

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Rôle de la peroxydation lipidique dans le développement de
l'athérosclérose**

par

Valérie MARCIL

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

Février 2008

© Valérie MARCIL, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures
Cette thèse intitulée :

**Rôle de la peroxydation lipidique dans le développement de
l'athérosclérose**

Présentée par :
Valérie MARCIL

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Dominique Garrel
.....
président-rapporteur

Dr Emile Levy
.....
directeur de recherche

Dr Victor Gavino
.....
membre du jury

Dr Louise Brissette
.....
examineur externe

Dr Olivier Receveur
.....
représentant du doyen à la FES

Sommaire

Introduction : L'athérosclérose consiste en une maladie lipidique inflammatoire ayant pour complications cliniques les maladies cardiovasculaires et les accidents vasculaires cérébraux. La physiopathologie de cette maladie implique l'interaction de différents types cellulaires au niveau de la paroi artérielle, dont les macrophages et les cellules endothéliales vasculaires. L'importance des LDL oxydées dans la pathogenèse de l'athérosclérose soulève un intérêt concernant l'implication du phénomène oxydatif dans son développement. De plus, les lésions d'athéromes sont caractérisées par une accumulation abondante de cholestérol et, de ce fait, les mécanismes de transport cellulaire de cholestérol revêtent une importance capitale dans la maladie. L'effet du stress oxydatif sur ce mécanisme demeure toutefois inconnu. **Objectifs** : Notre étude consiste à évaluer si le statut oxydatif des cellules impliquées dans l'athérosclérose peut influencer leur prédisposition à développer des anomalies oxydatives, inflammatoires et métaboliques. Pour ce faire, nous avons déterminé l'impact de la peroxydation lipidique sur le transport de cholestérol des macrophages THP-1 et des cellules endothéliales vasculaires HUVEC, sur les défenses antioxydantes cellulaires et sur les réponses inflammatoires. **Résultats** : Premièrement, nous avons exploré l'influence du stress oxydatif induit par le fer-ascorbate sur les processus de transport de cholestérol des macrophages. Selon nos résultats, en réponse à la peroxydation lipidique, le cholestérol s'accumule dans les macrophages THP-1 en conséquence d'une réduction de son efflux cellulaire et

de sa protéine de transport ABCA1, via une régulation de sa transcription génique et des facteurs de transcription PPARs et LXRs. Deuxièmement, nous avons évalué l'impact du stress oxydatif sur les mécanismes de transport de cholestérol et d'inflammation des cellules HUVEC. Dans ces cellules, la peroxydation lipidique n'a pas altéré le transport et les transporteurs de cholestérol. Par contre, la présence concomitante de stress oxydatif et des monocytes a amplifié leur adhésion aux cellules endothéliales et l'expression des molécules inflammatoires ICAM-1, E-sélectine et MCP-1, tout en réprimant l'expression de l'enzyme eNOS. Troisièmement, nous avons investigué l'influence du stress oxydatif sur les réponses antioxydantes et inflammatoires des THP-1. Nos travaux indiquent que lorsque les macrophages sont soumis à un stress oxydatif, il s'ensuit une peroxydation lipidique, une perturbation de la composition en acides gras polyinsaturés et une réponse inflammatoire. Dans nos conditions expérimentales, la réponse des enzymes antioxydantes ne s'est pas avérée efficace, ce qui a mené à une perturbation du statut rédox et à l'accumulation de peroxyde d'hydrogène.

Conclusions : Dans l'ensemble, nos travaux permettent de préciser l'impact de la peroxydation lipidique sur les étapes précoces de l'athérosclérose, en plus de souligner l'implication capitale des macrophages dans ce processus. En effet, lorsque les macrophages se trouvent dans un milieu pro-oxydatif, ils deviennent prédisposés à se développer en cellules spumeuses, entre autres par l'inhibition de la sortie de cholestérol cellulaire. Le stress oxydatif peut aussi stimuler la dysfonction des cellules endothéliales vasculaires, mais seulement lorsqu'elles sont mises en présence de monocytes. Enfin, l'importance des

monocytes/macrophages dans ces étapes pourrait être due à leur incapacité à se défendre adéquatement contre un stress oxydatif, devenant toxiques pour eux-mêmes et pour les cellules environnantes.

Mots-clefs : Athérosclérose, stress oxydatif, peroxydation lipidique, monocytes, macrophages, cellules endothéliales vasculaires, transport de cholestérol, facteurs de transcription.

