

2m11.2813.3

Université de Montréal

Régulation de la lipoprotéine lipase macrophagique par les acides gras

par

Sophie Élise Michaud

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Nutrition

juin, 2000

©Sophie Élise Michaud, 2000



E. 518 C. 11m

Ministère de l'Éducation

QU
145
158
2000
N. 007

Résolution de la Commission des études universitaires

Comité de l'Éducation

Département de l'Éducation

Ministère de l'Éducation

Ministère de l'Éducation

en vertu de la loi sur l'accès à l'information

la date de publication est le

en français

2000

Comité de l'Éducation



Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire est intitulé:

Régulation de la lipoprotéine lipase macrophagique par les acides gras

présenté par :

Sophie Élise Michaud

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

D^r Émile Levy

D^{re} Geneviève Renier

D^r Dominique Garrel

Mémoire accepté le : 28-09-2000

SOMMAIRE

L'athérosclérose est une complication majeure du diabète de type 2. La pathogenèse de cette complication demeure obscure mais implique la production, dans la paroi vasculaire, d'un facteur proathérogénique, la lipoprotéine lipase macrophagique. Il est démontré que les macrophages isolés de patients diabétiques de type 2 surproduisent la lipoprotéine lipase. Différentes anomalies métaboliques ou hormonales présentes dans le diabète de type 2 jouent un rôle majeur dans la surexpression de cette enzyme. Des niveaux élevés d'acides gras plasmatiques sont observés chez ces patients. Cette anomalie du métabolisme lipidique pourrait contribuer à l'augmentation de la production de la lipoprotéine lipase macrophagique chez les patients diabétiques de type 2. L'effet de divers acides gras dans le développement de l'athérosclérose a fait l'objet de plusieurs études démontrant un rôle proathérogénique des acides gras saturés et antiathérogénique des acides gras n-3 et monoinsaturés. Nous avons examiné la régulation de la lipoprotéine lipase macrophagique par les acides gras.

Nos résultats mettent en évidence que 1) les acides palmitique et stéarique induisent l'expression et l'activité de l'enzyme par un effet transcriptionnel dépendant des facteurs de transcription PPAR α 2) l'acide linoléique augmente la production et l'activité de la lipoprotéine lipase par un effet transcriptionnel dont le mécanisme d'action pourrait faire intervenir le protooncogène c-fos 3) l'acide arachidonique, malgré une inhibition marquée de la transcription de la lipoprotéine lipase, augmente la production et l'activité de l'enzyme par un mécanisme traductionnel 4) l'acide oléique n'affecte pas l'expression ou l'activité de l'enzyme 5) l'acide eicosapentaénoïque inhibe

la transcription de la LPL et diminue l'activité et la production de l'enzyme lorsque les macrophages sont incubés pendant une période prolongée en présence de cet acide gras.

En conclusion, nous avons démontré que les acides gras exercent des effets individuels distincts sur la production et l'activité de la lipoprotéine lipase macrophagique. La modulation de la lipoprotéine lipase macrophagique par les acides gras constitue un nouveau mécanisme par lequel ces facteurs pourraient exercer leurs effets anti- ou pro-athérogéniques. Une meilleure connaissance de la régulation de la lipoprotéine lipase macrophagique devrait permettre de développer de nouvelles stratégies nutritionnelles ou pharmacologiques afin de contrer le développement de l'athérosclérose.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Dédicace.....	xiv
Remerciements.....	xv
I. Introduction.....	1
I.1. La lipoprotéine lipase.....	2
I.1.1. Généralités.....	2
I.1.1.1. Propriétés enzymatiques de la LPL.....	3
I.1.1.2. Propriétés structurales de la LPL.....	4
I.1.2. Organisation du gène.....	5
I.1.3. Structure et domaines fonctionnels de la LPL.....	6
I.1.4. Mécanismes de régulation de la LPL	7
I.1.4.1. Régulation transcriptionnelle.....	7
I.1.4.2. Régulation postranscriptionnelle.....	11
I.1.4.2.1. Stabilité de l'ARN messager et traduction.....	11
I.1.4.2.2. Glycosylation.....	12
I.1.4.2.3. Sécrétion et liaison de la LPL aux protéoglycans.....	12
I.1.4.2.4. Interaction avec l'apo CII.....	14
I.1.5. Régulateurs physiologiques de la LPL macrophagique.....	14
I.1.5.1. Régulateurs nutritionnels.....	15
I.1.5.2. Régulateurs hormonaux.....	17
I.1.5.3. Les cytokines.....	18
I.1.5.4. La lipopolysaccharide	18
I.1.5.5. Les oxystérols.....	19

I.1.5.6. Les prostaglandines.....	19
I.1.5.7. Le PDGF et le M-CSF.....	20
I.1.5.7.8. L,acide rétinoïque.....	21
I.2. L`athérosclérose.....	21
I.2.1. Généralités.....	21
I.2.2. Facteurs de risque.....	22
I.2.3. Stades de développement de l`athérosclérose.....	23
I.2.3.1. La strie lipidique.....	24
I.2.3.2. La lésion fibro-lipidique.....	25
I.2.3.3. La plaque fibreuse.....	26
I.2.4. Étiologie de l`athérosclérose.....	28
I.2.4.1. L`hypothèse de la réponse au dommage endothélial.....	28
I.2.4.2. L`hypothèse de l`infiltration des lipides.....	29
I.2.4.3. L`hypothèse du stress oxydatif.....	30
I.2.4.4. L`hypothèse virale de l`athérosclérose.....	31
I.2.4.5. L`hypothèse inflammatoire de l`athérosclérose.....	32
I.2.5. Effets potentiels de la LPL dans le processus athérosclérotique.....	32
I.2.5.1. Effets pro-athérogéniques de la LPL.....	34
I.2.5.2. Effets anti-athérogéniques de la LPL.....	35
I.3. Les acides gras.....	36
I.3.1. Structure, classification et fonctions des acides gras.....	36
I.3.2. Acides gras et athérosclérose.....	39
I.3.2.1. Effets des acides gras sur la concentration des lipoprotéines.....	40
I.3.2.2. Effets des acides gras sur la thrombogénèse et la fonction plaquettaire.....	42
I.3.2.3. Effets des acides gras sur la fonction endothéliale.....	44
I.3.2.4. Effets des acides gras sur la réponse inflammatoire.....	46
I.3.2.5. Synthèse des effets anti-athérogéniques des acides gras n-3.....	46
I.4. Problématique, hypothèse et objectifs du projet de recherche.....	50

II. Résultats.....	51
II.1. Article:.....	52
“ Regulation of macrophage lipoprotein lipase by fatty acids: role of PPARs”	
III. Discussion.....	84
VI. Conclusion et perspectives.....	105
IV.1 Conclusion.....	106
IV.2 Perspectives.....	106
V. Références.....	108

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau 1.....9
Tableau 2.....23
Tableau 3.....38
Tableau 4.....49

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1.....7
Figure 2.....11
Figure 3.....38
Figure 4.....48

ARTICLE

Figure 1.....80
Figure 2.....81
Figure 3.....82
Figure 4.....83

LISTE DE ABBRÉVIATIONS

AA	: acide arachidonique
AG	: acides gras
AMPc	: adénosine monophosphate cyclique
ADN	: acide desoxyribonucléique
AP-1	: protéine activatrice-1 (activator protein-1)
Apo	: apolipoprotein
ARNm	: acide ribonucléique messenger
BSA	: albumine bovine sérique
COUP	: “chicken ovalbumine upstream protein”
CRE	: élément de réponse à l’adénosine monophosphate cyclique
DAG	: diacylglycérol
DHA	: acide docohexapentaénoïque
DMEM	: Dulbecco’s minimal essential medium
DTT	: dithiothreitol
EDRF	:facteur de vasorelaxation endothélium-dépendant
EDTA	: “ethylenediaminetetraacetic acid”
EPA	: acide eicosapentaénoïque
FA	: acides gras (fatty acids)
FAAR	: récepteurs activés par les acides gras
FCS	: sérum de veau foetal
FGF	:facteur de croissance des fibroblasts

- FSE : élément spécifique aux lipides
- GM-CSF : “granulocyte-macrophage-colony stimulating factor”
- GRE : élément de réponse au glucocorticoïdes
- HDL : lipoprotéines de haute densité
- HNF-4 : facteur nucléaire de l’hépatocyte
- HSPG : héparan sulfate protéoglycans
- ICAM-1 : “intracellular cell adhesion molecule-1”
- IFN γ : interféron gamma
- IGF-1 : facteur de croissance ressemblant à l’insuline (insulin-like growth factor)
- IL : interleukine
- IP₃ : inositol triphosphosphate
- INOS : “nitric oxide synthase” inductible
- LA : acide linoléique
- LDL : lipoprotéines de faible densité
- LPL : lipoprotéine lipase
- LPS : lipopolysaccharide
- MCP-1 : protéine chimiotactique des monocytes (monocyte chemoattractant protein-1)
- M-CFS : “monocyte-colony stimulating factor”
- MCV : maladies cardio-vasculaires
- Mo : macrophages
- NF-kB : facteur nucléaire kappa B
- NO : monoxyde d’azote

NOS	: “nitric oxide synthase”
OA	: acide oléique
Oct-1	: octamère-1
PA	: acide palmitique
PAI-1	: inhibiteur de l’activateur du plasminogène
PBS	: “phosphate buffered salt solution”
PDGF	: facteur de croissance dérivé des plaquettes
PG	:prostaglandine
PGI ₂	: prostacycline
PKC	:protéine kinase C
PMA	: phorbol 12-myristate 13-acétate
PMFS	: phenylmethylsulfonyl fluoride
PPAR	: “peroxisome proliferator-activated receptors”
PPRE	: “peroxisome proliferator response element”
PUFA	: acide gras polyinsaturé
RXR	: récepteur de l’acide rétinoïque
SA	: acide stéarique
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SP-1	: protéine stimulatrice-1
TGFbeta	: “transforming growth factor beta”
TBS	: tris-buffered saline
TNF α	: facteur de nécrose tumorale alpha
TRE	: élément répondant aux tyroïdes

VCAM-1 : molécule d'adhésion vasculaire-1

VLDL : lipoprotéines de très faible densité

DÉDICACE

À ma mère, Pauline, pour m'avoir enseigné la persévérance, le travail et l'engagement.

À mon mari, Louis-Philippe, pour son éternel optimisme son support et son amour sans frontière.

À mes soeurs, Julie et Anne, pour leur présence, leur humour et leurs encouragements.

REMERCIEMENTS

À D^{re} Geneviève Renier, ma directrice de recherche, qui m'a guidée et encouragée tout au long de ma maîtrise.

À l'association Diabète Québec, qui a subventionné mon projet de recherche de maîtrise.

À la Chaire Jean-Paul Houle, pour l'appui financier apporté durant mes études.

I. INTRODUCTION

Introduction

I.1 La lipoprotéine lipase

I.1.1 Généralités

La lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme impliquée dans le métabolisme des lipoprotéines. Elle a été mise en évidence dans de nombreuses cellules mais ses plus hauts niveaux d'expression se retrouvent dans le tissu adipeux, le muscle cardiaque et les glandes mammaires lors de la lactation (Étienne, 1984). La LPL est aussi exprimée, mais à des niveaux moindres, dans les ovaires, les glandes surrénales, les testicules, les poumons, les reins, l'hippocampe, le foie et les macrophages. Après sa synthèse, la LPL est transportée vers les capillaires, où elle se lie à la partie externe de la membrane des cellules endothéliales. C'est à ce niveau, qu'elle hydrolysera les lipoprotéines plasmatiques riches en triglycérides (Foubert et coll., 1996).

Bien que le rôle majeur de la LPL soit d'hydrolyser les lipoprotéines, la finalité de son action varie selon les tissus. Ainsi, l'enzyme permet la production de lait par la glande mammaire, la mise en réserve de graisse dans le tissu adipeux, la production d'énergie pour le muscle, la synthèse de surfactant dans les cellules pulmonaires et assure enfin la thermogénèse dans le tissu adipeux brun (Varizi et coll., 1999; Mellish et coll., 1999; van Bennekum et coll., 1999; Chen et coll., 1998; Cole et coll., 1995; Eckel, 1989).

La LPL est une glycoprotéine appartenant à la famille des sérine-estérases. Elle est constituée de 448 acides aminés et a un poids moléculaire de 51 kD (58 kD après glycosylation). Elle est active sous forme homodimérique non covalente (Wang et coll., 1992).

Zilversmit a émis en 1973 l'hypothèse que les produits lipolytiques dérivés du catabolisme des lipoprotéines par la LPL puissent être facilement captés par la paroi artérielle et soient donc potentiellement athérogènes. Cette hypothèse a été appuyée par les travaux de Stein et coll. (1994; 1993) démontrant que la LPL facilitait la captation cellulaire des lipoprotéines de faible densité (LDL).

Les travaux menés ces dernières années ont permis une connaissance approfondie de la relation structure-fonction de la LPL. Ainsi, il est maintenant bien connu que la LPL possède, outre ses fonctions enzymatiques, des propriétés structurales. Ces données soulignent le caractère multifonctionnel de cette protéine placée au centre des voies du métabolisme lipidique et de l'athérosclérose.

I.1.1.1 Propriétés enzymatiques de la LPL

La LPL est une enzyme primordiale à l'hydrolyse des triglycérides qui constituent l'essentiel du contenu lipidique des chylomicrons et des lipoprotéines de très faible densité (VLDL). Une fois synthétisée, elle est transportée à la surface des capillaires sanguins où elle se fixe aux héparan sulfates protéoglycans de l'endothélium. L'hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycérides par la LPL permet la libération d'acides gras (AG) qui seront pour leur grande majorité utilisés par les tissus périphériques comme substrats énergétiques ou seront stockés à l'intérieur des adipocytes sous forme de triglycérides. Une faible partie des AG circulants se retrouvera fixée à l'albumine. L'appauvrissement des lipoprotéines en triglycérides consécutive à l'hydrolyse de ces particules par la LPL, induit un enrichissement des VLDL et des chylomicrons en cholestérol ayant pour effet de stimuler les mécanismes de transfert de

lipides et d'échange d'apoprotéines vers les lipoprotéines de haute densité (HDL) et de favoriser le catabolisme des LDL (Santamarina-Fojo, 1992).

I.1.1.2 Propriétés structurales de la LPL

Indépendamment de son action catalytique, la LPL agit, en se liant aux protéoglycans exprimés à la surface des cellules, comme un ligand favorisant la captation et la dégradation des lipoprotéines (Williams et coll., 1992; Eisenberg et coll., 1992; Mulder et coll., 1993; Chappell et coll., 1993). L'effet de la LPL sur la captation des lipoprotéines nécessite qu'elle se lie simultanément aux héparans sulfates protéoglycans, aux lipoprotéines et à ses récepteurs (Goldberg, 1996). Les récepteurs cellulaires liant la LPL incluent tous les membres de la famille des récepteurs des LDL, c'est-à-dire, le récepteur des LDL, la protéine reliée au récepteur LDL (LRP), le récepteur Gp330 et le récepteur des VLDL (Chappell et Medh, 1998; Hendriks et coll., 1996). Cette fonction de pont jouée par la LPL a été largement documentée (Rumsey et coll., 1992; Mulder et coll., 1992; Beisiegel et coll., 1991) et récemment Merckel et coll., (1998) ont démontré que la LPL inactive était capable, en se liant aux protéoglycans, d'induire la captation des VLDL par les muscles. La LPL pourrait aussi former un pont entre les héparan sulfates exprimés à la surface de l'endothélium et ceux exprimés à la surface des monocytes et jouer ainsi le rôle d'une molécule d'adhésion (Mamputu et coll., 1997).

L'état d'oxydation des lipoprotéines influence l'effet de la LPL sur leur captation cellulaire, les LDL et les VLDL oxydées ayant plus d'affinité pour les héparans sulfates et la LPL exprimés à la surface des macrophages et des cellules endothéliales (Makoveichuk et coll., 1998; Auerbach et coll., 1996). De plus, la LPL stimule la liaison

des LDL oxydées aux macrophages et leur captation subséquente (Hendriks et coll., 1996).

I.1.2 Organisation du gène

Le gène de la LPL est localisé sur le bras court du chromosome 8 (8p22). L'acide désoxyribonucléique (ADN) complémentaire qui code pour la protéine mature de 448 acides aminés a été cloné et séquencé. Le gène de la LPL s'étend sur une longueur d'environ 30 kilobases et comporte 10 exons et 9 introns (fig. 1). Les exons 1 à 9 codent pour la protéine mature et sont très bien conservés entre les espèces. Ainsi une homologie de l'ordre de 80% est observée entre l'ADN complémentaire de diverses espèces de mammifères. Le premier et le dixième exon codent respectivement pour les régions 5' et 3'. Le premier exon code aussi pour les deux premiers acides aminés de la protéine mature. La dernière base du codon "stop" est codée par le très long exon 10 comprenant 1948 nucléotides.

La région 5' du gène, le promoteur, comporte divers sites d'interaction avec des facteurs tissulaires et nucléaires, des sites sensibles à l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et des séquences sensibles aux glucocorticoïdes et aux hormones thyroïdiennes (Deeb et coll., 1989; Olivecrona et coll., 1987; Wion et coll., 1987).

Près de soixante mutations du gène de la LPL ont été rapportées et décrites. Les mutations identifiées incluent des mutations introniques responsables d'un défaut d'épissage, des mutations ponctuelles, des insertions ou des délétions, des duplications et des mutations faux-sens. (Santamarina-Fojo, 1992; 1994; Lalouel et coll., 1992; Hayden et coll., 1991). Une mutation particulièrement fréquente du gène de la LPL consiste en la

substitution d'une glycine par un acide glutamique en position 188. Cette mutation induit la synthèse d'une molécule de LPL inactive. Une autre mutation en position 176, responsable de la substitution d'une alanine par une thréonine, entraîne un défaut de liaison de la LPL à l'héparine (Santamarina-Fojo et coll., 1994).

Il existe une fréquence extrêmement élevée de mutations du gène de la LPL chez les canadiens-français du Québec. Les mutations du gène de la LPL aux positions Gly188-Glu, Pro207-Leu, Asp250-Asn et Asn 291-Ser sont communes et constituent près de 97% des mutations retrouvées dans la déficience homozygote en LPL ou hyperchylomicronémie familiale (Ma et coll., 1994). Malgré le caractère récessif de l'hyperchylomicronémie familiale, la déficience hétérozygote en LPL existe et est associée à une fréquence accrue de dyslipoprotéïnémie modérée au profil lipidique athérogène (Babirak et coll., 1992; 1989; Wilson et coll., 1996).

I.1.3 Structure et domaines fonctionnels de la LPL

La LPL appartient à la famille des lipases dont les gènes sont homologues et hautement conservés (Sparkes et coll., 1987, Deeb et coll., 1989, Kirchgessner et coll., 1989). Elle est constituée d'un long domaine N-terminal (acides aminés 1 à 312) et d'un domaine C-terminal plus petit (acides aminés 313 à 448). La partie N-terminale inclut plusieurs sites d'interaction dont le peptide signal, les sites de glycosylation, la triade catalytique et le site de liaison aux héparans sulfates et à l'apo CII (Deeb et coll., 1989; Olivecrona et coll., 1987; Wion et coll., 1987). Le domaine C-terminal semble jouer un rôle dans l'interaction initiale et la spécificité de liaison avec le substrat (Wong et coll., 1994).

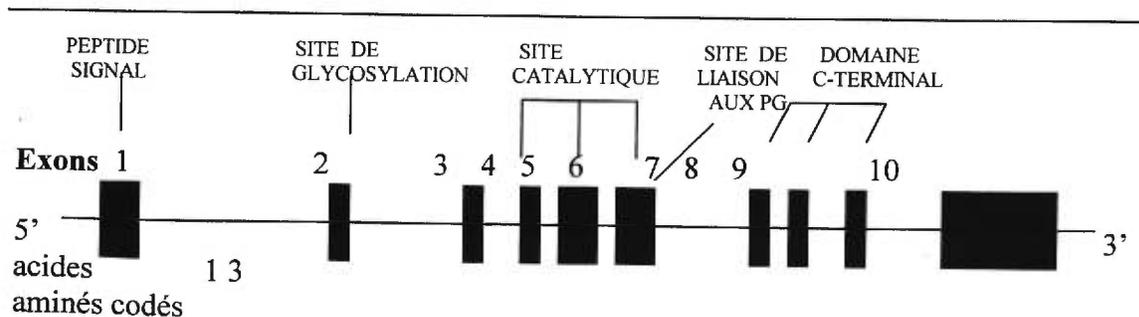


Figure 1. Représentation schématique du gène et des relations structure-fonctions de la LPL. (adapté de Kirchgessner et coll., 1989 et de Deeb et coll., 1989).

I.1.4 Mécanismes de régulation de la LPL

La régulation de la synthèse et de l'activité de la LPL est spécifique à une cellule et à un tissu donné et peut varier dans un même tissu au cours du développement (Singh-Bist et coll., 1994). La régulation de la LPL implique des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels.

I.1.4.1 Régulation transcriptionnelle de la LPL.

Il existe peu de données sur les mécanismes de régulation transcriptionnelle spécifiques à la LPL macrophagique. Toutefois, de nombreuses données existent quant à la régulation transcriptionnelle de la LPL adipocytaire. Ainsi, il a été démontré que la régulation transcriptionnelle de l'enzyme est régie par différents éléments *cis* localisés au niveau de la région 5' du gène de la LPL qui en interagissant avec divers facteurs nucléaires, tissulaires, métaboliques ou hormonaux modulent la transcription du gène de la LPL. L'octamère-1 (Oct-1) est une séquence retrouvée dans le promoteur de la LPL

qui serait responsable de la régulation transcriptionnelle de l'enzyme par différents agents tels la lipopolysaccharide (LPS) (Enerbäck, 1993). À ce propos, il a été proposé que la LPS puisse réguler l'expression génique de la LPL macrophagique en activant certaines protéines nucléaires susceptibles de reconnaître et de se lier à la séquence Oct-1 (Hill et coll., 1995). Parmi les autres éléments *cis* présents dans le promoteur du gène de la LPL, il existe l'élément récepteur aux glucocorticoïdes (GRE), l'élément spécifique aux lipides 2 (FSE 2), l'élément répondant à la thyroïde (TRE), les protéines activatrices 1 et 2 (AP1, AP2), la protéine stimulatrice 1 (Sp1), l'élément répondant à l'AMPc (CRE) et finalement le "peroxisome proliferator responsive element" (PPRE) (Schoonjans et coll., 1997).

Les "peroxisome proliferator activated receptors" (PPARs) sont les facteurs de transcription les plus récemment impliqués dans la régulation transcriptionnelle de la LPL. Ils se lient à la séquence consensus PPRE présente dans le promoteur de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, dont celui de la LPL. Les PPARs appartiennent à la superfamille des récepteurs stéroïdiens. Il existe trois isoformes de PPAR: α , β et γ qui sont ligands et tissus spécifiques (Tableau 1).

Tableau I. Spécificité tissulaire de l'expression des isoformes de PPARs, leurs ligands et leurs principaux rôles.

PPARs	Tissus	Ligands	Rôles
PPAR α	Tractus intestinal, foie, coeur, muscle, tissu adipeux brun, macrophage	Fibrates, acides gras, leucotriène B ₄	1. Dégradation des acides gras 2. Équilibre énergétique 3. Métabolisme des HDL et des TG 4. Réponse inflammatoire
PPAR β	Majorité des tissus	Peu de recherches concluantes	1. Modulateur de PPAR alpha et gamma
PPAR γ	Tissu adipeux, macrophage	Acides gras, prostaglandine J ₂ , troglitazone	1. Différenciation des adipocytes 2. Homéostasie du glucose 3. Régulation de l'activation macrophagique

PPAR α est exprimé préférentiellement dans les tissus présentant une activité catabolique élevée envers les AG comme le foie, le tractus intestinal, le coeur, les muscles, le rein, le tissu adipeux brun et le système immunitaire. Il est impliqué dans la régulation de plusieurs processus dont la β -oxydation des AG, l'équilibre énergétique, le métabolisme des HDL et des lipoprotéines riches en triglycérides et dans la réponse inflammatoire. Forman et coll. (1997) ont démontré que les eicosanoïdes, les AG incluant les acides linoléique, oleique, palmitique et stéarique et les médicaments hypolipémiants sont de puissants activateurs de PPAR α et des ligands spécifiques de ce facteur nucléaire.

PPAR β est exprimé de façon ubiquitaire par de nombreux tissus. Actuellement, on ne lui décerne aucune fonction spécifique comparativement aux autres PPARs. Cependant, son expression simultanée dans plusieurs tissus pourrait lui permettre de moduler l'activité et le niveau d'expression de PPAR α et γ (Schoonjans et coll., 1997).

PPAR γ est exprimé essentiellement dans le tissu adipeux (Rocchi et Auwerx, 1999). Ces ligands spécifiques incluent les AG tels les acides alpha-linolénique, arachidonique, eicosapentaénoïque, docohexapentaénoïque, la prostaglandine J₂ et le troglitazone. Il est un régulateur important de la différenciation adipocytaire et son activation induit l'adipogenèse. Il semble également jouer un rôle dans l'homéostasie du glucose (Sartippour et coll., 2000). Outre son rôle dans le contrôle du métabolisme lipidique et glucidique, PPAR γ semble exercer un rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire. Il a en effet été démontré que l'expression de PPAR γ macrophagique était induite par divers agents tels les LDL oxydées, le "granulocyte/macrophage colony-stimulating factor" (GM-CSF) et le "macrophage colony-stimulating factor" (M-CSF). L'activation de ce facteur nucléaire induit la différenciation des monocytes en macrophages, stimule la captation macrophagique des LDL oxydées et induit l'apoptose des macrophages humains (Rocchi et Auwerx, 1999). En contre partie, les agonistes de PPAR γ semblent diminuer l'activation macrophagique en limitant l'expression de certaines cytokines, de la "nitric oxide synthase" inducible (iNOS), de la gelatinase B et du récepteur "scavenger" A (Glass et coll., 1998). Ces effets seraient médiés par une action inhibitrice de PPAR γ sur les facteurs de transcription AP-1 et le facteur nucléaire kappa B (NF-kB). Ces observations suggèrent un rôle complexe de PPAR γ dans la réponse inflammatoire et le processus athéromateux.

Une fois activés par leurs ligands, les PPARs forment un hétérodimère avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR), un facteur de transcription ayant pour ligand l'acide rétinoïque (fig. 2) (Keller et coll., 1993).

