. Gill, J.E. Silbert, W.H.J. Douglas, and B.L. Fanburg. 1981. Involvement of cell surface heparin sulfate in the binding of lipoprotein lipase to cultured bovine endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 68: 995-1002.
3. Montalto, M.B., and A. Bensadoun. 1993. Lipoprotein lipase synthesis and secretion: effects of concentration and type of fatty acids in adipocyte cell culture. *J. Lipid Res.* 34: 397-407.
4. Olivecrona, T., S.S. Chernick, G. Bengtsson-Olivecrona, M. Garrison, and R.O. Scow. 1987. Synthesis and secretion of lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes: demonstration of inactive forms of lipase in cells. *J. Biol. Chem.* 262: 10748-10759.
5. Borensztajn, J. 1987. Heart and skeletal muscle lipoprotein lipase. *In* Lipoprotein lipase. J. Borensztajn, editor. Evener Publishers, Chicago, IL. 133-148.
6. Scow, R.O., and S.S. Chernick. 1987. Role of lipoprotein lipase during lactation. *In* Lipoprotein lipase. J. Borensztajn, editor. Evener Publishers, Chicago, IL. 149-185.
7. Wang-Iversen, P., A. Ungar, J. Blumis, P.R. Bukberg, J-C. Gibson, and W.V. Brown. 1982. Human monocytes in culture synthesize and secrete lipoprotein lipase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104: 923-928.
8. Chait, A., P-H. Iverius, and J.D. Brunzell. 1982. Lipoprotein lipase secretion by human monocyte-derived macrophages. *J. Clin. Invest.* 69: 490-493.

9. Jonasson, L., G. Bondjers, and G.K. Hansson. 1987. Lipoprotein lipase in atherogenesis: its presence in smooth muscle cells and absence from macrophages. *J. Lipid Res.* 28: 437-445.
10. Williams, K.J., G.M. Fless, K.A. Petrie, M.L. Snyder, R.W. Brocia, and T.L. Swenson. 1992. Mechanism by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein [a], low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 267: 13284-13292.
11. Skottova, N., R. Savonen, A. Lookene, M. Hultin, and G. Olivecrona. 1995. Lipoprotein lipase enhances removal of chylomicrons and chylomicron remnants by the perfused rat liver. *J. Lipid Res.* 36: 1334-1344.
12. Rinninger, F., T. Kaiser, W.A. Mann, N. Meyer, H. Greten, and U. Beisiegel. 1998. Lipoprotein lipase mediates an increase in the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesteryl esters by hepatic cells in culture. *J. Lipid Res.* 39: 1335-1348.
13. Aviram, M., E.L. Bierman, and A. Chait. 1988. Modification of low density lipoprotein by lipoprotein lipase or hepatic lipase enhances uptake and cholesterol accumulation in cells. *J. Biol. Chem.* 263: 15416-15422.
14. Rumsey, S.C., J.C. Obunike, Y. Arad, R.J. Deckelbaum, and I.J. Goldberg. 1992. Lipoprotein lipase-mediated uptake and degradation of low density lipoproteins by fibroblasts and macrophages. *J. Clin. Invest.* 90: 1504-1512.
15. Stein, O., M. Ben-Naim, Y. Dabach, G. Hollander, and Y. Stein. 1993. Can lipoprotein lipase be the culprit in cholesteryl ester accretion in smooth muscle cells in atheroma? *Atherosclerosis.* 99: 15-22.

16. Rutledge, J.C., and I.J. Goldberg. 1994. Lipoprotein lipase (LPL) affects low density lipoprotein (LDL) flux through vascular tissue: evidence that LPL increases LDL accumulation in vascular tissue. *J. Lipid Res.* 35: 1152-1160.
17. Saxena, U., E. Ferguson, and C.L. Bisgaier. 1993. Apolipoprotein E modulates low density lipoprotein retention by lipoprotein lipase anchored to the subendothelial matrix. *J. Biol. Chem.* 263: 14812-14819.
18. Mamputu, J.C., and G. Renier. 1999. Differentiation of human monocytes to monocyte-derived macrophages is associated with increased lipoprotein lipase-induced tumor necrosis factor- α expression and production. A process involving cell surface proteoglycans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 1405-1411.
19. Mamputu, J.C., A-C. Desfaits, and G. Renier. 1997. Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *J. Lipid Res.* 38:1722-1729.
20. Obunike, J.C., S. Paka, S. Pillarisetti, and I.J. Goldberg. 1997. Lipoprotein lipase can function as a monocyte adhesion protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1414-1420.
21. Ross, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 362: 801-809.
22. Clinton, S.K., and P. Libby. 1992. Cytokines and growth factors in atherogenesis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116: 1292-1300.
23. Lee, M.W., and D.L. Severson. 1994. Signal transduction in vascular smooth muscle: Diacylglycerol second messengers and PKC action. *Am. J. Physiol.* 267: 659-678.

24. Haller, H., C. Lindschau, P. Quass, A. Distler, and F.C. Luft. 1995. Differentiation of vascular smooth muscle cells and the regulation of protein kinase C-alpha. *Circ. Res.* 76: 21-29.
25. Clemens, M.J., I. Trayner I, and J. Menaya. 1992. The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. *J. Cell. Sci.* 103: 811-887.
26. Grosvenor, C.E., M.F. Picciano, and C.R. Baumrucker. 1993. Hormones and growth factors in milk. *Endocrine Reviews.* 14: 710-728.
27. Mentzer, S.J., P.M. Guyre, S.J. Burakoff, and D.V. Faller. 1986. Spontaneous aggregation as a mechanism for human monocyte purification. *Cell. Immunol.* 101: 312-319.
28. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
29. Ross, R., J. Masuda, E.W. Raines, A.M. Gown, S. Katsuda, M. Sasahara, L.T. Malden, H. Masuko, and H. Sato. 1990. Localization of PDGF-b protein in macrophages in all phases of atherogenesis. *Science.* 248: 1009-1012.
30. Ito, M., K. Yamada, J. Masuda, A. Kinoshita, H. Otsuki, and T. Hayakawa. 1995. Expression of PDGF in relation to cell division in atherosclerotic intima of human carotid arteries. *Neurol. Res.* 17: 345-348.
31. de Han, L.H., I. Bosselaers, W.M. Jongen, R.M. Zwijsen, and J.H. Koeman. 1994. Effect of lipid and aldehydes on gap-junctional intercellular communication between human smooth muscle cells. *Carcinogenesis.* 15: 253-256.

32. Lu, G., T.A. Morineli, K.E. Meier, S.A. Rosenzweig, and B.M. Egan. 1996. Oleic acid-induced mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. A role for protein kinase C. *Circ. Res.* 79: 611-618.
33. Morisaki, N., J.A. Lindsey, G.E. Milo, D.G. Cornwell. 1983. Fatty acid metabolism and cell proliferation. Effect of prostaglandin biosynthesis either from exogenous fatty acid or endogenous fatty acid release with hydralazine. *Lipids.* 18: 349-352.
34. Hiltunen, T.P., and S. Yla-Herttuala. 1998. Expression of lipoprotein receptors in atherosclerosis lesions. *Atherosclerosis.* 137: S81-88.
35. Weaver, A.M., J.J. Lysiak, and S.L. Gonias. 1997. LDL receptor family-dependent and -independent pathways for the internalization and digestion of lipoprotein lipase-associated beta-VLDL by rat vascular smooth muscle cells. *J. Lipid Res.* 38: 1841-1850.
36. Edwards, I.J., H. Xu, J.C. Obunike, I.J. Goldberg, and W.D. Wagner. 1995. Differentiated macrophages synthesize a heparan sulfate proteoglycan and oversulfated chondroitin sulfate proteoglycan that bind lipoprotein lipase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 400-409.
37. Evanko, S.P., J.C. Angello, and T.N. Wight. 1999. Formation of hyaluronan-and versican rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 1004-1013.
38. Silver, P.J., J.P. Moreau, E. Denholm, Y.Q. Lin, L. Nguyen, C. Bennett, A. Recktenwald, D. Deblois, S. Baker, and S. Ranger. 1998. Heparinase III limits rat arterial smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 351: 79-83.

39. Molteni, A., D. Modrowski, M. Hott, and P.J. Marie. 1999. Alterations of matrix - and cell associated proteoglycans inhibit osteogenesis and growth response to fibroblast growth factor-2 in cultured rat mandibular condyle and calvaria. *Cell. Tissue Res.* 29: 523-536.
40. Choy, M., S.L. Oltjen, Y.S. Otani, M.T. Armstrong, and P.B. Armstrong. 1996. Fibroblast growth factor-2 stimulates embryonic cardiac mesenchymal cell proliferation. *Dev. Dyn.* 206: 193-200.
41. Wang, S., D. Desai, G. Wright, R.M. Niles, and G.L. Wright. 1997. Effects of protein kinase C alpha overexpression on A7r5 smooth muscle cell proliferation and differentiation. *Exp. Cell. Res.* 236: 117-126.
42. Migas, I., M. Chuang, Y. Sasaki, and D.L. Severson. 1997. Diacylglycerol metabolism in SM-3 smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 1249-1256.
43. Grange, J.J., L.M. Baca-Regen, A.J. Nollendorfs, Y. Persidsky, D.L. Sudan, and B.T. Baxter. 1998. Protein kinase C isoforms in human aortic smooth muscle cells. *J. Vasc. Surg.* 27: 919-926.
44. Yla-Herttuala, S., B.A. Lipton, M.E. Rosenfeld, I.J. Goldberg, D. Steinberg, and J.L. Witztum. 1991. Macrophages and smooth muscle cells express lipoprotein lipase in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88: 10143-10147.
45. O'Brien, K.D., D. Gordon, S. Deeb, M. Ferguson, and A. Chait. 1992. Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 89: 1544-1550.

46. O'Brien, K.D., M. Ferguson, D. Gordon, and S.S. Deeb. 1994. Lipoprotein lipase is produced by cardiac myocytes rather than interstitial cells in human myocardium. *Arterioscler. Thromb.* 14: 1445-1457.
47. Tabas, I., Y. Li, R.W. Brocia, S.W. Xu, T.L. Swenson, and K.J. Williams. 1993. Lipoprotein lipase and sphingomyelinase enhance the association of atherogenic lipoproteins with smooth muscle cells and extracellular matrix: a possible mechanism for low density lipoprotein and lipoprotein (a) retention and macrophage foam cell formation. *J. Biol. Chem.* 268: 20419-20432.
48. De Sanctis, J.B., I. Blanca, and N.E. Bianco. 1996. Regulatory effects of lipoprotein lipase on proliferative and cytotoxic activity of NK cells. *J. Lipid Res.* 37: 1987-2000.

III. DISCUSSION

Les principales cellules immuno-compétentes impliquées dans l'athérogenèse sont les monocytes/macrophages (Ross, 1995; Massy et Keane, 1996). Ces cellules sécrètent des quantités importantes de facteurs immuns susceptibles de promouvoir le développement et la progression de l'athérosclérose, tels les cytokines, les lymphokines et les facteurs de croissance (Hansson et coll., 1994; Ross, 1999). Les monocytes, des cellules sanguines précurseurs des macrophages, sont présents à tous les stades de l'athérogenèse (Ross, 1999; Massy et Keane, 1996). On estime que l'adhésion des monocytes circulants aux cellules endothéliales est un des événements les plus précoces de l'athérogenèse (Schwartz et coll., 1993). Les recherches effectuées au cours des dernières années ont démontré que cette adhésion est médiée par des molécules spécifiques exprimées à la surface des monocytes et des cellules endothéliales. Ces molécules sont actuellement regroupées en trois catégories: la super-famille des immunoglobulines, la famille des sélectines, et la famille des intégrines. La super-famille des immunoglobulines comprend notamment les molécules ICAM-1, ICAM-2, et VCAM-1 qui sont exprimées à la surface des cellules endothéliales, et la molécule LFA-3 qui est exprimée à la surface des monocytes (Springer, 1990; Williams et Barclay, 1988). Les membres de la famille des sélectines exprimés à la surface des cellules endothéliales incluent la E-sélectine et la P-sélectine (Bevilacqua et Nelson, 1993; McEver et coll., 1991), la L-sélectine étant exprimée à la surface des monocytes (Kuijpers et Harlan, 1993). Les intégrines exprimées à la surface des monocytes incluent les VLA qui sont des membres de la sous-famille β_1 des intégrines (Elices et coll., 1990; Akizyma et coll., 1990), et des membres de la sous-famille β_2 incluant LFA-1 (CD11a/CD18), CR3 (CD11b/CD18; Mac-1), et p150,95 (CD18; CR4) (Figdor et coll., 1990; Doherty et coll., 1987; Elliott et coll., 1990). Alors que les molécules d'adhésion ICAM-1 et ICAM-2 se lient aux intégrines β_2 (Springer, 1990; Carlos et Harlan, 1990), VCAM-1 interagit avec l'antigène VLA-4 (Osborn et coll., 1989; Elices et coll., 1990). L'adhésion

monocytaire à l'endothélium est un processus complexe comprenant diverses étapes (Springer, 1994). Si le rapprochement initial des monocytes aux cellules endothéliales ou "rolling" implique des molécules d'adhésion de type sélectine (Nelson et coll., 1995), l'adhésion ferme de ces cellules aux cellules endothéliales requiert l'expression des antigènes VCAM-1 et ICAM-1 à la surface de l'endothélium (Springer, 1994). Le fait que l'expression de VCAM-1 précède l'accumulation des macrophages dans la paroi artérielle supporte un rôle important de cette molécule d'adhésion dans le recrutement des monocytes (Richardson et coll., 1994; Li et coll., 1993).

L'importance de l'adhésion monocytaire à l'endothélium vasculaire est soulignée par le fait de son augmentation dans diverses maladies ou conditions associées à un risque accru de MCV. Le diabète, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, l'angor instable, la tabagisme, le stress hémodynamique et des niveaux élevés en fibrinogène plasmatique sont autant de situations associées à une adhésion accrue des monocytes à l'endothélium (Kalra et coll., 1994; Faggiotto et coll., 1984; Mazzone et coll., 1993; Kreuzer et coll., 1996; Gonzales et Wick, 1996). Le rôle crucial de ce processus dans l'athérogenèse est aussi supporté par l'observation que différentes molécules potentiellement antiathérogéniques, telles la L-arginine, les antioxydants et l'aspirine réduisent l'adhésion monocytaire à l'endothélium vasculaire (Adams et coll., 1997; Martin et coll., 1997; Weber et coll., 1995, 1996).

Il est important de souligner qu'outre le fait de permettre le recrutement monocytaire dans l'espace sous endothélial, le contact monocyte-endothélium semble aussi pouvoir faciliter le développement de la maladie athéromateuse en induisant la production dans la paroi vasculaire de

divers facteurs proathérogéniques, tels le PDGF, le G-MCSF et le facteur tissulaire (Lo et coll., 1995; Takahashi et coll., 1996; Funayama et coll., 1998).

L'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire est suivie de leur migration dans l'espace sous-endothélial de la paroi artérielle (Navab et coll., 1991; Schwartz et coll., 1993). Dans l'intima de la paroi artérielle, les monocytes se transforment en macrophages activés sous l'action de divers facteurs immuns (Goldman, 1990; Jonasson et coll., 1990) et éléments de la matrice incluant le fibrinogène (Kreuzer et coll., 1996) et le collagène (Wesley II et coll., 1998). Par leur capacité à accumuler les lipides, les macrophages activés sont ensuite convertis en cellules spumeuses (Rosenfeld et coll., 1990). Il a été suggéré que la captation des lipides puisse servir de stimulus aux macrophages pour la sécrétion d'une variété de substances telles des cytokines, des espèces radicalaires oxygénées, des facteurs de croissance, et des enzymes hydrolytiques, incluant la LPL, susceptibles de contribuer au développement de l'athérosclérose (Ross, 1995; Faruqi et DiCorleto, 1993; Ross, 1999).

III.1. Rôle de la LPL dans l'adhésion des monocytes

La LPL se lie aux HSPGs exprimés à la surface des monocytes et des cellules endothéliales (Edwards et coll., 1995; Shimada et coll., 1981; Sivaram et coll., 1994). Bien que ces observations suggèrent que la LPL liée à l'endothélium vasculaire puisse interagir avec les monocytes circulants en se liant aux HSPGs exprimés à leur surface, il n'existait, lors de l'initiation de nos travaux, aucune étude visant à vérifier cette possibilité. Notre première étude a donc consisté à tester l'hypothèse selon laquelle, la LPL en formant un "pont moléculaire" entre les cellules endothéliales et les monocytes humains, pourrait favoriser l'adhésion monocyttaire à l'endothélium

vasculaire. Nos résultats (Mamputu et coll., 1997) démontrent que la LPL augmente effectivement l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales. La suppression de l'augmentation de l'adhésion des monocytes induite par la LPL par le traitement des cellules endothéliales ou des monocytes à l'héparinase indique que l'expression des HSPGs à la surface de ces cellules est requise pour l'effet stimulant de l'enzyme sur le processus d'adhésion. Nos données démontrant que la LPL inactive est incapable de stimuler l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales indiquent d'autre part que l'activité enzymatique de la molécule est nécessaire pour l'obtention de cet effet. Enfin, nos résultats montrant que la dissociation de la LPL dimérique par la chaleur supprime l'effet de la LPL suggèrent que la forme monomérique de la LPL soit incapable de stimuler l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales.

Zilversmit (1973) a proposé pour la première fois un rôle de la LPL dans l'athérogenèse. Dans cette hypothèse récemment mise à jour (Zilversmit, 1995), l'auteur stipule que l'action hydrolytique de la LPL liée à l'endothélium vasculaire sur les lipoprotéines riches en triglycérides aboutit à la diminution de la taille de ces particules et favorise dès lors leur pénétration dans la paroi artérielle. Cette hypothèse suggère en outre que les acides gras libérés par l'action de la LPL puissent endommager l'endothélium et initier le déclenchement de processus thrombotiques. Saxena et coll. (1992) ont examiné l'effet des produits lipolytiques de la LPL sur l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales. Ces auteurs ont démontré que la lipolyse des VLDL par la LPL induit l'adhésion des monocytes à l'endothélium. Ils ont observé que cet effet corrèle avec la génération d'AGLs résultant de l'hydrolyse des triglycérides présents dans les VLDL par la LPL. A partir de ces observations, Saxena et coll. (1992) ont donc proposé que des produits dérivés de l'hydrolyse des triglycérides par la LPL puissent augmenter l'adhésion des monocytes à l'endothélium

vasculaire. Alors que Saxena et coll. (1992) ont examiné la capacité de la LPL à réguler l'adhésion des monocytes à l'endothélium par son activité hydrolytique, nos recherches ont été principalement axées sur l'effet structural de cette protéine dans ce processus. Notre étude démontre que la LPL, en l'absence de toutes lipoprotéines exogènes, stimule l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et qu'elle exerce cet effet par sa capacité de liaison aux HSPGs exprimés à la surface de ces cellules. Si ces résultats suggèrent bel et bien que la LPL puisse accroître la liaison des monocytes à l'endothélium par ces propriétés structurales, nos données montrant que l'addition de VLDL dans le milieu de culture augmente de manière significative l'adhésion monocyttaire stimulée par la LPL, indiquent aussi clairement la capacité de l'enzyme à promouvoir ce processus par ces propriétés hydrolytiques. Tel que suggéré par Saxena et coll. (1992), il est possible que les acides gras libérés par l'action hydrolytique de la LPL puissent augmenter l'adhésion des monocytes en stimulant les mécanismes de transduction cellulaire impliqués dans l'expression des molécules d'adhésion. Il a été démontré que certains acides gras incluant l'acide linoléique induisent l'activation du facteur de transcription nucléaire NF-kappa B (NF- κ B), un médiateur majeur de la régulation de l'expression génique des molécules d'adhésion (Hennig et coll., 1996; 1997; Chen et coll., 1999). Parmi les autres mécanismes susceptibles d'être impliqués dans l'effet stimulant des acides gras sur la liaison monocyttaire à l'endothélium, mentionnons l'altération de la fluidité membranaire des cellules endothéliales (Cader et coll., 1995; Pritchard et coll., 1991), la formation d'espèces réactives oxygénées (Hennig et coll., 1996), l'activation de la PKC (Touny et coll., 1990), et l'altération du métabolisme des éicosanoïdes (Pritchard et coll., 1990).

Dans une étude menée simultanément à la nôtre, Obunike et coll. (1997) ont testé l'hypothèse que la LPL exprimée à la surface des cellules endothéliales et de la matrice

extracellulaire puisse, par sa capacité de liaison aux HSPGs, augmenter l'adhésion monocytaire. En accord avec nos observations, les résultats de cette étude (Obunike et coll., 1997) ont démontré que la LPL augmente effectivement l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales. Toutefois, contrairement à nos résultats, ces auteurs n'ont pu démontrer le caractère essentiel de l'activité enzymatique de la LPL sur l'adhésion des monocytes. La discordance entre nos résultats et ceux de Obunike et coll. peut être attribuable à divers facteurs. Le premier réside sans doute dans le lien, encore flou, existant entre l'activité de la LPL et sa capacité de liaison à l'héparine/HSPGs. En effet, si certains chercheurs affirment que l'activité de la LPL est requise pour sa liaison aux HSPGs de la surface cellulaire (Saxena et coll., 1991; Chappell et coll., 1993; Pillarisetti et coll., 1997), d'autres chercheurs infirment cette théorie en démontrant que l'inactivation de la LPL n'interfère pas avec sa capacité de liaison à l'héparine/HSPGs (Williams et coll., 1992; Lookene et coll., 1994; Rinninger et coll., 1998). Un autre facteur pouvant rentrer en ligne de compte réside dans les différences de protocoles expérimentaux utilisés dans ces deux études. Alors que nous avons testé le rôle de la LPL inactive sur l'adhésion des monocytes à l'endothélium, Obunike et coll. (1997) ont examiné l'effet de la LPL inactive sur l'adhésion des monocytes au plastique, c'est-à-dire dans un système acellulaire. Étant donné les caractéristiques totalement différentes de la liaison de la LPL à ces deux surfaces, la liaison de la LPL aux cellules endothéliales, mais non au plastique, étant dépendante de l'expression des protéoglycans (Cheng et coll., 1981), toute comparaison de nos résultats avec ceux d'Obunike et coll. (1997) est impossible. Un autre facteur pouvant expliquer les divergences des résultats obtenus quant à l'importance de l'activité de la LPL dans le phénomène d'adhésion est le type d'inhibiteurs de la LPL testés dans les deux études. Alors que nous avons utilisé dans notre étude un inhibiteur irréversible de l'activité de la LPL, le phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Obunike et coll. (1997) ont utilisé dans leur étude la tétrahydrolipstatine, un inhibiteur réversible de

l'activité de la LPL et de la lipase pancréatique (Olivecrona et Lookene, 1997; Lookene et coll., 1994; Borgström, 1988). Du fait de l'usage d'un tel inhibiteur réversible de la LPL, la possibilité d'une réactivation de la LPL dans les conditions expérimentales utilisées par Obunike et coll. (1997) ne peut être exclue. Étant donné la reformation de dimères ou même la formation d'oligomères après traitement de la LPL avec la tétrahydrolipstatine (Lookene et coll., 1994), il est possible que la LPL inactive mais sous forme dimérique puisse stimuler l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales. Nos données démontrant la suppression de l'effet stimulant de la LPL par l'anticorps 5D2, qui inhibe l'activité de la LPL sans induire la monomérisation de l'enzyme (Wong et coll., 1994), n'appuient toutefois pas cette dernière hypothèse. Alors que la concentration de PMSF utilisée dans notre étude a inhibé 90% de l'activité de la LPL, la concentration de tétrahydrolipstatine utilisée dans celle de Obunike et coll. (1997) n'a induit qu'une inhibition de l'activité de la LPL de l'ordre de 50%, suggérant fortement une activité résiduelle de la LPL après traitement de cette enzyme par la tétrahydrolipstatine. Un dernier facteur pouvant expliquer les discordances de résultats entre notre étude et celle de Obunike et coll. (1997) est le type de cellules monocytaires testées dans les deux études, soit des monocytes humains fraîchement isolés dans notre étude et une lignée monocyttaire THP-1, présentant des caractéristiques différentes des cellules non transformées (Wesley II et coll., 1998) dans celle de Obunike et coll. (1997).