Abstract

Introduction : Atherosclerosis is an inflammatory disorder involving lipid accumulation and leading to heart diseases and strokes. The pathophysiology of the disease involves the interaction of several cellular types in the artery wall, such as macrophages and vascular endothelial cells. The remarkable capacity of oxidized LDL to contribute to vascular lesions has raised large interest as to the implication of oxidative stress *per se* on atherosclerosis development. Besides, atherosclerotic lesions are characterized by an abundant cholesterol accumulation, which indicates cholesterol transport abnormalities in the arterial wall. Nevertheless, the impact of oxidative stress relative to these events remains unknown. **Objectives** : The aims of our studies were to determine whether oxidative stress increases the predisposition of cells to develop atherosclerotic lesions. To this end, we have examined the impact of lipid peroxidation on cholesterol trafficking in THP-1 macrophages and in HUVEC vascular endothelial cells, with particular emphasis on the related mechanisms. We have also assessed the ability of macrophages to deploy antioxidant defense when challenged with oxidative stress. **Results** : First, we have explored the influence of oxidative stress induced by the iron-ascorbate system on cholesterol transport in macrophages. According to our findings, lipid peroxidation limits cholesterol outflow via the inhibition of LXRs gene expression, leading to a decline in PPARs mRNA, which in turn decreased ABCA1 expression and lowered cholesterol efflux. Second, we have evaluated the impact of iron-ascorbate on cholesterol transport and inflammation by focusing on endothelial vascular cells.

Surprisingly, in HUVEC cells, lipid peroxidation did not lead to significant changes in cholesterol influx/efflux and in lipoprotein-cholesterol receptors. On the other hand, oxidative stress enhanced cellular adhesion of HUVEC and THP-1 along with an increase in the inflammatory molecules ICAM-1, E-selectin and MCP-1, as well as in the eNOS enzyme. Finally, we have tested the susceptibility of THP-1 macrophages to develop oxidative stress and to deploy antioxidant defense mechanisms that insure the proper balance between the prooxidant and antioxidant molecules. Our results show that macrophages, activated under conditions of oxidative stress, have not exhibited powerful endogenous antioxidants, which may enhance inflammation magnitude. **Conclusions** : Overall, our study highlighted the impact of lipid peroxidation on the early steps of atherosclerosis development and clarified the obligatory involvement of macrophages in the process. Indeed, when macrophages reside in a prooxidative environment, they become more susceptible to foam cell development, implicating, among others, the inhibition of cellular cholesterol efflux. Additionally, oxidative stress induced endothelial cell dysfunction, but only in the presence of monocytes. Finally, the importance of monocytes/macrophages in these steps could be caused by their incapacity to adequately detoxify free radicals and lipid peroxidation molecules, thereby developing harmful toxic effects against themselves and surrounding cells.

Key words : Atherosclerosis, oxidative stress, lipid peroxidation, monocytes, macrophages, endothelial vascular cells, cholesterol transport, transcription factors.

Table des matières

<i>Page de titre</i>	<i>i</i>
<i>Page d'identification des jurys</i>	<i>ii</i>
<i>Sommaire</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract</i>	<i>vi</i>
<i>Table des matières</i>	<i>viii</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>xii</i>
<i>Liste des tables</i>	<i>xiv</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>xv</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xxiv</i>
1. INTRODUCTION	1
1.1 LIPIDES ET LIPOPROTÉINES	2
1.1.1 Lipides alimentaires	2
1.1.1.1 Acides gras	2
1.1.1.2 Triacylglycérols	3
1.1.1.3 Phospholipides	4
1.1.1.4 Cholestérol	5
1.1.2 Digestion des lipides	7
1.1.2.1 Hydrolyse des lipides	7
1.1.2.2 Émulsification et solubilisation micellaire	9
1.1.3 Absorption intestinale des lipides	11
1.1.3.1 Passage transmembranaire	11
1.1.3.2 Transport intracellulaire	14
1.1.3.3 Réestérification des lipides	17
1.1.3.3.1 Triacylglycérols	17
1.1.3.3.2 Phospholipides	20
1.1.3.3.3 Cholestérol	20
1.1.3.4 Assemblage des lipoprotéines intestinales	22
1.1.3.4.1 « Editing » de l'apo B	22
1.1.3.4.2 Lipidation de l'apo B et formation des chylomicrons	23
1.1.3.5 Autres lipoprotéines intestinales	28