Actuellement plusieurs études mettent en évidence la régulation de la LPL par les PPARs en réponse à différents stimuli tels que les fibrates (Auwerx et coll., 1996), les AG (Auwerx et coll., 1996) et le glucose (Sartippour et coll., 2000).

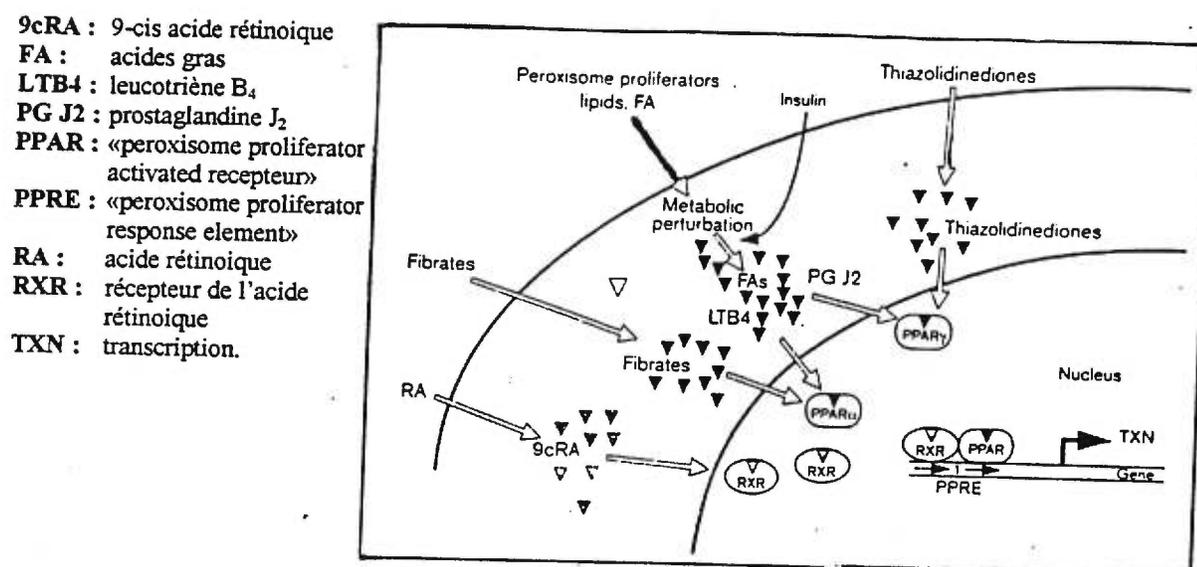


Figure 2. Représentation schématique de l'activation de la transcription génique par formation de l'hétérodimère PPAR:RXR.

I.1.4.2 Régulation post-transcriptionnelle

I.1.4.2.1 La stabilité de l'ARN messager et la traduction

Il a été suggéré que la stabilité de l'acide ribonucléique messager (ARNm) de la LPL puisse être due à la richesse en adénosine et en tyrosine de l'exon 10 (Brault et coll., 1992). La demi-vie de l'ARNm de la LPL est de douze heures (Stray et coll., 1990) et

peut être modifiée par différents agents. Ainsi, il a été démontré que les catécholamines (Ranganathan et coll., 1997), la LPS (White et coll., 1988) et l'interféron γ (INF- γ) (Jonasson et coll., 1990) régulent la traduction de la LPL en activant des protéines de liaison *trans* se liant à la région 3' non traduite (3' UTR) de l'ARNm. Il a été postulé que la protéine kinase C (PKC), en phosphorylant ces protéines, puisse intervenir dans la traduction de la LPL (Ranganathan et coll., 1997).

I.1.4.2.2 Glycosylation

La glycosylation est indispensable à la maturation et à la sécrétion de la LPL active. La LPL humaine possède trois sites de glycosylation: Asn-43, Asn-259 et Asn-359 (Semb et Olivecrona, 1989). Toutefois, seul le site Asn-43 est important pour la sécrétion et l'activité de la LPL (Ben-Zeev et coll., 1994). Le processus de glycosylation se fait en plusieurs étapes. Il débute dans le réticulum endoplasmique pour ensuite se poursuivre dans les différents compartiments de l'appareil de Golgi (Braun et coll., 1992). Dans chacun des compartiments, différentes enzymes clivent ou ajoutent à la protéine des résidus de glucose, de mannose, d'acide galacturonique, de galactose et d'acide sialique conduisant à la formation de chaînes d'oligosaccharides complexes.

I.1.4.2.3 Sécrétion et liaison de la LPL aux protéoglycans

Il existe deux mécanismes de sécrétion de la LPL: un mécanisme constitutif et un mécanisme régulé. Le mécanisme constitutif réfère au processus par lequel les protéines sont sécrétées au fur et à mesure qu'elles sont synthétisées, sans accumulation intracellulaire. Le mécanisme régulé est le processus par lequel les protéines

nouvellement synthétisées sont emmagasinées dans des vésicules jusqu'à ce qu'un stimulus particulier survienne et induise leur sécrétion. L'héparine induirait l'exocytose de la LPL à partir de ces vésicules (Pradines-Figueres et coll., 1990).

Une interaction LPL-membrane plasmique cellulaire a été proposée dès 1963 par Robinson (Robinson et coll., 1963). Cette hypothèse a été confirmée depuis lors par plusieurs équipes de recherche (Enerbäck et coll., 1993; Braun et coll., 1992; Santamarina-Fojo et coll., 1994; Ma et coll., 1994). Après sa sécrétion, la LPL se fixe par une liaison ionique non spécifique aux héparans sulfates protéoglycans (HSPG) exprimés à la surface des cellules. Cette interaction aurait pour effet d'augmenter l'activité de l'enzyme (Camps et coll., 1990) et de faciliter son interaction avec les lipoprotéines circulantes (Mann et coll., 1999). Une fois liée aux HSPG, la LPL peut être relâchée ou internalisée dans la cellule où elle sera soit dégradée, soit recyclée à la surface de la cellule (Saxena et coll., 1990).

Il existe au niveau de la LPL une région homologue au domaine de la famille des protéines liant les AG (Langlois et coll., 1989). Cette région est adjacente à la région de la LPL liant l'héparine. Il a été suggéré que les AG et l'héparine puissent réguler la libération de la LPL de l'endothélium vasculaire par déplacement compétitif (Enerbäck et coll., 1993; Edwards et coll., 1994). Saxena et Goldberg (1990) ont démontré que les AG libres favorisent la relâche de la LPL liée à l'endothélium vasculaire. Ce mécanisme permettrait de prévenir une surcharge d'AG dans la cellule dans des conditions de lipolyse accrue (Saxena et coll., 1989). La présence de quatre à six sites de liaison (selon l'acide gras) des AG sur la molécule de LPL a été bien documentée (Edwards et coll., 1994).

I.1.4.2.4 Interaction avec l'apo CII

Il a été démontré que la LPL nécessite, pour son activité maximale, la présence de son cofacteur, l'apolipoprotéine CII (apo CII). L'apo CII est retrouvée au niveau des VLDL, des chylomicrons et des HDL (Fremont et coll., 1987). Le site de liaison de l'apo CII est localisé dans le domaine N-terminal de la molécule de LPL. La région C-terminale de l'apo CII (acides aminés 55 à 74) semble responsable de l'activation de la LPL (Smith et coll., 1980). Il a été suggéré que l'interaction apoCII-LPL puisse provoquer un changement de conformation dans la structure de l'enzyme facilitant l'association du site catalytique de la LPL avec son substrat lipidique.

I.1.5 Régulateurs physiologiques de la LPL

La régulation de la LPL par différents agents a fait l'objet de plusieurs investigations au cours des dernières décennies. Malheureusement, les résultats obtenus sont souvent incomplets ou même contradictoires en raison des différentes approches expérimentales utilisées ou du type cellulaire examiné. En effet, il est clairement démontré que la régulation de la sécrétion de la LPL est spécifique pour un tissu et une cellule donnée et diffère en particulier considérablement entre l'adipocyte, la cellule musculaire et le macrophage (Mead et coll., 1999).

La production de LPL par le macrophage est stimulée par divers facteurs dont les agents induisant la différenciation cellulaire (Goldman et coll., 1990), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (Renier et coll., 1996; Inaba et coll., 1995) et diverses cytokines (Querfeld et coll., 1990; Auwerx et coll., 1989; Jonasson et coll., 1990). Une

augmentation de synthèse de la LPL est aussi observée suite à l'incubation de macrophages humains en présence de VLDL (Ishibashi et coll., 1989), ou suite à la captation de lipoprotéines modifiées par le récepteur "scavenger" (Murata et coll., 1988). La sécrétion de la LPL par le macrophage est finalement influencée par le stade d'activation de la cellule. En effet, les macrophages inflammatoires produisent davantage de LPL que les cellules résidentes (Behr et coll., 1986). La section suivante révisé en détail l'effet de différents agents sur la régulation de la LPL macrophagique.

I.1.5.1 Régulateurs nutritionnels

Il n'existe pas à l'heure actuelle de données sur les effets de l'état de jeûne et de l'état post-prandial sur la régulation de la LPL macrophagique. Par contre, on connaît bien leurs effets sur la production de la LPL adipocytaire et cardio-myocytaire (Olivecrona et coll., 1993; Oliver et coll., 1993). En période post-prandiale, l'activité de la LPL augmente de manière marquée dans le tissu adipeux alors qu'elle diminue dans le muscle cardiaque. Au cours du jeûne l'effet inverse se produit. La régulation de la LPL par les états post-prandial et de jeûne semblent impliquer des mécanismes post-transcriptionnels puisqu'ils affectent peu les niveaux d'ARNm et les taux de synthèse de la LPL (Semb et Olivecrona, 1986;1989).

Le glucose est un facteur nutritionnel modulant l'expression de la LPL macrophagique. En effet, Sartippour et coll. (1998) ont démontré que les macrophages cultivés en présence de concentrations élevées de glucose, surproduisent la LPL. La régulation génique de la LPL macrophagique par le glucose s'exercerait au niveau

transcriptionnel et impliquerait l'activation de la PKC et du protooncogène c-fos (Sartippour et coll., 1998).

Les AG, des substrats énergétiques potentiellement importants pour le macrophage (Yin et coll., 1997; Newsholme et coll., 1987), ont été proposés comme régulateurs de la LPL macrophagique (Renier et coll., 1993). En effet, ces auteurs ont rapporté que les AG polyinsaturés de type oméga-3 diminuaient l'expression et la production de la LPL par les macrophages murins. De plus, ces mêmes auteurs ont démontré que la composition en lipides de la diète affectait la LPL. Les mécanismes responsables de l'inhibition de la LPL par les AG oméga-3 restent inconnus.

À ce jour, il n'existe pas d'autres études concernant la régulation de la LPL macrophagique par les AG. Par contre, leurs effets sur la régulation de la LPL adipocytaire et plasmatique ont été largement documentés. En effet, il a été démontré que les AG à longue chaîne (14 carbones et plus) diminuaient l'activité de la LPL adipocytaire (Amri et coll., 1996) et l'activité de la LPL plasmatique (Bengtsson et coll., 1980). Cette inhibition de l'enzyme par les AG a l'avantage de constituer un mécanisme de rétro-contrôle empêchant les produits hydrolytiques des triglycérides d'être produits plus rapidement qu'ils ne sont utilisés par les tissus.

Les AG affectant peu les niveaux d'ARNm et les niveaux de synthèse de la LPL, la régulation de l'activité par ces facteurs nutritionnels semble impliquer des mécanismes post-transcriptionnels.

Les AG polyinsaturés oméga-3 semblent aussi jouer un rôle important dans la régulation de la LPL adipocytaire et plasmatique. En effet, Luo (1998), et Zampelas (1994) ont démontré qu'une supplémentation de la diète en AG n-3 chez des sujets sains

augmentaient l'ARNm de la LPL adipocytaire et l'activité de la LPL plasmatique avec pour conséquence une diminution des concentrations de triglycérides plasmatiques (Murphy MC et coll., 1999).

I.1.5.2 Les régulateurs hormonaux

La régulation hormonale de la LPL macrophagique a fait l'objet de quelques études utilisant différents agents en particulier, la dexaméthasone, l'insuline, le facteur de croissance ressemblant à l'insuline-1 (IGF-1), la thyroxine, l'hormone de croissance, la prolactine et récemment les oestrogènes.

La régulation de la LPL macrophagique par les glucocorticoïdes a été particulièrement bien étudiée. Il a été démontré que la dexaméthasone inhibait chez la souris l'activité enzymatique de la LPL (Behr et coll., 1986; Goldman et coll., 1990) mais induisait l'activation transcriptionnelle (via les récepteurs aux glucocorticoïdes) et l'activité enzymatique de la LPL monocytaire et macrophagique humaine. Cette effet s'accroît avec le stade de différenciation des macrophages et l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes, ces derniers augmentant au cours de la maturation de ces cellules (Domin, 1991).

Contrairement à leur effet stimulant sur la synthèse et l'activité de la LPL adipocytaire (Ewart et coll., 1997; Behr et coll., 1986; Kraemer et coll., 1992; Saffari et coll., 1992), l'insuline, l'IGF-1 et la thyroxine n'affectent pas la LPL macrophagique (Behr et Kramer, 1986).

Il n'existe pas de données quant à l'effet de l'hormone de croissance, de la prolactine et des catécholamines sur la production de LPL par le macrophage, ces

hormones contrôlent cependant la production de LPL par le tissu adipeux. En effet, l'hormone de croissance augmente l'activité, le niveau d'ARNm et la transcription de la LPL adipocytaire (Enerback et coll., 1993), la prolactine induit une légère diminution de l'activité de la LPL dans le tissu adipeux (Enerback et coll., 1993) et les catécholamines diminuent l'activité et la synthèse de la LPL adipocytaire (Kern et coll., 1996).

Récemment, Homma et coll. (2000) ont démontré *in vitro* que les oestrogènes supprimaient la transcription de la LPL adipocytaire et l'accumulation de triglycérides dans les adipocytes 3T3-L1 (Homma et coll., 2000). Bien qu'une séquence du promoteur de la LPL ressemblant à l'AP-1 ait été identifiée et semble impliquée dans l'inhibition de la transcription de l'enzyme, le ou les facteur(s) de transcription diminuant l'activité du promoteur de la LPL n'ont à ce jour été reconnus. Les auteurs indiquent ainsi que le rôle protecteur attribué aux oestrogènes contre les maladies cardiovasculaires et l'obésité pourrait faire intervenir l'effet supprimeur des hormones stéroïdiennes sur l'expression de la LPL adipocytaire.

I.1.5.3 Les cytokines

L'effet de différentes cytokines sur la régulation de la LPL macrophagique a été largement investigué par Tengku-Muhammad et coll. entre 1996 et 1999. En utilisant différentes lignées macrophagiques, ces auteurs ont rapporté que l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-11 (IL-11), l'INF- γ , et le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) diminuaient la synthèse de l'ARNm ainsi que l'activité et la masse de la LPL macrophagique. L'analyse de l'effet combiné de ces différentes cytokines sur l'expression de la LPL a démontré un

effet synergistique maximal de la combinaison INF- γ et TNF- α (Tengku-Muhammad et coll., 1998). La réduction d'activité de la LPL par ces deux cytokines est imputée à une diminution des niveaux d'ARNm de la LPL suggérant un effet transcriptionnel de ces substances.

I.1.5.4 La lipopolysaccharide

La LPS stimule l'expression génique et la production de diverses cytokines dont le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6 (Hill et coll., 1995). L'effet de la LPS sur l'expression de la LPL macrophagique a été étudié par différents auteurs (Enerbäck et coll., 1993, Hill et coll., 1995; Tengku-Muhammad et coll., 1996). Ceux-ci ont démontré que la LPS réduisait l'expression génique et l'activité de la LPL macrophagique. Récemment un rôle de la tyrosine kinase et de la phosphatidylinositol-3'-kinase dans l'effet inhibiteur de la LPS sur l'expression macrophagique de la LPL a été proposé (Tengku-Muhammad, 1998).

I.1.4.5 Les oxystérols

Les oxystérols sont des molécules produites par l'oxydation des LDL incluant le 7 α - et β -hydroxycholestérol, le 7-cétocholestérol, le 5,6- α -epoxycholestérol, le cholestane-3 β -5 α -6 β -triol et le 24-,25-,27-hydroxycholestérol. Hultén et coll. (1996) ont documenté la présence d'oxystérols dans les tissus athérosclérotiques humains et ont testé l'effet de ces produits sur l'expression de la LPL macrophagique. Ils ont remarqué que l'addition de 7 β -hydroxycholestérol et de 25-hydroxycholestérol diminuait les niveaux d'ARNm et l'activité enzymatique de la LPL macrophagique. Parmi les autres dérivés

lipidiques, le cholestane-3 β -5 α -6 β -triol et le 27-hydroxycholestérol (Hultén et coll., 1996), les LDL oxydées et la lysophosphatidyl-choline (Stengel et coll., 1998) diminuent également l'activité de la LPL macrophagique.

I.1.5.6 Les prostaglandines

Les prostaglandines sont des eicosanoïdes formés par cyclooxygénation ou lipoxygénation à partir d'AG tels l'acide arachidonique et l'acide linoléique. Les prostaglandines interviennent dans la régulation de la fonction reproductrice, de la fonction endothéliale et vasculaire et de la réponse inflammatoire. Elles sont synthétisées dans les membranes cellulaires à partir des phospholipides membranaires et libérées de façon continue à l'extérieur de la cellule (Marieb, 1993). Les monocytes et les macrophages sécrètent des prostaglandines (PG) en grande quantité. Desanctis et coll. (1994) ont investigué l'effet des PG, en particulier des PGE₂, sur l'expression de la LPL macrophagique. Ils ont démontré que les PGE₂ inhibaient la sécrétion ainsi que les niveaux d'ARNm de la LPL macrophagique murine. Ces auteurs ont aussi rapporté une augmentation considérable de la production d'AMPc par les macrophages traités par les PGE₂. L'effet inhibiteur direct de l'AMPc sur les niveaux d'ARNm et d'activité enzymatique de la LPL, documenté par Desanctis et coll. (1999), corrobore les travaux de Behr et coll. (1986) qui ont rapporté que les substances qui augmentaient la concentration intracellulaire d'AMPc, inhibaient la sécrétion de LPL. Ces données suggèrent que les PGE₂ inhibent l'expression génique de la LPL par une voie de signalisation impliquant l'AMPc.

I.1.5.7 Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le “macrophage-colony stimulating factor” (M-CSF)

Le PDGF est exprimé et sécrété par les macrophages. Trois isoformes ont été identifiés: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, la forme principalement exprimée par le macrophage étant le PDGF-BB. L'équipe de Inaba et coll. (1995) ont rapporté que l'incubation de macrophages en présence de PDGF-BB augmentait l'activité de la LPL de manière dose et temps dépendante. Ils ont aussi démontré que le PDGF-BB augmentait la synthèse “de novo” de l'ARNm de la LPL et que cette induction s'exerçait par l'activation de la PKC. Ces mêmes auteurs ont en outre documenté l'effet stimulant du M-CSF sur la synthèse de l'ARNm de la LPL et sur la sécrétion de l'enzyme par les macrophages humains et murins. Des mécanismes transcriptionnels seraient à l'origine de cette stimulation. La sécrétion de la LPL macrophagique augmente lors de la différenciation des monocytes en macrophages ou lorsque ceux-ci prolifèrent (Goldman et Sopher, 1989). L'effet stimulant du M-CSF et du PDGF sur l'expression de la LPL macrophagique pourrait dès lors être attribuable à la capacité de ces facteurs de croissance à stimuler la prolifération, la différenciation et la maturation des macrophages (Inaba et coll., 1995; Mori et coll., 1991).

I.1.5.8 L'acide rétinoïque

Enerbäck et Gimble (1993) ont rapporté que l'acide rétinoïque inhibait l'activité de la LPL produite par les macrophages murins. L'acide rétinoïque induirait l'augmentation d'expression de “transforming growth factor beta” (TGF- β), ce dernier

ayant pour effet de diminuer l'activité et le niveau d'ARNm de la LPL (Enerback et Gimble, 1993).

I.2 L'athérosclérose

I.2.1 Généralités

L'athérosclérose constitue une des principales causes de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. Elle est responsable de près de 50% des décès en Amérique, en Europe et dans certaines parties de l'Asie (World Health Organization, 1985). Les manifestations cliniques de l'athérosclérose constituent un problème de santé publique majeur dans notre pays. L'athérosclérose est une maladie chronique qui débute dans l'enfance et dont le potentiel évolutif varie selon la présence de divers facteurs de risque. L'étude des mécanismes physiopathologiques de l'athérosclérose a débuté il y a plusieurs décades. L'examen des événements précoces survenant au cours du processus athéromateux démontre que les cellules inflammatoires impliquées dans la pathogenèse de l'athérosclérose sont des composantes classiques d'une réponse inflammatoire de type chronique précédant la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses. L'infiltration et l'accumulation de lipides dans l'espace sous-endothélial représentent d'autres événements précoces de l'athérosclérose. L'athérosclérose est à l'origine de plusieurs complications dont l'angine de poitrine, l'infarctus du myocarde, et ultimement l'insuffisance cardiaque.

I.2.2 Facteurs de risque

L'athérosclérose est une pathologie multifactorielle responsable des manifestations cliniques des maladies coronariennes, cérébrovasculaires et vasculaires périphériques. Dès 1970, les résultats des études épidémiologiques à long terme ont permis d'identifier des facteurs de risque réversibles et irréversibles de cette maladie. Les principaux facteurs de risque réversibles sont la dyslipidémie, le stress oxydatif, l'obésité, le tabagisme, la sédentarité, l'hypertension, le diabète, l'hyperhomocystéinémie et les agents infectieux. Les antécédants familiaux, l'âge et le sexe mâle constituent des facteurs de risque irréversibles. Il est à noter que près de 80% de la population québécoise présente au moins un facteur de risque modifiable. Les facteurs de risque ainsi que les mécanismes impliqués dans le développement de l'athérosclérose sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2. Facteurs de risque impliqués dans le développement de l'athérosclérose (adapté de "Weber, P., Atherosclerosis Risk Factor Modification by n-3 fatty acids; Atherosclerosis Reviews, volume 21, 1990)

Facteurs de risque non-modifiables	acteurs de risques modifiables	Mécanismes
Histoire familiale	Alimentation inadéquate	Acides gras
Sexe masculin	Hyperlipémie	Eicosanoïdes
Âge	Obésité	Plaquette
	Diabète	Monocyte/ Macrophage
	Hypertension artérielle	Cellule endothéliale
	Tabagisme	Cellule musculaire lisse
	Sédentarité	Facteurs de croissance
	Hyperhomocystéinémie	Cytokines
	Maladie immunitaire	Cholestérol/oxLDL
	Infection virale	

I.2.3 Stades de développement de l'athérosclérose

L'athérosclérose est un processus pathologique chronique initié par l'accumulation de lipoprotéines dans l'espace sous-intimal du vaisseau et par l'adhésion des monocytes à l'endothélium. Suite à leur migration vers l'espace sous-endothélial, les monocytes se différencient en macrophages qui, par leur capacité à accumuler le cholestérol, se transforment en cellules spumeuses. Les facteurs de croissance, les cytokines et d'autres substances vasoactives sécrétées par les macrophages, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les plaquettes, favorisent la progression de la lésion athéromateuse. Au stade ultérieur de la maladie, les cellules musculaires lisses modifient leur phénotype et migrent à travers la limitante élastique interne vers l'espace sous-endothélial où elles prolifèrent et sécrètent divers constituants de la matrice extracellulaire. Au stade terminal de la maladie, la plaque, surplombée d'une coiffe dense de tissu conjonctif, entraîne le rétrécissement de la lumière vasculaire. Cette section révisé en détail les stades de développement de l'athérosclérose.

I.2.3.1 La strie lipidique

Les premières étapes de l'athérosclérose se déroulent dans l'espace sous-endothélial. Les deux acteurs essentiels y sont d'une part les particules de LDL cholestérol qui, ayant traversé l'endothélium, subissent dans l'intima du vaisseau un processus d'oxydation et/ou de glycation et d'autre part, les monocytes qui, ayant adhéré aux cellules endothéliales activées pénètrent dans l'espace sous-endothélial. L'infiltration des monocytes à travers l'endothélium et leur différenciation ultérieure en macrophages

est médiée par divers facteurs chémoattractants dont les LDL oxydées, la protéine chimiotactique des monocytes (MCP-1), l'IL-8, le PDGF et le M-CSF. Les macrophages captent les LDL oxydées et se transforment en cellules spumeuses (Rosenfeld et coll., 1990; Ross, 1999).

L'augmentation de perméabilité endothéliale aux lipoprotéines ainsi qu'à d'autres constituants du plasma est un événement précoce précédant la formation de la lésion (Ross et coll., 1977). Cette dysfonction endothéliale serait médiée par l'altération de divers facteurs dont le monoxyde d'azote (NO), les prostacyclines, le PDGF, l'angiotensine II, l'endothéline et les molécules d'adhésion des leucocytes (L-sélectine, intégrines) et des cellules endothéliales (E-sélectine, P-sélectine, ICAM-1, VCAM-1).

L'accumulation de cellules inflammatoires et de lipides dans l'intima, caractérise la strie lipidique (Massy et Keane, 1996). Visible dès l'enfance et asymptomatique, elle se traduit par un épaissement jaunâtre de l'intima. La strie lipidique est réversible et peut donc régresser suite à la modification des facteurs de risque impliqués (Ross, 1995).

I.2.3.2 La lésion fibro-lipidique

La lésion intermédiaire est constituée en grande partie de monocytes/macrophages, de cellules T ainsi que de cellules musculaires lisses. Les cellules sont bordées par une matrice conjonctive discrète contenant des fibres de collagène, des fibres élastiques et des protéoglycans.

Les lipides de la lésion intermédiaire sont constitués essentiellement d'esters de cholestérol, mais aussi de phospholipides et de cholestérol. Ils sont majoritairement

contenus dans les macrophages et les cellules musculaires lisses. Des lipides extracellulaires sont aussi visibles (van Reyk et coll., 1999).

À cette étape de la maladie, la progression de la plaque fait intervenir différents facteurs impliqués dans la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses, la formation des cellules spumeuses, l'activation des cellules T et finalement l'adhésion et l'agrégation plaquettaire.

Des substances chimiotactiques telles le PDGF, le facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF-2) et le TGF- β , sécrétées par les macrophages et les cellules endothéliales stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses et leur migration subséquente vers la média (Badimon et coll., 1993). Les cellules musculaires lisses produiront aussi une quantité importante de matrice extracellulaire dans l'espace sous-endothélial.