Tel que mentionné précédemment, nos résultats indiquent que l'incubation des monocytes humains en présence d'héparinase induit une suppression totale de la capacité de la LPL à stimuler l'adhésion de ces cellules à l'endothélium. Alors que notre observation semble indiquer que les HSPGs exprimés à la surface de ces cellules jouent un rôle majeur dans la liaison de la LPL aux monocytes humains, Obunike et coll. (1997) ont rapporté que le traitement des cellules THP-1 à

l'héparinase ne réduit pas complètement leur liaison à la LPL. Ces auteurs ont, par conséquent, suggéré que d'autres molécules présentes à la surface de ces cellules puissent contribuer à leur liaison à la LPL. Partant de l'observation que des peptides contenant la séquence RGD (arginine, glycine, asparagine) inhibent partiellement la liaison des monocytes à la LPL, Obunike et coll. (1997) ont proposé l'implication possible de certaines intégrines exprimées à la surface monocyttaire dans l'interaction LPL-monocytes. Bien que l'analyse de la séquence de la LPL bovine ne démontre pas la présence de séquences RGD, mais plutôt celle de deux séquences contenant seulement les acides aminés arginine, glycine (Arg-Gly-Ser et Arg-Gly-Leu-Gly-Asp) (Senda et coll., 1987; Raisonnier et coll., 1995), Obunike et coll. (1997) ont proposé que de telles séquences présentes dans la séquence de la LPL bovine puissent interagir avec les intégrines exprimées à la surface monocyttaire. Ce postulat ne remet cependant pas en cause le rôle majeur des HSPGs dans la liaison des monocytes à la LPL puisque l'effet inhibiteur de l'héparinase sur la liaison des monocytes à la LPL n'est pas influencé par l'incubation des monocytes en présence de peptides RGD (Obunike et coll., 1997). L'implication des intégrines dans le processus d'adhésion des monocytes à l'endothélium stimulé par la LPL reste en outre à démontrer, Obunike et coll (1997) n'ayant pas examiné l'effet des peptides RGD sur l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les monocytes migrent dans l'intima de la paroi artérielle après leur adhésion à l'endothélium vasculaire. Étant donné que la LPL se lie aux HSPGs de la matrice extracellulaire, un effet stimulant de la LPL sur la liaison des monocytes à la matrice est anticipable. Cette propriété de la LPL a été effectivement démontrée par Obunike et coll. (1997) qui ont observé que la LPL, en se liant aux HSPGs de la matrice extracellulaire et de la surface monocyttaire, augmente la liaison des monocytes à la matrice. Les monocytes circulants étant

continuellement recrutés dans l'intima au cours de l'athérogenèse (Schwartz et coll., 1993), cet effet de la LPL est susceptible de favoriser leur accumulation dans la paroi artérielle. Par ailleurs, la LPL en se liant conjointement à la matrice et aux macrophages présents dans la lésion (Edwards et coll., 1995) pourrait entraver le retour de ces cellules vers la circulation (Gerrity et coll., 1981) et dès lors favoriser leur rétention dans l'espace sous-endothélial.

L'athérosclérose est une maladie des moyens et gros vaisseaux sanguins. Par opposition, la LPL agit essentiellement au niveau des capillaires sanguins. Ces données suscitent deux questions majeures à savoir: la LPL est-elle présente à la surface des vaisseaux de moyen et gros calibre et dans l'affirmative, d'où origine-t-elle? Plusieurs études ont montré que l'activité de la LPL est présente dans les extraits des grosses artères (Corey et Zilvermit, 1977; Camps et coll., 1990; Zilvermit, 1979; Dicorleto et Zilvermit, 1975; Henson et Schotz, 1975). En outre, plusieurs évidences suggèrent que la LPL, originant de diverses sources cellulaires, puisse se fixer à l'endothélium des moyens et gros vaisseaux sanguins. Étant donné que les cellules endothéliales ne synthétisent pas la LPL, il a été proposé que la LPL associée aux artères de moyen et gros calibre puisse provenir d'autres types de cellules vasculaires. La mise en évidence de la sécrétion de l'enzyme par les CMLs (Vance et coll., 1982) et les MDMs dans la plaque athéromateuse (Yla-Herttuala et coll., 1991; O'Brien et coll., 1992) suggère que ces cellules puissent être la source de la LPL liée aux cellules endothéliales de la macro-vasculature. La LPL étant exprimée à la surface de l'endothélium surplombant la plaque (Yla-Herttuala et coll., 1991), il est possible qu'une fraction de la LPL sécrétée par les cellules de la lésion athéromateuse puisse migrer vers la partie luminale de l'endothélium vasculaire. Alternativement, l'enzyme pourrait être transportée par la circulation vers les moyens et gros vaisseaux sanguins pour ensuite se fixer aux cellules endothéliales. En effet,

il a été démontré que la LPL circule dans le plasma liée aux lipoprotéines (Vilella et coll., 1993; Kern et coll., 1990; Zambon et coll., 1996) et que son activité plasmatique s'accroît de manière considérable après absorption alimentaire de graisses (Karpe et coll., 1998).

Une autre question d'importance majeure est celle relative à la pertinence biologique de nos observations (Mamputu et coll., 1997). Babirak et coll. (1989) ont démontré que le niveau plasmatique physiologique de la LPL est de l'ordre de 200 ng/ml. D'après nos observations montrant que, dans nos conditions expérimentales, environ 10% de la LPL ajoutée de manière exogène (1 µg/ml) se lie *in vitro* aux cellules endothéliales, nous pouvons estimer la concentration effective de LPL capable de stimuler l'adhésion des monocytes à l'endothélium à environ 100 ng/ml, une concentration correspondant aux niveaux plasmatiques de LPL observés chez le sujet normal. Bien qu'il soit donc possible que la LPL, dans des conditions physiologiques, puisse faciliter l'interaction des monocytes avec l'endothélium vasculaire, nous pensons toutefois que l'intérêt de nos observations s'applique surtout à des situations pathologiques, telle l'athérosclérose, où les monocytes circulants sont abondamment attirés vers les sites de prédilection des lésions athéromateuses (Schwartz et coll., 1993; Gerrity et coll., 1979; Faggitto et coll., 1984) et où les MDMs et les CMLs sécrètent des quantités importantes de LPL (Jonasson et coll., 1991; O'Brien et coll., 1992; Yla-Herttuala, 1991). En résumé, nos données et celles de Obunike et coll., 1997 démontrent clairement un effet stimulant de la LPL sur la liaison des monocytes à l'endothélium vasculaire. Cette nouvelle fonction de la LPL, susceptible de contribuer au recrutement et la rétention des cellules mononucléaires, confère à cette enzyme une nouvelle propriété pro-athérogénique.

III.2. Rôle de la LPL dans l'activation des monocytes/macrophages humains

La différenciation des monocytes humains en MDMs est associée à un accroissement de l'expression des HSPGs à la surface cellulaire et à la production de chondroïtine sulfate protéoglycans (CSPGs). Ces propriétés confèrent aux macrophages la capacité de lier davantage de LPL comparativement aux monocytes (Edwards et coll., 1995). Renier et coll. (1994) ont démontré que la LPL augmente l'expression et la production de $\text{TNF}\alpha$ par les macrophages murins. Les mêmes chercheurs ont aussi rapporté que la LPL synergise avec l' $\text{IFN}\gamma$ pour induire l'expression génique de la NO synthase et la production de NO (Renier et Lambert, 1995). Les résultats de ces deux études suggèrent que la LPL puisse fonctionner comme une molécule de signalisation capable de réguler l'expression génique de certaines cytokines et autres produits sécrétés par les macrophages.

Plusieurs substances incluant les cytokines et la LPS entraînent l'activation des monocytes/macrophages (Seljelid et coll., 1993). Comme nous l'avons souligné précédemment, l'activation des monocytes/macrophages se traduit par la sécrétion de nombreuses substances incluant celle de diverses cytokines potentiellement pro-athérogéniques. Plusieurs mécanismes de signalisation intracellulaire sont impliqués dans l'activation des monocytes/macrophages par les cytokines et autres substances bio-actives. Ces mécanismes incluent l'activation des adénylate cyclases avec augmentation subséquente des niveaux d' AMPc (Scott, 1991), l'activation des tyrosine kinases (Wrenshall et coll., 1995; Collart et coll., 1990), l'activation des "mitogen activated protein kinases" (MAPK) (Weinsten et coll., 1992; Liu et coll., 1994), et l'activation de la PKC (Bakouche et coll., 1992).

De nombreuses évidences indiquent que la PKC joue un rôle important dans les mécanismes de signalisation régulant la réponse des monocytes/macrophages à plusieurs stimuli incluant les esters de phorbol (Chang et Beezhold, 1993), la LPS (Liu et coll., 1994), et l'IFN γ (Liu et coll., 1994). La PKC est constituée de deux domaines: le domaine de régulation et le domaine catalytique, situés respectivement dans la partie amino-terminale et carboxyl terminale de la molécule. Le domaine de régulation de la PKC contient deux sous-domaines: le sous-domaine C1 liant le diacylglycérol et les esters de phorbol qui sont des analogues fonctionnels de diacylglycérol, et le sous-domaine C2 qui lie les phospholipides acidiques et le calcium (Newton, 1997). La famille des PKC comprend plus de dix isoformes différant par leurs propriétés enzymatiques et leurs caractéristiques d'activation. Les divers sous-types de PKC peuvent être classifiés en trois groupes: les isoformes conventionnelles ou classiques qui dépendent du calcium et des lipides pour leur activation (PKC α , β , et γ), les nouvelles isoformes "calcium independent/lipid dependent" (PKC ϵ , δ , η , et θ), et les isoformes atypiques "calcium independent/lipid independent" (PKC ζ et λ) (Casabona, 1997). Dans la voie classique d'activation de la PKC, la liaison d'un messager extracellulaire à son récepteur membranaire entraîne l'activation de la phospholipase C ou de la phospholipase D induisant l'hydrolyse du phosphatidylinositol et conduisant à la formation d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP $_3$) et de diacylglycérol (DAG) (Bell et Burns, 1991; Gopalakrishna et coll., 1986; Exton, 1990). La liaison subséquente du calcium intracellulaire mobilisé par l'IP $_3$ et du DAG à la PKC entraîne l'activation de l'enzyme et sa translocation dans la fraction membranaire de la cellule (Chang et Beezhold, 1993). La translocation de la PKC n'est pas toujours synonyme d'activation, car certaines isoformes de PKC sont constitutivement présentes dans la fraction non-cytosolique de certaines cellules. Par exemple, la PKC ζ est présente dans les noyaux des cellules nerveuses de rats (Hagiwara et coll., 1990) et la PKC β II a été identifiée dans les noyaux des cellules

leucémiques humaines HL-60 (Fields et Fields, 1991). Toutefois, on ne sait pas encore si les isoformes de la PKC associées constitutivement à la membrane cellulaire sont catalytiquement actives. Par ailleurs, une isoforme spécifique de la PKC peut présenter un profil de translocation variable selon le type cellulaire et l'agent activateur. Par exemple, les esters de phorbol induisent la translocation de la PKC α du cytosol vers l'enveloppe nucléaire dans les cellules NIH-3T3 (Leach et coll., 1989), et vers la membrane plasmique dans les cellules HL60 et les cellules pancréatiques β (Fields et Fields, 1991; Ganessan et coll., 1992).

Nos résultats démontrent clairement que la LPL induit l'activation de la PKC dans les monocytes/macrophages humains (Mamputu et Renier, 1999a). Ces observations suggèrent que l'enzyme puisse agir comme premier messager en se liant à la membrane cellulaire. Les protéines exprimées à la surface des monocytes/macrophages humains susceptibles de lier la LPL sont les protéoglycans incluant les HSPGs et les CSPGs (Edwards et coll., 1995), et le α 2 MR/LRP (Nykjaer et coll., 1993). Bien que les mécanismes responsables de l'activation de la PKC monocyttaire/macrophagique par la LPL ne soient pas connus, deux mécanismes peuvent être proposés. Le premier est que la liaison de la LPL à la membrane plasmique des monocytes/macrophages puisse entraîner l'activation de la phospholipase C et le déclenchement de la cascade aboutissant à l'activation de la PKC. Le deuxième est que la LPL, en hydrolysant les phospholipides membranaires, puisse générer la libération d'acides gras et induire, par ces médiateurs, l'activation de la phospholipase C (Sumida et coll., 1993; Padma et coll., 1999) et celle subséquente de la PKC (Lu et coll., 1997; de Haan et coll., 1997). Pour vérifier l'implication des phospholipides membranaires dans l'induction de l'activation de la PKC par la LPL, l'effet de la LPL sur ce paramètre pourrait être reexaminé après solubilisation membranaire des

monocytes/macrophages avec un détergent. Compte tenu de la contribution des diacylglycérols dans l'activation de la PKC, une autre approche expérimentale consisterait à examiner le métabolisme des diacylglycérols dérivés de l'hydrolyse des phospholipides membranaires. Ceci pourrait se faire par le marquage sélectif de la phosphatidylcholine de la membrane cellulaire (Migas et coll., 1997) et la mesure de la concentration intracellulaire des DG radiomarqués après exposition des cellules à la LPL. Considérant le rôle essentiel de la phospholipase C dans l'activation de la PKC par les acides gras, l'effet de la LPL sur l'activation de la PKC monocyttaire et macrophagique pourrait aussi être évalué en présence ou en l'absence d'inhibiteurs de la phospholipase C.

Les deux principales isoformes de la PKC rencontrées dans les monocytes humains sont les isoformes calcium-dépendantes α et β (Chang et Beezhold, 1993). Ces observations et nos données démontrant que la calphostine C, un inhibiteur de la PKC interagissant avec le domaine de régulation calcium-dépendant de la PKC, inhibe l'activation de la PKC induite par la LPL suggèrent que les isoformes classiques de la PKC puissent être préférentiellement activées dans les monocytes et macrophages humains traités par la LPL. Par ailleurs, nos données démontrant que la redistribution de la PKC vers la fraction membranaire est plus élevée dans les macrophages que dans les monocytes humains, suggèrent que la translocation de la PKC induite par la LPL dans les monocytes/macrophages humains corrèle avec son activation.

L'activation de la PKC est impliquée dans la modulation de l'expression et de la production de plusieurs cytokines, incluant le $\text{TNF}\alpha$, par les monocytes/macrophages activés (Liu et coll., 1994; Bethea et coll., 1992). L'expression du gène du $\text{TNF}\alpha$ est régulée aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel (Shakhov et coll., 1990; Han et coll., 1990). En effet, il a

été démontré que le promoteur du gène codant pour le $\text{TNF}\alpha$ contient des sites de liaison pour les facteurs de transcription tels que l'AP-1 et le $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Rhoades et coll., 1992; Shakov et coll., 1990). En outre, la capacité de divers facteurs à réguler la demi-vie de l'ARNm du $\text{TNF}\alpha$ a été documentée. C'est le cas par exemple de la thalidomide qui, en augmentant la dégradation de l'ARNm monocyttaire du $\text{TNF}\alpha$, réduit la demi-vie de l'ARNm codant pour cette protéine de 30 à environ 17 minutes (Moreira et coll., 1993). Un autre facteur affectant la demi-vie de l'ARNm du $\text{TNF}\alpha$ est la LPS. Cette molécule stimule la synthèse de $\text{TNF}\alpha$ par les monocytes en augmentant la concentration cytoplasmique de l'ARNm, et en induisant la relâche d'une protéine qui, en se liant à l'ARNm du $\text{TNF}\alpha$, augmente la stabilité de ce messenger (Gong et coll., 1991; Willeaume et coll., 1995; Bender et coll., 1993).

Nos données (Mamputu et Renier, 1999a) démontrent que la LPL augmente les niveaux d'ARN messagers du $\text{TNF}\alpha$ et la production de cette cytokine par les monocytes et les MDMs humains, établissant ainsi de manière formelle le rôle de la LPL dans le contrôle de la régulation génique et de l'activation monocyttaire/macrophagique. D'une manière intéressante, nous avons aussi mis en évidence que le processus de différenciation des monocytes en macrophages s'accompagne d'une capacité de réponse accrue à la LPL tel que démontré par la stimulation plus prononcée de la production du $\text{TNF}\alpha$ par la LPL dans les cellules macrophagiques que dans les cellules monocytaires. L'importance potentielle de la PKC dans le contrôle de la régulation du $\text{TNF}\alpha$ par la LPL est soulignée dans notre étude par le parallélisme étroit existant entre la redistribution de la PKC, son activation et la sécrétion de $\text{TNF}\alpha$ dans les monocytes/macrophages humains traités par la LPL. En accord avec les données générées par Renier et coll. (1994a, 1994b) dans une lignée macrophagique murine, nous avons démontré l'implication de la PKC dans l'effet

de la LPL sur l'expression et la production de $\text{TNF}\alpha$ par les monocytes et macrophages humains. Étant donné les limites spécifiques de chaque méthode communément employée pour étudier la PKC, deux approches complémentaires, à savoir l'inhibition pharmacologique de la PKC et la déplétion intracellulaire en PKC par le PMA, ont été utilisées pour démontrer ce point (Mamputu et Renier, 1999a).

Il a été rapporté par Renier et coll. (1994a) que la LPL augmente les niveaux d'ARNm et la stabilité de l'ARNm codant pour le $\text{TNF}\alpha$ dans les macrophages murins. Prises dans leur ensemble, ces données indiquent que la LPL augmente l'expression du $\text{TNF}\alpha$ dans les macrophages murins par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. Bien que la quantité limitée de monocytes obtenus à partir de cellules sanguines périphériques mononucléées humaines ne nous ait pas permis de déterminer l'effet de la LPL sur les niveaux de synthèse de novo et la stabilité de l'ARNm du $\text{TNF}\alpha$, nos résultats démontrant une induction de l'expression génique du $\text{TNF}\alpha$ dans les cellules monocytaires traitées par la LPL suggèrent que les mêmes mécanismes puissent être responsables de l'effet stimulant de la LPL sur la production de $\text{TNF}\alpha$ dans les monocytes et MDMs humains.

La capacité de la LPL à stimuler la migration et la liaison d'un membre de la famille du $\text{NF-}\kappa\text{B}$ au promoteur du gène du $\text{TNF}\alpha$ a été précédemment documentée (Renier et coll., 1994a). Le facteur de transcription $\text{NF-}\kappa\text{B}$ contrôle l'expression de gènes codant pour plusieurs substances incluant les cytokines (Wadsworth et Koop, 1999; Kurokouchi et coll., 1998; Kalogeris et coll., 1999), les facteurs de croissance (Yermeni et coll., 1999), et les molécules d'adhésion (Rahman et coll., 1998; Ray et coll., 1997). L'activation excessive du $\text{NF-}\kappa\text{B}$ a été documentée lors de

l'inflammation associée au choc septique (Mukaida et coll., 1996) et à l'athérosclérose (Ricote et coll., 1998; Kranzhofer et coll., 1999; Erl et coll., 1999). Partant de ces observations, il est tentant de suggérer que la LPL puisse, en activant le facteur de transcription NF- κ B, stimuler l'expression de diverses autres molécules inflammatoires et puisse, ce faisant, amplifier la réaction inflammatoire, caractérisant le processus athéromateux.

Tel que mentionné précédemment, le phénomène de différenciation des monocytes humains en MDMs est associé à une augmentation de la liaison de la LPL à la surface cellulaire (Edwards et coll., 1995) attribuable à l'accroissement d'expression des HSPGs et à la production de CSPGs à la surface macrophagique. Nos résultats (Mamputu et Renier, 1999a) démontrant que le traitement des monocytes à l'héparinase inhibe la sécrétion de TNF α induite par la LPL indiquent clairement que la liaison de la LPL aux HSPGs exprimés à la surface des monocytes est requise pour son effet sur la production de TNF α . A l'opposé, l'absence d'effet de l'héparinase sur la sécrétion stimulée de TNF α macrophagique par la LPL mais sa suppression par la chondroitinase indiquent que les CSPGs exprimés à la surface des MDMs humains médient l'induction de la production de TNF α par la LPL. Puisque l'expression des CSPGs à la surface des MDMs humains est associée à une augmentation de liaison de la LPL à ces cellules (Edwards et coll., 1995), nos résultats suggèrent que les changements dans la capacité de liaison de la LPL survenant au cours du processus de différenciation des monocytes humains en macrophages puissent être responsables de la sensibilité accrue des MDMs à la LPL.

Les MDMs et les CMLs représentent les sources majeures de sécrétion de la LPL dans la lésion athéromateuse humaine (Yla-Herttuala et coll., 1991; O'Brien et coll., 1992).

L'accumulation des MDMs et la prolifération des CMLs pendant la formation et le développement de l'athérosclérose suggèrent la présence de niveaux élevés de LPL dans la paroi artérielle athéromateuse. Nos résultats (Mamputu et Renier, 1999a) démontrant l'effet stimulant *in vitro* de la LPL sur la production de TNF α monocytaire/macrophagique suggèrent que l'enzyme puisse activer les monocytes nouvellement recrutés dans la paroi artérielle et stimuler, de manière autocrine, les macrophages présents dans la lésion. Cette action de la LPL sur les monocytes et les MDMs pourrait contribuer aux niveaux élevés de TNF α rencontrés dans la lésion athéromateuse humaine. De multiples propriétés pro-athérogéniques du TNF α ont été décrites dans la littérature. Par exemple, il a été démontré que le TNF α induit l'expression de molécules d'adhésion (Osborn et coll., 1989; Bevilacqua et coll., 1987), stimule l'adhésion des leukocytes aux cellules endothéliales (Cavender et coll., 1987) et leur chimiotaxie (Ming et coll., 1987). Le TNF α stimule aussi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Leibovich et coll., 1987) et la nécrose hémorragique (Watanabe et coll., 1988), deux caractéristiques essentielles de la lésion athéromateuse en progression. De plus, le TNF α induit une activité procoagulante similaire à celle du facteur tissulaire et supprime les propriétés anticoagulantes des cellules endothéliales (Bevilacqua et coll., 1986). Enfin, plusieurs études ont démontré que le TNF α stimule la migration et la prolifération des CMLs (Mattana et coll., 1997; Tanaka et coll., 1996; Jovinge et coll., 1997; Lei et Buja, 1996). Le TNF α étant un facteur proathérogénique, nous proposons que la production accrue de cette cytokine en réponse à la LPL puisse contribuer au développement et à la progression de l'athérosclérose.