1.1.4 Transport et métabolisme des lipides dans la circulation.....	29
1.1.4.1 Chylomicrons	30
1.1.4.2 Lipoprotéines de très haute densité (VLDL)	32
1.1.4.2.1 Assemblage et sécrétion des VLDL	32
1.1.4.2.2 Métabolisme des VLDL	33
1.1.4.3 Lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL)	34
1.1.4.4 Lipoprotéines de faible densité (LDL)	35
1.1.4.5 Lipoprotéines de haute densité (HDL) et transport inverse du cholestérol	37
1.2 ATHÉROSCLÉROSE.....	44
1.2.1 Importance et impacts sociaux de la maladie.....	44
1.2.2 Physiopathologie de l'athérosclérose.....	46
1.2.2.1 Anatomie de la paroi vasculaire	48
1.2.2.2 Dysfonction endothéliale	49
1.2.2.2.1 Endothélium vasculaire	49
1.2.2.2.2 Fonction endothéliale : oxyde nitrique	51
1.2.2.2.3 Fonction endothéliale : prostaglandines	54
1.2.2.2.4 Fonction endothéliale : endothéline.....	56
1.2.2.2.5 Perte de la fonction endothéliale	57
1.2.2.3 Infiltration des LDL	58
1.2.2.4 Rétention des LDL	58
1.2.2.5 Modification des LDL et propriétés des LDL oxydées	59
1.2.2.6 Adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales	64
1.2.2.6.1 Expression des molécules d'adhésion	66
1.2.2.6.1.1 Sélectines	67
1.2.2.6.1.2 Superfamille des immunoglobulines	70
1.2.2.6.2 Expression des intégrines	72
1.2.2.6.3 Molécules d'adhésion solubles.....	73
1.2.2.7 Transmigration chimiotactique	74
1.2.2.8 Formation des cellules spumeuses et des stries lipidiques	75
1.2.2.9 Prolifération et migration des cellules musculaires lisses: formation de la chape fibreuse	79
1.2.2.10 Formation du corps nécrotique	80
1.2.2.11 Stabilité des plaques athéromateuses	82
1.2.2.12 Complication et rupture des plaques athéromateuses	83
1.2.3 Transport de cholestérol dans les macrophages et les cellules endothéliales vasculaires	85
1.2.3.1 Influx de cholestérol	86
1.2.3.1.1 Récepteurs de LDL.....	86
1.2.3.1.2 Récepteurs éboueurs.....	86
1.2.3.1.2.1 «Scavenger receptors class A» (SRA)	87
1.2.3.1.2.2 «Fatty acid translocase» (CD36).....	89
1.2.3.1.2.3 «Scavenger receptor class B type I» (SR-BI)	91
1.2.3.1.3 «Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1» (LOX-1).....	94

1.2.3.2 Efflux de cholestérol	96
1.2.3.2.1 «ATP-Binding cassette transporter A1» (ABCA1)	97
1.2.3.2.2 «ATP-Binding cassette transporter G1» (ABCG1)	103
1.2.3.2.3 Apolipoprotéine E	105
1.2.4 Facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme lipidique	106
1.2.4.1 «Peroxisome Proliferator-Activated Receptors» (PPARs)	106
1.2.4.1.1 PPAR α	109
1.2.4.1.2 PPAR γ	110
1.2.4.1.3 PPAR δ	111
1.2.4.1.4 PPARs et athérosclérose	113
1.2.4.1.4.1 PPAR α et athérosclérose	113
1.2.4.1.4.2 PPAR γ et athérosclérose	114
1.2.4.1.4.3 PPAR δ et athérosclérose	117
1.2.4.2 «Liver X Receptors» (LXRs)	118
1.2.4.2.1 LXRs et athérosclérose	119
1.2.5 Facteurs de risque de l'athérosclérose	122
1.2.5.1 Résistance à l'insuline et diabète	122
1.2.5.2 Dyslipidémies athérogènes	124
1.2.5.2.1 Hypercholestérolémie	125
1.2.5.2.2 Niveaux plasmatiques de HDL	126
1.2.5.2.3 Hypertriglycéridémie	127
1.2.5.3 Hyperhomocystéinémie	128
1.2.5.4 Hypertension artérielle et angiotensine II	129
1.2.6 Athérosclérose et pédiatrie	131
1.3 STRESS OXYDATIF	132
1.3.1 Formation des radicaux libres	132
1.3.2 Oxydants non radicalaires	135
1.3.3 Sources des dérivés réactifs de l'oxygène dans la paroi vasculaire	137
1.3.3.1 Transport mitochondrial d'électrons	139
1.3.3.2 NADPH oxydases	140
1.3.3.3 Xanthine oxydase	143
1.3.3.4 Découplage de l'oxyde nitrique synthase endothéliale	144
1.3.3.5 Myéloperoxydase	147
1.3.3.6 Lipoxygénases	147
1.3.3.7 Métaux de transition	148
1.3.4 Défenses antioxydantes	148
1.3.4.1 Enzymes antioxydantes	149
1.3.4.1.1 Superoxydes dismutases	149
1.3.4.1.2 Catalase et peroxydases	150