Les macrophages jouent un rôle important dans la progression de la lésion athéromateuse. Ils prolifèrent, incorporent des lipides et oxydent les LDL (Chisolm et coll., 1999). Ils expriment à leur surface de multiples récepteurs dont les récepteurs "scavenger" reconnaissant les LDL oxydées.

L'activation lymphocytaire est médiée par des cytokines exprimées dans la lésion telles que le TNF- α , l'IL-2 et le GM-CSF. Les lymphocytes-T sont une composante immunitaire de l'athérogenèse (Hansson et coll., 1998) et leur prolifération pourrait induire l'expansion de la lésion.

Lorsque l'endothélium est altéré, les plaquettes sanguines y adhèrent et sont activées. Cette activation conduit à la formation de prostaglandines, telles le thromboxane A₂, et de leucotriènes qui stimulent la réponse inflammatoire. Les plaquettes activées

peuvent s'accumuler dans la paroi artérielle et recruter des plaquettes additionnelles dans un thrombus en expansion. Elles vont aussi libérer des éléments mitogéniques et chémoattractants tels le PDGF et le TGF- β , contribuant à l'infiltration des monocytes et à la prolifération des cellules musculaires lisses (Bombelli et coll., 1998). L'agrégation et l'adhésion plaquettaire semblent stimulées par les intégrines, la P-sélectine, la fibrine, le thromboxane A2 et le facteur tissulaire.

1.2.3.3 La plaque fibreuse

La plaque fibreuse est constituée d'une matrice extracellulaire de tissu conjonctif dense contenant de nombreuses cellules musculaires lisses, des macrophages et des lymphocytes T. Le tissu conjonctif produit par les cellules musculaires lisses est composé de collagène, de fibres élastiques et de protéoglycans. C'est l'accumulation de cette matrice, de lipides extracellulaires ainsi que de macrophages et de cellules musculaires lisses remplis d'ester de cholestérol qui donne naissance à la plaque fibreuse (Ross, 1999). La nécrose des macrophages et des cellules musculaires lisses sous l'action du cholestérol libre, de la lyso-phosphatidylcholine et des stérols oxydés entraîne la formation d'un dépôt extracellulaire de lipides. Ces lipides vont se centraliser et former un amas lipidique plus ou moins volumineux.

À ce stade, la plaque a atteint sa maturité. Bien que déjà assez volumineuse, l'obstruction qu'elle fait de la lumière vasculaire est amenuisée par le phénomène de remodelage vasculaire (Glagov et coll., 1987), le développement de la plaque à l'intérieur du vaisseau étant contrebalancé par une dilatation de celui-ci. Néanmoins, le phénomène d'élargissement compensateur n'étant pas sans limite, toute augmentation ultérieure de la

taille de la plaque finira par limiter le débit sanguin et occasionnera des symptômes cliniques.

La gravité de la lésion athéromateuse vient de son potentiel d'évolution rapide vers la thrombose. Depuis quelques années, de multiples travaux se sont attardés à comprendre les mécanismes sous jacents à cette évolution et ont abouti à la notion de vulnérabilité ou de rupture de la plaque d'athérome. La rupture de la plaque permet le contact entre le sang et les substrats thrombogènes qui forment son centre lipidique. Le risque de rupture de la plaque s'accroît en fonction de sa richesse en lipides et en macrophages, et de sa pauvreté en cellules musculaires lisses, en éléments fibreux et en collagène. Les macrophages en libérant des enzymes, les métalloprotéinases, qui dégradent la matrice contribuent à la déstabilisation et à la rupture de la plaque athéromateuse (Newby et Zaltsman, 1999).

I.2.4 Étiologie de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie très complexe dont la pathogenèse n'est pas clairement établie. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'étiologie de cette pathologie. Parmi ces hypothèses on distingue l'hypothèse de la réponse au dommage endothélial, l'hypothèse de l'infiltration des lipides, l'hypothèse du stress oxydatif, l'hypothèse virale et l'hypothèse inflammatoire. L'intégration de ces diverses hypothèses semble requise pour pouvoir expliquer d'une meilleure façon le processus d'initiation de l'athérosclérose.

I.2.4.1 L'hypothèse de la réponse au dommage endothélial

L'hypothèse de la réponse au dommage endothélial soutient le rôle majeur d'une altération endothéliale dans l'initiation du processus athéromateux. Cette dysfonction de l'endothélium en induisant l'inactivation de divers mécanismes anti-athérogéniques (Busse et Flemind, 1996), constituerait le mécanisme précoce du développement de l'athérosclérose (Ross et coll., 1977). L'état de dysfonction endothéliale se traduit par divers phénomènes pathologiques tels l'expression accrue de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium, l'augmentation de perméabilité vasculaire, la perte de capacité vasodilatatrice, la sécrétion accrue de facteurs vasoconstrictifs, la perte de régénération des cellules endothéliales et la perte des propriétés endothéliales antithrombotiques et finalement la production anormale de cytokines et de facteurs de croissance (Dart et coll., 1999).

La dysfonction endothéliale est associée à une altération de la synthèse et de la relâche de plusieurs molécules dont le NO, les prostacyclines (PGI₂ et PGI₃), le facteur de vasorelaxation endothélium-dépendant (EDFR) et l'endothéline. La réduction de la lumière artérielle, induite par la vasoconstriction en réponse aux stimuli, pourrait promouvoir l'interaction du sang avec la paroi artérielle (Badimon et coll., 1993).

Les conséquences de l'altération endothéliale sont l'adhésion et la pénétration des monocytes aux sites de lésions ainsi que l'infiltration et l'accumulation des LDL dans l'intima (Steinberg et coll., 1989).

I.2.4.2. L'hypothèse de l'infiltration des lipides

L'hypothèse de l'infiltration des lipides suggère que des concentrations élevées de LDL plasmatiques entraînent l'accumulation de ces lipoprotéines dans la paroi artérielle et leur captation par les macrophages et les cellules musculaires lisses (Brown et coll., 1990). L'accumulation de cholestérol dans ces cellules aboutit à la formation de la strie lipidique. Cette hypothèse a pris naissance au début du siècle et a été récemment renforcée par l'étude clinique "The Framingham Study" démontrant une corrélation entre les niveaux de cholestérol sérique et les maladies cardiovasculaires (Castelli et coll., 1990).

Divers travaux appuient cette hypothèse. Par exemple, Nordestgaard et coll. (1994) ont démontré qu'une diminution des niveaux de cholestérol sanguin est reliée à une réduction des événements coronariens. De plus, une relation entre des niveaux élevés de cholestérol plasmatique et l'abondance des stries lipidiques dans la lésion athéromateuse a été récemment documentée par Napoli et coll. (1999).

I.2.4.3 L'hypothèse du stress oxydatif

Cette hypothèse fait valoir que les mécanismes impliqués dans l'athérogenèse sont la conséquence d'une augmentation des niveaux de stress oxydatif causé par une production accrue de radicaux libres et/ou par une diminution des niveaux d'antioxydants. Cette hypothèse avance en outre que le stress oxydatif induit l'activation de gènes régulés par le système redox.

Le rôle des radicaux libres comme agents initiateurs de la lésion athéromateuse a été largement documenté. Ainsi, les radicaux libres ont été identifiés comme facteurs de

risque de l'athérosclérose pouvant entraîner, entre autre, la dysfonction endothéliale, l'activation des cellules endothéliales et macrophagiques et l'oxydation des particules de LDL (Abplanalp et coll., 2000). L'effet inhibiteur des antioxydants sur le processus athérosclérotique a été imputé à une réduction de l'infiltration des monocytes dans l'intima (Rangan et coll., 1999), à une inhibition d'oxydation des LDL (Tsujita et Yokoyama, 1996) et à une réduction d'expression des molécules d'adhésion (Ferns et coll., 1993). Les antioxydants pourraient aussi exercer leur rôle cardio-protecteur en inhibant la prolifération des cellules musculaires lisses, l'induction de l'agrégation plaquettaire, la production des cellules spumeuses et l'apoptose cellulaire (Girndt et coll., 2000; Weisburger, 1999).

Les recommandations diététiques quant à la supplémentation en vitamines antioxydantes à titre prophylactique des maladies cardio-vasculaires, demeurent un sujet de controverse. En effet, bien que certaines études épidémiologiques aient observé une relation inverse entre les niveaux ou l'apport en vitamine E et les événements cardio-vasculaires (Losonczy et coll., 1996), un apport accru en antioxydants n'a pu démontré de manière constante son efficacité à diminuer l'incidence d'événements cardio-vasculaires (Yusuf et coll., 2000). La consommation d'aliments riches en antioxydants demeure à ce jour la seule mesure préconisée pour la prévention des maladies cardio-vasculaires.

I.2.4.4 L'hypothèse infectieuse de l'athérosclérose

Cette hypothèse a pris corps en 1978 avec les travaux de Fabricant et coll. Ces chercheurs ont proposé qu'une infection par le virus de l'herpès pourrait participer au

développement de l'athérosclérose. Depuis lors, il a été démontré que le virus de l'herpès simplex 1 et le cytomégalovirus pouvaient, en infectant les cellules vasculaires, altérer leurs fonctions et, ce faisant, induire le développement de mécanismes proathérogéniques tels la transformation des macrophages en cellules spumeuses, la prolifération des cellules musculaires lisses, la dysfonction endothéliale, l'expression des molécules d'adhésion et finalement la production de cytokines par les monocytes/macrophages (Nicholson et coll., 1998).

Des études récentes suggèrent que d'autres agents infectieux incluant *Chlamydia pneumoniae* et *Helicobacter pylori* puissent aussi être impliqués dans la pathogenèse de l'athérosclérose. En ce qui concerne le *Chlamydia pneumoniae*, plusieurs études histologiques rapportent sa présence dans la lésion athéromateuse. Bien qu'il semble que l'infection par cette bactérie puisse accélérer le développement des lésions dans certains modèles expérimentaux, diverses études n'ont pu apporter de preuves convaincantes que *Chlamydia pneumoniae* soit capable à lui seul d'induire des lésions athérosclérotiques. Des études sont actuellement en cours afin de déterminer l'efficacité d'antibiotiques ciblant le virus *Chlamydia pneumoniae* à réduire le risque d'événements cardiovasculaires chez des patients souffrant d'ischémie cardiaque (Gurfinkel et coll., 2000; Kaykov et coll, 1999).

Depuis 1994, plusieurs études séro-épidémiologiques ont cherché une association entre *Helicobacter pylori* et les maladies artérielles. Leur analyse n'a pu cependant démontrer l'existence d'une association forte entre ce pathogène et les maladies cardiovasculaires.

I.2.4.5 L'hypothèse inflammatoire de l'athérosclérose

L'hypothèse inflammatoire de l'athérosclérose stipule que le processus athéromateux résulte d'une réponse inflammatoire initiale représentant un mécanisme de protection de la paroi artérielle. Cette inflammation résulte de l'agression de l'endothélium par divers facteurs de risque. Lorsque l'agression se perpétue et devient chronique, cette réponse inflammatoire devient excessive et fibro-proliférative (Ross, 1999). Nous disposons aujourd'hui de preuves indéniables montrant que les lésions athérosclérotiques présentent les attributs classiques de l'inflammation, c'est-à-dire, l'infiltration monocytaire, la prolifération des cellules musculaires lisses et des vaisseaux sanguins et la sclérose conjonctive.

I.2.5 Effets potentiels de la LPL dans le processus athérogénique

Bien que la LPL puisse exercer, en périphérie un effet anti-athérogénique, de nombreuses évidences suggèrent que l'enzyme sécrétée dans la paroi vasculaire, puisse promouvoir par ses propriétés enzymatiques et structurales, le développement de l'athérosclérose.

Les résultats de multiples études suggèrent en effet un rôle critique de la LPL macrophagique dans la pathogenèse de l'athérosclérose. En 1977, Corey et Zilversmit ont démontré que la concentration de LPL dans l'espace sous-endothélial s'accroît lors de la progression de la lésion et qu'il existe une corrélation positive entre sa production dans la paroi artérielle et l'accumulation des esters de cholestérol (Zilversmith, 1979). Yla-Herttuala (1991) et O'Brien (1992) ont mis en évidence la sécrétion de LPL par les macrophages et les cellules musculaires lisses dans la lésion athéromateuse. Les cellules

spumeuses dérivées des macrophages sont la source primaire de LPL dans la lésion. Renier et coll. (1993), ont démontré, chez la souris congénique, que l'état de susceptibilité à l'athérosclérose est associé à des niveaux jusqu'à trois fois plus élevés de LPL macrophagique. Récemment, il a été démontré, qu'en dépit d'une dyslipidémie profonde, une diète athérogénique n'augmente pas de manière significative le développement de lésions athéromateuses, chez des souris présentant un déficit hétérozygote en LPL (Semenkovich et coll., 1998). Enfin, le rôle de la LPL macrophagique dans la formation des cellules spumeuses et des lésions athéromateuses a été récemment rapporté par Babaev et coll., (1999). Prises dans leur ensemble, ces données démontrent un rôle pro-athérogénique de la LPL produite dans la paroi vasculaire.

I.2.5.1 Effets pro-athérogéniques de la LPL

L'effet pro-athérogénique de la LPL a été principalement attribué à sa capacité à favoriser l'accumulation de lipides à l'intérieur des macrophages. En hydrolysant les lipoprotéines riches en triglycérides, la LPL génère des résidus de lipoprotéines qui sont captés et phagocytés par le macrophage. Les AG libres produits par l'action catalytique de la LPL sont réestérifiés à l'intérieur du macrophage et contribuent à leur tour à la formation des cellules spumeuses. (Aviram et coll., 1988).

Les LDL résultant de l'hydrolyse des VLDL par la LPL contribuent aussi de manière marquée au développement de la lésion (Steinberg et coll., 1989). En effet, l'oxydation de ces molécules dans l'intima favorise leur captation par le macrophage et induit la formation des cellules spumeuses. La LPL peut aussi exercer ses effets pro-

athérogéniques de par ses propriétés structurales. En effet, indépendamment de son action catalytique, la LPL se lie aux protéoglycans exprimés à la surface de diverses cellules, incluant les macrophages, et agit comme ligand facilitant la captation et la dégradation des lipoprotéines remnantes par les macrophages et les cellules musculaires lisses (Williams et coll., 1992; Chappell et coll., 1993). L'association de la LPL aux particules remnantes favorise aussi leur interaction avec la surface cellulaire et stimule leur captation et leur rétention dans la paroi vasculaire (Eisenberg et coll., 1992; Saxena et coll., 1992; Auerbach et coll., 1999; Hendriks et coll., 1996). Il a été démontré que la LPL produite dans la paroi vasculaire, augmente la liaison et l'association des LDL natives et oxydées, aux macrophages, et contribue par ce mécanisme à la formation des cellules spumeuses (Wang et coll., 1999a).

La LPL pourrait aussi favoriser la prolifération des cellules musculaires lisses. En effet, Mamputu et coll. (2000, in press), ont démontré que la prolifération des cellules musculaires lisses était augmentée *in vitro* en présence de LPL.

La LPL induit aussi *in vitro* l'expression génique du TNF- α par les macrophages (Renier et coll., 1994). L'activation des cellules T, médiée par le TNF- α , étant un processus important impliqué dans la progression de la lésion athéromateuse, l'effet de la LPL sur la production de TNF- α pourrait constituer un autre mécanisme par lequel cette enzyme favoriserait le développement de l'athérosclérose.

Enfin, il a été récemment proposé que la LPL puisse, en formant un pont entre les HSPG exprimés à la surface des monocytes et ceux exprimés à la surface des cellules endothéliales jouer le rôle d'une molécule d'adhésion (Mamputu et coll., 1997).

I.2.5.2 Effets anti-athérogéniques de la LPL

Plusieurs observations expérimentales supportent le rôle anti-athérogénique de la LPL en périphérie. Ainsi, Benlian et coll., (1996), ont récemment démontré que des patients déficients en LPL développent des lésions athéromateuses relativement avancées. Il a aussi été documenté que les sujets hétérozygotes pour la mutation du gène de la LPL, chez qui une diminution d'activité enzymatique de la LPL plasmatique est observée, sont prédisposés à développer des lésions athéromateuses prématurément (Wittrup et coll., 1997; Henderson et coll., 1999).

Le fait que la lipolyse des lipoprotéines riches en triglycérides au niveau du tissu adipeux, du coeur et des muscles squelettiques, détermine un profil lipidique non athérogénique (Yagy et coll., 1999) et l'observation que la surexpression de la LPL normalise le profil lipidique athérogénique des souris déficientes en Apo-E ou en récepteurs aux LDL et protège ces animaux de l'hyperlipidémie induite par la diète supportent le rôle anti-athérogénique de la LPL en périphérie. L'étude de Hokenson et coll., (1999) démontrant une relation entre la diminution d'activité plasmatique de la LPL et la production de petites particules athérogènes de LDL appuie cette hypothèse.

Un autre argument en faveur d'un rôle anti-athérogénique de la LPL est l'observation selon laquelle l'administration d'un activateur de la LPL tissulaire, le NO-1886, prévient en augmentant les HDL, le développement de l'athérosclérose (Tsutsumi et coll., 1993). De plus, la capacité de la LPL à médier la captation sélective des HDL riches en esters de cholestérol par les cellules hépatiques et à stimuler la clairance hépatique des lipoprotéines et des résidus de chylomicrons (Rinninger et coll., 1998)

suggère que cette enzyme puisse par son activité plasmatique, prévenir le développement de l'athérosclérose.

I.3. Les acides gras

I.3.1 Structure, classification et fonctions des acides gras

Structure: Les AG sont des composés organiques formés d'une chaîne hydrocarbonée plus ou moins longue présentant à une extrémité un groupe méthyl (-CH₃) et à l'autre un groupement carboxyl (-COOH). Le groupement carboxyl peut réagir avec l'une des fonctions alcool du glycérol pour former un triglycéride (Fig. 3).

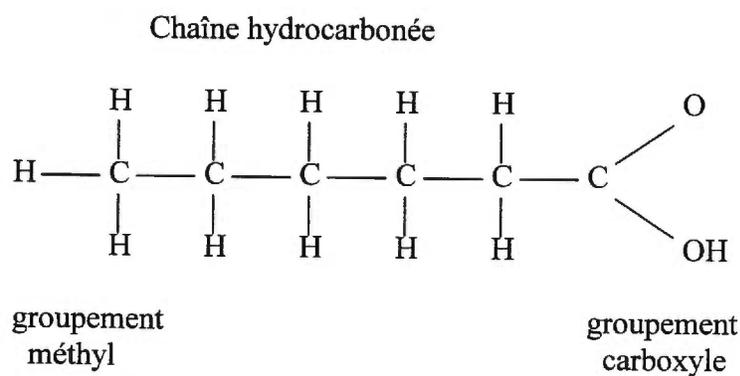


Fig.3 Représentation schématique d'un acide gras

Classification: Les AG sont métabolisés en AG supérieurs par élongation et désaturation successives et sont incorporés aux phospholipides des membranes cellulaires. Voici la classification des AG selon leur degré de saturation (Tableau 3).

Tableau 3. Dénomination et nomenclature des principaux acides gras

Dénomination commune	Nomenclature
Acides gras saturés	
Butyrique	C4:0
Caproïque	C6:0
Caprylique	C8:0
Caprique	C10:0
Laurique	C12:0
Myristique	C14:0
Palmitique	C16:0
Stéarique	C18:0
Arachidique	C20:0
Béhénique	C22:0
Lignocérique	C24:0
Acides gras monoinsaturés	
Palmitoléique	C16:1, n-7
Oléique	C18:1, n-9
Gadoléique	C20:1, n-9
Erucique	C22:1, n-9
Nervonique	C24:1, n-9
Acides gras polyinsaturés	
Linoléique	C18:2, n-6
γ -linoléique	C18:3, n-6
α -linoléique	C18:3, n-3
Dihomo- γ -linoléique	C20:3, n-6
Eicosatriénoïque	C20:3, n-9
Arachidonique	C20:4, n-6
Eicosapentaénoïque	C20:5, n-3
Docosatetraénoïque	C22:4, n-6
Docosapentaénoïque	C22:5, n-6
Docosahexaénoïque	C22:6, n-3

Fonctions: Les lipides possèdent cinq fonctions physiologiques importantes: 1) ils constituent une source d'énergie appréciable, 2) ils interviennent dans la structure cellulaire et les fonctions de la membrane et jouent, en particulier, un rôle majeur dans le fonctionnement cérébral, 3) ils représentent une source d'AG essentiels pour la synthèse des PG et leucotriènes, 4) ils assurent le transport des vitamines liposolubles A, D, E et K, 5) ils contrôlent les concentrations et les propriétés biologiques des lipoprotéines plasmatiques.

I.3.2 Acides gras et athérosclérose

Les AG alimentaires suscitent depuis plusieurs années un regain d'intérêt dans la communauté médicale et scientifique. En effet, les AG ont été identifiés comme des facteurs activement impliqués dans l'étiologie de certaines maladies chroniques et dans diverses réactions immunitaires et inflammatoires. L'athérosclérose et la thrombose sont les deux principales causes de maladies coronariennes. Les AG semblent jouer un rôle déterminant dans ces pathologies même si leur implication dans le cas de la thrombose s'avère moins claire. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'effet des AG sur le processus athéromateux sont la concentration des lipoprotéines, la thrombogénèse et la fonction plaquettaire, la fonction endothéliale et finalement la réponse immunitaire et inflammatoire. Ces processus seront discutés dans la prochaine section.

I.3.2.1 Effets des acides gras sur la concentration des lipoprotéines

Les concentrations de lipoprotéines plasmatiques sont un facteur de risque déterminant de l'athérosclérose. Durant des années, l'effet des AG sur la lipidémie se résumait comme suit: les AG saturés l'augmentent, les polyinsaturés la diminuent et les monoinsaturés ne l'affectent pas. Nous savons maintenant qu'il y a des nuances à apporter à ces affirmations et que l'effet des AG sur ce paramètre varie, selon leur configuration, leur degré de saturation et la situation de la double liaison sur la chaîne carbonée.

Plusieurs études, menées par Mensink et Katan (1989; 1990; 1992) ont permis d'élucider davantage l'effet des AG sur la lipémie. Ces travaux ont permis de démontrer que les AG saturés augmentent les niveaux de cholestérol sérique, en augmentant les taux de LDL plasmatiques. Les mécanismes par lesquels les AG saturés augmentent les taux de LDL cholestérol restent obscurs, bien que certains aient proposé que ces AG puissent inhiber le métabolisme hépatique des LDL en diminuant l'activité des récepteurs LDL ou en augmentant la production de l'apoB-100 des LDL et des VLDL (Grundy et coll., 1986; Spady et coll., 1993; Hayes et coll., 1992).

Tous les AG saturés ne sont pas identiques quant à leur propension à accroître les concentrations de lipoprotéines. Ainsi, l'acide stéarique et les AG ayant dix ou moins d'atomes de carbone ne semblent pas augmenter les taux de cholestérol (Keys et coll., 1965a; Bonanome et coll., 1988; Mensink et Katan, 1992). En fait, seuls les acides laurique, myristique et palmitique seraient hypercholestérolémiant (Zock et coll., 1994; Temme et coll., 1996), l'effet hypercholestérolémiant de l'acide myristique étant quatre fois plus marqué que celui des deux autres AG (Hegsted et coll., 1965; Ulbricht et coll.,

1991). Cater et ses collaborateurs (1997) ont aussi démontré qu'un mélange d'acide caprylique et caprique, deux AG saturés à chaîne moyenne, augmentait légèrement les niveaux de LDL mais n'avaient pas d'effet sur les HDL. D'une manière générale, l'on peut dire que malgré l'effet stimulant de certains AG sur les concentrations de LDL et de HDL, tous les AG saturés augmentent le ratio LDL:HDL à des niveaux comparables.

Les graisses hydrogénées, ont aussi un effet néfaste sur les lipides sanguins. Le processus d'hydrogénation des AG induit une saturation de certaines de leurs doubles liaisons et un changement de leur configuration naturelle *cis* en configuration *trans*. Leur action sur les lipoprotéines sériques serait au moins aussi néfaste que celle des AG saturés (Mensink et coll., 1990; Katan et coll., 1995; Aro et coll., 1997). De plus, ces AG n'augmenteraient pas seulement les LDL mais diminueraient aussi le taux des HDL (Castelli et coll., 1986).

Diverses études ont aussi permis de démontrer que les AG monoinsaturés tels l'acide oléique, longtemps considérés comme neutres, sont aussi efficaces que les AG polyinsaturés à faire baisser les taux sériques de cholestérol (Mensik et Katan, 1992; Mattson et coll., 1985; Mensink et coll., 1989). Chez les individus ayant un apport en matière grasses modéré, les AG monoinsaturés auraient un effet plus favorable sur les lipides et les lipoprotéines plasmatiques que les AG polyinsaturés (Sirtori et coll., 1992). Une diète riche en acide oléique rétablit l'activité des récepteurs LDL (Dietschy et coll., 1993) et augmente la clairance des esters de cholestérol par les HDL (Kosla et Hayes, 1996).

Parmi les AG polyinsaturés (PUFA), l'acide linoléique s'avère aussi efficace que l'acide linoléique pour réduire les taux sanguins de cholestérol total, de triglycérides

et de LDL (Chan et coll., 1991). Les PUFA diminueraient les LDL plasmatiques en augmentant l'activité des récepteurs aux LDL (Hayes et coll., 1992).

L'effet des AG oméga-3 sur la cholestérolémie demeure un sujet de controverse. Chez les sujets hyperlipémiques, l'huile de poisson, diminue les triglycérides mais augmente les LDL et les HDL (Harris, 1997).

I.3.2.2 Effets des acides gras sur la thrombogénèse et la fonction plaquettaire

L'apport alimentaire en AG conduit à leur incorporation dans les phospholipides de la membrane des plaquettes sanguines et entraîne de ce fait la modification de certaines propriétés susceptibles d'intervenir dans les processus de coagulation, d'agrégation plaquettaire et finalement de thrombose.

L'effet des AG sur la fonction plaquettaire a récemment fait l'objet de quelques études (Mutanen et coll., 1997; Turpeinen et coll., 1997; 1998). Ces travaux démontrent qu'un enrichissement *in vivo* des phospholipides membranaires par les AG entraîne une activation des plaquettes. Cette activation semble particulièrement importante dans le cas des AG de configuration *trans* et de l'acide stéarique. Une diminution d'activation plaquettaire serait cependant observée dans le cas des AG n-3.