Alors que nous avons démontré un effet stimulant de la LPL sur la production monocytaire/macrophagique du TNF α , il est important de souligner le fait que d'autres chercheurs ont mis clairement en évidence un effet inhibiteur du TNF α sur la sécrétion et l'activité de la LPL

adipocytaire (Kern et coll., 1997; Kern et coll., 1995; Fried et Zechner, 1989). Ces données suggèrent donc l'existence possible d'un mécanisme d'inhibition rétroactive de la sécrétion macrophagique de la LPL par le $\text{TNF}\alpha$. Contrairement à l'effet inhibiteur du $\text{TNF}\alpha$ sur la sécrétion et l'activité de la LPL adipocytaire (Tengku-Muhammad, 1996; Tengku-Muhammad, 1998), les données actuellement disponibles dans la littérature ne semblent pas indiquer d'effet inhibiteur de cette cytokine sur la sécrétion et l'activité de la LPL macrophagique dans les MDMs humains. (Sartippour et coll., 1998; White et coll., 1988; Friedman et coll., 1988). Les effets différentiels du $\text{TNF}\alpha$ sur la LPL adipocytaire et macrophagique illustrent très bien la régulation cellulaire spécifique de cette enzyme.

III.3. Rôle de la LPL dans la prolifération des CMLs vasculaires

Par son activité hydrolytique sur les lipoprotéines riches en triglycérides, la LPL stimule la relâche d'AGLs. Les VLDL et les résidus de VLDL étant présents dans la lésion athéromateuse humaine (Rapp et coll., 1994), une quantité importante d'AGLs est susceptible d'être générée dans la paroi artérielle par l'effet hydrolytique de la LPL sécrétée dans la lésion athéromateuse. Le rôle déterminant des AGLs dans le contrôle de la prolifération des CMLs est bien démontré. En effet, les AGLs inhibent la communication intercellulaire entre les CMLs (de Haan et coll., 1994), et certains d'entre eux, incluant les acides oléique, linoléique et arachidonique, induisent directement la prolifération des CMLs (de Haan, 1997; Lu, 1996; Morisaki et coll., 1983). Ces observations suggèrent que la production d'AGLs dans la paroi artérielle puisse, en stimulant la prolifération des CMLs, contribuer au remodelage vasculaire associé à l'athérogenèse.

À la lumière des données démontrant un effet des AGLs sur la croissance des CMLs (Morisaki et coll., 1983; de Han et coll., 1994; Lu et coll., 1996), nous avons dans un premier temps testé la possibilité que la LPL puisse stimuler la prolifération des CMLs par son action lipolytique sur les lipoprotéines riches en triglycérides. Pour ce faire, des CMLs ont été traitées avec de la LPL en présence ou en absence de lipoprotéines exogènes. Alors que nos données (Mamputu et Renier, 1999b) indiquent un effet stimulant direct de la LPL sur la croissance des CMLs, cet effet n'a pu être majoré par la présence de VLDL dans le milieu de culture des CMLs. Cette observation suggère que, dans nos conditions expérimentales, les produits lipolytiques dérivés des triglycérides ne sont pas requis pour la prolifération des CMLs induite par la LPL. Par ailleurs, nos résultats démontrant que l'inactivation de la LPL par la chaleur ou par immunoneutralisation supprime l'effet de la LPL sur la prolifération des CMLs indiquent que l'activité lipasique joue un rôle important dans l'effet de l'enzyme sur la prolifération des CMLs. L'importance de l'activité lipasique dans l'effet stimulant de la LPL sur la prolifération cellulaire est également démontrée par nos résultats indiquant que la pancréatique lipase, un membre de la famille des lipases, stimule effectivement la prolifération des CMLs. Il est donc possible que la LPL puisse exercer son effet en hydrolysant un autre substrat tels les phospholipides membranaires. Puisque la LPL a été isolée du lait bovin par chromatographie d'affinité sur une colonne d'héparine-sépharose, nous avons examiné la possibilité que l'effet de la LPL sur la prolifération des CMLs soit due à des facteurs de croissance se liant à l'héparine présents dans le lait et pouvant par conséquent contaminer notre préparation de LPL. Nos données (Mamputu et Renier, 1999b) démontrent l'absence de facteurs de croissance mitogéniques pour les CMLs dans notre préparation de LPL. Ces résultats et ceux générés par l'immunoneutralisation des facteurs de croissance liant l'héparine dans la préparation de LPL supportent le rôle majeur de l'enzyme dans la stimulation de la prolifération des CMLs. Enfin, nos

données démontrant l'inhibition de la prolifération des CMLs par l'anticorps monoclonal 5D2 indiquent clairement la spécificité de la LPL dans la réponse proliférative des CMLs.

Nos résultats montrant que le traitement des CMLs à l'héparinase abolit la prolifération des CMLs induite par la LPL suggèrent que les HSPGs présent à la surface des CMLs sont indispensables pour l'effet de la LPL sur la prolifération cellulaire. Il est possible, tel que démontré pour certains facteurs de croissance incluant le "fibroblast growth factor-2" (FGF-2) et le PDGF (Molteni et coll., 1999; Choy et coll., 1996; Silver et coll., 1998), que les HSPGs puissent agir comme co-récepteurs dans l'effet stimulant de la LPL sur la prolifération des CMLs.

Considérant que les MDMs sécrètent constitutivement la LPL, nous avons testé la possibilité que le milieu conditionné des MDMs puisse stimuler la prolifération des CMLs. Nos données (Mamputu et Renier, 1999b) indiquent que le surnageant des MDMs induit de manière significative la prolifération des CMLs. Toutefois, nos résultats démontrant que l'immunoneutralisation de la LPL n'affecte pas l'effet du milieu conditionné des MDMs sur la prolifération des CMLs suggèrent que l'enzyme n'est pas impliquée dans cet effet. Une preuve additionnelle de la non-implication de la LPL dans l'effet du milieu conditionné des MDMs est fournie par nos résultats montrant que l'addition de LPL exogène, à la concentration rencontrée dans le milieu de culture des MDMs, ne stimule pas la prolifération des CMLs. Cette observation suscite la question de savoir la masse minimale de LPL requise pour stimuler la prolifération des CMLs. Les travaux effectués dans notre laboratoire ont démontré que la LPL à 500 ng/ml stimule la prolifération des CMLs (Mamputu et Renier, données non publiées). La possibilité qu'il existe un seuil d'activation inférieur à cette concentration n'a toutefois pas été déterminée.

Les voies de signalisation médiant la prolifération des CMLs en réponse aux AGLs impliquent l'activation de la PKC (Lu, 1996). Le rôle de la PKC dans la médiation de la prolifération des CMLs vasculaires en réponse à plusieurs stimuli est bien documenté. Natarajan et coll. (1992) ont rapporté que l'effet stimulant de l'hyperglycémie sur la prolifération des CMLs est associé à une augmentation de l'activité de la PKC. L'activation de la PKC- δ a été mise en évidence dans l'effet du PDGF et de l'endothéline-1 sur l'activité mitogénique des CMLs (Assender et coll., 1996). Alors que les inhibiteurs de la PKC inhibent la prolifération des CMLs induite par divers agents, l'activité inhibitrice de l'héparine et de l'alpha-tocophérol est associée à leur capacité d'inhiber la voie de signalisation intracellulaire médiée par la PKC (Herbert et coll., 1996; Azzi et coll., 1997). Les AGLs semblent activer la PKC en l'absence de DAG et de toute augmentation apparente de calcium intracellulaire et semblent activer préférentiellement les isoformes de la PKC ne dépendant pas du calcium et peut-être certaines isoformes atypiques de la PKC (Lu et coll., 1997).

En 1997, Migas et coll. ont démontré que la phospholipase C bactérienne, une enzyme compétitionnant avec la LPL pour la liaison aux CMLs, active la PKC- ϵ dans les CMLs. Partant de ces observations et de nos données antérieures (Mamputu et Renier, 1999a) qui indiquaient un effet stimulant de la LPL sur l'activation de la PKC dans les macrophages humains, nous avons examiné la possibilité que la LPL puisse stimuler la prolifération des CMLs vasculaires en activant la PKC. Nos résultats (Mamputu et Renier, 1999b) démontrent que la LPL stimule *in vitro* la prolifération des CMLs humaines en activant la PKC. L'implication de la PKC dans la stimulation de la prolifération des CMLs est renforcée par nos données démontrant que l'inhibition pharmacologique de la PKC par deux inhibiteurs spécifiques, la calphostine C et la chelerythrine, abolissent complètement la stimulation de la prolifération des CMLs induite par la LPL. Les isoformes α , β I,

β II, δ , et ϵ de la PKC ont été identifiées dans les CMLs vasculaires (Grange et coll., 1998). Il a été rapporté que les isoformes α et β I sont localisées principalement dans la fraction soluble de la cellule et migrent dans la fraction membranaire après stimulation par les esters de phorbol, alors que les isoformes δ et ϵ sont localisées essentiellement dans la fraction membranaire. Nos résultats (Mamputu et Renier, 1999b) démontrant que la LPL induit la translocation de la PKC du cytosol vers la fraction membranaire suggèrent que la prolifération des CMLs induite par la LPL puisse impliquer la translocation des isoformes calcium-dépendantes α et β I. Cette possibilité est supportée par nos données démontrant que la calphostine C, qui interagit avec le domaine calcium-dépendant de régulation de la PKC, inhibe la prolifération des CMLs induite par la LPL.

Bien que nos données indiquent un effet stimulant de la LPL sur la prolifération des CMLs, la pertinence biologique de nos observations demeure incertaine, vu l'absence de données sur la quantité de LPL produite dans la lésion athéromateuse. Tel que suggéré précédemment, nous ne pouvons toutefois exclure que l'accumulation des MDMs et des CMLs dans l'intima de la paroi artérielle ne puisse générer une quantité suffisante de LPL pour stimuler la prolifération des CMLs. Bien que la littérature ne rapporte aucune étude sur le rôle de la LPL dans la prolifération des CMLs, une publication récente par De Sanctis et coll.(1996) a rapporté un effet stimulant de la LPL sur la prolifération des cellules NK "natural killer cells". Ces auteurs ont démontré que la LPL exerce son effet en se liant à la membrane cellulaire et en induisant la translocation de la PKC du cytosol vers la membrane plasmique. Couplées aux nôtres, ces dernières observations semblent suggérer une nouvelle fonction de la LPL, celle d'agir en tant que facteur de croissance.

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

IV.1. Conclusions

Les résultats de nos études démontrent que la LPL 1) augmente l'adhésion des monocytes humains aux cellules endothéliales; 2) agit comme une molécule de signalisation capable d'induire l'activation des monocytes/macrophages humains et 3) stimule la prolifération des CMLs vasculaires humaines.

Bien que ces données *in vitro* démontrent de nouvelles propriétés de la LPL susceptibles de contribuer au développement et à la progression de l'athérosclérose, des essais d'intervention *in vivo* s'avèrent nécessaires pour démontrer la pertinence biologique de nos observations.

IV.2. Perspectives

Les évidences accumulées à ce jour suggèrent que la LPL puisse exercer un rôle périphérique anti-athérogénique mais un rôle pro-athérogénique dans la paroi vasculaire. Il est donc essentiel que toutes interventions visant à contrecarrer les effets de la LPL dans la paroi vasculaire tiennent compte du double effet de cette enzyme. À la lumière des données rapportées dans le présent travail, plusieurs interventions visant à réduire les effets pro-athérogéniques de la LPL dans la paroi vasculaire pourraient être envisagées. Compte tenu du rôle potentiellement anti-athérogénique de la LPL en périphérie, l'utilisation systémique d'anticorps monoclonaux contre la LPL dans le but de réduire l'effet stimulant de cette enzyme sur l'adhésion des monocytes au niveau de la macro-vasculature semble devoir être prohibée. Il est à noter que ce type d'intervention risquerait en outre de s'avérer totalement inefficace vu la multitude de mécanismes moléculaires et cellulaires régissant la liaison des monocytes à l'endothélium. Partant de ce fait, il est clair que d'autres stratégies visant à inhiber l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire au stade

précoce de l'athérogenèse doivent être envisagées. À ce titre, l'utilisation d'anticorps contre les molécules d'adhésion exprimés soit à la surface monocytaire soit à la surface endothéliale pourrait s'avérer efficace pour réduire le recrutement des cellules inflammatoires dans la paroi vasculaire. À ce propos, une étude réalisée chez le lapin a démontré une inhibition partielle de l'accumulation des leucocytes dans la paroi artérielle après administration d'anticorps anti-CD18 (Kling et coll., 1992). L'utilisation de drogues, telles les antioxydants ou les PPAR γ ligands, susceptibles de moduler l'expression de molécules d'adhésion pourrait aussi limiter l'infiltration des monocytes dans la paroi artérielle. Ces drogues devraient posséder une action vasculaire spécifique, ne pas augmenter la production de LPL macrophagique, ni induire d'autres facteurs proathérogéniques. L'utilisation de la dexaméthasone, par exemple, serait contre-indiquée car, tout en supprimant l'expression de la E-selectine par les cellules endothéliales (Brostjan et coll., 1997), elle entraînerait simultanément une augmentation de la sécrétion et de l'activité de la LPL par les monocytes/macrophages humains. En raison de leurs propriétés inhibitrices sur l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (De Caterina et coll., 1994), l'utilisation de nutriments tels les acides ω -3 peut aussi être envisagée. L'utilisation de ces AGPI n-3 serait particulièrement bénéfique pour l'organisme car ils pourraient tant contribuer à l'augmentation de l'activité de la LPL plasmatique (Harris et coll., 1997; Zampelas et coll., 1994) qu'à la diminution de la sécrétion macrophagique de LPL et d'autres cytokines (Renier et coll., 1993). Malgré le rôle crucial de l'adhésion monocytaire à l'endothélium dans la pathogenèse de l'athérosclérose, certaines données in vivo relatives au taux de recrutement des monocytes au cours du processus athéromateux ainsi qu'à l'importance relative de diverses sélectines et intégrines sont encore manquantes. De ces données, il apparaît que seule une meilleure connaissance de ces

mécanismes nous permettra de développer dans les années futures de nouvelles stratégies susceptibles de réduire la liaison monocytaire à l'endothélium vasculaire.

D'autres approches envisageables pour prévenir ou ralentir le développement de l'athérosclérose incluent l'inhibition de l'activation des monocytes/macrophages et de la prolifération des CMLs. Nos données démontrant *in vitro* un rôle de la LPL dans l'activation des cellules macrophagiques et dans la prolifération des CMLs suggèrent l'utilité potentielle de certaines stratégies visant à bloquer l'effet de l'enzyme. Premièrement, l'incorporation d'oligonucléotides anti-sens dans la paroi artérielle pourrait permettre l'inhibition sélective de la synthèse de la LPL par les macrophages et les CMLs. Pour ne pas compromettre la synthèse de la LPL par les autres cellules incluant les adipocytes, une attention particulière devra être accordée à la rétention de ces oligonucléotides dans la paroi vasculaire. Deuxièmement, l'inhibition pharmacologique des mécanismes de signalisation intracellulaire impliqués dans l'effet de la LPL sur l'induction de la production de cytokines et la prolifération des CMLs pourrait contribuer à la réduction de l'effet de la LPL sur la progression de l'athérosclérose. À ce propos, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ou d'oligonucléotides anti-sens de la PKC ciblant les monocytes/macrophages pourrait être envisagée après détermination du type d'isoforme impliqué dans cet effet. Considérant l'aspect multifactoriel de la maladie athéromateuse et la multitude de facteurs génétiques et environnementaux impliqués dans ce processus pathologique, il est évident qu'une stratégie visant un seul facteur, en l'occurrence la LPL, ne peut prétendre à démontrer des effets protecteurs significatifs sur le processus athérogénique. A ce point de vue, nous pensons qu'une approche de type préventive visant à réduire les facteurs de risque par modification de nos habitudes de vie reste encore aujourd'hui la meilleure et la première stratégie à développer dans le combat contre les MCV.

V. RÉFÉRENCES

Adams MR, Jessup W, Hailstones D, Celermajer DS. L-Arginine reduces human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial expression of cell adhesion molecules. *Circulation*. 1997;95:662-668.

Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic S, Clinton S, Brinckerhoff C, Sukhova G, Libby P. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation*. 1998;83:1015-1026.

Ailhaut G, Amri E-Z, Etienne J, Negrel R, Vannier C. Development and maturation of lipoprotein lipase in cultured adipose cells. In: NATO life science series A. Vol. 116. Dreyfus H, Gatt s, Massarelli R, Freyszyl L, eds. Enzymes of lipid metabolism I. New York, Plenum Press;1986:485-492.

Alexander NJ, Smythe NL. Dietary modulation of in vitro lymphocyte function. *Ann Nutr Metab*. 1988;32:192-199.

Al-Humidam A, Edwards CK, Al-Sofia A, Dzimir M, Al-Sedairy ST, Khabar KSA. A carboxylic nucleoside analogue is a TNF-alpha inhibitor with immunosuppressive action: role of prostaglandin E2 and protein kinase C and comparison with pentoxifylline. *Cell Immunol*. 1998;188:12-18.

Allen S, Khan S, Al-Mohanna F, Batten P, Yacoub M. Native low density lipoprotein-induced calcium transients trigger VCAM-1 and E-selectin expression in cultured human vascular cells. *J Clin Invest*. 1998;101 :1064-1075.

Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*. 1991;11:745-750.

Anitschkow N, Chalатов S. Über experimentelle Cholesterinsteatose und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Centralbl Allg Path v Anat.* 1913;24:1.

Appel B, Fried SK. Effects of insulin and demethasone on lipoprotein lipase in human adipose tissue. *Am J Physiol.* 1992;262:E695-E699.

Argraves KM, Battley FD, MacCalman CD, McCrae KR, Gafvels M, Kozarsky KF, Chappell DA, Strauss 3rd JF, Strickland DK. The very low density lipoprotein receptor mediates the cellular catabolism of lipoprotein lipase and urokinase-plasminogen activator inhibitor type I complexes. *J Biol Chem.* 1995;270:26550-26557.

Armstrong VW, Cremer P, Eberle E, Schulze F, Wieland H, Kreuzer H, Seidel D. The association between serum Lp(a) concentrations and angiographically assessed coronary atherosclerosis. Dependence on serum levels. *Atherosclerosis* 1986;62:249-257.

Ashby P, Bennet DP, Spencer IM, Robinson DS. Post-translational regulation of lipoprotein lipase activity in adipose tissue. *Biochem J.* 1978;176:865-872.

Assender JW, Irenius E, Fredholm BB. Endothelin-1 causes a prolonged protein kinase C activation and acts as a co-mitogen in vascular smooth muscle cells. *Acta Physiol Scand.* 1996;157:451-460.

Auebarch BJ, Bisgaier CL, Wölle J, Saxena U. Oxidation of low density lipoproteins greatly enhances their association with lipoprotein lipase anchored to endothelial cell matrix. *J Biol Chem.* 1996;271:1329-1335.

Austin MA and JE Hokanson. The epidemiological case for triglyceride as a risk factor for cardiovascular disease. In : Jacobot B, Mathé D, Fruchart J-C, eds. *Atherosclerosis XI* 1998 :591-598.

Austin MA. Plasma triglycerides and coronary heart disease. *Atheroscler Thromb*. 1991;11 :2-14.

Autio I, Jaakkola O, Solakivi T, Nikkari T. Oxidized low-density lipoprotein is chemotactic for arterial smooth muscle cells in culture. *FEBS Lett*. 1990;277:247-249.

Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K. Lipoprotéine lipase: recent contributions from molecular biology. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1992;29:243-268.

Auwerx JH, Deeb S, Brunzell JD, Wolfbauer G, Chait A. Lipoprotein lipase gene expression in THP-1 cells. *Biochemistry*. 1989;28:4563-4567.

Aviram M, Bierman EL, Chait A. Modification of low density lipoprotein by lipoprotein lipase or hepatic lipase induces enhanced uptake and cholesterol accumulation in cells. *J Biol Chem*. 1988;263:15416-15422.

Aviram M. Modified forms of low density lipoprotein and atherogenesis. *Atherosclerosis* 1993;98:1-9.

Azzi A, Boscoboinik D, Clement S, marilly D, Ozer NK, Ricciarelli R, Tasinato A. Alpha tocopherol as a modulator of smooth muscle cell proliferation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1997;57:507-514.

Babirak S, Brown BG, Brunzell JD. Familial combined hyperlipidemia and abnormal lipoprotein lipase. 1992; *Arterioscler Thromb*. 1992;12:1176-1183.

Babirak S, Iverius PH, Fujimoto WY, Brunzell JD. Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis*. 1989;9:326-334.

Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1993;87 :3-16.

Bakouche O, Moreau JL, Lachman LB. Secretion of IL-1. Role of protein kinase C. *J Immunol*. 1992;148:84-91.

Barbir M, Wile D, Trayner I, Aber VR, Thompson GR. High prevalence of hyperglyceridaemia and apolipoprotein abnormalities in coronary artery disease. *Br Heart J*. 1988;60 :397-403.

Barcellini-Couget S, Pradiness-Figueres A, Roux P, Dani C, Ailhaud G. *Endocrinology*. 1993;132:53-60.

Barnes MJ, Knight CG, Farndale RW. Collagens and atherosclerosis: cell-collagen interaction. In : Jacobot B, Mathé D, Fruchart J-C , eds. *Atherosclerosis XI*. 1998:299-306.

Barter PJ, Rye K-A. High-density lipoproteins and coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 1996;121 :1-12.

Bates SR, Murphy PL, Feng Z, Kanazawa T, Getz GS. Very low density lipoproteins promote triglyceride accumulation in macrophages. *Arteriosclerosis* 1984;4:103-114.

Baumberger C, Ueevitch RJ, Dayer DM. Modulation of endotoxic activity of lipopolysaccharide by high-density lipoprotein. *Pathobiology*. 1991;59 :378-383.

- Behr SR, Kraemer FB. Regulation of the secretion of lipoprotein lipase by mouse macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1986;889:346-354.
- Beisiegel U, Heeren J. Lipoprotein lipase targeting of lipoproteins to receptors. *Proc Nutr Soc*. 1997;56:731-737.
- Beisiegel U, Krapp A, Weber W, Olivecrona G. The role of alpha 2M receptor/LRP in chylomicron remnant metabolism. *Ann NY Acad Sci*. 1994;737:53-69.
- Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:8342-8346.
- Bell RM, Burns DJ. Lipid activation of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1991;266:4661-4664.
- Bender A, Srenger H, Gong JH, Henke A, Bolte G, Spengler HP, Naim M, Gemsa D. The potential effect of LPS on tumor necrosis factor-alpha production by influenza A virus-infected macrophages. *Immunobiology*. 1993;187:353-371.
- Benlian P, De Gennes JL, Foubert L, Zhang H, Gagné SE, Hayden M. Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. *N Engl J Med*. 1996;335:848-854.
- Bensadoun A. Lipoprotein lipase. *Ann Rev Nutr*. 1991;11:217-237.
- Ben-Zeev O, Doolittle MH, Singh N, Chang CH, Schotz MC. Synthesis and regulation of lipoprotein lipase in the hippocampus. *J Lipid Res*. 1990;31:1307-1313.