1.3.4.1.3 Défenses antioxydantes dépendantes du glutathion.....	152
1.3.4.1.4 Séquestration des métaux	155
1.3.4.2 Antioxydants non enzymatiques	156
1.3.4.2.1 Ascorbate (vitamine C).....	156
1.3.4.2.2 Acide urique	159
1.3.4.2.3 Bilirubine.....	159
1.3.4.2.4 Vitamine E.....	160
1.3.4.2.5 Coenzyme Q ₁₀	163
1.3.5 Dérivés réactifs de l'oxygène et athérosclérose	164
1.3.5.1 Peroxydation lipidique	166
1.3.5.2 LDL oxydées	168
1.3.6 Réactions rédox et signalisation cellulaire	169
1.3.7 Stress oxydatif et régulation transcriptionnelle.....	171
1.3.7.1 «Nuclear factor-kappa B» (NF-κB)	171
1.3.7.2 «Activator protein-1» (AP-1)	173
1.3.7.3 «Peroxisome proliferator-activated receptors» (PPARs)	174
1.3.8 Épidémiologie des maladies cardiovasculaires et supplémentation en antioxydants. 175	
1.3.8.1 Études de cohortes prospectives	175
1.3.8.2 Études randomisées contrôlées : prévention primaire	176
1.3.8.3 Études randomisées contrôlées : prévention secondaire	179
1.3.8.4 Vitamine E en combinaison avec d'autres antioxydants	182
1.4 Choix des modèles in vitro	187
1.4.1 Système pro-oxydant fer-ascorbate.....	187
1.4.2 Modèles cellulaires	191
2. BUTS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	193
3. ARTICLE 1.....	197
4. ARTICLE 2.....	238
5. ARTICLE 3.....	280
6. DISCUSSION GÉNÉRALE	331
7. RÉFÉRENCES.....	355

Liste des figures

Figure 1 : Molécules de glycérol et de triacylglycérol	p.3
Figure 2 : Molécule de phospholipide	p.4
Figure 3 : Molécule de cholestérol	p.6
Figure 4 : Micelle	p.10
Figure 5 : Réestérification des triacylglycérols	p.19
Figure 6 : Réestérification des phospholipides.....	p.20
Figure 7 : Assemblage des pré-chylomicrons dans le réticulum endoplasmique.....	p.25
Figure 8 : Formation des chylomicrons.....	p.27
Figure 9 : Chylomicron	p.28
Figure 10 : LDL.....	p.37
Figure 11 : HDL	p.38
Figure 12 : Transport inverse du cholestérol.....	p.41
Figure 13 : Lésions athéromateuses	p.47
Figure 14 : Anatomie de la paroi vasculaire.....	p.49
Figure 15 : Biosynthèse de l'oxyde nitrique.....	p.53
Figure 16 : LDL et formation de l'athérosclérose	p.64
Figure 17 : Interactions leucocytes-cellules endothéliales	p.66
Figure 18 A : Développement de l'athérosclérose	p.78
Figure 18 B : Développement de l'athérosclérose	p.81
Figure 18 C : Développement de l'athérosclérose	p.84
Figure 19 : SR-BI	p.92

Figure 20 : ABCA1	p.98
Figure 21 : Récepteurs de cholestérol des macrophages	p.106
Figure 22 : Régulation transcriptionnelle par les PPARs	p.108
Figure 23 : Régulations et fonctions des PPARs	p.112
Figure 24 : Régulations et fonctions des LXRs	p.121
Figure 25 : NADPH oxydase	p.141
Figure 26 : Structure de la eNOS	p.145
Figure 27 : Découplage de la eNOS	p.146
Figure 28 : Activité pro-oxydante de l'ascorbate	p.158
Figure 29 : Alpha-tocophérol	p.160
Figure 30 : Alpha- et gamma-tocophérol	p.162
Figure 31 : Peroxydation lipidique et formation des aldéhydes	p.167
Figure 32 : Système pro-oxydant fer-ascorbate et peroxydation lipidique	p.189
Figure 33 : Réduction de l'efflux de cholestérol par le stress oxydatif dans les macrophages THP-1	p.338
Figure 34 : Stress oxydatif et cellules endothéliales vasculaires	p.342
Figure 35 : Synthèse et métabolisme du glutathion	p.347
Figure 36 : Réponse des macrophages au stress oxydatif	p.352