L'intégration des AG n-3 aux phospholipides membranaires diminue aussi la libération de PDGF par les plaquettes. Ce facteur de croissance est libéré par l'agrégat plaquettaire au contact de la paroi artérielle et induit la croissance et la prolifération des cellules musculaires lisses et des macrophages (Fox et coll, 1988; Russel et coll., 1990). Une autre activité importante du PDGF est l'activation des récepteurs des LDL, processus responsable de la captation des lipides par les macrophages et de leur

transformation en cellules spumeuses (Habenicht et coll., 1990). L'inhibition de la relâche de PDGF par les AG n-3 résulterait d'une diminution d'activation de la PKC.

Les effets anti- ou pro-coagulants des AG semblent médiés principalement par le fibrinogène, une protéine plasmatique produite par le foie et impliquée dans le processus de coagulation, le facteur de coagulation von Willebrand, le facteur de coagulation VII, l'antithrombine III et l'inhibiteur du plasminogène-1 (PAI-1). Selon plusieurs études, les AG moduleraient de manière marquée les niveaux plasmatiques du fibrinogène. En effet, des études menées par Bladbjerg et coll., (1995) et Mutanen et Aro, (1997) démontrent qu'une diète riche en acide stéarique augmente les taux de fibrinogène plasmatique. De plus, une relation inverse entre la prise alimentaire d'AG n-3 et les niveaux plasmatiques de fibrinogène a été rapportée par Shahar et coll.(1993) dans une étude visant à évaluer les niveaux de risques cardiovasculaires de différentes communautés.

L'effet des AG sur l'expression du facteur von Willebrand a fait l'objet de plusieurs études. Shahar et coll., (1993), ont observé une association négative entre la consommation alimentaire d'AG n-3 et les niveaux plasmatiques du facteur von Willebrand. Blann et coll., (1995) ont pour leur part démontré qu'une diète faible en cholestérol ou en gras saturés, diminuait de manière significative les niveaux plasmatiques du facteur von Willebrand et qu'une corrélation négative existait entre les niveaux plasmatiques du facteur von Willebrand et la consommation d'AG n-6 et n-3.

L'effet des AG sur l'expression du facteur de coagulation VII, ne semble pas dépendre de la composition en AG et seuls les apports alimentaires lipidiques totaux semblent déterminer les variations d'expression de ce facteur. À ce sujet, il est bien démontré qu'une diète riche en lipides entraîne une augmentation des niveaux

plasmatiques du facteur VII (Bladbjerg et coll., 1995). L'activation de ce facteur de coagulation serait due à la libération d'AG suite à l'hydrolyse des triglycérides (Silveira et coll., 1994).

Les AG n-6 et n-3 augmentent aussi les niveaux plasmatiques de l'antithrombine III et une supplémentation alimentaire en AG n-3 augmente l'expression et l'activité du PAI-1 (Freese et Mutanen, 1997).

Il a été postulé que l'effet anti-thrombogénique des AG n-3 puisse enfin être du à une diminution de production de thromboxane A₂, un facteur proagrégant plaquettaire et vasoconstrictif (Leaf et coll., 1989).

I.3.2.3 Effets des acides gras sur la fonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est associée à une augmentation de synthèse et de relâche de plusieurs facteurs dont les molécules d'adhésion, les cytokines, les facteurs activant les plaquettes et l'endothéline et à une diminution d'expression de PGI₂, du NO et du TGF-β. Les AG semblent pouvoir moduler l'expression de certains de ces facteurs.

Des études menées par Fischer et coll., (1986) et Hamazaki et coll., (1989) dans les populations Eskimo et Japonaise et reprises par la suite par De Caterina (1990) et Nordoy (1994), concluent qu'un apport alimentaire riche en AG n-3 d'origine marine, augmente la production de PGI₂ dans l'organisme. Cet effet bénéfique des AG n-3 semble cependant s'accompagner d'une diminution de production d'autres agents vasodilatateurs tels le NO et l'EDRF (De Caterina et coll., 1990; Nordoy et coll., 1994).

Les acides docohexapentaénoïque (DHA) et eicosapentaénoïque (EPA) diminuent l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine par les cellules

endothéliales humaines activées (Collie-Duguid et Wahle, 1996). De plus, il a été démontré que le DHA diminuait l'expression de VCAM-1 induite par les cytokines (Weber et coll., 1995). Cette diminution d'expression de VCAM-1 serait due à l'inactivation du facteur de transcription NF- κ B, un facteur inductible impliqué dans la transcription des molécules d'adhésion endothéliales. Une étude récente chez les lapins suggère aussi la capacité des AG monoinsaturés à réduire l'expression de VCAM-1 *in vivo* (De Caterina et coll., 1995b) via une diminution de l'expression de l'ARNm de NF- κ B. Il est suggéré que la régulation de l'expression des molécules d'adhésion par les AG puisse impliquer un mécanisme oxydatif-dépendant, l'expression génique de VCAM-1 pouvant être diminuée *in vitro* par les antioxydants.

Toborek et coll., (1997; 1996) ont démontré que l'acide linoléique, en induisant un stress oxydatif, pouvait jouer un rôle primordial dans le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans le développement de la lésion athérogénique. En effet, le stress oxydatif induit par l'acide linoléique active le NF- κ B qui, en activant à son tour les cellules endothéliales, entraîne la production de TNF- α . Le stress oxydatif induit par l'acide linoléique entraînerait aussi une altération de la barrière endothéliale et ultérieurement, la dysfonction de l'endothélium.

Enfin, les AG n-3 diminuent *in vitro* la production stimulée par le TNF α , le TGF- β et la thrombine de PDGFc, un facteur de croissance analogue au PDGF produit par les cellules endothéliales et réduisent *in vivo* chez les sujets sains, la synthèse endothéliale de TNF- α et d'IL-1- β (Caughey et coll., 1996).

I.3.2.4 Effets des acides gras sur la réponse inflammatoire

L'effet des AG sur la réponse inflammatoire fut investigué en utilisant majoritairement les AG n-3.

Effets *in vitro* : L'acide alpha-linolénique, l'EPA et le DHA diminuent la prolifération des lymphocytes T humains (Kelly et Parker, 1979; Santoli et coll., 1990). Ces AG réduisent aussi la réaction inflammatoire en atténuant la réponse à l'antigène, en diminuant la capacité des cellules immunitaires à présenter l'antigène (Fujikama et coll., 1992) et en supprimant la production d'IL-2, un facteur stimulant la prolifération des lymphocytes (Calder et Newsholme, 1992).

Effets *ex vivo*: Chez les animaux, une diète riche en AG n-3 induit une diminution de la réponse immunitaire au niveau de la rate, du thymus et des ganglions lymphatiques (Kelley et coll., 1988). De plus, les AG n-3 diminueraient aussi certaines fonctions macrophagiques telles l'activité phagocytaire, atténueraient la production de molécules d'adhésion (Sanderson et coll., 1995), de facteurs chémoattractants (Sperling et coll., 1993) ainsi que celle de l'interleukine-2 et le facteur nucléaire-B (Endres et coll., 1993; 1995b; Renier et coll., 1993).

I.3.2.5 Synthèse des effets anti-athérogéniques des acides gras n-3

Un apport alimentaire accru en AG n-3 induit leur intégration aux phospholipides membranaires. Il en résulte une modification de certaines propriétés membranaires telles la viscosité et la fluidité (Terrano, 1983). Ces AG en devenant les substrats préférentiels de la phospholipase A2 induisent une diminution de production des métabolites biologiquement actifs de l'acide arachidonique tels les PG, les thromboxanes et les

leucotriènes (fig. 4), des facteurs intervenant directement dans les processus de coagulation sanguine et inflammatoire et dans la régulation du tonus vasculaire vasomoteur. Les acides EPA et DHA inhiberaient aussi la cyclooxygénase, une enzyme nécessaire à la formation des prostanoïdes à partir de l'AA (Anonymous, Lancet, 1988).

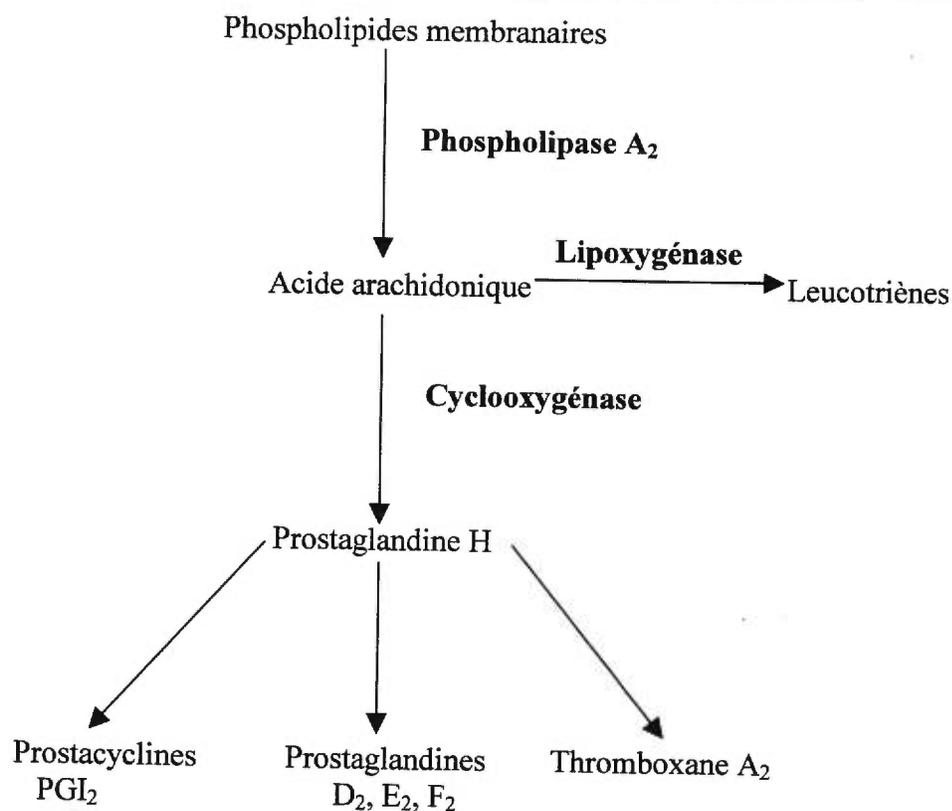


Fig.4 Représentation schématique de la synthèse des eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique

L'intérêt suscité par les AG n-3 dans la prévention des maladies cardiovasculaires, relève de plusieurs observations épidémiologiques. La faible incidence d'athérosclérose, d'hypertension artérielle et la relation inverse entre l'apport en AG n-3

et la cholestérolémie dans les populations consommant des quantités importantes de ces AG, comptent parmi celles-ci (Boona et coll., 1990; Keys, 1980; Mc Millan, 1990; Oliver, 1989; Rasmanis et coll., 1988, Scott, 1989).

Un apport enrichi de manière chronique en AG n-3 diminue les taux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides, augmente le temps de saignement, diminue l'agrégation plaquettaire et entraîne une correction de l'hypertension artérielle (Keys, 1980; Kasim et coll., 1988; Terrano, 1983). Les mécanismes d'action par lesquels les AG n-3 exerceraient ces effets antiathérogéniques sont les suivants:

- 1) Les AG n-3 moduleraient la production des eicosanoïdes telles le PGE₂, PGI₂, le PGI₃, le leucotriène B₄ et le thromboxane A₂ par les cellules du système immunitaire.
- 2) Les AG n-3, par leur intégration à la membrane, moduleraient la fluidité de celle-ci.
- 3) Les AG n-3 réguleraient les voies de transduction impliquant la protéine kinase C, le calcium et les médiateurs lipidiques.
- 4) Les AG n-3 contrôleraient l'expression de gènes impliqués dans la production de cytokines, l'oxydation des AG et la formation des lipoprotéines. Le tableau 4 résume les effets biochimiques et fonctionnels responsables de l'action anti-athérogénique des AG n-3.

Tableau 4 Actions anti-athérogéniques des acides gras n-3

(adapté de "Atherosclerosis Risk factor modification by n-3 Fatty Acids" Weber PC. Atherosclerosis Reviews, Volume 21, 1990)

Diminution de facteurs de risque	Augmentation de facteurs de protection
<ul style="list-style-type: none"> • Métabolites de l'AA • Agrégation plaquettaire • Synthèse de PDGF • Fonction du monocyte /macrophage • Production de cytokines (TNF et IL-1) • Production de radicaux libres • Pression sanguine • Triglycérides • Fibrinogène • Hyperplasie de l'intima • Viscosité sanguine 	<ul style="list-style-type: none"> • Formation des prostacyclines PGI₂ et PGI₃ • Formation et relâche de l'EDRF • Activité fibrinolytique • Capacité des globules rouges à se déformer • Compliance vasculaire

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

Les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de morbidité et de mortalité chez les Nord-américains. L'athérosclérose représente en outre une complication majeure du diabète de type 2. La pathogenèse de cette complication est multifactorielle et implique la production dans la paroi vasculaire de la LPL macrophagique. Nous avons démontré que des anomalies métaboliques ou hormonales présentes dans le diabète de type 2, entraînent une surexpression de la LPL macrophagique (Sartippour et coll., 1998). Des niveaux élevés d'AG plasmatiques sont observés chez les patients diabétiques. Cette anomalie du métabolisme lipidique pourrait contribuer à l'augmentation de production de la LPL macrophagique observée chez ces sujets. L'hypothèse de ce projet est que les AG exercent une action régulatrice directe sur l'activité et la production de la LPL macrophagique.

Les objectifs de ce projet sont:

- 1) de caractériser l'effet de divers types d'AG sur la régulation de la LPL macrophagique.
- 2) d'établir les mécanismes moléculaires responsables de la régulation de la LPL par les AG.
- 3) d'identifier le rôle des "peroxisome proliferator-activated receptors" dans la régulation de la LPL par les AG.

II. RÉSULTATS

II.1 Article

**DIRECT REGULATORY EFFECT OF FATTY ACIDS ON MACROPHAGE
LIPOPROTEIN LIPASE: ROLE OF PPARs.**

Sophie Élise Michaud and Geneviève Renier.

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

Short title: Regulation of macrophage LPL by fatty acids.

Key words: Macrophage, lipoprotein lipase, fatty acids, diabetes.

Abbreviations: LPL, lipoprotein lipase; FA, fatty acids AA, arachidonic acid; EPA; eicosapentaenoic acid; LA, linoleic acid; OA, oleic acid; PA, palmitic acid; SA, stearic acid; Mo, macrophage; BSA, bovine serum albumin; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; DMEM, Dulbecco's minimal essential medium; FCS, fetal calf serum; DTT, dithiothreitol; PBS, phosphate buffered salt solution; PPARs, peroxisome proliferator-activated receptors; PPRE, peroxisome proliferator responsive element; PKC, protein kinase C; TBS, Tris-buffered saline.

SUMMARY

Atherosclerosis is a major complication of type 2 diabetes. The pathogenesis of this complication is poorly understood but clearly involves the production in the vascular wall of macrophage (Mo) LPL. Mo LPL is increased in human diabetes. Peripheral factors dysregulated in diabetes, including glucose and free fatty acids (FA), may contribute to this alteration. We previously reported that high glucose stimulates LPL production both in J774 murine and human Mo. In the present study, we evaluated the direct effect of FA on murine Mo LPL expression and examined the involvement of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in this effect. J-774 Mo were cultured for 24h with 0.2 mM unsaturated FA (arachidonic (AA), eicosapentaenoic (EPA), linoleic (LA)), monounsaturated FA (oleic (OA)) and saturated FA (palmitic (PA), stearic (SA)) bound to 2% bovine serum albumin. At the end of this incubation period, Mo LPL mRNA expression, immunoreactive mass, activity and synthetic rate were measured. Incubation of J-774 cells with LA, PA and SA significantly increased Mo LPL mRNA expression. In contrast, exposure of these cells to AA and EPA dramatically decreased this parameter. All FA, with the exception of EPA and OA, increased extra- and intracellular LPL immunoreactive mass and activity. Intracellular LPL mass and activity paralleled extracellular LPL mass and activity in all FA-treated cells. In Mo exposed to AA, LA and PA, an increase in Mo LPL synthetic rate was observed. To evaluate the role of PPARs in the modulatory effect of FA on Mo LPL gene expression, DNA binding assays were performed. Results of these experiments demonstrate an enhanced binding of nuclear proteins extracted from all FA-treated Mo to the peroxisome proliferator response element (PPRE) consensus sequence of the

LPL promoter. PA-, SA- and OA-stimulated binding activity was effectively diminished by immunoprecipitation of the nuclear proteins with anti-PPAR α antibodies. In contrast, anti-PPAR γ antibodies only significantly decreased AA-induced binding activity. Overall, these results provide first evidence for a direct regulatory effect of FA on Mo LPL. They also support a role of PPARs in the regulation of Mo LPL gene expression by FA.

INTRODUCTION

Atherosclerosis is the major underlying cause of cardiovascular diseases in adults and the leading cause of morbidity and mortality among diabetic patients (1-6). It has been shown that LPL, a secretory product of Mo in the arterial wall, contributes to the development and progression of atherosclerosis (7-12). We have previously shown that high glucose enhances LPL production in J774 murine and human Mo (13). Furthermore, we have recently demonstrated that Mo isolated from patients with type 2 diabetes overproduce LPL (14). Apart glucose, other metabolic factors dysregulated in diabetes such as FA may play a key role in Mo LPL overproduction associated with human diabetes. Indeed, FA are increased in the plasma of diabetic patients and are produced at high concentrations in the arterial wall through the hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins infiltrating the intima (15).

The role of FA in atherogenesis has been largely characterized over the last decades. While many evidences have supported a pro-atherogenic effect of saturated FA (16-20), a protective action with respect to the arterial wall has been attributed to unsaturated FA (20-25). One major mechanism responsible for the modulatory effect of FA on the atherogenic process is lipid metabolism. LPL is a major enzyme involved in the hydrolysis of lipoproteins. Recently, an inhibitory effect of FA on plasma and adipocyte LPL has been documented. More specifically, it has been shown that rats fed a high fat diet have decreased plasma and adipocyte LPL activity levels (26) and that high-fat feeding of normal subjects causes an impairment of insulin-stimulated LPL activity in adipose tissue (27). In addition, fasting and catecholamines, which stimulate lipolysis and increase plasma FA levels, have been reported to decrease

adipocyte LPL activity (28). Because LPL gene expression in adipose tissue is increased (29) or unaffected by FA (30,31), post-translational mechanisms have been implicated in the regulation of adipocyte LPL by these metabolic agents.

Despite the potential key role of Mo LPL and FA in atherogenesis associated with diabetes, the regulatory effect of FA on Mo LPL expression has not been investigated. Based on our previous results showing a similar metabolic regulation of LPL expression in murine and human Mo (13), we investigated in the present study the direct regulatory effect of FA on LPL in J774 murine Mo. Our data demonstrate that FA directly modulate Mo LPL expression and suggests a role of PPARs in this effect.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Reagents

Fetal calf serum (FCS) was purchased from Wisent (St-Bruno, Qc). Dulbecco's minimal essential medium (DMEM), penicillin-streptomycin and heparin were obtained from Gibco BRL (Grand Island, NY). Sodium salt FA, FA-free bovine serum albumin fraction V (BSA) and dextran sulfate were obtained from Sigma (St-Louis, MO). Cesium chloride, glycine, sodium dodecyl sulfate (SDS) and formaldehyde solution were obtained from Fischer (Fair Lawn, NJ). [³²P] dCTP (specific activity 3000Ci/mmol) and [³⁵S] methionine (specific activity 1000Ci/mmol) were provided by ICN Biochemicals (Costa Mesa, CA).

Murine Mo

The J774 murine Mo cell line was obtained from American Type Cell Collection (Rockville, MD). 7×10^6 murine Mo were cultured in DMEM containing 10% FCS and 1% penicillin-streptomycin. Mo were incubated for 24h in serum-free DMEM in presence of 0.2 mM of various FA including polyunsaturated FA (arachidonic (AA), eicosapentaenoic (EPA) and linoleic (LA)), monounsaturated FA (oleic (OA)) and saturated FA (palmitic (PA) and stearic (SA)) bound to 2% BSA. Serum-free DMEM supplemented with 2% BSA was used as control. Under these experimental conditions, FA-to-albumin molar ratio was approximately 1, value which is within physiological levels.

Analysis of LPL mRNA expression

Northern Blot analysis: Following treatment with FA, Mo were lysed with guanidine isothiocyanate. Total RNA was purified by centrifugation through a cesium chloride gradient (32). Twenty μg of total RNA was separated on a 1.2% agarose gel containing 2.2 mol/l of formaldehyde (33). The blots were prehybridized for 8h in prehybridization buffer. The mRNA expression was analysed by hybridization with [^{32}P] dCTP-labeled murine LPL and S28 cDNA probes. Hybridization was detected by autoradiography with Kodak Biomax Film (Rochester, NY). mRNA expression was quantified by high resolution optical densitometry (Alpha Imager 2000, Packard Instruments, Meriden CT). LPL mRNA levels were normalized to the levels of S28 mRNA and expressed as percentages of control values.

Electrophoretic mobility shift assay

The isolation of the nuclei was performed as previously described (34). Briefly, 5×10^7 J774 cells were collected, washed with cold phosphate buffered salt solution (PBS), and lysed in 1 ml of ice-cold buffer A (15 mmol/l KCl, 2 mmol/l MgCl_2 , 10 mmol/l HEPES, 0.1% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 0.5% Nonidet P-40). After a 10-min incubation on ice, lysed cells were centrifuged and the nuclei were washed with buffer A without Nonidet P-40. The nuclei were then lysed in a buffer containing 2 mol/l KCl, 25 mmol/l HEPES, 0.1 mmol/l ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 1 mmol/l dithiothreitol (DTT). After a 15-min incubation period, a dialysis buffer (25 mmol/l HEPES, 1 mmol/l DTT, 0.1% PMSF, 2 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 0.1 mmol/l EDTA and 11% glycerol) was added to the nuclei preparation. Nuclei were collected by centrifugation for 20 min at 13,000 rpm. Aliquots (50 μl) of the supernatants were

frozen at -70°C , and protein concentration was determined. DNA retardation (mobility shift) electrophoresis assays were performed as previously described by Fried and Crothers (35). Briefly, 5 μg nuclear extracts were incubated for 15 min in the presence of 5x binding buffer (125 mmol/l HEPES, pH 7.5, 50% glycerol, 250 mmol/l NaCl, 0.25% Nonidet P-40, 5 mmol/l DTT) in the presence or absence of 200ng anti-PPAR α , β , (Santa Cruz, Biotechnology inc, Santa cruz, CA) or γ (Calbiochem, La Jolla, CA) antibodies. End-labeled double-stranded consensus sequences of the LPL promoter PPAR-enhancing element (20,000 cpm per sample) were then added to the samples for 30 min. Samples were analysed on a 4% nondenaturing polyacrylamide gel (PAGE), containing 0.01% Nonidet P-40. The specificity of the nuclear protein binding was assessed by incubating the nuclear proteins isolated from murine macrophages with labeled DNA probe in the presence of a 1000-molar excess of unlabeled DNA probe.

DNA probes

The cDNA probes for detection of murine LPL was prepared by polymerase chain reaction technique. cDNA was obtained from total RNA using a reverse transcription reaction. Two synthetic primers spanning bases 255-287 and 1,117-1,149 of the LPL cDNA, were used to enzymatically amplify a 894-base pair region of the LPL probe. The cDNA probe for S28 was obtained from American Type Cell Collection (Rockville, MD). A 20-mer double stranded oligonucleotide containing the PPRE consensus sequence of the human LPL gene promoter (36) (sense :5'-CGTCTGCCCTTTCCCCCTCT-3'; antisense: 5'-GAGAAGAGGGGGAAAGGGCA-3') was synthesized with the aid of an automated DNA synthesizer. After annealing, the

double-stranded oligonucleotide was labeled with [γ - 32 P] ATP by using the Boehringer-Mannheim 5'-end-labeling kit (Indianapolis, IN).

Determination of murine LPL immunoreactive mass and activity

2×10^6 J774 cells were incubated for 24h in DMEM containing 0.2 mM FA. One hour before the end of the incubation period, 100 U/ml heparin was added to the medium. Extra- and intracellular LPL immunoreactive mass and activity were determined in the supernatants and in 0.5 N NaOH cell lysates using the Markit-F-LPL kit (Dainippon, Pharmaceutical, Osaka, Japan) (37) and the confluoip kit (Progen, Heidelberg, Germany) (38), respectively. LPL mass and activity were normalized to the levels of total cell proteins.

Immunoprecipitation assay

Following treatment with the appropriate FA, 1×10^6 cells were washed twice with PBS and incubated for 1h with methionine-free DMEM. Cells were then metabolically labeled with 100 μ Ci [35 S] methionine for 4h and chased for 1h with complete DMEM. Radiolabeling was ended by the addition of lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 100 μ g/ml PMSF, 1% Triton X-100). Immunoprecipitation of LPL in cell lysates was performed as follows. After centrifugation of homogenates at 17,000 g for 20 min. at 4°C, the supernatant was collected and used for immunoprecipitation. The samples (200 μ g total cytoplasmic proteins) were incubated at 4°C for 4h with 10 μ g of the monoclonal anti-LPL antibody 5D2 (a generous gift of Dr J.D. Brunzell, University of Washington, Seattle) followed by incubation with 10 μ l goat anti-mouse IgG antiserum (Bio Rad, Hercules, CA). The immunocomplexes were collected on protein

A/G PLUS-agarose beads (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA), washed twice with Tris-buffered saline (TBS) containing 0.2% NP-40, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, then with TBS only. The pellet was resuspended in 1x SDS-loading buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol), boiled for 10 min and the samples were subjected to a 8% SDS-PAGE (39). Immunoprecipitation of cytoplasmic proteins isolated from heparin-stimulated Mo was used as positive control (40). Immunoprecipitation with the irrelevant anti-human interleukin-6 antibody (10 μ g) (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) was used as negative control. After autoradiography, the intensity of the bands was quantified by densitometry using an image analysis scanning system (Alpha Imager 2000, Packard Instruments, Meriden, CT).

Determination of cell viability

Cell viability after treatment with FA was assessed by trypan blue exclusion. Viability was consistently found to be higher than 90%.

Determination of protein concentrations

Protein concentration was measured according to the Bradford method (41) using a colorimetric assay (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) and BSA as standard.

Statistical Analysis

Statistical analysis of the results were done by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons. All values were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). A value of $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Effect of FA on Mo LPL mRNA expression.