- Ben-Zeev O, Stahnke G, Liu G, Davis RC, Doolittle MH. Lipoprotein lipase and hepatic lipase: the role of asparagine-linked glycosylation in the expression of a functional enzyme. *J Lipid Res.* 1994;35:2049-2059.
- Berger A, German JB, Chiang BL, Ansari AA, Keen CL, Fletcher MB, Gershwin E. Influence of feeding unsaturated fats on growth and immune status of mice. *J Nutr.* 1993;123:225-233.
- Bergeron J, Normand T, Bharucha A, Murthy MRV, Julien P, Gagné C, Dionne C, De Braekeleer M, Brun D, Hayden MR, Lupien PJ. Prevalence, geographical distribution and genealogical investigations of mutation 188 of lipoprotein lipase gene in the French canadian population of Quebec. *Clin Genet.* 1992;41:206-210.
- Bethea JR, Gillespie GY, Benveniste EN. Interleukin-1 beta induction of TNF-alpha gene expression: involvement of protein kinase C. *J Cell Physiol.* 1992;152:264-273.
- Betteridge DJ, Bhatnager D, Bing RF, Durrington PN, Evans GR, Flax H, Jay RH, Lewis-Barned N, Mann J, Matthews RD, et al. Treatment of familial hypercholesterolemia. United Kingdom lipid clinics study of pravastatin and cholestyramine. *B M J.* 1992;304 :1335-1338.
- Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest.* 1983;91:379-387.
- Bevilacqua MP, Pober JS, Mendric DL, Cotran RS. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1987;84:9238-9242.
- Billiar T, Bankey P, Svinger B, Curran RD, West MA, Holman RT, Simmons RL, Cerra FB. Fatty acid uptake and Kupffer cell function: fish oil alters eicosanoid and monokine production to endotoxin stimulation. *Surgery.* 1988;104:343-349.

- Blankenhorn DH, Nessim SA, Johnson RL, Sanmarco ME, Azen SP, Cashin-Hemphill L. Beneficial effects of combined colestipolnicotin therapy on coronary atherosclerosis and coronary venous bypass grafts. *JAMA*. 1987;257:3233-3240.
- Bobryshev YV, Lord RSA, Rainer S, Jamal OS, Munro VF. Vascular dendritic cells and atherosclerosis. *Pathol Res Pract*. 1996;192:462-467.
- Bobryshev YV, Lord RSA. Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions. *Cardiovasc Res*. 1998;37:799-810.
- Bobryshev YV, Lord RSA. S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions. *Cardiovasc Res*. 1995;29:689-696.
- Bonanome A, Visona A, Lusiani L, beltramello G, Confortin L, Biffanti S, Sorgato F, Costa F, Pagnan A. carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: effect of a low fat, high carbohydrate diet versus a diet high in monounsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr*. 1991;54:586-590.
- Borén J, Olin K, Lee I, Chait A, Wight T, Innearity TL. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest*. 1998;101:2658-2664.
- Borgström B. Mode of action of tetrahydrolistatin: a derivative of the naturally occurring lipase inhibitor lipstatin. *Biochim Biophys Acta*. 1988;962:308.

Boulanger CM, Tanner FC, Béa ML, Hahn AWA, Werner A, Lüscher TF. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res.* 1992;70:1191-1197.

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

Boutard V, Fouquery B, Philippe C, Perez J, Baud L. Fish oil supplementation and essential fatty acids deficiency reduce nitric oxide synthesis by rat macrophages. *Kidney.* 1994;46:1280-1286.

Brannon PM, Cheung AH, Bensadoun A. Synthesis of lipoprotein lipase in cultured avian granulosa cells. *Biochem Biophys Acta.* 1978;531:96-108.

Brattström L, Israelsson B, Lindgarde F, Hultberg B. Higher total plasma homocysteine in vitamine B₁₂ deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Metabolism.* 1988;37 :175-178.

Brault D, Noe L, Etienne J, Hamelin J, Raissonier A, Souli A, Chuat J.-C, Dugail I, Quignard-Boulangé A, Lavau M, Galibert F. Sequence of rat lipoprotein lipase-encoding cDNA. *Gene.* 1992;121:237-246.

Braun JEA, Severson DL. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J.* 1992;287:337-347.

Brenner RR. Effects of unsaturated fatty acids on membrane structure and enzyme kinetics. *Progress in Lipid Research.* 1984;23:69-96.

Brostjan C, Anrather J, Csizmadia V, Natarajan G, Winkler H. Glucocorticoids inhibit E-selectin expression by targeting NF-kB and not ATF/c-june. *The journal of Immunology*. 1997;158:3836-3844.

Brought KS, Whelan J, Hardadottir I, Kinsella JE. Effect of increasing the dietary (n-3) to (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio on murine liver and peritoneal cell fatty acids and eicosanoid formation. *J Nutr*. 1991;121:155-164.

Brown BG, Zhao XQ, Sacco DE, Albers JJ. Lipid lowering and plaque regression; new insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation*. 1993;87 :1781-1791.

Brown G, Albers JJ, Fisher LD, Schaeffer SM, Lin JT, Kaplan C, Zhao XQ, Bisson BD, Fritzpatrick VF, Dodge MT. Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *New Engl J Med*. 1990;323:1289-1298.

Brunzell JD, Hazzard WR, Porte Jr D, Bierman EL. Evidence for a common, saturable, triglyceride removal mechanism for chylomicrons and very low density lipoproteins in man. *J Clin Invest*. 1973;52:1578-1585.

Brunzell JD. Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. In: *The metabolic basis of inherited disease* 7th ed. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, eds. McGraw-Hill, New York;1995:1913-1932.

Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res*. 1996;33 :181-194.

- Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition : Three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*. 1991 ;67 :1033-1036.
- Cader AA, Butterfield DA, Watkins BA, Chung BH, Hennig B. Electron spin resonance studies of fatty acid-induced alterations in membrane fluidity in cultured endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 1995;27:665-673.
- Calder PC. Dietary fatty acids and the immune system. *Nutr Rev*. 1998;S70-S83.
- Camejo G, Hurt-Camejo E, Bondjers G. Effect of proteoglycans on lipoprotein-cell interactions: possible contribution to atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1990;1:431-436.
- Camejo G, Hurt-Camejo E, Olsson U, Bondjers G. Proteoglycans and lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1993;4:385-391.
- Campbell GR, Campbell JH, Manderson JA, Horrigan S, Rennick RE. Arterial smooth muscle. *Arch Path Lab Med*. 1988;112 :977-988.
- Campbell JH, Campbell GR. Cell biology of atherosclerosis. *J Hypertens*. 1994;12 :S129-S132.
- Campbell LA, O'Brien ER, Cappuccio AL, Kuo CC, Wang SP, Steward D, Patton DL, Cummings PK, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* TWAR in human coronary atherectomy tissues. *J Infect Dis*. 1995;172:585-588.
- Campos H, Dreon DM, Krauss RM. Associations of hepatic and lipoprotein lipase activities with changes in dietary composition and low density lipoprotein subclasses. *J Lipid Res*. 1995;36:462-472.

Camps L, Reina M, Llobera M, Vilaró S, Olivecrona T. Lipoprotein lipase: cell origin and functional distribution. *Am J Physiol*. 1990;258:C673-C681.

Cannon RO 3rd. Potential mechanisms for the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on endothelial dysfunction : the role of nitric oxide. *Am J Cardiol*. 1998;82 :5S-10S.

Capers Q 4th, Alexander RW, Lou P, DeLeon H, Wicox JN, Ishizaka N, Howard AB, Taylor WR. Monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues of hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30 :1397-1402.

Carrero P, Gomez-Coronado D, Olivecrona G, Lasuncion MA. Binding of lipoprotein lipase to apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1299:198-206.

Casabona G. Intracellular signal modulation: a pivotal role for protein kinase C. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat*. 1997;21:407-425.

Castelli WP, Levy D, Wilson PW, Anderson K, Sanders M. Sudden death: the view from Framingham. In: the prevention of sudden cardiac death. Kostis JB, Sanders M, eds. Wiley Liss, New York;1990:1-12.

Cathcart ES, Leslie CA, Meydani SN, et al. A fish oil diet retards experimental amyloidosis, modulates lymphocyte function and decreases macrophage arachidonate metabolism in mice. *J Immunol*. 1987;139:1850-1854.

Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetables oil or fish oil. *Am J Clin Nutr*. 1996;63:116-122.

Chaet MS, Garcia VF, Arya G, Ziegler MM. Dietary fish oil enhances macrophage production of nitric oxide. *J Surg Res.* 1994;57:65-68.

Chait A, Iverius P-H, Brunzell JD. Lipoprotein lipase secretion by human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest.* 1982;69:490-493.

Chajek-Shaul T, Friedman G, Stein O, Etienne J, Stein Y. Endogenous plasma lipoprotein lipase activity in fed and fasting rats may reflect the functional pool of endothelial lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta.* 1985;837:271-278.

Chajek-Shaul T, Halimi O, Ben-Naim M, Stein O, Stein Y. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C releases lipoprotein lipase from heparin releasable pool in rat heart cell cultures. *Biochim Biophys Acta.* 1989;1014:178-183.

Chan BL, Lisanti MP, Rodriguez-Boulan E, Saltiel AR. *Science.* 1988;241:1670-1672.

Chang HR, Arsenijevic D, Pechere JC, Piguet PF, Mensi N, Girardier L, Dulloo AG. Dietary supplementation with fish oil enhances in vivo synthesis of tumor necrosis factor. *Immunol Ltts.* 1992;34:13-18.

Chang MY, Sasahara M, Chait A, Raines EW, Ross R. Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probucol: 2. Cellular composition and proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1631-1640.

Chang ZL, Beezhold DH. Protein kinase C activation in human monocytes: regulation of PKC isoforms. *Immunology.* 1993;80:360-366.

Chappell DA, Fry GL, Waknitz MA, Muhonen LE, Pladet MW, Iverius P-H, Strickland DK. Lipoprotein lipase induces catabolism of normal triglyceride-rich lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor in vitro. *J Biol Chem.* 1993;268:14168-14175.

Chappell DA, Fry GL, Walknitz MA, Iverius PH, Williams SE. The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor binds and mediates catabolism of bovine milk lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 1992;267:25764-25767.

Chappell DA, Medh JD. Receptor-mediated mechanisms of lipoprotein remnant metabolism. *Prog Lipid Res.* 1998;37:393-422.

Chasek T, Stein O, Stein Y. Pre-and post-natal development of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride hydrolase activity in rat tissues. *Atherosclerosis.* 1977;26:549-561.

Cheng CF, Oosta GM, Bensadoun A, Rosenberg RD. Binding of lipoprotein lipase to endothelial cells in culture. *J Biol chem.* 1981;256:12893-12898.

Chevreuil O, Hultin M, Ostergad PB, Olivecrona T. Depletion of lipoprotein lipase after heparin administration. *Arterioscler Thromb.* 1993a;13:1391-1396.

Chiesa G, Michelagnoli S, Cassinotti M, Gianfranceschi G, Werba JP, Pazzucconi F, Sirtori CR, Franceschini G. Mechanisms of high-density lipoprotein reduction after probucol treatment-Changes in plasma cholesterol esterification/transfer and lipase activities. *Metabolism.* 1993;42:229-235.

Chilsom GM, Ma G, Irwin KC, Martin LL, Gunderson KG, Lindberg LF, Morl DW, DiCorleto PE. 7-beta-hydroperoxycholest-5-en-3 beta-ol, a component of human atherosclerotic lesions, is the

primary cytotoxin of oxidized human low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:11452-11456.

Chiu B, Viira E, Tucker W, Fong IW. Chlamydiae pneumoniae, cytomegalovirus, and herpes simplexvirus in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation*. 1997;96 :2144-2148.

Choi SY, Sivaram P, Walker DE, Curtis LK, Gretch DG, Sturley SL, Attie AD, Deckelbaum RJ, Golberg IJ. Lipoprotein lipase associated with lipoproteins involves protein-protein interaction with apolipoprotein B. *J Biol Chem*. 1995;270:8081-8086.

Choi SY, Sivaram P, Walker DE, Curtiss LK, Gretch DG, Sturley SL, Attie D, Deeckerbaum RJ, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase association with lipoproteins involves protein-protein interaction with apolipoprotein B. *J Biol Chem*. 1995;270:8081-8086.

Choy M, Oltjen SL, Otani YS, Armstrong MT, Armstrong PB. Fibroblast growth factor-2 stimulates embryonic cardiac mesenchymal cell proliferation. *Dev Dyn*. 1996;206:193-200.

Cisar LA, Hoogewerf AJ, Cupp M, Rapport CA, Bensadoun A. Secretion and degradation of lipoprotein lipase in cultured adipocytes. Binding of lipoprotein lipase to membrane heparan sulfate proteoglycans is necessary for degradation. *J Biol Chem*. 1989;264:1767-1774.

Cleland SJ, Petric JR, Veda S, Elliott HL, Connell JM. Insulin as a vascular hormone : implications for the pathophysiology of cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1998;25 :175-184.

Cockerill GW, Rye K-A, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15 :1987-1994.

- Collart MA, Baeuerle P, Vassali P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappaB-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappaB. *Mol Cell Biol.* 1990;10:1498.
- Collins T. Analysis of the ELAM-1 and VCAM-1 promoters—tools to target gene expression in endothelium intransgenic animals. *J Vasc Surg.* 1992;15:923-924.
- Colwell JA, Lopes-Virella MF. A review of the development of large-vessel disease in diabetes mellitus. *Am J Med.* 1988;85:113-118.
- Cooper AL, Gibbons L, Horan MA, et al. Effect dietary supplementation with fish oil supplementation on fever and cytokine production in human volunteers. *Clin Nutr.* 1993;12:321-328.
- Cooper DA, Lu SC, Wiswanath R, Freiman RN, Bensadoun A. The structure and complete nucleotide sequence of the avian lipoprotein lipase gene. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1129:166-171.
- Corey JE, Zilversmit DB. Effects of cholesterol feeding on arterial lipolytic activity in the rabbit. *Atherosclerosis.* 1977;27:201-212.
- Cornhill JF, Barrett WA, Herderick EE, Mahley RW, Fry DL. Topographic study of sudanophilic lesions in cholesterol-fed minipigs by image analysis. *Arteriosclerosis.* 1985;5 :415-426.
- Couderc R, Maachi M. Lipoprotein (a) : importance of its determination in current clinical practice. *J Mal Vasc.* 1998;23 :165-175.

- Cryer A, Jones HM. Changes in the lipoprotein lipase (clearing-factor lipase) activity of white adipose tissue during development of the rat. *Biochem J.* 1978;172:319-325.
- Currie RA, Eckel RH. Characterization of a high affinity octamer transcription factor binding site in the human lipoprotein lipase promoter. *Arch Biochem Biophys.* 1992;298:630-639.
- Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoproteins induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:5134-5138.
- Cushing SD, Fogelman AM. Monocytes may amplify their recruitment into inflammatory lesions by inducing monocyte chemotactic protein. *Arterioscler Thromb.* 1992;12 :78-82.
- Daly JM, Reynolds MB, Sigal RK, Shou J, Liberman MD. Effect of dietary protein and amino acids on immune function. *Crit Care Med.* 1990;18:S86-S93.
- D'Anastasio C, Impallomeni M, McPherson GA, Clements WG, Brooks PA, Batchelor JR. Antibodies against monocytes and endothelial cells in the sera of patients with atherosclerotic peripheral arterial disease. *Atherosclerosis.* 1988;74:99-105.
- Dansky HM, Charlton SA, Harper MC, Smith JD. T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Nat Acad Sci.* 1997;94:4642-4646.
- Darley-Usmar VM, Hogg N, O'Learly VJ, Wilson MT, Moncada S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Rad Res Comms.* 1992;17:9-20.

- Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1994;94 :437-444.
- Daugherty A, Puré E, Delfel-Butteiger D, Leferovich J, Roselaar SE. The effects of total lymphocyte deficiency on the extent of atherosclerosis in apolipoprotein E-mice. *J Clin Invest.* 1997;100:1575-1580.
- Daugherty A, Zweifel BS, Schonfeld G. Probucol attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Br J Pharmacol.* 1989;98:612-618.
- Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J.* 1993;69:377-381.
- Davies MJ. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation.* 1990;82 :II38-46.
- De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone M, Jr, Libby P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vas Biol.* 1994;14:1829-1836.
- de Deckere EA, Verplanck CJ, Blonk CG, Van Nielsen WG. Effects of type and amount of dietary fat on rabbit and rat lymphocyte proliferation in vitro. *J Nutr.* 1988;118:11-18.
- De Fronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM. Obesity, hypertension, dyslipidaemia, and atherosclerotic vascular disease. *Diabetes Care* 1991;14:173-194.

de Haan LH, Bosselaers I, Jongen WM, Zwijsen RM, Koeman JH. Effect of lipid and aldehydes on gap-junctional intercellular communication between human smooth muscle cells. *Carcinogenesis*. 1994;15:253-256.

De Sanctis JB, Blanca I, Bianco NE. Regulatory effects of lipoprotein lipase on proliferative and cytotoxic activity of NK cells. *J Lipid Res*. 1996;37:1987-2000.

De Sanctis JB, Varesio L, Radzioch D. Prostaglandins inhibit lipoprotein lipase gene expression in macrophages. *Immunology*. 1994;81:605-610.

Deeb SS, Peng R. Structure of the human lipoprotein lipase gene. *Biochemistry* 1989;28:4131-4135.

Defacque H, Piquenarl D, Basset A, Mart J, Commes T. Transforming growth factor-beta1 is an autocrine mediator of U937 cell growth arrest and differentiation induced by vitamin D3 and retinoids. *J Cell Physiol*. 1999;178:109-119.

Delong P, O'Sullivan MG, Huggins E, Hubbard CL, McCall C. Bacterial lipopolysaccharide induction of the prostaglandin G/H synthase 2 gene causes thromboxane-dependent pulmonary hypertension in rabbits. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20:493-499.

Di Salvo J, Pfitzer G, Semenchul LA. Protein tyrosine phosphorylation, cellular Ca^{2+} , and Ca^{2+} sensitivity for contraction of smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol*. 1994;72 :1434-1439.

Dicorleto PE, Soyombo AA. The role of the endothelium in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*. 1993;4:364-372.

- DiCorleto PE, Zilversmit DB. Lipoprotein lipase activity in bovine aorta. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1975;148:1101-1105.
- Domin WS, Chait A, Deeb S. Transcriptional activation of the lipoprotein lipase gene in macrophages by dexamethasone. *Biochemistry.* 1991;30:2570-2574.
- Doolittle MH, Ben-Zeev O, Elovson J, Martin D, Kirchgessner TG. The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *J Biol Chem.* 1990;265:4570-4577.
- Dovgan PS, Edwards JD, Zhan X, Wilde M, Agrawal DK. Cigarette smoking increases monocyte adherence to cultured endothelial cell monolayer. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;203 :929-934.
- Dugi KA, Dichek HL, Talley GD, Brewer Jr HB, Santamarina-Fojo S. Human lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates. *J Biol Chem.* 1992;267:25086-2509.
- Dupplaa C, Couffinhal T, Labat L, Fawaz J, Moreau C, Bietz I, Bonnet J. Monocyte adherence to endothelial cells in patients with atherosclerosis : relationships with risk factors. *Eur J Clin Invest.* 1993;23 :474-479.
- Eckel RH, Fujimoto WY, Brunzell JD. Insulin regulation of lipoprotein lipase in cultured 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1978;84:1069-1075.
- Eckel, RH. Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med.* 1989;320:1060-1068.

Edwards IJ, Xu H, Obunike JC, Goldberg IJ, Wagner WD. Differentiated macrophages synthesize a heparan sulfate proteoglycan and oversulfated chondroitin sulfate proteoglycan that bind lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vac Biol.* 1995;15:400-409.

Edwards K, Chan RYS, Sawyer WH. Interactions between fatty acids and lipoprotein lipase: specific binding and complex formation. *Biochemistry.* 1994;33:13304-13311.

Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Yamada A, Urabe Y, Takeshita A. Evidence of impaired endothelium-dependent coronary vasodilatation in patients with angina pectoris and normal angiograms. *N Engl J Med.* 1993;328 :1659-1664.

Eisenberg S, Sehayek E, Olivecrona T, Vlodavsky I. Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J Clin Invest.* 1992;90:2013-2021.

Emeson EE, Robertson AL. T lymphocytes in aortic and coronary intimas. Their potential role in atherogenesis. *Am J Pathol.* 1988;130:369-376.

Emeson EE, Shen M-L, Bell CGH, Quereshi A. Inhibition of atherosclerosis in CD4 T-cell-ablated and nude (nu/nu) C57BL/6 hyperlipidemic mice. *Am J Pathol.* 1996;149:675-685.

Emmerich J, Verges B. Liens entre Lp(a) et hémostasie. *Rev Prat.* 1992;6 :49-51.

Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW, Cannon JG, Rogers TS, Klempner MS, Weber PC et al. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med.* 1989;320:265-271.

Endres S, Meydani SN, Ghorbani R, et al. Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and monuclear cell proliferation. *J Leuk Biol.* 1993;54:599-603.

Enerbäck S, Bjursell G. Genomic organization of the region encoding guinea pig lipoprotein lipase; evidence for exon fusion and unconventional splicing. *Gene.* 1989;84:391-397.

Enerbäck S, Gimble JM. Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1993;1169:107-125.

Enerbäck S, Ohlsson BG, Samuelsson L, Bjursell G. Characterization of the human lipoprotein lipase (LPL) promoter: evidence of two cis-regulatory regions, LP-alpha and LP-beta, of importance for the differentiation-linked induction of the LPL gene during adipogenesis. *Mol Cell Biol.* 1992;12:4622-4633.

Enerbäck S, Semb H, Bengtsson-Olivecrona G, Carlsson P, Hermansson ML, Olivecrona T, Bjursell G. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding lipoprotein lipase of guinea pig. *Gene.* 1987;58:1-12.

Enerbäck S, Semb H, Tavernier J, Bjursell G, Olivecrona T. Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase; effects of nutritional state and of tumor necrosis factor on mRNA levels in adipose tissue, heart, and liver. *Gene.* 1988;64:97-106.

Erl W, Hansson GK, de Martin R, Draude G, Weber KS, Weber C. Nuclear factor-kappaB regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1999;84:668-677.

Etingin O, Silverstein R, Hajjar D. Identification of a monocyte receptor on herpesvirus-infected endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:7200-7203.

Etingin O, Silverstein R, Hajjar D. von Willebrand factor mediates platelet adhesion to virally infected endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:5153-5156.

Ewart HS, Carroll R, Severson DL. Lipoprotein lipase activity in rat cardiomyocytes is stimulated by insulin and dexamethasone. *Biochem J*. 1997;327:439-442.

Exton JH. Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J Biol Chem*. 1990;265:1.

Fabricant C, Fabricant J, Minick CR, Litrenta M. Herpes virus induced atherosclerosis induced atherosclerosis in chickens. *Fed Proc*. 1983;42:2476-2479.

Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta M, Minick C. Virus-induced atherosclerosis. *J Exp Med*. 1978;148 :335-340.

Faergeman O. The relationship of triglycerides and LDL cholesterol to coronary heart disease. In : Jacobot B, Mathé D, Fruchart J-C , eds. *Atherosclerosis XI*.1998:605-607.

Faggot A, Robs R, Hacker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. 1. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis*. 1984;4:323-340.

Faggiotto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis*. 1984;4:323-340.

Farese RV Jr, Yost TJ, Eckel RH. Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism*. 1991;40:214-216.

Farinaro E, Panico S, Jossa F. Diet and cardiovascular risk among women in Italy. *Ann Ist Super Sanità*;1992;28:349.

Faruqi RM, DiCorleto PE. Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation. *Br Heart*. 1993;69 :S19-S29.

Fernandes G, Bysani C, Venkatraman JT, Tomar V, Zhao W. Increased TGF-beta and decreased oncogene expression by omega-3 fatty acids in the spleen delays onset of autoimmune disease in B/W mice. *J Immunol*. 1994;152:5979-5987.