The kinetic effect of FA on LPL mRNA expression was determined by incubating J774 cells in the presence of FA for 3 to 48h. The earliest changes in LPL mRNA levels in response to saturated and polyunsaturated FA were observed after a 6 and 12h incubation period, respectively (data not shown). Maximal effect of all tested fatty acids on macrophage LPL gene expression was observed at 24h (Fig.1A). Incubation of J774 cells in presence of LA, PA and SA for 24h significantly increased Mo LPL mRNA levels. Maximal effect was observed with saturated FA (LPL mRNA levels (% over basal values) : PA:150± 20% ; SA:140± 15%, P<0.001). LPL mRNA levels were also positively modulated by LA and OA (LPL mRNA levels (% over basal values) : LA :133± 6%, P<0.001; OA :116± 22%, P>0.05). In contrast, exposure of Mo to AA and EPA dramatically decreased LPL mRNA levels (LPL mRNA levels (% of basal values) AA : 48± 6%, P<0.001; EPA:60± 5%, P<0.001). Under these experimental conditions, no modulation of the rRNA expression of S28 was observed (Fig.1B). LPL mRNA levels normalized to the levels of S28 rRNA are presented in Fig.1C.

Effect of FA on Mo LPL immunoreactive mass and activity.

The levels of extra- and intracellular LPL immunoreactive mass and activity, normalized to the levels of total cell proteins, in FA-treated Mo are illustrated in Fig.2. Treatment of J774 cells for 24h with AA, LA, PA and SA increased extra- and intracellular LPL immunoreactive mass (Fig.2A,B) and activity (Fig.2C,D). In contrast, exposure of Mo to OA and EPA did not significantly alter these parameters (Fig.

2A,B,C,D). Relative content of LPL mass and activity within vs heparin-released from cells remained constant following treatment of the cells by FA (data not shown).

Effect of FA on Mo LPL synthetic rate.

To determine the effect of FA on Mo LPL synthesis, Mo were pulse-labeled in the presence of FA and cell extracts were immunoprecipitated to yield the radiolabeled LPL protein. Heparin-stimulated cells and immunoprecipitation with an irrelevant antibody were used as positive and negative controls, respectively. As illustrated in figure 3, treatment of J774 cells with AA, LA and PA for 24h led to a significant increase in LPL synthetic rate (LPL synthetic rate (% over basal values) : AA : $153 \pm 18\%$; LA : $168 \pm 8\%$; PA : $142 \pm 5\%$ $P < 0.05$). In contrast, EPA, OA and SA did not affect this parameter (Fig.3). LPL synthesis in FA-treated Mo, expressed as percentages of control values, is illustrated in figure 3B.

Effect of FA on the binding of nuclear proteins to the regulatory PPRE sequence of the LPL gene promoter.

Exposure of Mo for 24h to all FA resulted in a dramatic increase in the binding of nuclear proteins to the PPRE consensus sequence of the LPL promoter (Fig.4A,B). This binding was specifically competed in the presence of a 1000-fold molar excess of the unlabeled PPRE oligonucleotide (data not shown). While immunoneutralization of nuclear proteins with anti-PPAR γ antibodies only effectively reduced AA-stimulated binding activity (Fig. 4A), incubation of nuclear extracts in presence of anti-PPAR α antibodies decreased PA-, SA- and OA-stimulated binding activity to the PPRE sequence (Fig.4B). In contrast, no effect of anti-PPAR β antibodies on FA-stimulated binding activity to the PPRE sequence was observed (data not shown).

DISCUSSION

The present study demonstrates that FA exert a direct regulatory effect on Mo LPL expression. Key elements in the lipid signal transduction pathway include transport of exogenous FA into cells, metabolism of FA to second messengers, trafficking of the messengers to the nucleus and regulation of gene transcription via association with nucleus co-activators or repressors. A wide number of adipocyte lipid related genes, including the adipocyte lipid binding protein (42-43), has been shown to be regulated by exogenous FA (43-44). Our results demonstrating that FA exert a direct modulatory effect on Mo LPL mRNA levels indicate that LPL is also a target gene for FA in Mo. Regulation of Mo LPL gene expression by FA may involve transcriptional factors such as PPARs (45) or FA activated receptors (FAARs) (42) which both recognize the putative PPRE sequence present in the LPL gene. Alternatively, based on the well documented stimulatory effect of FA on protein kinase C (PKC) (46) and on the key role of PKC and c-fos in the regulation of the LPL gene (46-48), a role of c-fos in the regulation of Mo LPL gene expression by FA may be postulated.

Results presented here suggest that FA, including PA, SA and AA, might exert their regulatory effect on Mo LPL gene expression, at least partly, through a PPAR-dependent mechanism. Indeed, we found that these well characterized ligands and activators of PPARs (49) directly regulate Mo LPL gene expression and enhance in a PPAR-specific manner, the binding activity of nuclear proteins to the PPRE element present in the LPL gene. Apart PPARs, FAARs which also recognize the putative PPRE sequence present in the LPL gene promoter are likely to be involved in the regulation of Mo LPL gene expression by exogenous FA. This possibility may apply to

LA and EPA that enhance the binding activity to the PPRE sequence in a PPAR-independent manner. Alternatively, a role of c-fos in the regulation of Mo LPL by FA may be proposed. This hypothesis merits particular consideration in the case of LA and EPA that regulate the PKC/c-fos signaling pathway (50-52) and induce parallel changes of Mo c-fos and LPL mRNA expression (personal observations).

While saturated FA bind to PPAR α with high affinity, unsaturated FA bind to all three PPAR subtypes with varying affinities. Of the unsaturated FA tested in the present study, LA and OA show higher affinity for PPAR α , while AA and EPA interact more efficiently with PPAR γ (49). Our findings that FA which function as PPAR α ligands, enhance Mo LPL gene expression and our observations that anti-PPAR α decreases the enhanced binding of nuclear proteins isolated from SA-, PA- and OA-treated Mo to the PPRE regulatory domain of the LPL gene suggest a positive relationship between PPAR α activation and Mo LPL gene expression. Whether a PPAR signalling pathway is involved in the suppressive effect of AA and EPA on Mo LPL gene regulation is presently unclear. Indeed, despite the previous evidence for a role of PPAR γ as a negative regulator of Mo gene expression (53-54), the net effect of PPAR γ ligands on Mo LPL gene expression has not been studied. Although our results demonstrate that PPAR γ binding to the PPRE sequence occurs in AA-treated Mo, they did not provide evidence for a role of this transcription factor in the EPA-induced DNA binding activity to the PPRE sequence. Apart PPAR, various transcription factors including FAAR (42), hepatocyte nuclear factor-4 (55) and chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (56) may bind to the PPRE DNA target site. Whether these

transcription factors may contribute to the suppressive effect of AA and EPA on Mo LPL gene expression remains to be investigated.

LPL producing cell types have the capacity to control this enzyme at a variety of levels (28-30). While adipocyte LPL regulation in response to FA has been proposed to take place mainly at the post-transcriptional level (30), our results suggest that Mo LPL regulation may occur both at the transcriptional and post-transcriptional level in response to FA. Because changes in LPL mRNA levels upon exposure of Mo to LA and PA are of the same size as changes in the LPL synthetic rate and secretion, one may hypothesize that Mo LPL regulation in response to these agents occurs primarily at the transcriptional level. Although we did not perform run-on assays, data showing that nuclear proteins isolated from Mo exposed to these FA bind to the LPL promoter PPRE sequence seem to support this possibility. In contrast, our results which demonstrate that changes in LPL gene expression following treatment of Mo with SA, AA and EPA do not correlate with changes in LPL synthetic rate and/or secretion, indicate that these FA regulate Mo LPL at the post-transcriptional level. Our finding that LPL synthetic rate paralleled protein activity in AA- and EPA-treated Mo indicates that translational events are involved in the effect of these FA on Mo LPL. In contrast, our observation that LPL protein synthesis is unaffected by SA whereas LPL secretion is increased in SA-treated Mo reflects post-translational control of LPL by this FA. Although the mechanisms involved in the translational control of Mo LPL by AA and EPA are unknown, it is possible that these FA may increase LPL translation processing by activating cytoplasmic *trans* stimulating proteins which bind to the mRNA 3' UTR. This possibility is supported by the observation of Kern et al (57)

showing that LPL translational regulation by thyroid hormone is exerted via a cytoplasmic protein interacting with the 3' untranslated region of the LPL mRNA.

Multiple evidences indicate that dietary saturated FA represent a risk factor for atherosclerosis (16-20). Based on the proatherogenic effects of LPL secreted by Mo in the subendothelial space, our results which demonstrate that saturated FA increase Mo LPL production suggest a new mechanism by which these metabolic factors may promote atherogenesis. In contrast to saturated FA, intake of polyunsaturated n-3 FA has been associated with a lower incidence of cardiovascular events (24, 58-59). One mechanism by which n-3 FA may favorably affect the atherogenic process is by reducing the secretion of proatherogenic cytokines by Mo. In accordance with our previous observation showing a reduction in LPL mRNA levels in Mo isolated from mice fed a fish oil-enriched diet (60), we found that incubation of Mo with n-3 FA for 24h decreases Mo LPL gene expression and that prolonged incubation (48h) of Mo with this FA reduces Mo LPL secretion (data not shown). Overall, these data suggest that a relative reduction in Mo LPL production may contribute to the cardioprotective effect of n-3 FA. Macrophages are able to utilize glucose, glutamine and FA as energy sources (61). Because complete oxidation of glucose and glutamine is limited in Mo, FA oxidation may provide, under various circumstances, a significant proportion of the energy required by these cells. In particular, these metabolic factors may constitute, in the energy limited environment of the atherosclerotic plaque, the crucial fuel for activated Mo energy expenditure. Infiltration of triglyceride-rich lipoproteins into the arterial wall and hydrolysis of these particles by LPL are likely to release high concentrations of FA in the subendothelial space of the vessels. Although the levels of

FA to which Mo are exposed in vivo are unknown, increased serum levels of unbound free FA have been documented in patients undergoing coronary angioplasty (62). Whether the concentrations of unbound free FA used in our experimental conditions reflect the levels of FA to which macrophages are exposed in the arterial wall, is presently uncertain.

Data generated by the current study suggest that production of FA in the arterial wall may regulate the production of Mo LPL at vascular sites. Because lipoproteins isolated from diabetic patients show increased levels of saturated FA and LA (63) and low levels of n-3 FA, infiltration of these particles in the arterial wall may favor the induction of Mo LPL that we previously reported in human type 2 diabetes (13). Enhanced production of Mo LPL in the arterial wall may contribute to the accelerated atherosclerosis associated with diabetes.

In conclusion, the present study provides first evidence for a direct regulatory effect of FA on macrophage LPL. It also supports a role of PPARs in the control of Mo LPL by FA.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada and the Association Diabète Québec.

REFERENCES

1. DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:173-194, 1991
2. Kannel WB, McGee DL : Diabetes and cardiovascular disease : the Framingham study. *JAMA* 241 :2035-2038, 1979
3. Stegmayr B, Asplund K : Diabetes as a risk factor for stroke : a population perspective. *Diabetologia* 38 :1061-1068, 1995
4. Haheim LL, Home I, Hjermann I, Leren P : Nonfasting serum glucose and the risk of fatal stroke in diabetic and nondiabetic subjects : 18-year follow-up of the Oslo study. *Stroke* 26 :774-777, 1995
5. Miettinen H, Salomaa V : Diabetes and macrovascular disease. *Coronary artery disease* 7 :708-714, 1996
6. Shantaram V: Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension. *Clin Exp Hypertension* 21: 69-77, 1999
7. Rumsey SC, Obunike JC, Arad Y, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ: Lipoprotein lipase-mediated uptake and degradation of low-density lipoproteins by fibroblasts and macrophages. *J Clin Invest* 90: 1504-1512, 1992
8. Kraemer FB: Role of lipoprotein lipase and apolipoprotein E secretion by macrophages in modulating lipoprotein uptake: possible role in acceleration of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes* 41:77-80, 1992

9. Renier G, Skamene E, DeSanctis JB, Radzioch D: High macrophage lipoprotein lipase expression and secretion are associated in inbred murine strains with susceptibility to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* 13 : 190-196, 1993
10. Mead JR, Cryer A, Ramji DP: Lipoprotein lipase, a key role in atherosclerosis? *FEBS Letters* 462: 1-6, 1999
11. Semenkovich CF, Coleman T, Daugherty A : Effects of heterozygous lipoprotein lipase deficiency on diet-induced atherosclerosis in mice. *J Lipid Res* 39 :1141-1151, 1998
12. Babaev VR, Fazio S, Gleaves LA, Carter KJ, Semenkovich CF, Linton MF : Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo. *J Clin Invest* 103: 1697-1705, 1999
13. Sartippour MR, Lambert A, Laframboise M, St-Jacques P, Renier G: Stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression and production. *Diabetes* 47: 431-438, 1998
14. Sartippour MR, Renier G : Upregulation of macrophage lipoprotein lipase in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 49 :597-601, 2000
5. Yin B, Loike JD, Kako Y, Weinstock PH, Breslow JL, Silverstein SC, Goldberg IJ: Lipoprotein lipase regulates fc receptor-mediated phagocytosis by macrophages maintained in glucose-deficient medium. *J Clin Invest* 100 : 649-657, 1997
6. Mensink RP, Katan MB: Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb* 12: 911-919, 1992
7. Kromhout D : Fatty acids, antioxidants, and coronary heart disease from an epidemiological perspective. *Lipids* 34: S27-S31, 1999

18. Nicosoli RJ, Wilson TA, Rogers EJ, Kritchvsky D : Effects of specific fatty acids (8 :0, 14 :0, cis-18 :1, trans-18 :1) on plasma lipoproteins, early atherogenic potential, and LDL oxidative properties in the hamster. *J Lipid Res* 39 :1972-1980,1998
19. Watts GF, Jackson P, Burke V, Lewis B : Dietary fatty acids and progression of coronary artery disease in men. *Am J Clin Nutr* 64 :202-209, 1996
20. Watts GF, Lewis B, Jackson P, Burke V, Lewis ES, Brunt JN, Coltart DJ : Relationship between nutrient intake and progression/regression of coronary atherosclerosis as assessed by serial quantitative angiography. *Can J Cardiol* 11 :110G-114G, 1995
21. Zheng ZJ, Folsom AR, Ma J, Arnett DK, McGovern PG, Eckfeldt JH : Plasma fatty acid composition and 6-year incidence of hypertension in middle-aged adults : the Atherosclerosis Risk in communities (ARIC) Study. *Am J Epidemiol* 150:492-500,1999
22. Massaro M, Carluccio MA, De Caterina R : Direct vascular antiatherogenic effects of oleic acid : a clue to the cardioprotective effects of the mediterranean diet. *Cardiologia* 44:507-513,1999
23. De Caterina R, Liao JK, Libby P : Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 71:213S-223S,2000
4. Connor WE : Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr* 71:171S-175S,2000
5. Blaha V, Solichova D, Cernohorsky D, Bratova M, Vyroubal P, Zadak Z : Bioanalysis of PUFA metabolism and lipid peroxidation in coronary atherosclerosis. *J Pharm Biomed Anal* 22:563-572,2000
3. Brown CM, Layman DK: Lipoprotein lipase activity and chylomicron clearance in rats fed a high fat diet. *J Nutr* 118:1294-1298, 1988

27. Sadur CN, Yost TJ, Eckel RH: Fat feeding decreases insulin responsiveness of adipose tissue lipoprotein lipase. *Metabolism* 33:1043-1047, 1984
28. 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* 265:4570-4577, 1990
29. Amri EZ, Teboul L, Vannier C, Grimaldi PA, Ailhaud G: Fatty acids regulate the expression of lipoprotein lipase gene and activity in preadipose and adipose cells. *Biochem J* 314: 541-546, 1996
30. Murphy MC, Zampelas A, Puddicombe SM, Furlonger NP, Morgan LM, Williams CM: Pretranslational regulation of the expression of the lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) gene by dietary acids fatty acids in the rat. *Br J Nutr* 70: 727-736, 1993
31. Ong JM, Kern PA: Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J Clin Invest* 84: 305-311, 1989
2. Chomczynski P, Sacchi N: Single step method for RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987
3. Thomas P: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5201-5205, 1980
4. Han JH, Beutler B, Huez G: Complex regulation of tumor necrosis factor mRNA turnover in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1090:22-28, 1991
5. Fried M, Crothers DM: Equilibria and kinetics of *lac* repressor-operator interaction by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 9: 6505-6525, 1981

36. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J : PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene expression. *EMBO J* 15 :5336-5348, 1996
37. Ikeda Y, Takagi A, Ohkaru Y, Nogi K, Iwanaga T, Kurooka S, Yamamoto A : A sandwich-enzyme immunoassay for the quantification of lipoprotein lipase and hepatic lipase in human postheparin plasma using monoclonal antibodies to the corresponding enzymes. *J Lipid Res* 30 :1911-1924, 1990
38. Duque M, Graupner M, Stutz H, Wicher I, Zechner R, Paltauf F, Hermetter A: New fluorogenic triacylglycerol analogs as substrates for the determination and chiral discrimination of lipase activities. *J Lipid Res* 37:868-876, 1996
39. Carroll R, Ben-Zeev O, Doolittle MH, Severson DL: Activation of lipoprotein lipase in cardiac myocytes by glycosylation requires trimming of glucose residues in the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 285: 693-696, 1992
40. Behr SR, Kraemer FB : Regulation of the secretion of lipoprotein lipase by mouse macrophages. *Biochim Biophys Acta* 889: 346-354, 1986
1. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976
2. Grimaldi PA, Teboul L, Gaillard D, Armengod AV, Amri EZ: Long chain fatty acids as modulators of gene transcription in preadipose cells. *Mol Cell Biochem* 192:63-68, 1999

43. Hertzler AV, Bernlohr DA: Regulation of adipocyte gene expression by polyunsaturated fatty acids. *Mol Cell Biochem* 188:33-39, 1998
44. Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli, W: Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2160-2164, 1993
45. Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, Staels B: Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR. *Atherosclerosis* 124: S29-37, 1996
46. Leger CL, Kadri-Hassani N : Modulation by some fatty acids of protein kinase C-dependent NADPH oxidase in human adherent monocyte : mechanism of action, possible implication in atherogenesis. *C R Seances Soc Biol Fil* 189 :765-769,1995
47. Ranganathan G, Kaakaji R, Kern PA: Role of protein kinase C in the translational regulation of lipoprotein lipase in adipocytes. *J Biol Chem* 274: 9122-9127, 1999
48. Barcellini-Couget S, Pradines-Figuères A, Roux P, Dani C, Ailhaud G: The regulation by growth hormone of lipoprotein lipase gene expression is mediated by c-fos protooncogene. *Endocrinology* 132:53-60, 1993
49. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA, Milburn MV : Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 3 :397-403,1999

50. Rao GN, Alexander RW, Runge MS: Linoleic acid and its metabolites, hydroperoxyoctadecadienoic acids, stimulate c-Fos, c-Jun, and c-Myc mRNA expression, mitogen-activated protein kinase activation, and growth in rat aortic smooth muscle cells. *J Clin Invest* 96: 842-847, 1995
51. Tappia PS, Man WJ, Grimble RF: Influence of unsaturated fatty acids on the production of tumor necrosis factor and interleukin-6 by rat peritoneal macrophages. *Mol Cell Biochem* 143:89-98, 1995
52. Futamura Y: Effect of amiodarone on release of cytokines from mouse alveolar macrophages pretreated with eicosapentaenoic acid. *Jpn J Pharmacol* 69: 335-341, 1995
53. Jiang C, Ting AT, Seed B: PPAR γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391:82-86, 1998
54. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK: The peroxisome proliferator-activated receptor γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391:79-82, 1998
55. Nicolas-Frances V, Dasari VK, Abruzzi E, Osumi T, Latruffe N: The peroxisome proliferator response element (PPRE) present at position -681/-669 in the rat liver 3-ketoacyl-CoA thiolase B gene functionally interacts differently with PPAR α and HNF-4. *Biochem Biophys Res Commun* 269 :347-351, 2000
56. Hegardt FG: Transcription regulation of mitochondrial HMG-CoA synthase in the control of ketogenesis. *Biochimie* 80 :803-806, 1998

57. Kern PA, Ranganathan G, Yukht A, Ong JM, Davis RC: Translational regulation of lipoprotein lipase by thyroid hormone is via a cytoplasmic repressor that interacts with the 3' untranslated region. *J Lipid Res* 37: 2332-2340, 1996
58. Angerer P, von Schacky C : n-3 polyunsaturated fatty acids and the cardiovascular system. *Curr Opin Lipidol* 11 :57-63,2000
59. Meydani M : Omega-3 fatty acids alter soluble markers of endothelial function in coronary heart disease patients. *Nutr Rev* 58 :56-59,2000
60. Renier G, Skamene E, De sanctis J, Radzioch D : Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesion in mice. *Arterioscler Thromb* 13 :1515-1524,1993
61. 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* :242 :631-636, 1987
62. Kleinfeld AM, Prothro D, Brown DL, Davis RC, Richieri GV, DeMaria A: Increases in serum unbound free fatty acid levels following coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 78:1350-1354, 1996
63. Prescott J, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH : The fatty acid distribution in low density lipoprotein in diabetes. *Biochim Biophys Acta* 1439 :110-116,1999

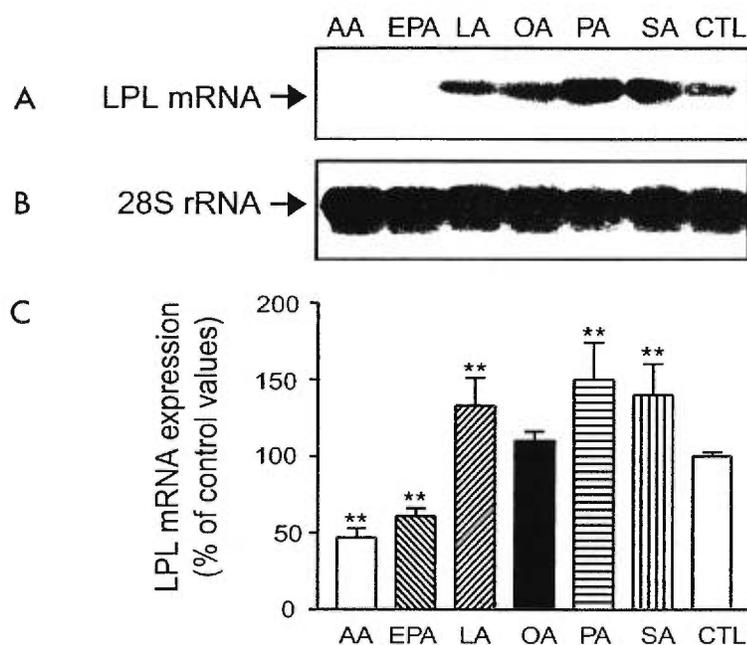


FIG. 1. Effect of FA on murine macrophage LPL mRNA expression. J774 cells were cultured for 24 h in presence of 0.2 mM arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA), linoleic acid (LA), oleic acid (OA), palmitic acid (PA) and stearic acid (SA). At the end of the incubation period, cells were lysed and total RNAs were extracted and analysed by Northern Blot analysis for LPL mRNA (A) and S28 rRNA (B). C : LPL mRNA levels normalized to the levels of S28 RNA. Data represent the mean \pm SEM of five experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. controls.

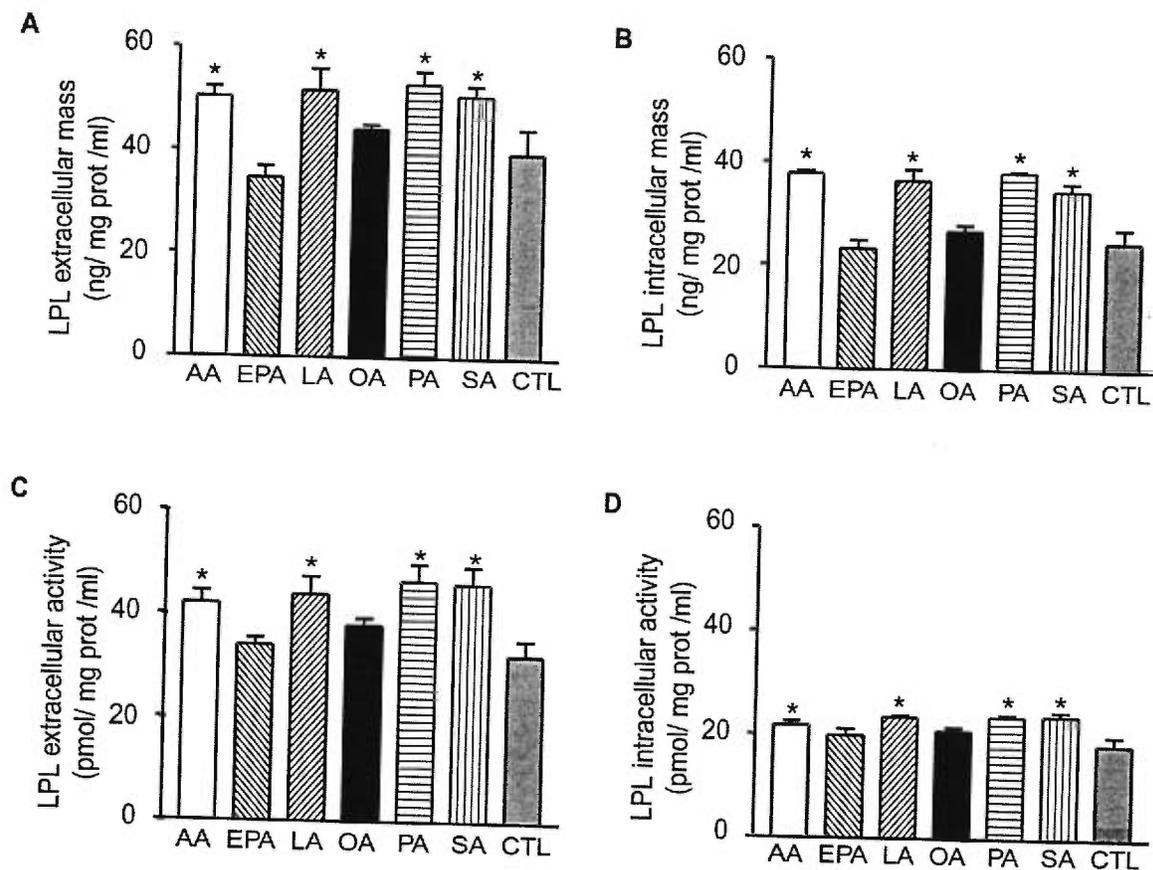


FIG.2. Effect of FA on murine macrophage LPL immunoreactive mass and activity. J774 cells were cultured for 24 h in presence of 0.2 mM arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA), linoleic acid (LA), oleic acid (OA), palmitic acid (PA) and stearic acid (SA). At the end of the incubation period, LPL immunoreactive mass (A-B) and activity (C-D) were measured in the culture medium and LPL intracellular activity was determined in cells lysates (C). All values represent LPL mass and activity normalized to the levels of total cell proteins. Data represent the mean \pm SEM of five experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. controls.

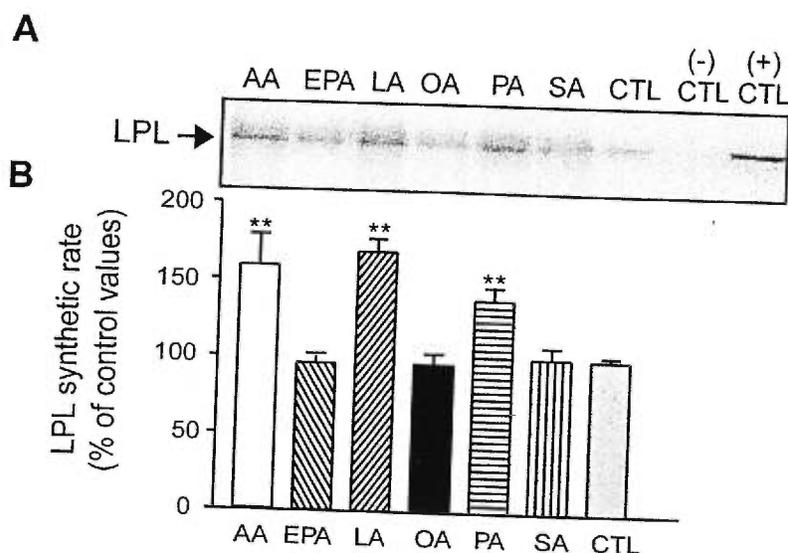


FIG. 3 Effect of FA on Mo LPL synthesis. J774 cells were cultured for 24h in presence of 0.2 mM arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA), linoleic acid (LA), oleic acid (OA), palmitic acid (PA) and stearic acid (SA) and then incubated for 1h in methionine-free medium. Cells were next labeled with [³⁵S]-methionine for 4h and chased for 1h with complete DMEM. LPL was immunoprecipitated by incubating total cytoplasmic proteins with 10 μ g of the monoclonal anti-LPL antibody 5D2. A : SDS-PAGE of cytoplasmic proteins isolated from Mo treated with FA or heparin- (CTL+) and immunoprecipitated with the anti-LPL antibody. CTL- : SDS-PAGE of cytoplasmic proteins isolated from Mo treated with FA and immunoprecipitated with the irrelevant anti-human interleukin-6 antibody. B : Graph bar showing LPL synthesis in FA-treated Mo. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. * P <0.05 ** P < 0.01 vs. controls.

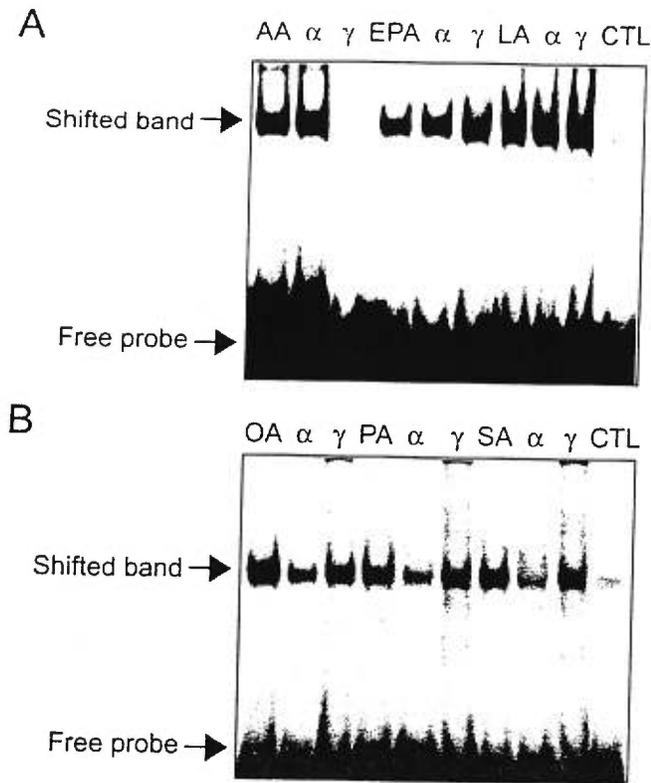


FIG.4. Effect of FA on the binding of nuclear proteins to the regulatory PPRE sequence of the LPL gene promoter. J774 cells were cultured for 24h in presence of 0.2 mM arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA), linoleic acid (LA), oleic acid (OA), palmitic acid (PA) and stearic acid (SA). At the end of this incubation period, nuclear proteins were isolated from the cells and incubated with end-labeled double-stranded consensus sequences of the LPL promoter PPAR-enhancing element. In some experiments, nuclear proteins were incubated in presence of anti-PPAR α and γ antibodies. Retardation was assessed by gel electrophoresis in 4% PAGE. Data represent the results of one representative experiment out of four. A : Binding activity of nuclear proteins extracted from AA-, EPA- and LA-treated Mo. B : Binding activity of nuclear proteins extracted from OA-, PA- and SA-treated Mo.

III. DISCUSSION

III. Discussion

Les maladies cardio-vasculaires causées par l'athérosclérose constituent la première cause de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. Le diabète de type 2 est associé à une prévalence accrue de maladies cardio-vasculaires (DeFronzo et coll., 1991; Stegmayr et coll., 1995; Shantaram, 1999). Parmi les anomalies métaboliques associées au diabète de type 2, l'hyperglycémie et la dyslipidémie représentent sans nul doute des déterminants majeurs des complications vasculaires associées à cette maladie (Weber, 1990).

Divers arguments plaident en faveur d'un rôle majeur de la LPL macrophagique dans la pathogenèse de l'athérosclérose (Mead et coll., 1999; Renier et coll., 1993; Semenkovich et coll., 1998). Nos études démontrant que de hautes concentrations de glucose stimulent in vitro la production de LPL macrophagique (Sartippour et coll., 1998) et que la LPL macrophagique est augmentée chez les sujets diabétiques de type 2 (Sartippour et coll., 2000) suggèrent un rôle de cette enzyme dans la pathogenèse de l'athérosclérose associée au diabète.

Outre l'hyperglycémie, diverses anomalies métaboliques présentes dans le diabète de type 2, telles la dyslipidémie, pourraient être responsables de l'induction de la LPL macrophagique chez le patient diabétique. L'observation que l'incubation de cellules macrophagiques humaines en présence de VLDL hypertriglycéridémiques augmentent la production de LPL (Ishibashi et coll., 1989) appuie cette hypothèse. Les anomalies quantitatives et qualitatives lipidiques majeures associées au diabète de type 2 sont l'hypertriglycéridémie, la diminution des taux plasmatiques des HDL (Kreisberg, 1998), la présence de LDL petites et denses et l'enrichissement des lipoprotéines en triglycérides

(Erkelens, 1998). Il est bien connu que la taille et la composition des particules de LDL sont des facteurs déterminant leur athérogénicité (Griffin et coll., 1999). Dans le diabète, la taille des particules de LDL est diminuée et la composition de ces particules est altérée, et ce tout particulièrement, chez les sujets présentant un mauvais contrôle glycémique (Erkelens, 1998). La composition des LDL en acides gras est un déterminant majeur de l'oxydabilité et donc de l'athérogénicité de ces particules et leur taille est inversement corrélée à la concentration plasmatique en AG (Vazquez et coll., 1998; Rudel et coll., 1995). L'augmentation des niveaux d'AG libres dans la circulation des sujets diabétiques de type 2, est la conséquence d'une activité lipolytique accrue au niveau du tissu adipeux et est impliquée dans la pathogenèse du diabète de type 2. L'augmentation des niveaux plasmatiques d'AG a été impliquée dans le développement de l'insulinorésistance (Weisenthal et coll., 1999) et semble exercer à long terme un effet cytotoxique pour la cellule bêta.

L'altération quantitative et qualitative des lipoprotéines associée au diabète facilite leur accumulation dans l'espace sous-endothélial (Erkelens, 1998). Les lipoprotéines captées dans l'intima vasculaire y sont hydrolysées sous l'action de la LPL, générant dès lors la relâche d'AG. Ces AG libérés dans la paroi vasculaire seront utilisés comme substrats énergétiques pour les cellules vasculaires et/ou pourront agir en tant que molécules de signalisation dans la régulation de la fonction cellulaire. Nos résultats qui démontrent que les AG exercent *in vitro* un rôle modulateur direct sur l'expression et la production de la LPL macrophagique suggèrent que la libération d'AG dans la paroi vasculaire, puisse en régulant les niveaux de sécrétion de la LPL dans la lésion

athéromateuse, être impliquée dans la pathogenèse de l'athérosclérose chez les sujets diabétiques.

Nos données indiquent clairement que l'acide linoléique, l'acide palmitique et l'acide stéarique stimulent *in vitro* la production et l'activité de la LPL macrophagique. Ces données sont particulièrement intéressantes au vu de nos résultats antérieurs (Sartippour et coll, 2000) et de ceux de Prescott et coll. (1999) démontrant respectivement une surproduction de LPL macrophagique et un enrichissement marqué des lipoprotéines en acide linoléique et en acides gras saturés dans le diabète humain. La surproduction de LPL macrophagique observée chez les sujets diabétiques de type 2 étant clairement dépendante de la présence de facteurs périphériques (Sartippour et coll, 2000), ces résultats suggèrent que l'altération de composition des lipoprotéines en acides gras puisse contribuer à la production excessive de LPL macrophagique associée au diabète. Cet effet pro-athérogénique pourrait être potentialisé par l'effet de l'hyperinsulinémie qui en induisant l'expression des récepteurs des LDL à la surface des cellules vasculaires pourrait accroître la captation et la rétention des LDL dans la lésion athéromateuse (Arrants et coll., 1994).

Nos résultats indiquent aussi que les acides arachidonique et eicosapentaénoïque, inhibent de manière importante l'expression de l'ARNm de la LPL macrophagique et stimulent et inhibent respectivement la production de LPL macrophagique. Les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la LPL par ces acides gras demeurent inconnues. Cependant, divers mécanismes d'action peuvent être envisagés. L'acide arachidonique est un précurseur de la synthèse des PG incluant la PGE₂ un facteur inhibant l'expression génique de la LPL macrophagique (De Sanctis et coll., 1994). La

diminution des niveaux d'ARNm de la LPL macrophagique induit par l'acide arachidonique pourrait donc s'expliquer par l'augmentation de la synthèse intracellulaire de cette PG. La PGE₂ inhibant aussi la sécrétion de la LPL macrophagique (De Sanctis et coll., 1994), son rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de la LPL par l'acide arachidonique est peu probable. Bien que d'autres métabolites dérivés de l'acide arachidonique et produits par l'action de la lipoxigénase et/ou de la cyclooxygénase puissent théoriquement être responsables de l'augmentation de sécrétion de la LPL macrophagique par l'acide arachidonique, leur nature reste à être identifiée.

L'acide eicosapentaénoïque, un AG polyinsaturé n-3, diminue aussi l'expression de l'ARNm de la LPL. Cet AG diminue en outre la sécrétion de cette enzyme lorsqu'il est incubé 48h en présence des cellules macrophagiques (observations personnelles). Depuis quelques années, plusieurs études ont tenté d'élucider les mécanismes responsables de l'effet cardio-protecteur des acides gras n-3. L'étude des effets de ces AG sur la régulation de la LPL chez le sujet diabétique de type 2 démontre un rôle inducteur des acides gras n-3 sur l'expression de la LPL adipocytaire, responsable d'une diminution des triglycérides plasmatiques et d'une amélioration de la sensibilité à l'action de l'insuline. Nos données démontrant un effet inhibiteur de l'acide eicosapentaénoïque sur l'expression de la LPL macrophagique supportent les résultats de Renier et coll., (1993) rapportant un effet inhibiteur d'une diète enrichie en AG n-3 sur les niveaux d'ARNm et la sécrétion de LPL macrophagique. Puisque les AG n-3 stimulent l'activité de la LPL plasmatique, le rôle cardio-protecteur des acides gras n-3 pourrait au moins partiellement impliquer une augmentation périphérique de la LPL et une inhibition de la relâche de LPL macrophagique dans la paroi vasculaire. L'effet inhibiteur de l'acide

eicosapentaénoïque sur l'expression de la LPL macrophagique pourrait être attribuable à son effet suppresseur sur l'activité de la PKC macrophagique (Tappia et coll., 1995).

La diète méditerranéenne, dont le principal constituant est l'acide oléique, exerce des propriétés cardio-protectrices. Ses effets bénéfiques ont été attribués à la capacité de l'acide oléique d'inhiber la réponse inflammatoire, l'expression des molécules d'adhésion, l'oxydation des lipoprotéines et finalement la synthèse du cholestérol. L'effet de l'acide oléique sur l'expression in vitro de la LPL macrophagique fut étudié par Sofer et coll., (1992) utilisant la lignée cellulaire tumorale J774. Ces auteurs rapportent que des concentrations de 0.2mM d'acide oléique n'affectent pas de manière significative l'activité de la LPL alors que des concentrations élevées de cet AG (0.6mM) suppriment l'activité de la LPL et l'accumulation de triglycérides dans le macrophage. Nos résultats démontrant que des concentrations physiologiques d'acide oléique n'influencent pas la production et l'activité de la LPL macrophagique sont similaires aux résultats produits par ces auteurs et lui confèrent plutôt un rôle neutre en ce qui concerne la régulation de cette enzyme. L'effet inhibiteur de concentrations élevées d'acide oléique sur l'activité de la LPL pourrait s'expliquer, en partie, par l'effet cytotoxique de l'acide gras sur le macrophage. En effet, tel qu'observé par un test d'exclusion au bleu trypan, l'incubation des J774 en présence de 0.8mM d'acides gras pour une période de 6h diminuait la viabilité d'environ 30%. Cette inhibition de l'enzyme par l'acide oléique pourrait aussi s'expliquer par un mécanisme de rétro-contrôle empêchant alors les produits hydrolytiques des triglycérides d'être produits plus rapidement qu'ils ne sont utilisés par la cellule.

La régulation de la LPL que nous avons documentée suite au traitement des macrophages par certains acides gras, implique clairement des mécanismes transcriptionnels. Il est bien documenté que les AG, par leur capacité à moduler l'expression génique, régulent le métabolisme, la prolifération et la différenciation cellulaire. Plusieurs gènes reliés au métabolisme des lipides sont modulés par les AG (Grimaldi et coll., 1999; Hertz et coll., 1998; Keller et coll., 1993; Heuvel et coll., 1999; Auwerx et coll., 1996). Les éléments clés impliqués dans la voie de signalisation des lipides incluent le transport des AG exogènes dans la cellule, leur conversion en seconds messagers, la migration des messagers du réticulum endoplasmique vers le noyau et la régulation de la transcription génique par liaison à un activateur ou à un inhibiteur nucléaire. L'effet modulateur des AG ou de leurs métabolites sur la transcription des gènes peut s'exercer soit directement, soit indirectement en stimulant ou inhibant la synthèse de certains facteurs de transcription qui se lieront au promoteur du gène ciblé.

Nos résultats démontrant une modulation des niveaux d'ARNm de la LPL macrophagique par les AG indiquent que cette enzyme est aussi un gène ciblé par les AG. Ces données corroborent celles générées par Yin et coll. démontrant une régulation de l'expression génique de la LPL adipocytaire par les AG (Yin et coll., 1997). Les mécanismes moléculaires responsables de la régulation de la transcription du gène de la LPL par les AG sont mal connus. Récemment, le rôle des PPARs dans l'effet transcriptionnel des AG a été documenté. Nos données démontrant l'implication de ces facteurs de transcription dans la régulation de la LPL macrophagique par les AG confirment cette donnée. Nos résultats suggèrent que l'isoforme PPAR α puisse contribuer à l'effet stimulant des AG saturés, tels les acides palmitique et stéarique, sur

l'expression génique de la LPL macrophagique. Cette relation possible entre l'activation de PPAR α et la stimulation de l'expression génique de la LPL macrophagique est appuyée par les résultats de Sartippour et coll. (2000), démontrant que le glucose, un facteur stimulant l'expression génique de la LPL macrophagique, augmente aussi les niveaux d'ARNm de PPAR α dans cette cellule. À l'opposé, le rôle des PPARs dans la régulation génique de la LPL macrophagique par les AG polyinsaturés semble beaucoup plus questionnable. En effet, bien que nous ayons pu démontrer que ces AG induisent la liaison de protéines nucléaires à l'élément de réponse PPRE, nous n'avons pu identifier ces protéines comme appartenant à la famille des PPARs.

Nos observations démontrant que les acides arachidonique et eicosapentaénoïque, qui lient de manière préférentielle l'isoforme PPAR γ , suppriment l'expression génique de la LPL suggèrent une action inhibitrice de cet isoforme dans la régulation transcriptionnelle de la LPL macrophagique. L'effet de l'activation de PPAR γ sur la régulation de la LPL macrophagique étant inconnu, des études sont actuellement en cours dans notre laboratoire pour déterminer in vitro le rôle de ligands de cet isoforme sur les niveaux d'ARNm de la LPL macrophagique.

Le rôle des PPARs dans le développement de l'athérosclérose a été particulièrement bien investigué ces dernières années. Ainsi, il a été démontré que les ligands de PPAR γ inhibent de manière générale l'activation macrophagique, réduisant spécifiquement l'expression de diverses cytokines et molécules d'adhésion et inhibant l'expression d'iNOS macrophagique (Ricote et coll., 1998). Il a aussi été démontré que l'activation de PPAR γ inhibe l'activité de la métalloprotéinase-9, une enzyme impliquée

dans la dégradation de la matrice cellulaire de la plaque (Ricote et coll., 1998; Marx et coll., 1998). Ces divers résultats, ajoutés à ceux démontrant divers effets anti-inflammatoires de PPAR γ , suggèrent un rôle potentiellement protecteur de ce facteur de transcription dans le développement de l'athérosclérose. Cette hypothèse est appuyée par des résultats d'études préliminaires montrant que le traitement des sujets diabétiques de type 2 par les thiazolidinediones, des ligands de PPAR γ , prévient le développement des lésions athéromateuses chez ces sujets (Komers et coll., 1998; Rocchi et coll., 1999).

Il existe toutefois d'autres évidences suggérant un rôle potentiellement proathérogénique de PPAR γ . Ainsi, l'étude de Ricote et coll. (1998), portant sur l'expression macrophagique de PPAR γ dans la lésion athéromateuse, a permis de démontrer que ce facteur de transcription est exprimé par les cellules spumeuses présentes dans ces lésions. Il a aussi été rapporté que l'activation de PPAR γ induit l'expression du récepteur "scavenger" CD36, un récepteur favorisant la captation de LDL oxydées par les macrophages (Nagy et coll. 1998; Tontonoz et coll. 1998) et favorise la différenciation des cellules monocytaires en macrophages (Tontonoz et coll., 1998). Une augmentation d'expression de PPAR γ par les macrophages a finalement été observée suite à l'incubation de ces cellules en présence de divers facteurs pro-athérogéniques, tels les LDL oxydées, le M-CSF et le GM-CSF (Ricote et coll., 1998).

Le rôle de PPAR α a pour sa part été présenté comme étant essentiellement antiathérogénique. Ainsi, il a été documenté que les agonistes de PPAR α favorisent la captation et l'oxydation des AG par les hépatocytes et les myocytes, via une stimulation de la LPL plasmatique et une inhibition de l'apo C-III. Devchand et coll. (1996) ont aussi suggéré que l'activation de PPAR α par les eicosanoïdes puisse stimuler le catabolisme de

ces facteurs par les voies de la bêta et de l'oméga oxydation. Considérant le rôle pro-inflammatoire de certains de ces médiateurs lipidiques, ce processus pourrait réduire la durée de la réponse inflammatoire. PPAR α est exprimé par les cellules de la lésion athéromateuse et pourrait exercer son effet anti-athérogénique en inhibant plusieurs facteurs tels l'iNOS, l'IL-1, l'IL-6 et la cyclooxygénase (Staels et coll., 1998). Ces effets seraient vraisemblablement médiés par les voies de signalisation impliquant les facteurs de transcription NF-kB et AP-1. Il existe cependant des données en faveur d'un rôle pro-athérogénique de PPAR α . Ainsi l'activation de PPAR α au niveau macrophagique s'accompagne d'effets pro-apoptotique (Chinetti et coll, 1998) et pro-inflammatoire (Colville-Nash et coll. 1998). Ces agents stimulent aussi, chez la souris, la production de TNF- α induite par la LPS (Hill et Coll, 1999). Finalement, Sartippour et coll. (2000) ont proposé que la surproduction de LPL macrophagique par le glucose puisse impliquer l'activation de PPAR α . Nos résultats impliquant PPAR α dans la surexpression de la LPL macrophagique par les AG saturés appuient à leur tour un rôle pro-athérogénique de ce facteur de transcription.

Les PPARs constituent des molécules cibles pour le développement de nouveaux traitements du diabète de type 2. En effet, les agonistes de PPAR α et γ sont administrés aux patients diabétiques dans le but de corriger la dyslipidémie et d'améliorer l'homéostasie glucidique. Nos résultats et ceux générés par Sartippour et coll. (2000) démontrent l'importance de déterminer le rôle biologique des PPARs dans la pathogenèse de l'athérosclérose. Ceci est particulièrement important, étant donné la grande fréquence de complications cardio-vasculaires chez les diabétiques de type 2. En dépit de la récente observation montrant le rôle inhibiteur de certains isoformes de PPARs dans l'activation

macrophagique (Ricote et coll., 1998), les effets anti-inflammatoires de ces facteurs n'ont pas encore été établis *in vivo*. D'autres études expérimentales et prospectives cliniques sont donc impérieuses afin d'évaluer plus amplement les effets à long terme des agonistes de PPARs sur l'athérogenèse associée au diabète humain.

Outre les PPARs, d'autres facteurs nucléaires semblent pouvoir contribuer à l'effet transcriptionnel des AG sur la LPL macrophagique. Cette possibilité est suggérée par nos données montrant l'inefficacité des anticorps anti-PPARs à inhiber la liaison des protéines nucléaires à la séquence PPRE induite par l'acide linoléique et par l'acide eicosapentaénoïque. Parmi les autres facteurs de transcription capables de se lier à la séquence PPRE on note le "chicken ovalbumin upstream promoter" (COUP) (Hegardt, 1998), le facteur nucléaire de l'hépatocyte (HNF-4) (Nicholas-Frances et coll., 2000) et le récepteur aux acides gras (FAAR) (Grimaldi et coll., 1999). Le rôle de ces facteurs dans la régulation de la LPL macrophagique est actuellement inconnu.

Parmi les autres mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans l'effet régulateur des AG sur l'expression génique de la LPL macrophagique se retrouvent la PKC et c-fos, et le stress oxydatif.

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 (Liu et coll., 1994). Dans la voie classique d'activation, la liaison d'un messenger extracellulaire à son récepteur membranaire entraîne l'activation de la phospholipase C

ou de la phospholipase D induisant l'hydrolyse du phosphatidylinositol et la formation d'inositol triphosphate (IP₃) et de diacylglycérol (DAG) (Bell et Burns, 1991).

Il est bien connu que l'expression de l'ARNm de la LPL est contrôlée par une voie de signalisation dépendante de la PKC et de c-fos (Auwerx et coll., 1989; Ranganathan et coll., 1999; Barcellini-Courget et coll., 1993). En effet, Ranganathan a clairement démontré que la PKC avait un rôle constitutif dans l'expression génique de la LPL adipocytaire et que l'inhibition de la PKC induisait une diminution de la synthèse de la LPL. De plus, Barcellini-Couget et coll. (1993), ont démontré que l'hormone de croissance augmentait l'expression adipocytaire de la LPL par un mécanisme dépendant de l'activation de la PKC et de celle du protooncogène c-fos. Les niveaux d'ARNm de la LPL macrophagique semblent eux aussi être contrôlés par des voies de signalisation impliquant l'activation de la phospholipase C et l'activation de la PKC. Ainsi, il a été démontré que l'activation de la PKC par un agent tel le phobol 12-myristate 13-acétate (PMA), induit une augmentation des niveaux d'ARNm de la LPL macrophagique (Auwerx et coll., 1989). Un autre argument en faveur du rôle régulateur de la PKC sur l'expression de la LPL macrophagique est l'observation de Inaba et coll. (1995) démontrant que le PDGF-BB entraîne une augmentation PKC-dépendante de la synthèse de l'ARNm de la LPL macrophagique. Finalement, il a été récemment démontré que le glucose, par son effet stimulant sur l'activation de la PKC et de c-fos, augmentait la transcription du gène de la LPL macrophagique (Sartippour et coll., 1998).

Les AG constituent des facteurs métaboliques pouvant moduler l'activation séquentielle de la phospholipase C (Padma et coll., 1999) et de la PKC (Lu et coll., 1997). Ainsi, au niveau macrophagique, il a été démontré que l'acide eicosapentaénoïque

inhibait l'activité de la PKC alors que l'acide linoléique augmentait cette dernière (Tappia et coll., 1995, Futurama, 1995). Au vu du rôle majeur de l'activation de la PKC dans l'induction de l'expression génique de la LPL macrophagique et de nos résultats démontrant un effet inhibiteur de l'acide eicosapentaénoïque et stimulant de l'acide linoléique, il est tentant de postuler que l'effet des AG sur la régulation de la LPL macrophagique puisse être médié par une voie de signalisation impliquant la PKC.

L'hypothèse d'un rôle de PKC/c-fos dans la régulation du gène de la LPL macrophagique est appuyé par nos résultats démontrant que tous les AG testés dans notre étude, à l'exception de l'AA, modulent l'expression de l'ARNm codant pour c-fos (observations personnelles). Ces résultats démontrant des variations parallèles des niveaux d'expression génique de la LPL et de c-fos par les macrophages traités par les AG suggèrent un rôle de ce protooncogène, dans l'effet transcriptionnel des AG sur la LPL macrophagique.