Flier JS, Underhill LS. Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med*. 1989;1060-1068.

Föger B, Drexel H, Hopferwieser T, Miesenböck G, Ritsch A, Lechleitner M, Trobinger G, Patsch JR. Fenofibrate improves postprandial chylomicron clearance in II B hyperlipoproteinemia. *Clin Investig*. 1994;72:294-301.

Foubert L, Benlian P, Turpin G. La lipoprotéine lipase: enzyme multifonctionnelle du métabolisme des lipoprotéines. *Presse Med*. 1996;25:207-210.

Foubert L, Benlian P, de Gennes JL. Molecular genetics and lipoprotein lipase deficiency. *Bull Acad Natl Med*. 1994;178:405-413.

Fredrickson DS, Lees RS. Familial hyperlipoproteinemia. In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS (eds) *The metabolic basis of inherited disease*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill;1965:429-485.

Fried SK, Zechner R. Cachectin/tumor necrosis factor decreases human adipose tissue lipoprotein lipase mRNA levels, synthesis, and activity. *J Lipid Res.* 1989;30:1917-1923.

Friedman G, Ben-Yehuda A, ben-Naim M, matsa D, Stein O, Stein Y. Effects of transforming growth factor-beta on lipoprotein lipase in rat mesenchymal heart cell cultures. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1254:140-146.

Fritsche KL, Cassity NA, Huang S-C. Effect of dietary fat source on antibody production and lymphocyte proliferation in chickens. *Poultry Sc.* 1991;70:611-617.

Fryer RH, Schwobe EP, Woods ML, Rodgers GM. Chlamydia species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity. *J Invest Med.* 1997;45:168-174.

Fujikawa M, Yamashita N, Yamazaki K, Sugiyama E, Suzuki H, Hamazaki T. Eicosapentanoic acid inhibits antigen-presenting cell function of murine splenocytes. *Immunology.* 1992;75:330-335.

Funayama H, Ikeda U, Takahashi M, Sakata Y, Kitagawa SI, Takahashi YI, Masuyama JI, Furukawa Y, Miura Y, Kano S, Matsuda M, Shimada K. Human monocyte-endothelial cell interaction induces platelet-derived growth factor expression. *Cardiovasc Res.* 1998;37:216-224.

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 1992;326:242-250, 310-318.

Fuster V, Stein B, Ambroise JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesbro JH. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis : evolving concepts. *Circulation.* 1990;82 :II47-II59.

Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;94:2493-2503.

Garg A, Bonanome A, Grundy SM. Comparison of a high carbohydrates diet with a high monounsaturated fat diet in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1988;319:829.

Garg A. High monounsaturated fat diet for diabetic patients. Is it time to change the current dietary recommendations? *Diab Care.* 1994;17:242.

Gargulli MC, Tobian L, Iwai J. reduction of blood pressure in salt-fed Dahl salt-sensitive rats with diet rich in olive oil, safflower oil or calcium biphoshate but not with calcium carbohydrate. *J Hypertens.* 1986;4:168.

Gavin LA, Cavalieri RR, Moeller M, McMahon FA, Castle JN, Gulli R. Brain lipoprotein lipase is responsive to nutritional and hormonal modulation. *Metabolism.* 1987;36:919-924.

Gazzaruso C, Garzaniti A, Buscaglia P, Bonetti G, Falcone C, Fratino P, Finardi G, Geroldi D. Association between apolipoprotein (a) phenotypes and coronary heart disease at a young age. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33:157-163.

Geist LJ, Dai LY. Cytomegalovirus modulates interlekin-6 gene expression. *Transplantation.* 1996;62 :653-658.

Genest JJ, Martin-Munley SS, McNamara Jr, Ordovas JM, Jenner J, Myers RH, Silberman SR, Wilson PW, Salem DN, Schaefer EJ. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation*. 1992;85:2025-2033.

Geng Y-J, Hansson GK. Interferon- γ inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest*. 1992;89:1322-1330.

Geng Y-J, Henderson L, Levesque E, Muszynski M, Hansson G, Libby P. Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2200-2208.

Geng Y-J, Wu Q, Muszynski M, Hansson G, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, and interleukin-1-beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:19-27.

Gerrity RG, Antonov AS. The pathogenesis of atherosclerosis. *Diabetologia*. 1997;40 :S108-S110.

Gerrity RG, Goss JA, Soby L. Control of monocyte recruitment by chemotactic factor(s) in lesion-prone areas of swine aorta. *Arteriosclerosis*. 1985;5:55-66.

Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol*. 1981;103:181-190.

Gerrity, RG. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol*. 1981;103:181-190.

Gessani S, Testa U, Varano B, Di Marzio P, Borghi P, Conti L, Barberi T, Tritarelli E, Martucci R, Seripa D, Peschle C, Beladerlli P. Enhanced production of LPS-induced cytokines during the

differentiation of human monocytes to macrophages. Role of LPS receptors. *J Immunol.* 1993;151:3758-3766.

Gey KF. Ten-year retrospective on the antioxidant hypothesis of arteriosclerosis: threshold plasma levels of antioxidant micronutrients related to minimum cardiovascular risk. *J Nutr Biochem.* 1995;6:206-236.

Gey KF. Vitamin E and other essential antioxidants regarding coronary heart disease: risk assessment studies. Epidemiological basis of the antioxidant hypothesis of cardiovascular disease. In: Vitamin E in health and disease. Packer L, Fuchs J, eds. Dekker: New York;1993:589-633.

Gey KF. On the antioxidant hypothesis with regard to arteriosclerosis. *Bibl Nutr Diet.* 1986;37:53-91.

Gimble JM, Dorheim MA, Cheng Q, Pekala P, Enerbäck S, Ellingsworth L, Kincade PW, Wang CS. Response of bone marrow stromal cells to adipogenic antagonists. *Mol Cell Biol.* 1989;9:4587-4595.

Glavov S et al. Pathobiology of the human atherosclerotic plaque. Ed. Springer-Verlag, New York, 1990.

Goalstone ML, Natarajan R, Standley PR, Walsh MF, Leitner JW, Carel K, Scott S, Nadler J, Sowers JR, Drazmin B. Insulin potentiates platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 1998;139 :4067-4072.

Golberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res.* 1996.37:693-707.

Goldberg IJ, Soprano DR, Wyatt ML, Vanni TM, Kirchgessner TG, Schotz MC. Localization of lipoprotein lipase mRNA in selected rat tissues. *J Lipid Res.* 1989;30:1569-1577.

Goldman R, Sopher O. Control of lipoprotein lipase secretion in mouse macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 1989;1001:120-126.

Goldman R. Control of lipoprotein lipase secretion by macrophages: effect of macrophage differentiation agents. *Leukocyte Biol.* 1990;47:79-86.

Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman LE, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. III. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new, inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest.* 1973;52:1544-1568.

Gong JH, Sprenger H, Hinder F, Bender A, Schmidt A, Horch S, Naim M, Gemsa D. Influenza virus infection of macrophages. Enhanced tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene expression and lipopolysaccharide-triggered TNF-alpha release. *J Immunol.* 1991;147:3507-3513.

Gong JH. Influenza A virus infection of macrophages. Enhanced tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene expression and lipopolysaccharide-triggered TNF-alpha release. *J Immunol.* 1991;147:3507-3513.

Gonzales RS, Wick TM. Hemodynamic modulation of monocytic cell adherence to vascular endothelium. *Ann Biomed Eng.* 1996;24:382-393.

Gopalakrishna R, Barsky SH, Thomas TP, Anderson WB. Factors influencing chelator-stable, detergent-extractable, phorbol diester-induced membrane association of protein kinase C.

Differences between Ca^{2+} -induced and phorbol ester-stabilized membrane bindings of protein kinase C. *J Biol Chem.* 1986;261:16438-16445.

Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation.* 1989;79 :8-15.

Gosselin J, Flamand L, D'Addario M, Hiscott J, Menezes J. Infection of peripheral blood mononuclear cells by herpes simplex and Epstein-Barr viruses: differential induction of interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest.* 1992;89:1849-1856.

Grainger DJ, Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, Wessberg PL, Wade DP, Lawn RM. Proliferation of human smooth muscle cells promoted by lipoprotein (a). *Science.* 1993;260 :1655-1658.

Grange JJ, Baca-Regen LM, Nollendorfs AJ, Persidsky Y, Sudan DL, Baxter BT. Protein kinase C isoforms in human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* 1998;27:919-926.

Granstein RD, Murphy GF, Margolis RJ, Byrne MH, Amento EP. Gamma-interferon inhibits collagen synthesis in vivo in the mouse. *J Clin Invest.* 1987;79:1254-1258.

Gray JM, Wade GN. Cytoplasmic estrogen, but not progestin, binding sites in male rat adipose tissues. *Am J Physiol.* 1980;239:E237-E241.

Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO, Jablons D. Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Res.* 1992;52:4113-4116.

Grégoire F, De Broux N, Hauser N, Heremans H, Van Damme J, Remacle C. Interferon-gamma and interleukin-1 inhibit adipocyte conversion in cultured rodent preadipocytes. *J Cell Physiol.* 1992;151:300-309.

Griffin M, Frazer A, Johnson A, Collins P, Owens D, Tomkin GH. Cellular cholesterol synthesis—the relationship to post-prandial glucose and insulin following weight loss. *Atherosclerosis.* 1998;138 :313-318.

Grundy SM, Vega GL. Two different views of the relationship of hypertriglyceridemia to coronary heart disease. Implications for treatment. *Arch Intern Med.* 1992;152 :28-34.

Gupta S, Pablo AM, Jiang X-C, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN- γ potentiates atherosclerosis in apoE knock-out mice. *J Clin Invest.* 1997;99:2752-2561.

Hafizi S, Nobin R, Allen SP, Chester AH, Yacoub MH. Contrasting effects of platelet-derived growth factor (PDGF) isomers on mitogens, contraction and intracellular calcium concentration in human vascular smooth muscle. *Acta Physiol Scand.* 1998;164:191-199.

Hajjar D, Fabricant C, Minick C, Fabricant J. Virus-induced atherosclerosis: herpesvirus infection alters arterial cholesterol metabolism and accumulation. *Am J Pathol.* 1986;122:62-70.

Hajjar D, Pomerantz K, Snow J. Analysis of the physical state of cholesteryl esters in arterial smooth muscle-derived foam cells by differential scanning calorimetry. *Biochem J.* 1990;268:693-697.

Hajjar KA, Gavish D, Breslow JL, Nachman RL. Lipoprotein (a) modulation of endothelial cell surface fibrinolysis and its potential role in atherosclerosis. *Nature.* 1989;339 :303-305.

Hamosh M, Clary TR, Chernick SS, Scow RO. Lipoprotein lipase activity and adipocyte differentiation in growing male rats. *Biochim Biophys Acta*. 1970;210:473-482.

Hang J, Rillema JA. Effect of rapamycin on prolactin-stimulated S6 kinase activity and milk product formation in mouse mammary explants. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1358:209-214.

Hannun YA. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem*. 1994;269:3125-3128.

Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol*. 1989;135 :169-175.

Hansson GK, Holm J. Interferon- γ inhibits arterial stenosis after injury. *Circulation*. 1991;84:1266-1272.

Hansson GK. Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*. 1998;9:73-75.

Hansson GK. Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1997;8:301-311.

Hardottir I, Kinsella JE. Increasing the dietary (n-3) to (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio increases tumor necrosis factor production by murine resident peritoneal macrophages without an effect on elicited peritoneal macrophages. *J Nutr*. 1992;122:1942-1951.

Hardottir I, Kinsella JE. Tumor necrosis factor production by murine resident peritoneal macrophages is enhanced by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1095:187-195.

Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocystine-induced arteriosclerosis : the role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest.* 1976;58 :731-741.

Harker LA, Slichter SJ, Scott CR, Ross R. Homocystinemia : vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med.* 1974;291 :537-543.

Hauner H. Abdominal obesity and coronary heart disease. Pathophysiology and clinical significance. *Hez.* 1995;20 :47-55.

Havel RJ, Gordon RS Jr. Idiopathic hyperlipemia: metabolic studies in affected family. *J Clin Invest.* 1960;39:1777-1790.

Hayden MR, Ma Y, Brunzell JD, Henderson HE. Genetic variants affecting human lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Curr Opin Lipidol.* 1991;2:104-109.

Heinecke JW, Kawamura M, Suzuki L, Chait A. Oxidation of low density lipoproteins by thiols : superoxide-dependent and independent mechanisms. *J Lipid Res.* 1993;34 :2051-2061.

Hendriks WL, van der Boom H, van Vark LC, Havekes LM. Lipoprotein lipase stimulates the binding and uptake of moderately oxidized low-density lipoprotein by J774 macrophages. *Biochem J.* 1996;314:563-568.

Hendrix M, Daemen M, Bruggerman C. Cytomegalovirus nucleic acid distribution within the human vascular tree. *Am J Pathol.* 1991;138:563-567.

Hendrix M, Salimans S, van Boven C, Bruggerman C. High prevalence of latently present cytomegalovirus in artery walls of patients suffering grade III atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1990;136:23-28.

Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, Humphries S. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:8154-8158.

Hennig B, Shasby A, Fulton B, Spector AA. Exposure to free fatty acids increases the transfer of albumin across cultured endothelial monolayers. *Arteriosclerosis*. 1984;4:489-497.

Hennig B, Toborek M, Joshi-Barve S, Barger SW, Barve S, Mattson MP, McClaim CJ. Linoleic acid activates nuclear transcription factor-kappaB (NF-kappaB) and induces NF-kappaB-dependent transcription in cultured endothelial cells. *Am J Clin Nutr*. 1996;63:322-328.

Henson LC, Schotz MC. Detection and partial characterization of lipoprotein lipase in bovine aorta. *Biochim Biophys Acta*. 1975;409:360-366.

Herbert JM, Clowes M, Lea HJ, Pascal M, Clowes AW. Protein kinase C alpha expression is required for heparin inhibition of rat smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 1996;271:25928-25935.

Hietanen E, Greenwood MRC. A comparison between lipoprotein lipase activity and adipocyte differentiation in growing male rats. *J Lipid Res*. 1977;18:480-490.

Hodis HN, Mack WJ, Azen SP, Alaupovic P, Pogoda JM, LaBree L, Hemphill LC, Krams DM, Blankenhorn DH. Triglyceride- and cholesterol-rich lipoproteins have a differential effect on mild/moderate and severe lesion progression as assessed by quantitative coronary angiography in a controlled trial of lovastatin. *Circulation*. 1994;90:42-49.

Hokanson JE, Brunzell JD, Jarvik GP, Wijsman EM, Austin MA. Linkage of low-density lipoprotein size to lipoprotein lipase gene in heterozygous lipoprotein lipase. *Am J Hum Genet.* 1999;64:608-618.

Holme I. Cholesterol reduction and its impact on coronary artery disease and total mortality. *Am J Cardiol.* 1995;76:10C-17C.

Hornstra G, Barth CA, Galli C, Mensik RP, Mutanen M, Riemersma RA, Roberfroid M, Salminen K, Vansant G, Verchuren PM. Functional food science and the cardiovascular system. *Br J Nutr.* 1998;80:S113-S146.

Hsueh WA, Law RE. Cardiovascular risk continuum : implications of insulin resistance and diabetes. *Am J Med.* 1998;105 :4S-14S.

Hua X, Enerbäck S, Hudson J, Youkhana K, Gimble JM. Cloning and characterization of the promoter of the murine lipoprotein lipase-encoding gene: structural and functional analysis. *Gene.* 1991;107:247-258.

Huang S-C, Misfeldt ML, Fritsche KL. Dietary fat influences Ia antigen expression and immune cell populations in the murine peritoneum and spleen. *J Nutr.* 1992;122:1219-1231.

Hughes DA, Pinder AC, Piper Z, et al. Fish oil supplementation inhibits the expression of major histocompatibility complex class II molecules and adhesion molecules on human monocytes. *Am J Clin Nutr.* 1996;63:267-272.

Hultin M, Bengtsson-Olivecrona G, Olivecrona T. Release of lipoprotein lipase to plasma by triacylglycerol emulsions. Comparison to the effect of heparin. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1125:97-103.

Hunink MG, Goldman L, Tosteson AN, Mittleman MA, Goldman PA, Williams LW, Tsevat J, Weintein MC. The recent decline in mortality from coronary heart disease, 1980-1990. The effect of secular trends in risk factors and treatment. *JAMA*. 1997;277 :535-542.

Inaba T, Kawamura M, Gotoda T, harada K, Shimada M, Ohsuga J, Shimano H, Akanuma Y, Yazaki Y, Yamada N. Effects of platelet-derived growth factor on the synthesis of lipoprotein lipase in human monocyte-derived macropahges. *Arterioscler Thromb*. 1995;15:522-528.

Jacobot B et Robert L. Atheroma, atherosclerosis and aging. In : Robert L, Murata K, Nagai Y (eds). Degenerative diseases of connective tissue and aging. Tokyo : Kodansha, 1985;153-166.

Jansen H, Hop W, Van Tol A, Brusckhe AVG, Birkenhäger JC. Hepatic lipase and lipoprotein lipase are not major determinants of the low density lipoprotein subclass pattern in human subjects with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 1994;107:45-54.

Janus ED, Postiglione A, Singh RB, Lewis B. The modernization of Asia : implications for coronary heart disease. *Circulation*. 1996;94 :2671-2673.

Jeffery NM, Cortina M, Newsholme EA, Calder PC. Effects of variations in the proportions of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in the rat diet on spleen lymphocyte functions. *Brit J Nutr*. 1997;77:805-823.

Jeffery NM, Sanderson P, Newsholme A. The ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat diet alters serum lipid levels and lymphocyte functions. *Lipids*. 1996;31:737-745.

Jessup W. Nitric oxide and macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. In: Woodford FP, Davignon J, Sniderman A (eds) *Atherosclerosis X* 1995;209-212.

Ji ZS, Sanan DA, Mahley RW. Intravenous heparinase inhibits remnant lipoprotein clearance from the plasma and uptake by the liver: in vivo role of heparan sulfate proteoglycans. *J Lipid Res*. 1995;36:583-592.

Jonasson L, Bondjers G, Hansson GK. Lipoprotein lipase in atherosclerosis: its presence in smooth muscle cells and absence from macrophages. *J Lipid Res*. 1987;28:437-445.

Jonasson L, Hansson GK, Bondjers G, Noe L, Etienne L. Interferon-gamma inhibits lipoprotein lipase in human monocyte-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1053:43-48.

Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986;6:131-138.

Jonasson L, Holm J, Skalli O, Gabbiani G, Hansson GK. Expression of class II transplantation antigen on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1985;76:125-131.

Jonkind JF, Verker A, Hoogerbrugge N. Monocytes from patients with combined hypercholesterolemia-hypertriglyceridemia and isolated hypercholesterolemia show increased adhesion to endothelial cells in vitro: II. Influence of intrinsic and extrinsic factors on monocyte binding. *Metabolism*. 1995;44:374-378.

- Jovinge S, Ares MPS, Kallin B, Nilsson J. Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to Ox-LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:1573-1579.
- Julien P, Vohl M-C, Gaudet D, Gagné C, Lévesque G, Després J-P, Cadelis F, Brun L-D, Nadeau A, Murthy MRV. Hyperinsulinemia and abdominal obesity affect the expression of hypertriglyceridemia in heterozygous familial lipoprotein lipase deficiency. *Diabetes.* 1997;46:2063-2068.
- Julien P, Gagné C, Murthy MRV, Cantin B, Cadelis F, Moorjani S, Lupien P. Mutations of the lipoprotein lipase gene as a cause of dyslipidemias in the Quebec population. *Can J Cardiol.* 1994;10:54-60.
- Jurgens G, Chen Q, Esterbauer H, Mair S, Ledinski G, Dinges HP. Immunostaining of human autopsy aortas with antibodies to modified apolipoprotein B and apoprotein(a). *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1689-1699.
- Kalogeris TJ, Laroux FS, Cockerell A, Ichikawa H, Okayama N, Phifer TJ, Alexander JS, Grisham MB. Effect of selective proteasome inhibitors on TNF-induced activation of primary and transformed endothelial cells. *Am J Physiol.* 1999;276:C856-864.
- Kalra VY, Ying Y, Deemer K, Natarajan R, Nadler JL, Coates TD. Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1994;160:154-162.
- Kane JP, Mallow MJ, Ports TA, Phillips NR, Diehl JC, Havel RJ. Regression of coronary atherosclerosis during treatment of familial hypercholesterolemia with combined drug regimens. *JAMA.* 1990;264:3007-3012.

- Kardinaal AFM, Kok FJ, Ringstad J, Gomezaracena J, Mazaev VP, Kohlmeier L, Martin BC, Aro A, Karek JD, Delgadorodreiguez M, Riemersma RA, Vantveer P, Huttunen JK, Martinmoreno JM. Antioxydants in adipose tissue and risk of myocardial infarction-The EURAMIC Study. *Lancet*. 1993;342:1379-1384.
- Karpe F, Hultin M. Endogenous triglyceride-rich lipoproteins accumulate in rat plasma when competing with a chylomicron-like triglyceride emulsion for a common lipolytic pathway. *J Lipid Res*. 1995;36:1557-1566.
- Karpe F, Olivecrona T, Samra JS, Summers LK, Humphreys Sm, Frayn KN. Lipoprotein lipase transport in plasma: role of muscle and adipose tissues in regulation of plasma lipoprotein concentrations. *J Lipid Res*. 1998;39:2387-2393.
- Karpe F, Olivecrona T, Walldius G, Hamsten A. Lipoprotein lipase in plasma after an oral fat load: relation to free fatty acids. *J Lipid Res*. 1992;33:975-984.
- Karpe F, Steiner G, Uffelman K, Olivecrona T, Hamsten A. Postprandial lipoproteins and progression of coronary arterosclerosis. *Atherosclerosis*. 1994;106 :83-97.
- Katz SS, Shipley GG, Small DM. Physical chemistry of the lipids of human atherosclerotic lesions. Demonstration of a lesion intermediate between fatty streak and advanced plaque. *J Clin Invest*. 1976;58:200-211.
- Kawada N, Mizogushi Y, Kobayashi K, Monna T, Morisawa S. Calcium-dependent prostaglandin biosynthesis by lipopolysaccharide-stimulated rat Kupffer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1992;47:209-214.

Kawagushi A, Miyatake K, Yutani C, Beppu S, Tsushima M, Yamamura T, Yamamoto A. Characteristic cardiovascular manifestation in homozygous and heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am Heart J.* 199;137:410-418.

Kelley VE, Ferretti A, Izui S, Ferretti A, Izui S, Strom TB. A fish oil diet rich in eicosapentaenoic acid reduces cyclooxygenase metabolites and suppresses lupus in MRL-lpr mice. *J Immunol.* 1985;134:1914-1919.

Kelly DS, Nelson GJ, Serrato CM, Nelson GJ, Serrato CM, Schmidt PC, Branch LB. Effects of type of dietary fats on indices of immune status of rabbits. *J Nutr.* 1988;118:1376-1384.

Kern PA, Martin RA, Carty J, Goldberg IJ, Ong JM. Identification of lipoprotein lipase immunoreactive protein in pre- and postheparin plasma from normal subjects and patients with type I hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res.* 1990;31:17-26.

Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest.* 1995;95:2111-2119.

Kern PA. Potential role of TNF alpha and lipoprotein lipase as candidate genes for obesity. *J Nutr.* 1997;127:1917S-1922S.

Key N, Vercellotti G, Winkelmann J, Moldow C, Goodman J, Esmon N, Esmon C, Jacob H. Infection of vascular endothelial cells with herpes simplex virus enhances tissue factor activity and reduces thrombomodulin expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:7095-7097.

- Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Blackburn H, Buzina R, Diodordevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, Kromhout D, Nedijkovic S, Punsar S, Seccareccia F, Toshima H. The diet and 15 year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol.* 1986;124:903.
- Khoo JC, Mahoney EM, Witztum JL. Secretion of lipoprotein lipase by macrophages in culture. *J Biol Chem.* 1981;256:7105-7108.
- Khoo JC, Vance JE, Mahoney EM, Jensen D, Wancewicz E, Steinberg D. Neutral triglyceride lipase in macrophages. *Arteriosclerosis.* 1984;4:34-40.
- Kinsella JE, Lokesh B, Broughton S, Whelan J. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview. *Nutrition.* 1990;6:24-44.
- Kirchgessner TG, LeBoeuf RC, Langner CA, Zollman S, Chang CH, Taylor BA, Schotz MC, Gordon JJ, Lusis AJ. Genetic and developmental regulation of the lipoprotein lipase gene: loci distal and proximal to the lipoprotein lipase structural gene control enzyme expression. *J Biol Chem.* 1989;264:1473-1482.
- Kling D, Fingerle J, Harlan JM. Inhibition of leukocyte extravasation with a monoclonal antibody to CD18 during formation of experimental thickening in rabbit carotid arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1992;12:997-1007.
- Knekt P, Reunanen A, Jarvinen R, Seppanen R, Heliovaara M, Aromaa A. Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. *Am J Epidemiol.* 1994;139:1180-1189.

- Kockx MM, de Meyer GR, Bortier H, de Meyere N, Muhring J, Bakker A, Jacob W, Van Vaeck L, Herman A. Luminal foam cell accumulation is associated with smooth muscle cell death in the intimal thickening of human saphenous vein grafts. *Circulation*. 1996;94:1255-1262.
- Kounnas MZ, Chappell DA, Strickland DA, Argraves WS. Glycoprotein 330, a member of the low density lipoprotein receptor family, binds lipoprotein lipase. *J Biol Chem*. 1993;268:14176-14181.
- Kovacs A, Weber M, Burns L, Jacob H, Vercellotti G. Cytoplasmic sequestration of p53 in cytomegalovirus-infected human endothelial cells. *Am J Pathol*. 1997;149:1531-1539.
- Kovacs IB, Ratnatunga CP, Ridler CD, Gorog P, Edmondson SJ, Rees GM. Significance of plasma fibrinogen in coronary arterial disease: marker or causative risk factor for arterial thrombosis. *Int J Cardiol*. 1992;35:57-64.
- Kraemer F. Role of lipoprotein lipase and apolipoprotein E secretion by macrophages in modulating lipoprotein uptake. *Diabetes*. 1992;41:77-82.
- Kraemer FB, Takeda D, Natu V, Sztalryd C. Insulin regulates lipoprotein lipase activity in rat adipose cells via wortmannin- and rapamycin-sensitive pathways. *Metabolism*. 1998;47:555-559.
- Kraemer FB. Role of lipoprotein lipase and apolipoprotein E secretion by macrophages in modulating lipoprotein uptake. *Diabetes*. 1992;42:77-80.
- Kranzhofer R, Browatzki M, Schmidt J, Kubler W. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;257:826-828.

- Krapp A, Zhang H, Ginzinger D, Liu M-S, Lindberg A, Olivecrona G, Hayden MR, Beisiegel U. Structural features in lipoprotein lipase necessary for the mediation of lipoprotein uptake into cells. *J Lipid Res.* 1995;36:2362-2373.
- Kreuzer J, Denger S, Schmidts A, Jahn L, Merten M, von Hodenberg E. Fibrinogen promotes monocyte adhesion via a protein kinase C dependent mechanism. *J Mol Med.* 1996;74:161-165.
- Kristal B, Shurtz-Swirskik R, Chezar J, Manaster J, Levy R, Shapiro G, Weissman I, Shasha SM, Sela S. Participation of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens.* 1998;11 :921-928.
- Kronenberg F. Homocysteine, lipoprotein (a) and fibrinogen : metabolic risk factor for cardiovascular complications of chronic renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1998;7 :271-278.
- Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis.* 1985;5 :293-301.
- Kuijpers TW, Harla JM. Monocyte-endothelial interactions: insights and questions. *J Lab Clin Med.* 1993;122:641-651.
- Kume N, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured endothelial cells. *J Clin Invest.* 1994;93:907-911.

Kume, N, Cybulsky MI, Gimbrone MAJ. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultures of humans and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest.* 1992;90:1138-1144.

Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA, Goo YA, Wissler RW, Beneditt EP. *Chlamydiae pneumoniae* (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 year old). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92 :6911-6914.

Kurokouchi K, Kambe F, Yasukawa K, Izumi R, Ishiguro N, Iwata H, Seo H. TNF-alpha increases expression of IL-6 and ICAM-1 genes through activation of NF-kappaB in osteoblast-like ROS17/2.8 cells. *J Bone Miner Res.* 1998;13:1290-1299.

Kwok S, Singh-Bist A, Natu V, Kraemer FB. Dietary regulation of the very low density lipoprotein receptor in mouse heart and fat. *Horm Metab Res.* 1997;29:524-529.

Lala HP, Scoppola A, Motti C, Cortese C, Caccesse D, Menzinger G. Apolipoprotein E genotype and cholesterologenesis in polygenic hypercholesterolemia. *Metabolism.* 1998;47:97-100.

Lalouel JM, Wilson DE, Iverius PH. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase: molecular and genetic aspects. *Curr Opin Lipidol.* 1992;3:86-95.

Lamarche B, Lewis GF. Atherosclerosis prevention for the next decade : risk assessment beyond low density lipoprotein cholesterol. *Can J Cardiol.* 1998;14 :841-851.

Lambert M, Lupien PJ, Gagné C, Levy E, Blaiichman S, Langlois S, Hayden MR, Rose V, Clarke JT, Wolfe BM, Clarson C, Parsons H, Stephure DK, Potvin D, Lambert J. Treatment of familial

hypercholesterolemia in children and adolescents: effect of lovastatin. Canadian Lovastatin in Children Study Group. *Pediatrics*. 1996;97:619-628.

Langlois S, Deeb S, Brunzell JD, Kastelein JJ, Hayden MR. A major insertion accounts for a significant proportion of mutations underlying human lipoprotein lipase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:948-952.

Lanzavecchia A. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Ann Rev Immunol*. 1990;8:145-173.

Lapidus L, Bengtsson C, Larsson B, Pennert K, Rybo E, Sjostrom L. Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *Br Med J*. 1984;289:1251-1261.

Lawn RM, Schwartz K, Patty L. Convergent evolution of apolipoprotein (a) in primates and hedgehog. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1997;94 :11992-11997.

Lees RS, Wilson DE, Schonfeld G, Fleet S. The familial dyslipoproteinemias. In : Steinberg AG, Bearn AG, eds. Progress in medical genetics. Vol. 9. New York : Grune & Stratton, 1973 :237-290.

Lees RS, Wilson DE, Schonfeld G, Fleet S. The familial dyslipoproteinemias. In: Steinberg AG, Bearn AG. Progress in medical genetics. Vol. 9. New York: Grune & Straton;1973:237-290.

Lehr HA. Adhesion-promoting effects of cigarette smoke on leukocytes and endothelial cells. *Ann NY Acad Sci*. 1993;686 :112-118.

Lei X, Buja LM. Detection and localization of tumor necrosis factor-alpha in WHHL rabbit arteries. *Atherosclerosis*. 1996;125:81-89.

Lembo G, Morisco C, Lanni F, Barbato E, Vecchione C, Fratta L, Trimarco B. Systemic hypertension and coronary artery disease : the link. *Am J Cardiol.* 1998;82L :2H-7H.

Levine GN, Keaney JF, Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease. Clinical benefits and possible mechanisms. *N Engl Med.* 1995;332 :512-521.

Levy E, Thibault L, Turgeon J, Roy CC, Gurbindo C, Lepage G, Godard M, Rivard GE, Seidman E. Beneficial effects of fish oils on lipoproteins and lipoprotein lipase in patients with glycogen storage disease type I. *Am J Clin Nutr.* 1993;57:922-929.

Liang K, Vaziri ND. Gene expression of LDL receptor, HMG-Coa reductase, and cholesterol-alpha-hydroxylase in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 1997;12:1381-1386.

Libby P, Geng Y-J, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton S, Sukhova G, Lee R. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol.* 1996;7:330-335.

Libby P, Hansson GK. Biology of disease; involvement of the immune system in human atherogenesis : current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest.* 1991;64 :5-15.

Libby P, Warner SJC, Salomon RN, Birinyi LK. Production of platelet-derived growth factor-like mitogen by smooth muscle cells from human atheroma. *N Engl J Med.* 1988;318 :1493-1498.

Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4⁺ cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today.* 1995;16:34-38.

Lindqvist P, Ostlund-Lindqvist AM, Witztum JL, Steinberg D, Little JA. The role of lipoprotein lipase in the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins by macrophages. *J Biol Chem.* 1983;258:9086-9092.

Lipid Research Clinics Program. The lipid research clinics coronary primary prevention trial results: I. Reduction in incidence of coronary heart disease. II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *J Am Med Ass.* 1984;251:351-374.

Liu MK, Herrera-Velit P, Brownsey RW, Reiner NE. CD-14 dependent activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1994;153:2642-2652.

Liu M-S, Jirik FR, LeBoeuf RC, Henderson H, Castellani LW, Lusis AJ, Ma Y, Forsythe IJ, Zhang H, Kirk E, Brunzell JD, Hayden MR. Alteration of lipid profiles in plasma of transgenic mice expressing human lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 1994;269:11417-11424.

Lo SK, Cheung A, Zheng Q, Silverstein RL. Induction of tissue factor on monocytes by adhesion to endothelial cells. *J Immunol.* 1995;154:4768-4777.

Lokesh BR, Hsieh HL, Kinsela JE. Peritoneal macrophages from mice fed dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids secrete low levels of prostaglandins. *J Nutr.* 1986;116:2547-2552.

Lokesh BR, Sayers TJ, Kinsela JE. Interleukin-1 and tumor necrosis factor synthesis by mouse peritoneal macrophages is enhanced by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Immunol Letts.* 1990;23:281-286.

Lookene A., Skottova N, Olivecrona G. Interaction of lipoprotein lipase with the active site inhibitor tetrahydrolipstatin (Orlistat). *Eur J Biochem.* 1994;222:395.

Loscalzo J. The relation between atherosclerosis and thrombosis. *Circulation.* 1992;86 :III-95-III99.

Low MG. Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins. *FASEB J.* 1989;3:1600-1608.

Lu G, Morineli TA, Meier KE, Rosenzweig SA, Egan BM. Oleic acid-induced mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. A role for protein kinase C. *Circ Res.* 1996;79:611-618.

Luo J, Rizkalla SW, Vidal H, Oppert JM, Colas C, Boussairi A, Guerre-Milo M, Chapuis AS, Chevalier A, Durand G, Slama G. Moderate intake of n-3 fatty acids for 2 months has no detrimental effect on glucose metabolism and could ameliorate the lipid profile in type 2 diabetic men. Results of a controlled study. *Diabetes Care.* 1998;21:717-724.

Ma Y, Henderson HE, Liu MS, Zhang H, Forsythe IJ, Clarke-Lewis I, Hayden MR, Brunzell JD. Mutagenesis in four candidate heparin binding regions and identification of residues affecting heparin binding of human lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* 1994;35:1511-1523.

Ma Y, Ooi TC, Liu M-S, Zhang H, McPherson R, Edwards AL, Forsythe IJ, Frohlich J, Brunzell JD, Hayden MR. High frequency of mutations in the human lipoprotein lipase gene in pregnancy-induced chylomicronemia: possible association with apolipoprotein E2 isoform. *J Lipid Res.* 1994;35:1066-1075.

Maass M, Bartels C, Kruger S, Krause E, Engel PM, Dalhoff K. Endovascular presence of *Chlamydiae pneumoniae* DNA is a generalized phenomenon in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis.* 1998;140 :S25-30.

Mach F, Schoenbeck U, Bonnefoy J-Y, Pober J, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40. Induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation.* 1997;96:396-399.

Mach WJ, Krauss RM, Hodis HN. Lipoprotein subclasses in the monitored atherosclerosis regression study (MARS). *Arteriocl Thromb Vasc Biol.* 1996;16 :697-704.

Mackness GB. The immunological basis of acquired cellular resistance. *J Exp Med.* 1964;120:105-120.

Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991;286 :152-154.

Mahley RW, Innerarity TL. Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 1983;737:197-222.

Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH. Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17 :2074-2081.

Makoveichuk E, Lookene A, Olivecrona G. Mild oxidation of lipoproteins increases their affinity for surfaces covered by heparan sulfate and lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;252:703-710.

Malinow MR, Nieto FJ, Szklo M, Chambless LE, Bond G. Carotid artery intimal-medial wall thickening and plasma homocyst(e)ine in asymptomatic adults : the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation.* 1993;87 :1107-1113.

Mamo JCL, Elsgood CL, Gennat HC, Yu K. Degradation of chylomicron remnants by macrophages occurs via phagocytosis. *Biochemistry* 1996;35:10210-10214.

Mamputu JC, Desfaits AC, Renier G. Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *J Lipid Res.* 1997;38:1722-1729.

Mamputu JC, Renier G. Differentiation of human monocytes to monocyte-derived macrophages is associated with increased lipoprotein lipase-induced tumor necrosis factor-alpha expression and production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999a;19:1405-1411.

Mamputu JC, Renier G. Proliferative effect of lipoprotein lipase on human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999b, in revision.

Marshall LA, Johnston PV. The influence of dietary essential fatty acids on rat immunocompetent cell prostaglandin synthesis and mitogen-induced blastogenesis. *J Nutr.* 1985;115:1572-1580.

Martin A, Foxall T, Blumberg JB, Meydani M. Vitamin E inhibits low-density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to human aortic endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:429-436.

Massy ZA, Keane WF. Pathogenesis of atherosclerosis. *Semin Nephrol.* 1996;16 :12-20

Mattana J, Effionz C, Kapasi A, Singhal PC. Leukocyte-polytetrafluoro-ethylene interaction enhances proliferation of vascular smooth muscle cells via tumor necrosis factor-alpha secretion. *Kidney Int.* 1997;52:1478-1485.

Mattila KF, Valle MS, Nieminen MS, Valtonen VV, Hietaniemi KL. Dental infections and coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1993;103 :205-211.

Mattila KJ. Viral and bacterial infections in patients with acute myocardial infarction. *J Intern Med.* 1989;225 :293-296.

Mattsson Hultén L, Lindmark H, Diczfalusy U, Björkhem I, Ottoson M, Liu Y, Bondjers G, Wiklund O. Oxysterols present in atherosclerotic tissue decrease the expression of lipoprotein lipase messenger RNA in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest.* 1996;97:461-468.

Matzaris S, Jackson SP, Laxminarayam KM, Speed CJ, Mitchell CA. Identification and characterization of the phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate 5-phosphatase in human platelets. *J Biol Chem.* 1994;269:3397-33402.

Mazzone A, De Servi S, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Pasotti D, Bramucci E, Angoli L, Marsico F, Specchia G, Notario A. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation.* 1993;88:358-363.

Mckeigue PM, Ferrie JE, Pierpoint T, Marmot MG. Association of early-on set coronary heart disease in South Asia men with glucose intolerance and hyperinsulinemia. *Circulation.* 1993;87:152-161.

McMillan GC. Nature and definitions of atherosclerosis. In: Lee KT, ed. *Atherosclerosis.* Ann NY Acad Sci. 1985;454:1-4.

McMurray HF, Partasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest.* 1993;92:1004-1008.

McPherson R, Hogue M, Milne RW, Tall AR, Marcel YL. Increase in plasma cholesteryl ester transfer protein during probucol treatment-Relation to changes in high density lipoprotein composition. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:476-481.

Medh JD, Bowen SL, Fry GL, Ruben S, Andracki M, Inoue I, Lalouel JM, Strickland DK, Chappell DA. Lipoprotein lipase binds to low density lipoprotein receptors and induces receptor-mediated catabolism of very low density lipoproteins in vitro. *J Biol Chem.* 1996;271:17073-17080.

Mehta JL, Saldeen TGP, Rand K. Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31 :1217-1225.

Melnick J, Dreesman G, McCollum C, Petrie B, Burek J, DeBakey M. Cytomegalovirus antigen within human arterial smooth muscle cells. *Lancet.* 1983;2:644-646.

Melnick JL, Hu C, Burek J, Adam E, DeBakey ME. Cytomegalovirus DNA in arterial walls of patients with atherosclerosis. *J Med Virol.* 1994;42 :170-174.

Merckel M, Kako Y, Radner H, Cho IS, Ramasamy R, Brunzell JD, Golberg IJ, Breslow JL. Catalytically inactive LPL expression in muscle of transgenic mice increases VLDL uptake: direct evidence that LPL bridging occurs in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:13841-13846.

Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morill-Labrode A, Dimarello CA, Gorbach SL. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J Nutr.* 1991;121:547-555.

Migas I, Chuang M, Sasaki Y, Severson DL. Diacylglycerol metabolism in SM-3 smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997;75:1249-1256.

Ming WJ, Bersani L, Mantovani A. Tumour necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Immunology.* 1987;138:1469-1474.

Molteni A, Modrowski D, Hott M, Marie PJ. Alterations of matrix –and cell associated proteoglycans inhibit osteogenesis and growth response to fibroblast growth factor-2 in cultured rat mandibular condyle and calvaria. *Cell Tissue Res.* 1999;29:523-536.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide : physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43 :109-142.

Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med.* 1993;177:1675-1680.

Morin CL, Schlaepfer IR, Eckel RH. Tumor necrosis factor-alpha eliminates binding of NF-Y and octamer-binding protein to the lipoprotein lipase promoter in 3T3-L1 adipocytes. *J Clin Invest.* 1995;95:1684-1689.

Morisaki N, Lindsey JA, Milo GE, Cornwell DG. Fatty acid metabolism and cell proliferation. Effect of prostaglandin biosynthesis either from exogenous fatty acid or endogenous fatty acid release with hydralazine. *Lipids.* 1983;18:349-352.

Morishita R, Yamada S, Higaki J, Tomita N, Kida I, Aaki M, Moriguchi A, Hayashi S, Sakurabayashi I, Kaneda Y, Ogihara T. Conditioned medium from Hep G2 cells transfected with human apolipoprotein (a) gene stimulates growth of human vascular smooth muscle cells : effects of overexpression of human apolipoprotein (a) gene. *Hypertension.* 1998;32 :215-222.

Moru N, Gotoda T, Ishibashi S, Shimano H, Harada K, Inaba T, Takaku F, Yazaki Y, Yamada N. Effects of human recombinant macrophage colony-stimulating factor on the secretion of lipoprotein lipase from macrophages. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:1315-1321.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol.* 1989;7:145-173.

Mosquera J, Rodriguez-Iturbe B, Parra G. Fish oil dietary supplementation reduces Ia expression in rat and mouse peritoneal macrophages. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990;56:124-129.

Mukaida N, Ishikawa Y, Ikeda N, Fujioka N, Watanabe S, Kuno K, Matsushima K. Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock: biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF-kappa B and regulation of cytokine production/action through beta2 integrin in vivo. *J Leukoc Biol.* 1996;59:145-151.

Mulder MP, Lombardi P, Jansen H, van Berkel TJ, Frants RR, Havekes LM. Low density lipoprotein receptor internalizes low density and very low density lipoproteins that are bound to heparan sulfate proteoglycans via lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 1993;268:9369-9375.

Munro JM, van der Walt JD, Munro CS, Chalmers JA, Cox EL. An immunohistochemical analysis of human aortic fatty streaks. *Hum pathol.* 1987;18:375-380.

Murthy V, Julien P, Gagné P. Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. *Pharmacol Ther.* 1996;70:101-135.

Nagano Y, Kita T, Yokode M, Ishii K, Kume N, Otani K, Arai H, Kawai C. Probucol does not affect lipoprotein metabolism in macrophages of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis.* 1989;9:453-461.

Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewer CF Jr, Gimbrone MA Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1994;94 :885-891.

Natarajan R, Gonzales N, Xu L, Nadler JL. Vascular smooth muscle cells exhibit increased growth in response to elevated glucose. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187:552-560.

National Cholesterol Education Program. Second report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel II). *Circulation*. 1994;89:1329-1345.

Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, Valente AJ, Berliner JA, Drinkwater DC, Laks H, Fogelman AM. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in co-cultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1991;88:2039-2046.

Neish AS, Williams AJ, Palmer HJ, Whitley MZ, Collins. Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J Exp Med*. 1992;176:1583-1593.

Neito FJ, Adam E, Sorlie P, Farzadegan H, Melnick JL, Comstock GW, Szklo M. Cohort study of cytomegalovirus infection as a risk factor for carotid intimal-medial thickening, a measure of subclinical atherosclerosis. *Circulation*. 1996;94 :922-927.

Newsholme P, Gordon S, Newsholme EA. Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. *Biochem J*. 1987;242:631-636.

Newton AC. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9:161-167.

Nicholson AC, Hajjar DP. Herpesviruses in atherosclerosis and thrombosis. Etiologic agents or ubiquitous bystanders? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18 :339-348.

Nicholson AC, Hajjar DP. Herpesviruses in atherosclerosis and thrombosis. Etiologic agents or ubiquitous bystanders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:339-348.

Nicoletti A, Kaveri S, Caligiuri G, Bariéty J, Hansson G. Immunoglobulin treatment reduces atherosclerosis in apo E knockout mice. *J Clin Invest.* 1998;102:910-918.

Nielsen LB, Juul K, Nordestgaard BG. Increased degradation of lipoprotein (a) in atherosclerotic compared with nonlesioned aortic intima-inner media of rabbits : in vivo evidence that lipoprotein (a) may contribute to foam cell formation. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18 :641-649.

Nivelstein-Post P, Mottino G, Fogelman A, Frank JS. An ultrastructural study of lipoprotein accumulation in cardiac valves of the rabbit. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:1151-1161.

Nivelstein-Post PFEM, Fogelman A, Mottino G, Frank JS. Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus of low density lipoprotein : a deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:1795-1805.

Nordestgaard BG, Nielsen LB. Arteriosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Curr Opin Lipdol.* 1994;5:252-257.

Norman T, Bergeron J, Fernandez Margallo T, Bharucha A, Murthy MRV, Julien P, Gagné C, De Braekeleer M, Ma R, Hayden MR, Lupien PJ. Geographic distribution and genealogy of mutation 207 of the lipoprotein lipase gene in the French canadian population of Quebec. *Hum Genet.* 1992;89:671-675.

Nykjaer A et al. The alpha2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds lipoprotein lipase and beta-migrating very low density lipoprotein associated with lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 1993;268:15048-15055.

Nykjaer A, Nielsen M, Lookene A, Meyer N, Roigaard H, Etzerodt M, Beisiegel U, Olivecrona G, Gliemann J. A carboxyl-terminal fragment of lipoprotein lipase bind to the low density lipoprotein receptor-related protein and inhibits lipase-mediated uptake of lipoprotein in cells. *J Biol Chem.* 1994;269:31747-31755.