Un autre médiateur possible de l'effet modulateur des AG sur la régulation de la LPL macrophagique est le stress oxydatif. En effet, une augmentation de production de radicaux libres a été documentée en présence d'une augmentation des niveaux d'AG dans la circulation sanguine ou dans la paroi vasculaire. (Hennig et coll., 1996; Visioli et coll., 1998; Rosenfeld, 1998; Paolisso et coll., 1999). Ces mêmes auteurs ont aussi démontré qu'une diète riche en acides gras, et plus particulièrement riche en acide linoléique, jouait un rôle majeur dans la production de radicaux libres circulants. Par son effet stimulant sur l'activation de facteurs de transcription tels NF- κ B et AP-1, le stress oxydatif induit l'expression de divers gènes associés à l'activation cellulaire et à la réponse inflammatoire tels la LPL macrophagique (Renier et coll., 1996) Ces données suggèrent

que l'induction des niveaux d'ARNm de la LPL macrophagique par l'acide linoléique puisse faire intervenir un mécanisme dépendant du stress oxydatif.

Outre les mécanismes de régulation transcriptionnelle, la régulation de la LPL fait intervenir des mécanismes post-transcriptionnels. Ainsi, la stabilité de l'ARNm, la traduction, la glycosylation, le transport intracellulaire de la protéine et la sécrétion de la LPL peuvent être modifiés par divers stimuli. De nombreuses études ont démontré que les AG régulaient la sécrétion de la LPL adipocytaire par des mécanismes post-transcriptionnels. Ainsi, Doolittle et coll. (1990) ont observé que l'état de jeûne augmentait chez le rat les niveaux d'ARNm et le taux de synthèse de la LPL et que cet effet était accompagné d'une diminution de l'activité de la LPL sans altération de la production de la protéine. Les catécholamines, des agents connus pour leur effet lipolytique adipocytaire et stimulant sur la relâche d'AG, diminuent la synthèse et la sécrétion de la LPL sans affecter les niveaux d'ARNm de l'enzyme (Ball et coll., 1996; Raynolds et coll., 1990; Ong et coll., 1992). Amri et coll. (1996) ont finalement démontré que le bromopalmitate et le linolenate induisaient la transcription du gène de la LPL adipocytaire mais supprimaient toutefois la sécrétion et l'activité de celle-ci. Si ces données suggèrent que la régulation de la LPL adipocytaire par les AG puisse impliquer des mécanismes post-transcriptionnels, d'autres études appuient cependant un rôle transcriptionnel majeur des AG dans la régulation de la LPL adipocytaire. Ainsi, Kirkland (1994) et Montalto (1993) ont rapporté que la régulation de la LPL adipocytaire par les AG monoinsaturés et polyinsaturés n-3 et n-6 s'exerce au niveau transcriptionnel,

ces AG diminuant conjointement les niveaux d'ARNm, la synthèse, la sécrétion et l'activité de la LPL.

L'importance des mécanismes transcriptionnel et posttranscriptionnel dans la régulation de la LPL par les AG, est appuyée par nos données démontrant que selon le type d'AG étudié, la régulation de la LPL macrophagique peut être transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. En effet, alors que nos résultats indiquent clairement que les acides linoléique, palmitique et stéarique stimulent l'expression de l'ARN messager de la LPL, l'activité et la masse immunoréactive de l'enzyme, nous avons observé que l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaénoïque diminuent de manière marquée l'ARNm de la LPL macrophagique mais induisent de manière significative, ou n'affectent pas, respectivement, l'activité et la masse de la LPL.

Alors que divers mécanismes sont responsables de la régulation transcriptionnelle de la LPL, il existe peu de données sur les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la stabilité de l'ARNm, de la traduction, de la glycosylation, du transport intracellulaire et de la sécrétion de la LPL macrophagique.

Il a été démontré que certains agents régulent la traduction de la LPL en activant des protéines de liaison *trans* se liant à la région 3' non traduite de l'ARNm (Ranganathan et coll., 1997; White et coll., 1998; Jonasson et coll., 1990). La PKC en phosphorylant ces protéines pourrait intervenir dans ce processus (Ranganathan et coll., 1998). Il est possible que certains métabolites dérivés des AG puissent augmenter la stabilité de l'ARNm de la LPL soit, en activant la PKC soit, en se liant à la région 3' non traduite (Kern et coll., 1996). Cette éventualité est, en particulier, envisageable dans le cas de l'acide arachidonique, qui malgré son effet inhibiteur marqué sur l'expression de

l'ARNm de la LPL, possède un effet stimulant marqué sur la synthèse de la LPL macrophagique.

Une autre étape dans la sécrétion de la LPL étant celle de la glycosylation, il a été finalement proposé que les AG, par leur capacité à induire le clivage de résidus de glucose au niveau de la molécule de LPL dans le réticulum endoplasmique rugueux (Amri et coll., 1996), puissent agir en tant que modulateurs de l'activité et de la sécrétion de l'enzyme.

Les effets pro- ou anti-athérogéniques des divers types d'AG sont bien documentés. De façon générale, la littérature scientifique s'accorde pour reconnaître les AG saturés comme pro-athérogéniques et les AG polyinsaturés comme anti-athérogéniques. Nos résultats démontrant que les AG saturés testés dans notre étude soit les acides palmitique et stéarique augmentent la production et l'activité de la LPL macrophagique suggèrent un nouveau mécanisme par lequel ces AG pourraient exercer leur rôle pro-athérogénique (Mensink et Katan, 1992; Krombout, 1999; Nicosoli et coll., 1998; Watts et coll., 1996). En dépit de l'effet cardio-protecteur clairement attribué aux AG polyinsaturés, nous avons aussi documenté un effet stimulant des acides arachidonique et linoléique sur la sécrétion de la LPL par les macrophages. Malgré le nombre limité d'études portant sur l'effet de l'acide arachidonique sur le développement des maladies cardio-vasculaire, Zheng et coll. (1999), ont récemment démontré un accroissement significatif des concentrations plasmatiques d'acide arachidonique chez les sujets hypertendus. Une implication des métabolites de l'acide arachidonique tels PGE_2 , 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) et 15(S)-HETE a aussi été mise en évidence dans la stimulation de la réponse inflammatoire, l'activation monocytaire et tout

particulièrement dans l'interaction monocytes-endothélium (Patricia et coll., 1999; Baud et coll., 1985; Goetzl et coll., 1979). En dépit du peu d'informations actuellement disponibles sur les effets de l'acide arachidonique sur le développement et les progression des maladies cardio-vasculaires, ces données suggèrent que l'acide arachidonique et/ou ses dérivés, par sa (leur) capacité à stimuler la réponse inflammatoire, l'activation et l'adhésion monocyttaire et la production de LPL macrophagique, puisse(nt) exercer un rôle pro-athérogénique.

En ce qui concerne l'acide linoléique, de multiples recherches lui confèrent un rôle potentiel dans l'athérogenèse et les maladies cardio-vasculaires. En effet, Hodgson et coll., (1993) ont démontré qu'il existait une association positive entre la consommation d'acide linoléique, la concentration plaquettaire de cet AG et l'incidence de maladies cardio-vasculaires. Il a aussi été documenté que l'acide linoléique modulait l'expression de gènes impliqués dans la pathogenèse de l'athérosclérose et exprimés par les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules musculaires lisses. Par son effet stimulant sur la production de radicaux libres et la peroxydation lipidique, il a été en outre démontré que l'acide linoléique entraînait l'activation du facteur nucléaire NF- κ B par les cellules endothéliales (Toborek et coll., 1997; 1996; Hennig et coll., 1996), un facteur de transcription activé par le stress oxydatif et impliqué dans la régulation de la réponse inflammatoire et particulièrement dans l'expression de diverses cytokines et molécules d'adhésion (Gerritsen et coll., 1993; Marui et coll., 1993). Rao et coll. (1995) ont aussi démontré que l'acide linoléique stimulait la synthèse d'ADN codant pour les protooncogènes c-fos et c-jun et accroissait l'expression de l'ARNm de c-myc, entraînant de par ces effets, la prolifération des cellules musculaires lisses. Finalement, Borsum

(1997) et Reid (1992) ont démontré que l'administration in vivo d'acide linoléique induisait l'activation monocytaire. Nos résultats démontrant que l'acide linoléique induit l'expression et l'activité de la LPL macrophagique identifient un nouvel effet pro-athérogénique de cet AG.

À l'inverse, nos données démontrant que l'incubation prolongée des macrophages en présence d'acide eicosapentaénoïque inhibe la production de LPL macrophagique supportent le concept d'un effet protecteur des AG n-3 dans le développement de l'athérosclérose (Watts et coll., 1995; Angerer et coll., 2000; Renier et coll., 1993; Massaro et coll., 1999).

Diverses études épidémiologiques, ont montré que l'incidence des maladies coronariennes dans les populations consommant une grande quantité d'huile de poisson, riche en acides gras n-3, est faible (Bang et coll., 1980). Une multitude d'évidences indirectes suggèrent aussi l'effet anti-athérosclérotique de diètes enrichies en acides gras n-3. Ainsi, il a été démontré qu'une diète riche en acide alpha-linolénique diminue le nombre d'événements coronariens et de morts subites (de Lorgeril et coll., 1994). Bien que les études cliniques n'apportent pas de preuve directe de l'effet bénéfique de l'huile de poisson sur l'athérogenèse, des travaux ont néanmoins démontré, que ces acides gras diminuaient la tension artérielle et exerçaient des effets hypotriglycémiant, vasodilatateur et anti-inflammatoire (Roche et coll., 1999; Horrocks et Yeo, 1999; Nakamura et coll., 1998; Kestin et coll., 1990). Un effet inhibiteur des acides n-3 sur divers paramètres incluant l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Davis et coll., 1987), la production d'agents chémoattractants (von Schacky et coll., 1990), l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (De Caterina et coll., 1994),

l'agrégation plaquettaire (Moncada et coll., 1985) et la synthèse du facteur VII de coagulation, a en outre été rapporté (Cigolini et coll., 1996). Enfin, une inhibition de la production de TNF-alpha par les acides gras n-3 a été rapportée par diverses études (Renier et coll., 1993; Endres et coll., 1989).

L'inhibition de la LPL macrophagique par les AG n-3 suggère un mécanisme d'action additionnel par lequel ces AG pourraient exercer leur action cardio-protectrice.

Tel que mentionnée précédemment, l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire est un événement précoce impliqué dans le développement de l'athérosclérose. Les AG, en modulant l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales amplifient ou inhibent ce phénomène. Alors que les AG n-3 et monoinsaturés diminuent l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine (Collie-Duguid et Wahle, 1996; De Caterina et coll., 1995b; Massaro et coll., 1999), les acides gras saturés et l'acide linoléique, en induisant la production de radicaux libres et l'activation ultérieure de NF-kB, stimulent l'expression de ces molécules d'adhésion (Toborek et Hennig, 1998; Mensink et Katan, 1992). De par ces propriétés structurales, la LPL exprimée dans la paroi vasculaire favorise aussi l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Mamputu et coll., 1997; Obunike et coll., 1997). La surproduction de LPL macrophagique observée en présence des acides arachidonique, linoléique, palmitique et stéarique pourrait favoriser l'attachement initial et l'adhésion irréversible des monocytes à l'endothélium.

Bien que la pertinence de nos résultats demeure à être établie *in vivo*, nos résultats suggèrent que la modulation de la LPL macrophagique par les AG puisse représenter un nouveau mécanisme par lequel ces facteurs métaboliques exercent leurs effets anti- ou pro-athérogéniques.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

IV. Conclusion et perspectives

I.V.1 Conclusion

En conclusion, cette étude démontre que les AG exercent un effet régulateur direct sur l'expression de la LPL macrophagique. Cet effet s'exercerait au niveau transcriptionnel en ce qui concerne les acides linoléique, palmitique et stéarique et au niveau post-transcriptionnel pour les acides arachidonique et eicosapentaénoïque. De plus, cette étude supporte un rôle des facteurs de transcription PPARs dans la régulation de la LPL par les AG.

I.V.2 Perspectives

Diverses évidences suggèrent un double rôle de la LPL, soit anti-athérogénique en périphérie et pro-athérogénique dans la paroi vasculaire. Les effets athérogéniques de la LPL ont été principalement attribués à sa capacité 1) d'hydrolyser les VLDL et les LDL et de favoriser leur infiltration dans la paroi artérielle 2) de favoriser l'accumulation de lipides à l'intérieur des macrophages, 3) d'activer la fonction macrophagique et dès lors de stimuler la production de facteurs proathérogéniques 4) de favoriser l'adhésion des monocytes à l'endothélium. Toutes interventions visant à abolir les effets proathérogéniques de la LPL dans la paroi vasculaire devront donc obligatoirement tenir compte du double effet de cette enzyme. Compte tenu du rôle anti-athérogénique de la LPL en périphérie, l'utilisation de stratégies pharmacologiques visant l'inhibition systémique de la LPL est à proscrire. Des stratégies nutritionnelles ou pharmacologiques visant l'inhibition spécifique de la production et de l'activité de la LPL macrophagique

dans la paroi artérielle pourraient vraisemblablement ralentir le développement de la plaque d'athérome.

Dans ce travail, nous démontrons que les acides arachidonique, linoléique, palmitique et stéarique induisent la production de cette enzyme alors que les acides eicosapentaénoïque et oléique inhibent ou n'exercent que peu d'effet sur ce paramètre. Ces résultats suggèrent que des stratégies nutritionnelles visant un apport accru en AG n-3 et monoinsaturés dans la diète, pourraient être envisagées afin de réduire la production de la LPL macrophagique dans la paroi vasculaire. Le bénéfice de cet effet vasculaire pourrait être majoré ou potentialisé par les autres effets antiathérogéniques des AG n-3, tels par exemple leurs propriétés inhibitrices sur l'expression des molécules d'adhésion (Collie-Duguid et Wahle, 1996; De Caterina et coll., 1995b) et leur effet stimulant sur l'activité de la LPL plasmatique (Zampelas et coll., 1994). Enfin, nos résultats suggérant un rôle des PPARs dans le contrôle de l'expression de la LPL macrophagique par les AG souligne l'importance de mener d'autres études expérimentales et cliniques afin de déterminer leur rôle exact de ces facteurs de transcription dans la pathogenèse de l'athérosclérose.

V. RÉFÉRENCES

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

Amri EZ, Teboul L, Vannier C, Grimaldi PA, Ailhaud G. Fatty acids regulate the expression of lipoprotein gene and activity in preadipose and adipose cells. *Biochem J*. 1996;314:541-546.

Angerer P, von Schacky C. n-3 polyunsaturated fatty acids and the cardiovascular system. *Curr Opin Lipidol*. 2000;11:57-63.

Anonymous. Fish oil. *Lancet*. 1988;1:1081-1083.

Aro A, Jauhiainen M, Partanen R, Salminen I, Mutanen M. Stearic acid, trans fatty acids and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein (a) and lipid transfer proteins of healthy subjects. *Am J Clin Nutr*. 1997;65:1419-1426.

Arrants J. Hyperinsulinemia and cardiovascular risk. *Heart Lung*. 1994;23:118-124.

Auerbach BJ, Cain W, Ansong M, Newton RS, Saxena U, Bisgaier CL. Lipoprotein lipase greatly enhances the retention of lipoprotein (a) to endothelial cell-matrix. *Atherosclerosis*. 1999;142 :89-96.

- Auerbach BJ, Bisgaier CL, Wolle 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.
- Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, Staels B. Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrate and fatty acids change the expression of the LPL and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR. *Atherosclerosis.* 1996;124 suppl: S29-37.
- 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;263:15416-154122.
- Babaev VR, Fazio S, Gleaves LA, Carter KJ, Semenkovich CF, Linton MF. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo. *J Clin Invest* 1999;103 :1697-1705.
- Babirak S, Ivenus PH, Fujimota WY, Brunzell JD. Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Artherosclerosis.* 1989;9:326-334.

- Babirak S, Brown BG, Brunzell JD, Familial combined hyperlipidemia and abnormal lipoprotein lipase. *Arteriosclerosis Thromb.* 1992;12:1176-1183.
- Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1993;87:3-16.
- Ball KL, Speake BK, Robinson DS. Effects of adrenaline on the turnover of lipoprotein lipase in rat adipose tissue. *Biochim Biophys Acta.* 1986;877:399-405.
- Bang HO, Dyerberg J, Sinclair HM. The composition of eskimo food in North Western Greenland. *Am J Clin Nutr.* 1980;33:2657-2661.
- Barcellini-Couget S, Pradines-Figueres A, Roux P, Dani C, Ailhaud G. The regulation by growth hormone of lipoprotein lipase gene expression is mediated by c-fos protooncogene. *Endocrinology.* 1993;1332:53-60.
- Baud L, Sraer J, Delarue F, Bens M, Balavoine F, Schlondorff D, Ardaillou R, Sraer JD. Lipoxygenase products mediate the attachment of rat macrophages to glomeruli in vitro. *Kidney Int.* 1985;27:855-863.
- Behr RS, Kraemer FB. Regulation of the secretion of lipoprotein lipase by mouse macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1986;889:346-354.

- 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.
- Bengtsson G, Olivecrona T. Lipoprotein lipase: some effects of activator proteins. *Eur J Biochem*. 1980;106:549-555.
- Bengtsson G, Olivecrona T. Lipoprotein lipase. Mechanism of product inhibition. *Eur J Biochem*. 1980;106 :557-562.
- 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.
- 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.
- Bladbjerg EM, Tholstrup T, Marckmann P, Sandstrom B, Jespersen J. Dietary changes in fasting levels of factor VII coagulant activity (FVIII:C) are accompanied by changes in factor VII protein and other vitamin K-dependent proteins. *Thromb Haemost*. 1995;73:239-242.

- Blann AD, Jackson P, Bath PMW, Watts GF. Von Willebrand factor, a possible indicator of endothelial cell damage, decreases during long-term compliance with a lipid lowering diet. *J Intern Med.* 1995;237:557-561.
- Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells : evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelium intracellular adhesion molecule 1(ICAM-1), alpha Vbeta-integrin, and GP1balph. *J Exp Med.* 1998;187 :329-339.
- Boona VH, Bjerve KS, Straume B. Effect of eicosanoic and docosahexanoic acids on blood pressure in hypertension. *N Engl J Med* 1990;322:796-801.
- Bonanome A, Grundy SM. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N Engl J Med.* 1988;318:1244-1248.
- Borsum K, Aksnes J, Muller F, Hagve TA, Kierulf P, Rollag H. Modification of mononuclear cell function after incubation with albumin-bound unsaturated fatty acids or soybean oil emulsion. *APMIS.* 1997;105:671-679.
- Brault D, Noe L, Etienne J, Hamelin J, Raissonier A, Souli A, Chuat JC, Dugail I,, Quignard-Boulangue 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.
- Brown G, Albers JJ, Fisher LD, Schaeffer SM, Lin JT, Kaplan C, Zhao XQ, Bisson BD, Fitzpatrick VF, Dodge NT. 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.
- Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vas Res* 1996;33:181-194.
- Calder PC, Newholmes EA. Polyunsaturated fatty acids suppress human peripheral blood lymphocyte proliferation and interleukine-2 production. *Clinical Science*. 1992;82:695-700.
- Camps L, Reina M, Llobera M, Vilaro S, Olivecrona T. Lipoprotein lipase: cell origin and functional distribution. *Am J Physiol*. 1990;258:C673-C681.
- Castelli WP, Garrison RJ, Peter WF. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham study. *JAMA* 1986;256:2835-2838.

Cater NB, Heller HJ, Denke MA. Comparison of the effects of medium chain triacylglycerols, palm oil, and high oleic acid sunflower oil on plasma triacylglycerol fatty acids and lipid and lipoprotein concentrations in humans. *Am J Clin Nutr.* 1997;65:41-45.

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

Cavender D, Saegusa Y, Ziff M. Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1987;139:1855-1860.

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

Chan JK, Bruce VM, McDonald BE. Dietary linolenic acid is as effective as oleic acid and linoleic acid in lowering blood cholesterol in normolipidemic men. *A J Clin Nutr.* 1991;53:1230-1234.

Chen YQ, Su M, Walia RR, Hao Q, Civington JW, Vaughan DE. Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1998;273 :8225-8231.

Chilsom GM 3rd, Hazen SL, Fox PL, Cathcart MK. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms. *J Biol Chem.* 1999;274 :25959-25962.

Cigolini M, Targher G, Seidell JC, Schiavon R, Tonoli M, Muggeo M, De Sandre G. Plasma factor VII and its relation to adipose tissue fatty acids and other atherogenic risk factors in healthy men. *Eur J Clin Invest.* 1996;26:247-253.

Cole SA, Hixson JE. Baboon lipoprotein lipase : cDNA sequence and variable tissue-specific expression of two transcripts. *Gene.* 1995;161 :265-269.

Collie-Duguid ESR, Wahle KWJ. Inhibitory effect of fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of endothelial cell adhesion molecules. *Biochem Biophys Res Com.* 1996;220:969-974.

Colville-Nash PR, Qureshi SS, Willis D, Willoughby DA. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. *J Immunol.* 1998;161:978-984.

- Corey JE, Zilverman DB. Effects of cholesterol feeding on arterial lipolytic activity in the rabbit. *Atherosclerosis*. 1977;27:201-212.
- Dart AM, Chin-Dusting JP. Lipids and the endothelium. *Cardiovasc Res*. 1999;43 :308-322.
- Davis HR, Bridenstine RT, Vesselinovitch D, Wissler RW. Fish oil inhibits development of atherosclerosis in rhesus monkeys. *Arteriosclerosis*. 1987;7:441-449.
- De Caterina R, Tanaka H, Kakagawa T, Hauptman PJ, Libby P. The direct effect of injectable cyclosporine and its vehicle, cremophor, on endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Transplantation* 1995b;60:270-275.
- De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA Jr, Libby P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:1829-1836.
- Deeb SS, Peng R. Structure of the human lipoprotein lipase gene. *Biochem*. 1989;28:4131-4135.

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

de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Guidollet J, Touboul P, Delaye J. Mediterranean alpha-linolenic acid rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet*. 1994;343:1454-1459.

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

Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vasquez M, Gonzalez FJ, Whali W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996;384 :39-43.

Dietschy JM, Woollett LA, Spady DK. The interaction of dietary cholesterol and specific fatty acids in the regulation of LDL receptor activity and plasma LDL-cholesterol concentrations. In :Nutrition in cardiovascular-Cerebrovascular Diseases. *Annal NY Acad Sci*. 1993;676 :11-26.

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 posttranscriptional regulation. *J Biol Chem*. 1990;265:4570-4577.
- Eckel RH. Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J med*. 1989;320:1060-1068.
- Edwards K, Chan RYS, Sawyer WH. Interaction between fatty acids and lipoprotein lipase: specific binding and complex formation. *Biochemistry*. 1994;33:13304-13311.
- Eisenberg S, Sehayek E, Olivecrona T, Vlodaysky I. Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J Clin Invest*. 1992;90:2013-2021.
- Endres S, Meydani SN, Ghorbani R, Schindler R, Dinarello CA. Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukine-2 production and mononuclear cell proliferation. *J Leuk Biol*. 1993;54:599-603.
- Enerback S, Gimble JM. Lipoprotein lipase expression: physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochim Biophys Acta*. 1993;169:107-125.
- Erkelens DW. Diabetic dyslipidaemia. *Eur Heart J*. 1998;19Suppl H:H27-H40.

Étienne J. La lipoprotéine lipase. *Ann Biol clin.* 1984;42:179-197.

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

Fabricant C, Fabricant J, Minick CR, Litrenta M. Herpes virus induced atherosclerosis induced 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.

Ferns GA, Forster L, Stewart-Lee A, Nourooz-Zadeh J, Anggard EE. Probucol inhibits mononuclear cell adhesion to vascular endothelium in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis.* 1993;199 :171-181.

Fisher S, Weber PC, Dyerberg J. The prostacyclin/thromboxane balance is favourable shifted in Greenland Eskimos. *Prostaglandins* 1986;32:235-240.

Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptor alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:4312-4317.

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

Fox PL, Dicorleto PE. Fish oil inhibits endothelial cell production of PDGF like protein. *Science.* 1988;241:453-456.

Freese R, Mutanen M. Alpha-linolenic acid and marine n-3 fatty acids only slightly differ in their effects on hemostatic factors in healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 1997;66:591-598.

Fremont L, Duranthon V, Gozzelino MT, Mahe S. Actvation of trout adipose tissue lipoprotein lipase by trout apoproteins. *Biochimie.* 1987;69 :773-779.

Fujikama M, Yamashita N, Yamazaki K, Sugiyama E, Suzuki H, Hamazaki T. Eicosapentaenoic acid inhibits antigen-presenting cell function of murine splnocytes. *Immunol.* 1992;75:330-335.

Futamura Y. Effect of amiodarone on release of cytokines from mouse alveolar macrophages pretreated with eicosapentaenoic acid. *Jpn J Pharmacol.* 1995;69:335-341.

Gerritsen ME, Bloor CM. Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J.* 1993;7:523-532.

- Girndt M, Lengler S, Kaul H, Sester U, Sester M, Kohler H. Prospective crossover trial of the influence of vitamin E-coated dialyzer membranes on T-cell activation and cytokine induction. *Am J Kidney Dis.* 2000 ; 35 :95-104.
- Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1987;316:1371-1375.
- Goetzl EJ, Sun FF. Generation of unique mono-hydroxy-eicosatetraenoic acids from arachidonic acid by human neutrophils. *J Exp Med.* 1979;150:406-411.
- Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res.* 1996;37:693-707.
- 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. *leucocyte Biol.* 1990;47:79-86.
- Grimaldi PA, Teboul L, Gaillard D, Armengod AV, Amri EZ. Long chain fatty acids as modulators of gene transcription in preadipose cells. *Mol Cell Biochem.* 1999;192:63-68.

- Grundy SM. Cholesterol and coronary heart disease. *JAMA*. 1986;256:2849-2858.
- Gurfinkel E, Bozovich G, Mautner B, Anderson JL, Muhlestein JB, Carlquist J, Allen A, Trehan S, Nielson C, Hall S, Brady J, Egger M, Horne B, Lim T. Chlamydia pneumoniae in coronary artery disease. *Circulation*. 2000;101: E118-119.
- Habenicht AJ, Salbach P, Janssen-Timmen U, Blattner C, Schettler G. Platelet-derived growth factor-a factor with an expanding role in health and disease. *Klin Wochenschr*. 1990;68:53-59.
- Hamazaki T, Fisher S, Urakaza M, Sawazaki S, Yano S, Kuwamori T. Urinary excretion of PGI₂/3-M and recent n-6/3 fatty acid intake. *Prostaglandins*. 1989;37:417-424.
- Hansson GK. Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1998;9:73-75.
- Harris WS. n-3 fatty acids and serum lipoproteins:human studies. *Am J Clin Nutr*. 1997;65:1645S-1654S.
- Hayden MR, Ma Y, Brunzell J, Henderson HE. Genetic variant affecting human lipoprotein and hepatic lipase. *Curr Opin Lipidol*. 1991;2:104-109.