O'Brien K, Nagano Y, Gown A, Kita T, Chait A. Probucol treatment affects the cellular composition but not anti-oxidized low density lipoprotein immunoreactivity of plaques from Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1991;11:751-759.

O'Brien KD, Alpers CE, Hokanson JE, Wang S, Chait A. Oxidation specific epitopes in human coronary atherosclerosis are not limited to oxidized low-density lipoprotein. *Circulation.* 1996;94:1216-1225.

O'Brien KD, Gordon D, Deeb S, Ferguson M, Chait A. Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1992;89:1544-1550.

Obsorne Jr JC, Bengtsson-Olivecrona G, Lee NS, Olivecrona T. Studies on inactivation of lipoprotein lipase: role of dimer to monomer dissociation. *Biochemistry* 1985;24:5606-5611.

Obunike JC, Edwards IJ, Rumsey SC, Curtiss LK, Wagner WD, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ. Cellular differences in lipoprotein lipase mediated uptake of low density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1994;269:13129-13135.

Obunike JC, Swarnalatha P, Pillarisetti S, Golberg JJ. Lipoprotein lipase can function as a monocyte adhesion protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1414-1420.

Oikawa T, Onozawa C, Sakaguchi M, Morita I, Murota S. Three isoforms of platelet-derived growth factors all have the capability to induce angiogenesis in vivo. *Biol Pharm Bull.* 1994;17:1686-1688.

Oka K, Tkalcovic GT, Nakamo T, Tucker H, Ishimura-Oka K, Brown WV. Structure and polymorphic map of human lipoprotein lipase gene. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1049:21-26.

Olivecrona G, Hultin M, Savonen R, Skottova N, Lookene A, Tugrul Y, Olivecrona T. Transport of lipoprotein lipase in plasma and lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis X.* Woodford FP, Davignon J, Sniderman A, eds. Elsevier;1995:250-253.

Olivecrona G, Lookene A. Noncatalytic functions of lipoprotein lipase. *Methods Enzymol.* 1997;286:102-116.

Olivecrona T, Bengtsson G. In: Lipases. Borgstrom B, Brockman H, eds. Elsevier: Amsterdam;1984:206-261.

Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Curr Opin Lipidol.* 1993;1:187-196.

Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Curr Opin Lipidol.* 1990;1:222-230.

Olivecrona T, Chernick SS, Bengtsson-Olivecrona G, Garrison M, Scow RO. Synthesis and secretion of lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes: demonstration of inactive forms of lipase in cells. *J Biol Chem.* 1987;262:10748-10759.

Olivecrona T, Liu G, Hultin M, Bengtsson-Olivecrona G. Regulation of lipoprotein lipase. *Biochem Soc Trans.* 1993;21:509-513.

Oliver JD, Rogers MP. Stimulation of lipoprotein lipase synthesis by refeeding, insulin and dexamethasone. *Biochem J.* 1993;292

Olzewski AJ, McCully KS. Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids. *Free Rad Biol Med.* 1993;14 :683-693.

Ong G, Thomas BJ, Mansfield AO, Davidson BR, Taylor-Robinson D. Detection and widespread distribution of *Chlamydia pneumoniae* in the vascular system and its possible implications. *J Clin Pathol.* 1996;49:102-106.

Ong JM, Kern PA. Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J Clin Invest.* 1989;84:305-311.

Ong JM, Simsolo RB, Saffari B, Kern PA. The regulation of lipoprotein lipase gene expression by dexamethasone in isolated rat adipocytes. *Endocrinology.* 1992;130:2312-2316.

Osborn L, Hession C, Tizzard R, Vassallo C, Luhsoskyj S, Chiroso G, Lobb R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds lymphocytes. *Cell.* 1989;59:1203-1211.

Ostlund-Lindqvist AM, Gustafson S, Lindqvist P, Witztum JL, Little JA. Uptake and degradation of human chylomicrons by macrophages in culture: role of lipoprotein lipase. *Arteriosclerosis* 1983;3:433-440.

Padma M, Das UN. Effect of cis-unsaturated fatty acids on the activity of protein kinases and protein phosphorylation in macrophage tumor (AK-5) cells in vitro. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999;60:55-63.

Palinski W, Miller E, Witztum JL. Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:821-825.

Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:605-616.

Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SA, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vitro. *Proc Natl Acad Sci*. 1989;86:1372-1376.

Pardee AB. G₁ events and regulation of cell proliferation. *Science*. 1989;246 :603-608.

Parl F, Gutstein WH, D'Aguillo AF, Baez A. Endothelial injury. Association with elevations of serum bile acid and cholesterol concentrations in biliary-obstructed rats. *Atherosclerosis*. 1975;21:135-146.

Parks JS, Rudel L. Effect of fish oil on atherosclerosis and lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis*. 1990;84:83-94.

Parmley WW. A preventive and therapeutic approach in atherosclerosis. In : Jacobot B, Mathe D, Fruchard JC (eds). Atherosclerosis XI. Elsevier, Amsterdam, 1998 :205-212.

Partasarathy S, Steinberg D, Witztum JL. The role of oxidized -low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu Rev Med.* 1992;43:212-225.

Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1044 :275-283.

Parthasarathy S. Evidence for an additional intracellular site of action of probucol in the prevention of oxidative modification of low density lipoprotein. Use of a new water-soluble derivative. *J Clin Invest.* 1993.;89:1618-1621.

Parthasarathy S. Mechanism(s) of cell-mediated oxidation of low density lipoprotein. In : Nohl H, Esterbauer H, Evans CR, eds. Free radicals in the environment, medicine and toxicology. London : Richelieu Press, 1994 :163-179.

Parthasarathy S. Oxidation of low-density lipoprotein by thiol compounds leads to its recognition by the acetyl LDL receptor. *Biochim Biophys Acta.* 1987;917 :337-340

Patton JS, Shepard HM, Wilking H, Lewis G, Aggarwal BB, Eessalu TE, Gavin LA, Grunfeld C. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:8313-8317.

Pearson TA, Kramer EC, Solez K, Heptinstall RH. The human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* 1977;86:657-664.

Pedersen SB, Borglum JD, Moller-Pedersen T, Richelsen B. Effects of in vivo estrogen treatment on adipose tissue metabolism and nuclear estrogen receptor binding in isolated rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 1992;85:13-19.

Peinado-Onsurbe J, Staels B, Deeb S, Ramirez I, Llobera M, Auwerx J. *Biochem Biophys Acta.* 1992;1131:281-286.

Pertruschke T, Rohrig K, Hauner H. Transforming growth factor beta (TGF-beta) inhibits the differentiation of human adipocyte precursor cells in primary culture. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1994;18:532-536.

Peterson J, Bihain BE, Bengtsson-Olivecrona G, Deckelbaum RJ, Carpentier YA, Olivecrona T. Fatty acid control of lipoprotein lipase: a link between energy metabolism and lipid transport. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:909-913.

Phillips NR, Waters D, Havel RJ. Plasma lipoproteins and progression of artery disease evaluated by angiography and clinical events. *Circulation.* 1993;88 :2762-2770.

Poon M, Zhang X, Dunsky K, Taubman MB, Harpel PC. Apolipoprotein (a) induces monocyte chemotactic activity in human vascular endothelial cells. *Circulation.* 1997;96 :2514-2519.

Portman OW, Alexander M. Metabolism of sphingolipids by normal and atherosclerotic aorta of squirrel monkeys. *J Lipid Res.* 1970;11:23-30.

Pradines-Figuères A, Barcellini-Couget S, Dani C, Vannier C, Ailhaud G. Lipoprotein lipase stored in adipocytes and muscle cells is a cryptic enzyme. *J Lipid Res.* 1990;31:1283-1291.

Previato L, Parrott CL, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr. Transcriptional regulation of the human lipoprotein lipase gene in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 1991;266:18958-18963.

Price SR, Mizel SB, Pekala PH. Regulation of lipoprotein lipase synthesis and 3T3-L1 metabolism by recombinant interleukin 1. *Biochim Biophys Acta.* 1986;889:374-381.

Purcell-Huynh DA, Farese RV Jr, Johnson DF, Flynn LM, Pierotti V, Newland DL, Linton MF, Sanan DA, Young SG. Transgenic mice expressing high levels of human apolipoprotein B develop severe atherosclerotic lesions in response to a high-fat diet. *J Clin Invest.* 1995;95 :2246-2257.

Querfeld U, Ong JM, Prehn J, Carty J, Saffari B, Jordan SC, Kern PA. Effects of cytokines on the production of lipoprotein lipase in cultured human macrophages. *J Lipid Res.* 1990;31:1379-1386.

Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:2995-2998.

Rahman A, Kefer J, Bando M, Niles WD, Malik AB. E-selectin expression in human endothelial cells by TNF-alpha-induced oxidant generation and NF-kappaB activation. *Am J Physiol.* 1998;275:L533-544.

Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart.* 1993;69 :S30-S37.

Raisonnier A, Etienne J, Arnault F, Brault D, Noe L, Chuat J-C, Galibert F. Comparaison of cDNA and amino acid sequences of lipoprotein lipase in eight species. *Comp Biochem Physiol.* 1995;111B:386-398.

Rand ML, Sangar W, Hancock MA, Taylor DM, Marcovina SM, Packam MA, Kosschinsky ML. Apolipoprotein (a) enhances platelet responses to the thrombin receptor-activating peptide SFLLRN. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18 :1393-1399.

Ranganathan G, Vu D, Kern PA. Translational regulation of lipoprotein lipase by epinephrine involves a trans-acting binding protein interacting with the 3 untranslated region. *J Biol Chem.* 1997;272:2515-2519.

Rapola JM, Virtamo J, Ripatti S, Huttunen JK, Albanes D, Taylor PR, Heinonen OP. Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet.* 1997;349:1715-1720.

Rapp JH, Lespine A, Hamilton RL, Colyvas N, Chaumelton AH, Tweedie-Hardman J, Kotite L, Kunitake ST, Havel RJ, Kane JP. Triglyceride-rich lipoproteins isolated by selected-affinity anti-apolipoprotein B immunosorption from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:1767-1774.

Rasmussen ON, Thomsen C, Hansen KV, Vasterund M, Winther E, Hermansen K. Effects on blood pressure, glucose, and lipid level of a high monounsaturate compared with a high carbohydrate diet in NIDDM subjects. *Diab Care.* 1993;16:1565.

Rasmussen SJ, Eckmann L, Quayle AJ, Shen L, Zhang YX, Anderson DJ, Fierer J, Stephens RS, Kagnoff MF. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest.* 1997;99 :77-87.

Ray KP, Farrow S, Daly M, Talabot F, Searle N. Induction of the E-selectin promoter by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha. And inhibition by glucocorticoids. *Biochem J.* 1997;328:707-715.

Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988;37 :1595-1607.

Reddy KG, Nair RN, Sheedan HM, Hodgson JM. Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risks factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1994;23 :833-843.

Renier G, Lambert A. Lipoprotein lipase synergizes with interferon gamma to induce macrophage nitric oxide synthetase mRNA expression and nitric oxide production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:392-399.

Renier G, Olivier M, Skamene E, Radzioch D. Induction of tumor necrosis factor gene expression by lipoprotein lipase requires protein kinase C activation. *J Lipid Res.* 1994;35:1413-1421.

Renier G, Skamene D, De Sanctis J, Radzioch D. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1515-1524.

Renier G, Skamene E, DeSanctis J, Radzioch D. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerosis in mice. Modulation of macophage secretory activities. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1515-1524.

Renier G, Skamene E, DeSanctis JB, Radzioch D. High macrophage lipoprotein lipase expression and secretion are associated in inbred murine strains with susceptibility to atherosclerosis. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1993;13:190-196.

Renier G, Skamene E, DeSanctis JB, Radzioch D. Induction of tumor necrosis factor gene expression by lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* 1994;35:271-278.

Report of the Working Group of Arteriosclerosis of the National Heart, Lung, and Blood Institute (1981) DHEW No. (NIH)82-2035, vol.2, US Government Printing Office, Washington, DC.

Rhoades KL, Golub SH, Economou JS. The regulation of the human tumor necrosis factor alpha promoter region in macrophage, T cell, and B cell lines. *J Biol Chem.* 1992;267:22102-22107.

Rhoades KL, Golub SH, Economou JS. The regulation of the human tumor necrosis factor promoter region in macrophage, T cell, and B cell lines. *J Biol Chem.* 1992;267:22102-22107.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 1998;391:79-82.

Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med.* 1993;328:1450-1456.

Rinninger F, Kaiser T, Mann WA, Meyer N, Greten H, Beisiegel U. Lipoprotein lipase mediates an increase in the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesteryl esters by hepatic cells in culture. *J Lipid Res.* 1998;39:1335-1348.

Robert L. Le fibroblaste, définition de son phénotype par son " programme " de biosynthèse de la matrice extracellulaire. *Pathol Biol.* 1992;40 :851-858.

Rollins BJ, Stier P, Ernst T, Wong GG. The human homology of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol Cell Biol.* 1989;4687-4695.

Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE.. *Am J Pathol.* 1990;136:1229-1233.

Romanic AM, Arleth AJ, Willette RN, Ohlstein EH. Factor XIIIa cross-links lipoprotein (a) with fibrinogen and is present in human atherosclerotic lesions. *Circ. Res.* 1998;83 :264-269.

Romano M, Romano E, Bjorkerud S, Hurt-camejo E. Ultrastructural localization of secretory type II phospholipase A₂ in atherosclerotic and nonatherogenic regions of human arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18 :519-525.

Roselaar SE, Schonfeld G, Daugherty A. Enhanced development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by suppression of cell-mediated immunity. *J Clin Invest.* 1995;96:1389-1394.

Rosenblatt DS. Inherited disorders of folate transport and metabolism. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* New York : McGraw-Hill Publishing Co;1995 :3111-3128.

Rosenfeld ME, Khoo JC, Miller E, Parthasarathy S, Palinski W, Witztum JL. Macrophage-derived foam cells freshly isolated from rabbit atherosclerotic lesions degrade modified lipoproteins, promote oxidation of LDL, and contain oxidation specific lipid-protein adducts. *J Clin Invest.* 1990;87:90-99.

Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1977;86 :675-684.

Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Ann Rev Physiol.* 1995;57 :791-804.

- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s. *Nature* 1993a; 362 :801-809.
- Ross R. Cellular mechanisms of atherosclerosis. *Atherosclerosis Reviews*, Vol. 25, Weber PC, Leaf A, eds. Raven Press Ltd., New York;1993b:195-200.
- Ross R. Mechanisms of atherosclerosis- a review. *Adv Nephrol.* 1990;19 :79-86.
- Ross R. New insights into the mechanisms of atherogenesis. In : Jacobot B, Mathé D, Fruchart J-C (eds). *Atherosclerosis XI* 1998:201-204.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Engl J Med.* 1986;314:488-500.
- Ross R. Atherosclerosis-An inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
- Royall JA, Beckow RL, Beckman JS, Cunningham MK, Matalon S, Freeman BA. Tumor necrosis factor and interleukin I alpha increase vascular endothelial permeability. *Am J Physiol.* 1989;257:L399-410.
- Rumsey SC, Obunike JC, Arad Y, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase-mediated uptake and degradation of low density lipoproteins by fibroblasts and macrophages. *J Clin Invest.* 1992;90:1504-1512.
- Rutledge JC, Woo MM, Rezai AA, Curtiss LK, Golberg IJ. Lipoprotein lipase increases lipoprotein binding to the artery wall and increases endothelial layer permeability by formation of lipolysis products. *Circ Res.* 1997;80:819-828.

Saffari B, Ong JM, Kern PA. Regulation of adipose tissue lipoprotein lipase gene expression by thyroid hormone in rats. *J Lipid Res.* 1992;33:241-249.

Saito T, Ookubo R, Kuriyama M, Saano R, Ichinose A. Lipoprotein (a) concentration and molecular weight of apolipoprotein (a) in patients with cerebrovascular disease and diabetes mellitus. *Thromb Res.* 1997;87 :527-538.

Saku K, Zhang B, Liu R, Shirai K, Arakawa K. Associations among serum lipoprotein (a) levels, apolipoprotein (a) phenotypes, and myocardial infarction in patients with extremely low and high levels of serum lipoprotein (a). *Jpn Circ J.* 1999;63:659-665.

Salonen JT, Ylä-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyysönen K, Palinski W, Witztum JL. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet.* 1992;339:883-887.

Samuelsson L, Strömberg K, Vikman K, Bjursell G, Enerbäck S. The CCAAT/enhancer binding protein and its role in adipocyte differentiation: evidence for direct involvement in terminal adipocyte development. *EMBO J.* 1991;10:3787-3793.

Sanderson P, MacPherson GG, Jenkins CH, Calder PC. Dietary fish oil diminishes antigen presentation activity by rat lymphoid dendritic cells. *J Leuk Biol.* 1997;62:771-777.

Sanderson P, Yaqoob P, Calder PC. Effects of dietary lipid manipulation upon spleen lymphocyte functions and the expression of lymphocyte surface molecules. *J Nutr Environ Med.* 1995;5:119-132.

Santamarina-Fojo S, Dugi KA. Structure, function and role of lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 1994;5:1117-1125.

Santamarina-Fojo S. Genetic dyslipoproteinemias: role of lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II. *Curr Opin Lipidol* . 1992;3:186-195.

Sartippour MR, Lambert A, Laframboise M, St-Jacques P, Renier G. Stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression and production. *Diabetes*. 1998;47:431-438.

Saxena U, Klein MG, Goldberg IJ. Transport of lipoprotein lipase across endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1991;88:2254-2258.

Saxena U, Ferguson E, Bisgaier CL. Apolipoprotein E modulates low density lipoprotein retention by lipoprotein lipase anchored to the subendothelial matrix. *J Biol Chem*. 1993;268:14812-14819.

Saxena U, Goldberg IJ. Interaction of lipoprotein lipase with glycosaminoglycans and apolipoprotein C-II: effects of free fatty acids. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1043:161-168.

Saxena U, Klein MG, Goldberg IJ. Identification and characterization of the endothelial cell surface lipoprotein lipase receptor. *J Biol Chem*. 1991;266:17516-17521.

Saxena U, Klein MG, Goldberg IJ. Metabolism of endothelial cell-bound lipoprotein lipase: evidence for heparan sulfate proteoglycan-mediated internalization and recycling. *J Biol Chem*. 1990;265:12880-12886.

Saxena U, Klein MG, Goldberg IJ. Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids. *J Biol Chem*. 1989;264:4349-4355.

Saxena U, Klein MG, Vanni TM, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase increases low density lipoprotein retention by subendothelial cell matrix. *J Clin Invest.* 1992;89:373-380.

Saxena U, Kulkarni NM, Ferguson EF, Newton RS. Lipoprotein lipase-mediated lipolysis of very low density lipoproteins increases monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;198:1653-1658.

Schneider DJ, Absher PM, Neimane D, Russell JC, Sobel BE. Fibrinolysis and atherogenesis in the JCR :LA-cp rat in relation to insulin and triglyceride concentrations in blood. *Diabetologia.* 1998;41 :141-147.

Schonfeld G, Patsch W, Pflieger B, Witztum JL, Weidman SW. Lipolysis produces changes in the immunoreactivity and cell reactivity of very low density lipoproteins. *J Clin Invest.* 1979;64:1288-1297.

Schoojans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1302:93-109.

Schwartz CJ, Kelley JL, Nerem RM, Sprague EA, Rozek MM, valente AJ, Edwards EH, Prasad ARS, Kerbacher JJ, Logan SA. Pathophysiology of the atherogenic process. *Am J Cardiol.* 1989;64 :23G.

Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague A, Kelly JL, Nerem RM. The pathogenesis of atherosclerosis : an overview. *Clin Cardiol.* 1991;14 :1-6.

Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelly JL, Cayatte AJ, Rozek MM. Pathogenesis of the atherosclerotic lesions: implications for diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1992;15:1156-1167.

Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol*. 1993;71 :9B-14B.

Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits, I: focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis*. 1989a;9:895-907.

Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits, II: selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis*. 1989b;9:908-918.

Schwenke DC. Antioxydants and atherogenesis. *J Nutr Biochem*. 1998;9:424-445.

Seed M, Maily F, Vallance D, Doherty E, Winder A, Talmud P, Humphries SE. Lipoprotein lipase activity in patients with combined hyperlipidaemia. *Clin Invest*. 1994;72:100-106.

Seljelid R, Eskeland T. The biology of macrophages: I general principles and properties. *Eur J Haematol*. 1993;51:267-275.

Semb H, Olivecrona T. Nutritional regulation of lipoprotein lipase in guinea pig tissues. *Biochim Biophys Acta*. 1986;876:249-255.

Semb H, Olivecrona T. The relation between glycosylation and activity of guinea pig lipoprotein lipase. *J Biol Chem*. 1989;264:4195-4200.

Semb H, Olivecrona T. Two different mechanisms are involved in nutritional regulation of lipoprotein lipase in guinea-pig adipose tissue. *Biochem J.* 1989;262:505-511.

Semenkovich CF, Chen S-H, Wims M, Luo CC, Li WH, Chan L. Lipoprotein lipase and hepatic lipase mRNA tissuespecific expression, developmental regulation, and evolution. *J Lipid Res.* 1989;30:423-431.

Semenkovich CF, Luo CC, Nakanishi K, Chen SH, Smith LC, Chan L. In vitro expression and site-specific mutagenesis of the cloned human lipoprotein lipase gene. Potential N-linked glycosylation site asparagine 43 is important for both enzyme activity and secretion. *J Biol Chem.* 1990;265:5429-5433.

Senda M, Oka K, Brown WV, Qasba PK, Furuichi Y. Molecular cloning and sequence of a cDNA coding for bovine lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci.* 1984;81:1030-1034.

Shakov AN, Collart MA, Vassali P, Nedospakov SA, Jongeneel VC. KappaB-type enhancers are involved in LPS-mediated transcriptional activation of the TNF-alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med.* 1990;171:35-42.

Sherrington EJ, Sanderson P, Calder PC. The effect of dietary lipid manipulation on macrophages cell surface molecule expression. *Biochem Soc Transactions.* 1995;23:272S

Shils ME, Olson JA, Shike M. Modern nutrition in health and disease. Lea & Febiger (eds). Philadelphia;1994.

Shimada K, Gill PJ, Silbert JE, Douglas WHJ, Fanburg DL. Involvement of cell surface heparin sulfate in the binding of lipoprotein lipase to cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest.* 1981;68:995-1002.

Shimada M, Shimano H, Gotoda T, Yamamoto K, Kawamura M, Inaba T, Yazaki Y, Yamada N. Overexpression of human lipoprotein lipase in transgenic mice. Resistance to diet-induced hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 1993;268:17924-17929.

Sigal E, Laughton CW, Mulkins MA. Oxidation, lipoxygenase, and atherogenesis. *Ann NY Acad Sci.* 1994;714 :211-224.

Silver PJ, Moreau JP, Denholm E, Lin YQ, Nguyen L, Bennett C, Recktenwald A, Deblois D, Baker S, Ranger S. Heparinase III limits rat arterial smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol.* 1998;351:79-83.

Simionescu N, Vasile E, Lupu F, Propescu G, Simionescu M. Prelesional events in atherogenesis : accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. *Am J Pathol.* 1986;123 :109-125.

Sivaram P, Choi SY, Curtiss LK, Goldberg IJ. An amino-terminal fragment of apolipoprotein B binds to lipoprotein lipase and may facilitate its binding to endothelial cells. *J Biol Chem.* 1994;269:9409-9412.