Hayes KC, Khosla P. Dietary fatty acid threshold and cholesterolemia. *FASEB Journal* 1992;6: 2600-2607.

Hegardt FG. Transcription regulation of mitochondrial HMG-CoA synthase in the control of ketogenesis. *Biochimie*. 1998;80:803-806.

Hegsted DM, McGandy RB, Myers ML, Stare FJ. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr*. 1965;17:281-295.

Henderson HE, Kastelein JJ, Zwinderman AH, Gagne E, Jukema JW, Reijnders PW, Groenemeyer BE, Lie KI, Bruschke AV, Hayden MR, Jansen H. Lipoprotein lipase activity is decreased in a large cohort of patients with coronary artery disease and is associated with changes in lipids and lipoproteins. *J Lipid Res*. 1999;40 :735-743.

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.

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

- Hennig B, Toborek M, McClain CJ, Diana JN. Nutritional implications in vascular endothelial cell metabolism. *J Am Coll Nutr.* 1996;15:345-358.
- Hertzel AV, Bernlohr DA. Regulation of adipocyte gene expression by polyunsaturated fatty acids. *Mol Cell Biochem.* 1998;188:33-39.
- Hill MR, Kelly K, Wu X, Wanker F, Bass H, Morgan C, Wang CS, Gimble JM. Lipopolysaccharide regulation of lipoprotein lipase expression in murine macrophages. *Infection and Immunity.* 1995;63:858-864.
- Hodgson JM, Wahlqvist, Boxall JA, Balazs ND. Can linoleic acid contribute to coronary artery disease? *Am J Clin Nutr.* 1993;58:228-234.
- 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.
- Homma H, Kurachi H, Nishio Y, Takeda T, Yamamoto T, Adachi K, Morishige K, Ohmichi M, Matsuzawa Y, Murata Y. Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. *J Biol Chem.* 2000;275:11404-11411.

- Horrocks LA, Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid. *Pharmacol Res.* 1999;40:211-225.
- Hulten LM, Lindmark H, Diczfalusy U, Blorkhem I, Ottosson M, Liu Y, Bondjers G, Wiklund O. Oxysterol present in atherosclerotic tissue decrease the expression of lipoprotein lipase messenger RNA in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest.* 1996;97:461-468.
- Inaba T, Kawamura M, Gotoda T, Harada K, Shimada M, Ohsuga J, Shimano H, Akanuma Y, Yazaki Y, Yamada N. Effects of platelet-derived growth factor on the synthesis of lipoprotein lipase in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:522-528.
- Ishibashi S, Mori N, Murase T, Shimano H, Gotohda T, Kawakami M, Akanuma Y, Takaku F, Yamada N. Enhanced lipoprotein lipase secretion from human monocyte-derived macrophages caused by hypertriglyceridemic very low density lipoproteins. *Arteriosclerosis.* 1989;9:650-655.
- 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.

Kasim SE, Stern B, Kilhani S. Effects of n-3 fish oil on lipid metabolism, glycemic control and blood pressure in type II diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;67:1-5.

Katan MB, Zock PL, Mensink RP. Trans fatty acids and their effects on lipoproteins in humans. *Annual Reviews of Nutrition.* 1995;15:473-493.

Kaykov E, Abbou B, Friedstrom S, Hermoni D, Roguin N. Chlamydia pneumoniae in ischemic disease. *Isr Med Assoc J.* 1999;1:225-227.

Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato JK, Wahli W. Fatty acids and retinoids control metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:2160-2164.

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

Kelly JP, Parker CW. Effect of arachidonic acid and other unsaturated fatty acids on mitogenesis in human lymphocytes. *J Immunol* 1979;122:1556-1562.

Kern PA, Ranganathan G, Yukth A, Ong JM, Davis RC: Translational regulation of lipoprotein lipase by thyroid hormone is via a cytoplasmic repressor that interacts with the 3' untranslated region. *J Lipid Res* 1996;37:2332-2340.

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

Kestin M, Clifton P, Belling GB, Nestel PJ. n-3 fatty acids of marine origin lower systolic blood pressure and triglycerides but raise LDL cholesterol compared with n-3 and n-6 fatty acids from plants. *Am J Clin Nutr.* 1990;51:1028-1034.

Keys A. Seven countries: a multivariate analysis of death and coronary heart disease. Cambridge MA: Harvard University Press, 1980.

Keys A, Anderson JT, Grande F. Serum cholesterol response to changes in the diet II. The effect of cholesterol in the diet. *Metabolism* 1965a;14:759-765.

Keys A, Anderson JT, Grande F. Serum cholesterol response to changes in the diet IV. Particular saturated fatty acids in the diet. *Metabolism* 1965b;14:776-786.

Khosla P, Hayes KC. Dietary trans-monounsaturated fatty acids negatively impact plasma lipids in humans: critical review of the evidence. *J Am Coll Nutr.* 1996;15:325-339.

Kirchgessner TG, Chuat JC, Heinzmann C. Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:9647-9651.

Kirkland JL, Hollenberg CH, Kindler S, Roncari DAK. Long-chain fatty acids decrease lipoprotein lipase activity of cultured rat adipocytes precursors. *Metabolism*. 1994;43:144-151.

Komers R, Vrana A. Thiazolidinediones-tools for the research of metabolic syndrome X. *Physiol Res*. 1988;47:215-225.

Kornitzer M, Rose G. WHO european collaborative trial of multifactorial prevention of coronary heart disease. *Prev Med*. 1985;14:272-278.

Kraemer FB. Role of lipoprotein lipase and apolipoprotein E secretion by macrophages in modulating lipoprotein uptake: possible role in acceleration of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes*. 1992;41:77-80.

Kreisberg RA. Diabetic dyslipidemia. *Am J Cardiol*. 1998;82:67U-73U.

Kromhout D. Fatty acids, antioxidants, and coronary heart disease from an epidemiological perspective. *Lipids*. 1999;34:S27-S31.

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

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.

Leaf DA. Omega-3 fatty acids and coronary artery disease. More than a fish tale. *Postgrad Med*. 1989;85:237-244.

Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. *Nature*. 1987;329:630-632.

Losonczy KG, Harris TB, Havlik RJ. Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of all-cause and coronary disease mortality in older persons : the Established Populations for Epidemiologic Studies of the Elderly. *Am J Clin Nutr*. 1996;64 :190-195.

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. 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.

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.

Mamputu JC, Renier G. Proliferative effect of lipoprotein lipase on human vascular smooth muscle cells. *Artheroscler Thromb Vasc Biol.* in press.

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

Mann WA, Meyer N, Berg D, Greten H, Beisiegel U. Lipoprotein lipase compensates for the defective function of apo E variants in vitro by interacting with proteoglycans and lipoprotein receptors. *Atherosclerosis.* 1999;145 :61-19.

Marieb EL. Anatomie et physiologie humaines. Éditions du renouveau pédagogique inc. 1993.

Marui N, Offermann MK, Swerlick R. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993;92:1866-1874.

Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J. Macrophages in human atheroma contain PPAR gamma : differentiation-dependent peroxisomal proliferator- activated

receptor gamma expression and reduction of MMP-9 activity through PPAR gamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol.* 1998;153 :17-23.

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

Mattson FH, Grundy SM. Comparison of effects of dietary saturated monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins. *J Lipid Res.* 1985;26:194-202.

Mc Millan DE. Antihypertensive effects of fish oil. *N Engl J Med.* 1990;321:1002.

Mead JR, Cryer A, Ramji DP. Lipoprotein lipase, a key role in atherosclerosis? *FEBS letters* 1999;462:1-6.

Mellish JE, Iverson SJ, Bowen WD, Hammil MO. Fat transfer and energetics during lactation in the hooded seal : the roles of tissue lipoprotein lipase in milk fat secretion and pup deposition. *J Comp Physiol .* 1999;169 :377-390.

Mensink RP and Katan MB. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb.* 1992;12:911-919.

Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary trans fatty acids on high density and low density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med.* 1990;323:439-445.

Mensink RP, Katan MB. Effect of a diet enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids on levels of low density and high density lipoprotein cholesterol in healthy women and men. *N Engl Med.* 1989;321:436-441.

Merckel M, Kako Y, Radner H, Cho IS, Ramasamy R, Brunzell JD, Goldberg 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.

Moncada S. Prostacyclin, from discovery to clinical application. *J Pharmacol.* 1985;16:71-88.

Montalto MB, Bensadoun A. Lipoprotein lipase synthesis and secretion: effects of concentration and type of fatty acids in adipocyte cell culture. *J Lip Res.* 1993;34:397-407.

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.

Mulder M, Lombardi P, Jansen H, van Berkel TJ, Frants RR, Havekes LM. Heparan sulphate proteoglycans are involved in the lipoprotein lipase-mediated enhancement of the

- cellular binding of very low density and low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;185 :582-587.
- Murata Y, Behr SR, Kraemer FB. Regulation of macrophage lipoprotein lipase secretion by the scavenger receptor. *Biochim Biophys Acta.* 1988;972:17-24.
- Murphy Mc, Brooks CN, Rockett JC, Chapman C, Lovegrove JA, Gould BJ, Wright JW, Williams CM. The quantification of lipoprotein lipase mRNA in biopsies of human adipose tissue, using the polymerase chain reaction, and the effects of increased consumption of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Eur J Clin Nutr.* 1999;53:441-447.
- Mutanen M. Cis-unsaturated fatty acids and platelet function. *Prostagl Leuk Ess Fatty acids.* 1997;57:403-410.
- Mutanen M, Aro A. Coagulation and fibrinolysis factors in healthy subjects consuming high stearic or trans fatty acids. *Thromb Haemos.* 1997;77:99-104.
- Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell.* 1998;93:229-240.

- Nakamura N, Hamazaki T, Kobayashi M, Ohta M, Okuda K. Effects of eicosapentaenoic acids on remnants-like particles, cholesterol concentrations and plasma fatty acid composition in patients with diabetes mellitus. *In Vivo*. 1998; 12:311-314.
- Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D'Armiento FP, Palinski W. Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerosis lesions in childhood: Fate of early lesions in children (FELIC) study. *Lancet*. 1999;354: 1234-1241.
- Newby AC, Zaltsman AB. Fibrous cap formation or destruction-the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res*. 1999 41 :345-360.
- Newholmes P, Gordon S, Newholmes EA. Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. *Biochem J*. 1987;9:161-167.
- Nicholas-Frances V, Dasari VK, Abruzzi E, Osumi T, Latruffe N. The peroxisome proliferator response element (PPRE) present at position-681/-669 in the rat liver 3-ketoacyl-CoA thiolase B gene functionally interacts differently with PPARalpha and HNF-4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;269:347-351.

Nicholson AC, Hajjar DP. Herpesviruses in atherosclerosis and thrombosis. Etiologic agents or ubiquitous bystanders? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:339-348.

Nicosoli RJ, Wilson TA, Rogers EJ, Kritchvsky D. Effects of specific fatty acids (8:0, 14:0, cis-18:1, trans-18:1) on plasma lipoproteins, early atherogenic potential, and LDL oxidative properties in the hamster. *J Lipid Res.* 1998;39:1972-1980.

Nordestgaard BG, Nielsen LB. Arteriosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 1994;5:252-257.

Nordoy A, Hatcher L, Goodnight S, Fitzgerald GA, Connor WE. Effects of dietary fat content, saturated fatty acids, and fish oil on eicosanoid production and hemostatic parameters in normal men. *J Lab Clin Med.* 1994;123:914-920.

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.

Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Curr Opin Lipidol.* 1993;1:187-196.

- 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.
- Oliver JD, Rogers MP. Stimulation of lipoprotein lipase synthesis by refeeding, insulin and dexamethasone. *Biochem J*. 1993;292:525-530.
- Oliver MF. Diet coronary risk in men and women. *Lancet*. 1989;1:564.
- 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.
- 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. *Prostaglandines Leukot Essent fatty Acids*. 1999;60:55-63.
- Paolisso G, Esposito R, D'Alessio MA, Barbieri M. Primary and secondary prevention of atherosclerosis: is there a role for antioxidants? *Diabetes Metab*. 1999;25:298-306.
- Patricia MK, Kim JA, Harper CM, Shih PT, Berliner JA, Natarajan R, Nadler JL, Hedrick CC. Lipoxygenase products increase monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2615-2622.

- Pradines-Figueres A, Vannier C, Ailhaud G. Lipoprotein lipase stored in adipocytes and muscle cells is a cryptic enzyme. *J Lipid Res.* 1990;31:1467-1476.
- 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 macrophage. *J Lipid Res.* 1990;31:1379-1386.
- Rangan GK, Wang Y, Tay YC, Harris DC. Inhibition of NfKappaB activation with antioxidants is correlated with reduced cytokine transcription and translation in PTC. *AM J Physiol.* 1999;277 :F779-789.
- Ranganathan G, Kaakaji R, Kern PA. Role of protein kinase C in the translational regulation of lipoprotein lipase in adipocytes. *J Biol Chem.* 1999; 274:9122-9127.
- 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.
- Ranganathan G, Ong JM, Yukht A, Saghizadeh M, Simsolo RB, Pauers A, Kern PA. Tissue-specific expression of human lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 1995;270:7149-7155.

- Rao GN, Alexander RW, Runge MS. Linoleic and its metabolites, hydroperoxyoctadecadienoic acids, stimulates c-Fos, c-Jun, and c-Myc mRNA expression, mitogen-activated protein kinase activation, and growth in rat aortic smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1995;96:842-847.
- Rasmanis G, Vesterqvist O, Green K. Effects of intermittent treatment with aspirin on thromboxane and prostacyclin formation in patients with acute myocardial infarction. *Lancet.* 1988;2:245-247.
- Raynolds MV, Awald PD, Gordon DF, Gutierrez-Hartmann A, Rule DC, Wood WM, Eckel RH. Lipoprotein lipase gene expression in rat adipocytes is regulated by isoproterenol and insulin through different mechanisms. *Mol Endocrinol.* 1990;4:1416-1422.
- Reid VC, Brabbs CE, Mitchinson MJ. Cellular damage in mouse peritoneal macrophages exposed to cholesteryl linoleate. *Atherosclerosis.* 1992;92:251-260.
- 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 E, Desanctis JB, Radzioch D. High macrophage lipoprotein lipase expression and secretion are associated in inbred murine strains with susceptibility to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:190-196.

Renier G, Desfaits AC, Lambert A, Mikhail R: Role of oxidant injury on macrophage lipoprotein lipase production and sensitivity to LPL. *J Lipid Res* 1996;37:799-809.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CL. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1998;391 :79-82.

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.

Rocchi S, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: a versatile metabolic regulator. *Ann Med*. 1999;31:342-351.

Roche HM, Gibney MJ,. Long-chain polyunsaturated fatty acids and triacylglycerol metabolism in the postprandial state. *Lipids*. 1999;34:S259-S265.

Rosenfeld ME. Inflammation, lipids, and free radicals: lessons learned from the atherogenic process. *Semin Reprod Endocrinol*. 1998;16:249-261.

- Rosenfeld ME, Khoo JC, Miller E, Parthasarathy S, Palinski W, Witztum JL. Macrophage-derived foam cells freshly isolated from rabbit atherosclerosis 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. Atherosclerosis-An inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
- Rudel LL, Johnson FL, Sawyer JK, Wilson MS, Parks JS. Dietary polyunsaturated fat modifies low-density lipoproteins and reduces atherosclerosis of nonhuman primates with high and low diet responsiveness. *Am J Clin Nutr.* 1995;62:463S-470S.
- Rudel LL, Parks JS, Sawyer JK. Compared with dietary monounsaturated and saturated fat, polyunsaturated fat protects African green monkeys from coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:2101-2110.

- 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.
- Russel R, Junichi M, Raines EW. Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis. *Science.* 1990;248:1009-1011.
- 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.
- Sanderson P, Yaqoob P, Calser PC. Effect of dietary lipid manipulation upon rat spleen lymphocyte functions and the expression of lymphocyte surface molecules. *J Ntr Env Med.* 1995;5:119-132.
- Santamarina-Fojo S. Genetic dyslipoproteinemias:role of lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II.*Curr Opin Lipidol* 1992;3:186-195.
- Santamarina-Fojo S, Dugi KA. Structure, function and role of lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:117-125.
- Santoli D, Phillips PD, Colt TL, Zurier RB. Suppression of interleukine-2-dependent human T cell growth in vitro by prostaglandin E (PGE) and their precursor fatty acids. *J Clin Invest.* 1990;85:424-432.

- 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.
- Sartippour MR, Renier G. Upregulation of macrophage lipoprotein lipase in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2000;49:597-601.
- Sartippour MR, Renier G. Differential regulation of macrophage peroxisome proliferator-activated receptor expression by glucose:role of peroxisome proliferator-activated receptors in lipoprotein lipase gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;1:104-110.
- 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, Klein MG, Goldberg IL. 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 fatty acids. *J Biol Chem*. 1989;264:4349-4355.

- Schoonjans K, Martin G, Staels B, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol*. 1997;8:159.
- Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol*. 1993;71:9B-14B.
- Scott J. Unravelling arteriosclerosis. *Nature*. 1989;338:118-119.
- 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.
- Semenkovich CF, Coleman T, Daugherty A. Effects of heterozygous lipoprotein lipase deficiency on diet-induced atherosclerosis in mice. *J Lipid Res*. 1998;39 :1141-1151.
- Shahar E, Folsom AR, Wu KK, Dennis BH, Shimakawa T, Conlan MG, Davis CE, Williams OD. Association of fish intake and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids with a hypocoagulable profile. The atherosclerosis Risk in Communities study. *Atheroscler Thromb*. 1993;13:1205-1212.

- Shantaram V. Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension. *Clin Exp Hypertension*. 1999;21:69-77.
- Silveira A, Karpe F, Blomback M, Steiner G, Walldius G, Hamsten A. Activation of coagulation factor VII during alimentary lipemia. *Arterioscler Thromb* 1994;14:60-69.
- Singh-Bist A, Komaromy MC, Kraemer FB. Transcriptional regulation of lipoprotein lipase in the heart during development in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;202 :838-843.
- Sirtori CR, Gatti E, Tremoli E. Olive oil, corn oil and n-3 fatty acids differently affect lipids, lipoproteins, platelets, and superoxide formation in type II hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr*. 1992;56:113-122.
- Smith EB, Keen GA, Grant A, Stirk C. Fate of fibrinogen and risk of cardiovascular disease. *JAMA*. 1987;258:1183-1186.
- Smith LC, Voyta JC, Catapano AL, Kinnunen PK, Gotto AM Jr, Sparrow JT. Activation of lipoprotein lipase by synthetic fragments of apolipoprotein C-II. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;348:213-223.

- Sofer O, Fainaru M, Schafer Z, Goldman R. Regulation of lipoprotein lipase secretion in murine macrophages during foam cell formation in vitro. Effect of triglyceride-rich lipoproteins. *Arteriosclerosis Thromb.* 1992;12:1458-1466.
- Spady DK, Woollett LA, Dietschy JM. Regulation of plasma LDL cholesterol levels by dietary cholesterol and fatty acids. *Annual Review of Nutrition.* 1993;13:355-381.
- Sparkes RS, Zollman S, Klisak I. Human genes involved in lipolysis of plasma lipoproteins: mapping of loci for lipoprotein lipase to 8p22 and hepatic lipase to 15q21. *Genomics* 1987;1:138-144.
- Sperling RI, Benincaso AI, Knoell CT, Larkin JK, Austen KF, Robinson DR. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *J Clin Invest.* 1993;91:651-660.
- Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. *Circulation.* 1998;98:2088-2093.
- Stegmayr B, Asplund K. Diabetes as a risk factor for stroke: a population perspective. *Diabetologia* 1995;38:1061-1068.

- 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 aortic smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1212:305-310.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modification of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989;320:915-924.
- 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.
- Stray N, Letnes H, Blomhoff JP. Intracellular regulation of lipoprotein lipase in human monocyte-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1045:280-284.
- Temme EHM, Mensink RP, Hornstra G. Comparison of the effect of diets enriched in lauric, palmitic or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men. *Am J Clin Nutr*. 1996;63:897-903.

- 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.
- Terrano T. Effect of oral administration of highly purified eicosapentaenoic acid on platelet function, blood viscosity and red cell deformability in healthy human subjects. *Atherosclerosis*. 1983;46:321-331.
- Toborek M, Blanc Em, Kaiser S, Mattson MP, Hennig B. Linoleic acid potentiates TNF-mediated oxidative stress, disruption of calcium homeostasis, and apoptosis of cultured vascular endothelial cells. *J Lipid Res* 1997;38:2155-2167.
- Toborek M, Barger SW, Mattson MP, Barve S, McClain CJ, Hennig B. Linoleic acid and TNF-alpha cross amplify oxidative injury dysfunction of endothelial cells. *J Lipid Res*. 1996;37:123-135.
- Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 1998;93 :241-252.
- Tsujita M, Ykoyama S. Selective inhibition of free apolipoprotein-mediated cellular lipid efflux by probucol. *Biol Chemistry*. 1996;35 :13011-13020.

- 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.
- Turpeinen AAM, Sauer R, Freese R, Pajari AM, Mutanen M. Platelets are similarly activated by both oleic acid and linoleic acid rich diets in healthy humans. *Prostagl Leuk Ess Fatty Acids*. 1997;57:228.
- Turpeinen AM, Wubert J, Aro A, Lorenz R, Mutanen M. Similar effects of diets rich in stearic acid or trans fatty acids on platelet function and endothelial prostacyclin production in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:316-322.
- Ulbricht TVL, Southgate DAT. Coronary heart disease:seven dietary factors. *Lancet* 1991;338:985-992.
- van Bennekum AM, Kako Y, Weinstock PH, Harrison EH, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase expression level influences tissue clearance of chylomicron retinyl ester. *J Lipid Res*. 1999;40 :565-574.
- van Reyk DM, Jessup W. The macrophage in atherosclerosis : modulation of cell function by sterols. *J Leukoc Biol* 1999;66 :557-561.

- Vaziri ND, Liang K, Barton CH. Effect of increased afterload on cardiac lipoprotein lipase and LDL receptor expression. *Biochim Biophys Acta* 1999;1436 :577-584.
- Vazquez M, Merlos M, Adzet T, Laguna JC. Influence of lipid profile and fatty acid composition on the oxidation behavior of rat and guinea pig low density lipoprotein. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1998;119:311-316.
- Visioli F, Colombo C, Galli C. Oxidation of individual fatty acids yields different profiles of oxidation markers. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;245:487-489.
- von Schacky C, Fahrner C, Fisher S. Catabolism of leukotriene B5 in humans. *J Lipid Res*. 1990;31:1831-1838.
- Wang X, Greiberger J, Levak-Frank S, Zimmermann R, Zechner R, Jurgens G, Endogenously produced lipoprotein lipase enhances the binding and cell association of native, mildly oxidized and moderately oxidized low-density lipoprotein in mouse peritoneal macrophages. *Biochem J*. 1999a;343 :347-353.
- Wang CS, Hartsuck J, McConathy WJ. Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* 1992;1123:1-17.
- Watts GF, Jackson P, Burke V, Lewis B. Dietary fatty acids and progression of coronary artery disease in men. *Am J Clin Nutr*. 1996;64:202-209.

- Watts GF, Lewis B, Jackson P, Burke V, Lewis ES, Brunt JN, Coltart DJ. Relationship between nutrient intake and progression/regression of coronary atherosclerosis as assessed by serial quantitative angiography. *Can J Cardiol*. 1995;11:110G-114G.
- Weber C, Erl W, Pietsh A, Danesch U, Weber PC. Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cell stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:622-628.
- Weisburger JH. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food Chem Toxicol* 1999;37 :943-948.
- Weisenthal SR, Sandhu H, McCall RH, Tchpashvili V, Yoshii H, Polonsky K, Shi ZQ, Lewis GF, Mari A, Giacca A. Free fatty acids impair hepatic insulin extraction in vivo. *Diabetes*. 1999;48 :766-774.
- White JR, Chait A, Klebanoff SJ, Deeb S, Brunzell JD. Bacterial lipopolysaccharide reduces macrophage lipoprotein lipase levels: an effect that is independent of tumor necrosis factor. *J Lipid Res*. 1988;29:1379-1385.

- 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.
- Wilson DE, Emi M, Iverius PH. Phenotypic expression of heterozygous lipoprotein lipase deficiency in the extended pedigree of a proband homozygous for a missense mutation. *J Clin Invest.* 1996;86:735-750.
- Wion KL, Kirchgessner TG, Lusis AJ, Schotz MC, Lawn RM. Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence. *Science* 1987;235:1638-1641.
- Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen Aa, Abildgaard S, Steffensen R, Schnohr P, Nordestgaard BG. A common substitution (Asn 291Ser) in lipoprotein lipase is associated with increased risk of ischemic heart disease. *J Clin Invest.* 1997;99 :1606-1613.
- Wong H, Davis RC, Thuren T. Lipoprotein lipase domain function. *J Biol Chem.* 1994;269:10319-10323.
- Yagyu H, Ishibashi S, Chen Z, Osuga J, Okazaki M, Perrey S, Kitamine T, Shibamada M, Ohashi K, Harada K, Shionoiri F, Yahagi N, Gotoda T, Yazaki Y, Yamada N. Overexpressed lipoprotein lipase protects against atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *J Lipid Res.* 1999;40 :1677-1685.

- Yin B, Loike JD, Kako Y, Weinstock PH, Breslow JL, Silverstein SC, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase regulates Fc receptor-mediated phagocytosis by macrophage maintained in glucose-deficient medium. *J Clin Invest.* 1997;100:649-657.
- Yla-Herttualla S. Macrophages and oxidized low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Ann Med* 1991;23:561-567.
- Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 2000;342 :154-160.
- Zampelas A, Peel AS, Gould BJ, Wright J, Williams CM. Polyunsaturated fatty acids of the n-6 and n-3 series: effect on postprandial lipid and apolipoprotein levels in healthy men. *Eur J Clin Nutr.* 1994;48:842-848.
- Zheng ZJ, Folsom AR, Ma J, Arnett DK, McGovern PG, Eckfeld JH. Plasma fatty acid composition and 6-year incidences of hypertension in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in communities (ARIC) study. *Am J Epidemiol.* 1999;150:492-500.
- Zilverman DB. A proposal linking atherogenesis to the interaction of endothelial lipoprotein lipase with triglyceride-rich lipoproteins. *Circul Res.* 1973;33:633-638.

Zilversmith DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation*. 1979;60:473-485.

Zock PL, de Vries JHM, Katan MB. Impact of myristic acid versus palmitic acid on serum lipid and lipoprotein levels in healthy women and men. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 1994;14:567-575.