Sjölund M, Heldin U, Sejersen T, Heldin C-H, Thyberg IJ. Arterial smooth muscle cells express platelet-derived growth factor (PDGF) A chain mRNA, secrete a PDGF-like mitogen, and bind exogenous PDGF in a phenotype- and growth state-dependent manner. *Cell Biol.* 1988;106 :403-413.

Skinner MP, Raines EW, Ross R. Dynamic expression of $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrin receptors by human vascular smooth muscle cells : $\alpha 2\beta 1$ integrin is required for chemotaxis across type I collagen-coated membranes. *Am J Pathol.* 1994;145 :1070-1081.

Skottova N, Savonen R, Lookene A, Hultin M, Olivecrona G. Lipoprotein lipase enhances removal of chylomicrons and chylomicron remnants by the perfused rat liver. *J Lipid Res.* 1995;36:1334-1344.

Slattery ML, Jacobs DR Jr, Nichaman MZ. Leisure time physical activity and coronary heart disease death. The US Railroad Study. *Circulation.* 1989;79:304-311.

Smith EB, Keen GA, Grant A, Stirk C. Fate of fibrinogen and risk of cardiovascular disease. *JAMA.* 1987;258 :1183-1186.

Smith PD, Saini SS, Raffeld M, Manischewitz JF, Wahl SM. Cytomegalovirus induction of tumor necrosis factor- α by human monocytes and mucosal macrophages. *J Clin Invest.* 1992;90:1642-1648.

Sobel BE, Woodcock-Mitchell J, Schneider DJ, Holt RE, Marutsuka K, Gold H. Increased plasminogen activator inhibitor type I in coronary artery atherectomy specimens from type 2 diabetic compared with nondiabetic patients : a potential factor predisposing to thrombosis and its persistence. *Circulation.* 1998;97 :2213-2221.

Somers SD, Erickson KL. Alteration of tumor necrosis factor- α production by macrophages from mice fed diets high in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Cell Immunol.* 1994;153:287-297.

- Spooner PM, Chernick SS, Garrison MM, Scow RO. Insulin regulation of lipoprotein lipase lipase activity and release in 3T3-L1 adipocytes. Separation and dependence of hormonal effects on hexose metabolism and synthesis of RNA and protein. *J Biol Chem.* 1979;254:10021-10029.
- Sprecher E, Becker Y. Role of Langerhans cells and other dendritic cells in disease states. *In vivo.* 1993;7:217-227.
- Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-434.
- Staats HF, Lausch RN. Cytokine expression in vivo during murine herpetic keratitis. *J Immunol.* 1993;151:277-283.
- Stafforini DM, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. The platelet activating factor acetylhydrolase from human plasma prevents oxidative modification of low-density lipoprotein. *Trans Am Assoc Physicians.* 1993;106:44-63.
- Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, Tishler PV, Hennekens CH. A prospective study of plasma homocystein(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA.* 1992;268 :877-881.
- St-Armand J, Després J-P, Lemieux S, Lamarche B, Moorjani S, Prud'homme D, Bouchard C, Lupien PJ. Does lipoprotein or hepatic lipase activity explain the protective lipoprotein profile of premenopausal women. *Metabolism.* 1995;44:491-498.
- Stary HC. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J.* 1990;11 :3-9.

Sary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson DH, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. *Circulation*. 1992;85:391-405.

Sary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis*. 1989;9:19-32.

Stein JH, Rosenson RS. Lipoprotein Lp(a) excess and coronary heart disease. *Arch Intern Med*. 1997;157 :170-176.

Stein O, Ben-Naim M, Dabach Y, Hollander G, Halperin G, Stein Y. Can lipoprotein lipase be the culprit in cholesteryl ester accretion in smooth muscle cells in atheroma? *Atherosclerosis* 1993;99:15-22.

Stein O, Ben-Naim M, Dabach Y, Hollander G, Stein Y. Murine macrophages secrete factors that enhance uptake of non-lipoprotein [3H] cholesteryl ester by aortic smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1212:305-310.

Steinberg D, Parthasarthy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol : modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989;320 :915-924.

Steinberg D. Antioxydants and atherosclerosis : a current assessment. *Circulation*. 1991;84 :1420-1425.

Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: strengths and weaknesses. In: Woodfort FP, Davignon J, Smiderman A (eds) *Atherosclerosis X*. Elsevier, Amsterdam, 1995, pp 25-29.

- Steinbrecher VP, Zhang H, Laugheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 1990;9:155
- Steiner G. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology and intervention trials. In: Woodfort FP, Davignon J, Sniderman A (eds) *Atherosclerosis X*. Elsevier, Amsterdam, pp 749-752.
- Steinman RM. Dendritic cells. *Transplantation.* 1981;31:151-155.
- Stemme S, Hansson GK. Immune mechanisms in atherogenesis. *Annals of Medicine.* 1994;26:141-146.
- Stemme S, Holm J, Hansson GK. T lymphocytes in human atherosclerotic plaques are memory cells expressing CD45RO and the integrin VLA-1. *Arterioscler Thromb.* 1992;12:206-211.
- Stengel D, Antonucci M, Gaoua W, Dacet C, Lesnik P, Hourton D, Ninio E, Chapman MJ, Griglio S. Inhibition of LPL expression in human monocyte-derived macrophages is dependent on LDL oxidation state. A key role for lysophosphatidylcholine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1172-1180.
- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ, Brown MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxydant Study (CHAOS). *Lancet.* 1996;347:781-786.
- Stout RW. Insulin and atheroma. 20-yr perspective. *Diabetes Care.* 1990;13 :631-654.
- Street DA, Comstock GW, Salked RM, Schuap W, Klag MJ. Serum antioxydant and myocardial infarction-Are low levels of crotenoids and alpha-tocopherol risk factors for myocardial infarction? *Circulation.* 1994;90:1154-1161.

- Strong JP, McGill HC Jr. The natural history of coronary atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1962;40:37-49.
- Stubbs CD, Smith AD. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acids composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1984;779:89-137.
- Sumida C, Graber R, Numez E. Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostaglandins Leukot essent Fatty Acids.* 1993;48:117-122.
- Sweetser DA, Lowe JB, Gordon JI. The nucleotide sequence of the rat liver fatty acid-binding protein gene. Evidence that exon 1 encodes an oligopeptide domain shared by a family of protein which bind hydrophobic ligands. *J Biol Chem.* 1986;261:5553-5561.
- Tabas I, Li Y, Brocia RW, Xu SW, Swenson TL, Williams KJ. Lipoprotein lipase and sphingomyelinase synergistically enhance the association of atherogenic lipoproteins with smooth muscle cells and extracellular matrix. A possible mechanism for low density lipoprotein and lipoprotein (a) retention and macrophage foam cell formation. *J Biol Chem.* 1993;268:20419-20432.
- Tabas I, Schissel SL, Williams KJ, Schuchman EH, Rapp JH, Tweedie-Hardman J. Arterial-wall sphingomyelinase. In : Jacobot B, Mathé D, Fruchart J-C (eds). *Atherosclerosis XI* 1998:201-204.
- Takahashi S, Suzuki J, Kohno M, Oida K, tamai T, Miyabo S, Yamamoto T, Nakai T. Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 1995;270:15747-15754.

Takahashi M, Kitagawa S, Masuyama JI, Ikeda U, Kasahara T, Takahashi YI, Furukawa Y, Kano S, Shimada K. Human monocyte-endothelial cell interaction induces synthesis of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation*. 1996;93:1185-1193.

Tall AR, Bruce C, Sharp D, Ji Y, Sun Y, Wang N. Genetic determinants of HDL and their relationships to atherosclerosis. . In : Jacobot B, Mathé D, Fruchart J-C (eds). *Atherosclerosis XI*. 1998:867-870.

Tan KC, Ai VH, Chow WS, Chan MT, Leong L, lam KS. Influence of low density lipoprotein (LDL) subfraction profile and LDL oxidation on endothelium-dependent and independent vasodilatation in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:3212-3216.

Tanis BC, Westendorp GJ, Smelt HM. Effect of thyroid substitution on hypercholesterolemia in patients with subclinical hypothyroidism: a reanalysis of intervention studies. *Clin Endocrinol*. (Oxf). 1996;44:44643-44649.

Tanaka S, Yashiro A, Tasaki H, Nakashima Y. Enhanced macrophage uptake of lipoprotein (a) after Ca²⁺-induced aggregate-formation. *Lipids*. 1998;33 :385-392.

Tappia PS, Grimble RF. Complex modulation of cytokine induction by endotoxin and tumour necrosis factor from peritoneal macrophages of rats by diets containing fats of different saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acid composition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1991;43:141-149.

Taskinen M-R. Post-prandial lipemia and lipoprotein lipase. *Atherosclerosis X*. Woodford FP, Davignon J, Sniderman A, eds. Elsevier;1995:758-762.

Tatami R, Mabuchi H, Ueda K, Ueda R, Haba T, Kametani T, Ito S, Koizumi J, Ohta M, Miyamoto S, Nakayama A, Kanaya H, Oiwake H, Genda A, Takeda R. Intermediate density lipoprotein and cholesterol-rich very low-density lipoprotein in angiographically determined coronary artery disease. *Circulation*. 1981;64 :1174-1184.

Tengku-Muhammad TS, Cryer A, Ramji DP. Synergism between interferon gamma and tumor necrosis factor alpha in the regulation of lipoprotein lipase in the macrophage J774.2 cell line. *Cytokine*. 1998;10:33-48.

Tengku-Muhammad TS, Hughes TR, Cryer A, Ramji DP. Differential regulation of lipoprotein lipase in the macrophage J774.2 cell line by cytokines. *Cytokine*. 1996;8:525-533.

The Oslo Study Group. Effect of diet and smoking intervention on the incidence of coronary heart disease. *Lancet*. 1981;ii:1303-1310.

Thyberg J, Hedin U, Sjölund M, Palmberg L, Bottger BA. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*. 1990;10 :966-990.

Todd S, Woodward M, Boltonsmith C, Tunstallpedoe H. An investigation of the relationship between antioxidant vitamin intake and coronary heart disease in men and women using discriminant analysis. *J Clin Epidemiol*. 1995;48:297-305.

Tonstad S, Joakinusen O, Stensland-Bugge E, Leren TP, Ose L, Russell D, Bonna KH. Risk factors related to carotid intima-media thickness and plaque in children with familial hypercholesterolemia and control subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:984-991.

Tornvall P, Olivecrona G, Karpe F, Hamsten A, Olivecrona T. Lipoprotein mass and activity in plasma increase after heparin are separate parameters with different relations to plasma lipoproteins.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995;15

Tsukahara H, Haruki S, Hiraoka M, Hori C, Sudo M. Persistent hypercholesterolemia in frequently relapsing steroid-responsive nephrotic syndrome. *J Paediatr Child Health.* 1997;33:253-255.

Tsutsumi K, Inoue Y, Shima A, Murase T. Correction of hypertriglyceridemia with low high-density lipoprotein cholesterol by the novel compound NO-1886, a lipoprotein lipase-promoting agent, in STZ-induced diabetic rats. *Diabetes.* 1995;44:414-417.

Turek JJ, Schoenlein IA, Bottoms GD. The effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on tumor necrosis factor- production and leucine aminopeptidase levels in rat peritoneal macrophages. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1991;43:141-149.

Turek JJ, Schoenlein IA, Clark LK, Van Alstine WG. Dietary polyunsaturated fatty acids effects on immune cells of the porcine lung. *J Leuk Biol.* 1994;56:599-604.

Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum : methods and clinical applications. *Clin Chem.* 1993;39 :1764-1779.

Unanue ER, Allen PM. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science.* 1987;236:551-557.

Unanue ER, Beller DI, Lu CY, Allen PM. Antigen presentation: comments on its regulation and mechanism. *J Immunol.* 1984;132:1-5.

Valente AJ, Rozek MM, Sprague EA, Schwartz CJ. Mechanisms in intimal monocyte-macrophage recruitment. A special role for monocyte chemoattractant protein-1. *Circulation*. 1992;86:20-25.

van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1992;141:1427-1433.

Vance JE, Khoo JC, Steinberg D. Lipoprotein lipase in cultured pig aortic smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*. 1982;2:390-395.

Vannier C, Amri E-Z, Etienne J, Négrel R, Ailhaud G. Maturation and secretion of lipoprotein lipase in cultured adipose cells. I. Intracellular activation of the enzyme. *J Biol Chem*. 1985;260:4424-4431.

Verlangieri AJ, Bush MJ. Effects of d-tocopherol supplementation on experimentally induced primate atherosclerosis. *J Am Coll Nutr*. 1992;11:130-137.

Victorov AV, Hoek JB. Secretion of prostaglandins elicited by lipopolysaccharide and ethanol in cultured rat Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;215:691-697.

Vilaró S, Llobera M, Bengtsson-Olivecrona G, Olivecrona T. Synthesis of lipoprotein lipase in the liver of newborn rats and localization of the enzyme by immunofluorescence. *Biochem J*. 1988;249:549-556.

Vilella E, Joven J, Fernández M, Vilaró S, Brunzell JD, Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins. *J Lipid Res*. 1993;34:1555-1564.

Virella G, Fourspring K, Hyman B, et al. Immunosuppressive effects of fish oil in normal human volunteers: correlation with the in vitro effects of eicosapentaenoic acid on human lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol.* 1991;61:161-176.

Visser M, Tracy P, Vercellotti G, Goodman J, White J, Jacob H. Enhanced thrombin generation and platelet binding on herpes simplex virus-infected endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:8227-8230.

Wadsworth TL, Koop DR. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol.* 1999;57:941-949.

Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro : a model for the study of vascular injury. *Thromb. Res.* 1980;18 :113-121.

Wallinder L, Peterson J, Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G. Hepatic and extrahepatic uptake of intravenously injected lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta.* 1984;795:513-524.

Watanabe S, Hayashi H, Onozaki K, Okuyama H. Effect of dietary alpha-linolenate/linoleate balance on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in mouse macrophages. *Life Sci.* 1991;48:2013-2020.

Watanabe Y, Inaba T, Shimanao H, Gotoda T, Yamamoto K, Mokuno H, Sato H, Yazaki Y, Yamada N. Induction of LDL receptor-related protein during the differentiation of monocyte-macrophages. Possible involvement in the atherosclerotic process. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:1000-1006.

Watson AD, Navab M, Hough GP, Hama SY, La Du BN, Young L, Laks H, Permut LC, Fogelman AM, Berliner JA. Biologically active phospholipids in MM-LDL are transferred to HDL and are hydrolyzed by HDL-associated esterases. *Circulation*. 1994;90 :I-353.

Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, McIntyre TM, La Du BN, Fogelman AM, Berliner JA. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized-low density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1995;95 :774-782.

Watson TDG, Tan C-E, McConnell M, Clegg SK, Squires LF, Packard CJ. Measurement and physiological significance of lipoprotein and hepatic lipase activities in preheparin plasma. *Clin Chem*. 1995;41:405-412.

Watts GF, Mandalia S, Brunt JNH, Slavin BM, Coltart DJ, Lewis B. Independent association between plasma lipoprotein subfraction levels and the course of coronary artery disease in the St. Thomas's Atherosclerosis Regression Study (STARS). *Metabolism*. 1993;42 :1461-1467.

Weber C, Erl W, Pietsch A, Weber PC. Aspirin inhibits nuclear factor-kappa B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation*. 1995;91:1914-1917.

Weber C, Erl W, Weber K, Weber PC. Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers. *Circulation*. 1996;93:1488-1492.

Weinsten SL, sanghera JS, Lemke K, De Franco AL, Pelech SL. Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase in macrophages. *J Biol Chem*. 1992;267:14955-14962.

Weintraub MS, Grosskopf I, Rassin T, Miller H, Charach G, Rotmensch HH, Liron M, Rubinstein A, Iaina A. Clearance of chylomicron remnants in normolipidaemic patients with coronary artery disease : case control study over three years. *Br Med J.* 1996;312 :935-939.

White JR, Chait A, Klebanoff SJ, Deeb S, Brunzell JD. Bacterial lipopolysaccharide reduces macrophage lipoprotein lipase levels: an effect that is independent of tumour necrosis factor. *J Lipid Res.* 1988;29:1379-1385.

Wilhelmsen L. Coronary heart disease: epidemiology of smoking and intervention studies of smoking. *Am Heart J.* 1988;115:242-249.

Willeaume V, Krus V, Mijatovic T, Huez G. Tumor necrosis factor-alpha production induced by virus and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *J Inflamm.* 1995-96;46:1-12.

Williams KJ, Fless GM, Petrie KA, Snyder ML, Brocia RW, Swenson T. Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein (a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. *J Biol Chem.* 1992;267:13284-13292.

Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol.* 1998;9 :471-474.

Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:551-561.

Williams PT, Fortmann SP, Terry RB, Garay SC, Uranizan KM, Ellesworth N, Wood PD. Associations of dietary fat, regional adiposity, and blood pressure in men. *JAMA.* 1987;257:3251.

Williams RJ, Motteram JM, Sharp CH, Gallagher PJ. Dietary vitamin E and the attenuation of early lesion development in modified Watanabe rabbits. *Atherosclerosis*. 1992;94:153-159.

Williams SE, Inoue I, Tran H, Fry GL, Pladet MW, Iverius P-H, Laloel JM, Chappell DA, Strickland DK. The carboxyl-terminal domain of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor (LRP) and mediates binding of normal very low density lipoproteins to LRP. *J Biol Chem*. 1994;269:8653-8658.

Willnow TE, Golstein JL, Orth K, Brown MS, Herz J. Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J Biol Chem*. 1992;267:26172-26180.

Wilson DE, Emi M, Iverius PH, Hata A, Wu LL, Hilar E, Williams RR, Lalouel JM. Phenotypic expression of heterozygous lipoprotein lipase deficiency in the extended pedigree of a proband homozygous for a missense mutation. *J Clin Invest*. 1990;86:735-750.

Windler E, Chao YS, Havel RJ. Regulation of hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rat: opposing effects of homologous apolipoprotein E and individual C apoproteins. *J Biol Chem*. 1980;255:8303-83307.

Wion KL, Kirchgessner TG, Lusis AJ, Schotz MC, Lawn RM. Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence. *Science*. 1987;235:1638-1641.

Wissler RW, Vesselinovitch D, Hughes R, Turner D, Frazier L. Arterial lesions and blood lipids in rhesus monkeys fed human diets. *Exp Mol Pathol*. 1983;38: 117-136.

Wissler RW. Morphological characteristics of the developing atherosclerotic plaque: animal studies and studies of lesions from young people. *Atheroscler Rev.* 1991;23:91-103.

Witztum JL, Steinberg B. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991;88 :1785-1792

Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet.* 1994;344 :793-795.

Wojcicki J, Rozewicka b, Barcew-Wiszniewska L, Samochowiec S, Kadlubowska S, Tustanowski S, Juzyszyn Z. Effect of selenium and vitamin E on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis.* 1991;87:9-16.

Wong H, Davis RC, Nikazy J, Seebart KE, Schotz MC. Domain exchange: characterization of a chimeric lipase of hepatic lipase and lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:11290-11294.

Wong H, Davis RC, Thuren T, Goers JW, Nikazy J, Waite M, Schotz MC. Lipoprotein lipase domain function. *J Biol Chem.* 1994;269:10319-10323.

Woodhouse PR, Khaw KT, Plummer M, Foley A, Meade TW. Seasonal variations of plasma fibrinogen and factor VII activity in the elderly : winter infections and death from cardiovascular disease. *Lancet.* 1994;343 :435-439.

Wrenshall LE, Cerra FB, Singh RV, Platt JL. Heparan sulfate initiates signals in murine macrophages leading to divergent biologic outcomes. *The Journal of Immunology.* 1995;154:871-880.

Xu Q, Dietrich H, Steiner HJ, Gown AM, Schoel B, Mikuz G, Kaufmann SHE, Wick G. Induction of atherosclerosis in normocholesterolemic rabbits by immunization with heat shock protein 65. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1992;12:789-799.

Xu Q, Wick G. The role of heat shock proteins in protection and pathophysiology of the arterial wall. *Mol Med Today.* 1996;2:372-379.

Xu Q, Willeit J, Marosi M, Kleindienst R, Oberhollenzer F, Kiechl S, Stulnig T, Luef G, Wick G. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet.* 1993;341:225-259.

Xu X, Björntorp P. Effects of sex steroid hormones on differentiation of adipose precursor cells in primary culture. *Exp. Cell Res.* 1987;173:311-321.

Xu X-X, Tabas I. Sphingomyelinase enhances low density lipoprotein uptake and ability to induce cholesteryl accumulation in macrophages. *J Biol Chem.* 1991;266:24849-24858.

Yamasu K, Onoe H, Somoa GI, Oshima H, Mizumo D. Secretion of tumor necrosis factor during fetal and neonatal development of the mouse: ontogenic inflammation. *J Biol Response Mod.* 1989;8:644-655.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332:411.

Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Influence of cell culture conditions on diet-induced changes in lymphocyte fatty acid composition. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1255:333-340.

Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology*. 1994;82:603-610.

Yarnell JWG, Baker IA, Sweetnam PM, Bainton D, O'Brien JR, Whitehead PJ, Elwood PC. Fibrinogen, viscosity and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. *Circulation*. 1991;71 :831-843.

Yermeni KK, Bai W, Khan BV, Medford RM, Natarajan R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*. 1999;48:855-864.

Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Goldberg IJ, Steinberg D, Witztum JL. Macrophages and smooth muscle cells express lipoprotein lipase in human and atherosclerotic lesions. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1991;88:10143-10147.

Ylä-Herttuala S. Macrophages and oxidized low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Ann Med*. 1991;23:561-567.

Young SG, Parthasarathy S. Why are low density lipoproteins atherogenic? *West J Med*. 1994;160 :153-164.

Zambon A, Schmidt I, Beisiegel U, Brundzell JD. Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins. *J Lipid Res*. 1996;37:2394-2404.

Zampelas A, Peel AS, Gould BJ, Wright J, Williams CM. Polyunsaturated fatty acids of the n-6 and n-3 series: effects on postprandial lipid and apolipoprotein levels in healthy men. *Eur J Clin Nutr*. 1994;48:842-848.

Zanchetti A. Goals of antihypertensive treatment: prevention of cardiovascular events and prevention of organe damage. *Blood Pressure*. 1992;1:205-211.

Zechner R, Newman TC, Steiner E, Breslow JL. The structure of the mouse lipoprotein lipase gene: a B1 repetitive element is inserted into the 3' untranslated region of the mRNA. *Genom*. 1991;11:62-76.

Zeiber AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with impaired coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation*. 1991;84 :1984-1992.

Zhou Y, Leon M, Maclawiw M, Popma J, Yu Z, Finkel T, Epstein S. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N Engl J Med*. 1996;335:624-630.

Zhu Y, Lin JHC, Liao HL, Friedli O, Verna L, Marten NW, Strauss DS, Stemerman MB. LDL induces transcription factor activator-1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18 :473-480.

Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Atherosclerosis*. 1979;60:473-485.

Zilversmit DB. Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clin Chem*. 1995;41 :153-158.

Zsigmond E, Scheffler E, Forte TM, Potenz R, Wu W, Chan L. Transgenic mice expressing human lipoprotein lipase driven by the mouse metallothionein promoter. A phenotype associated with

increased perinatal mortality and reduced plasma very low density lipoprotein of normal size. *J Biol Chem.* 1994;269:18757-18766.