Liste des tables

Table 1 : Principaux transporteurs des lipides dans les entérocytes.....	p.16
Table 2 : Caractéristiques des lipoprotéines	p.30
Table 3 : Activités pro-athérogènes des oxLDL.....	p.63
Table 4 : Radicaux libres dans les systèmes biologiques	p.134
Table 5 : Oxydants non radicalaires	p.136
Table 6 : Études cliniques sur la supplémentation en vitamine E et les maladies cardiovasculaires : prévention primaire	p.178
Table 7 : Études cliniques sur la supplémentation en vitamine E et les maladies cardiovasculaires : prévention secondaire	p.181
Table 8 : Études cliniques sur la combinaison de suppléments d'antioxydants et les maladies cardiovasculaires.....	p.184

Liste des abréviations

μg	:	Microgramme
$\alpha\text{-TO}\bullet$:	Radical alpha-tocophéryle
$\alpha\text{-TOH}$:	Alpha-tocophérol
$\gamma\text{-GCS}$:	Gamma-glutamylcystéine synthétase
$\gamma\text{-GT}$:	Gamma-glutamyltransférase
AAPH	:	«2,2'-Azobis-2-méthyl-propanimidamide dihydrochloride»
ABCA1	:	«ATP binding cassette A1»
ABCG1	:	«ATP binding cassette G1»
ABCG4	:	«ATP binding cassette G4»
ABCP	:	«Acyl-coenzyme A binding protein»
ACAT	:	Acyl-coenzyme A : cholestérol acyltransférase
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADP	:	Adénosine diphosphate
ADRP	:	«Adipose differentiation-related protein»
AG	:	Acide gras
AGCC	:	Acide gras à chaîne courte
AGCL	:	Acide gras à chaîne longue
AGCM	:	Acide gras à chaîne moyenne
AGEs	:	«Advanced glycation products»
AMPc	:	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	:	«Activator protein-1»
Apo	:	Apolipoprotéine

APOBEC-1	:	«ApoB mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 1»
AR	:	Acide rétinoïque
ARNm	:	Acide ribonucléique messager
Asc	:	Ascorbate
ATOX-1	:	«Antioxydant-1»
ATP	:	Adénosine triphosphate
AVC	:	Accident vasculaire cérébral
BH ₄	:	(6R)-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine
BHT	:	«Butylated hydroxytoluene»
Ca	:	Calcium
CCK	:	Cholecystokinine
CETP	:	«Cholesterol ester transfer protein»
cGMP	:	Guanosine monophosphate cyclique
CHOL	:	Cholestérol
CM	:	Chylomicron
CML	:	Cellules musculaires lisses
CoA	:	Coenzyme A
Cox	:	Cycloxygénase
CREB	:	«AMPc responsive-element-binding protein»
CRP	:	Protéine C réactive
Cu	:	Cuivre
CYP27	:	«Sterol 27-hydrolase»
DG	:	Diglycéride

DGAT	:	Diacylglyc�rol acyltransférase
dL	:	D�cilitre
EC	:	Esters de cholestérol
ec	:	Extracellulaire
EIM	:	�paisseur intima-média
eNOS	:	Oxyde nitrique synthase endothéliale
F	:	Femmes
FABP	:	«Fatty acid binding protein»
FABPpm	:	«Fatty acid binding protein» de la membrane plasmatique
FAD	:	Flavine adénine dinucléotide
FATP4	:	«Fatty acid-transport protein 4»
Fe	:	Fer
FMN	:	Flavine mononucléotide
g	:	Gramme
GPAT	:	Glycérol-3-phosphate acyltransférase
GPx	:	Glutathion péroxydase
GR	:	Glutathion réductase
GSH	:	Glutathion
GSS	:	Glutathion synthétase
GSSG	:	Glutathion disulfide
GT	:	Glutathion S-transférase
GTP	:	Guanosine triphosphate
H	:	Hommes

HAEC	:	«Human aortic endothelial cells»
H ₂ O ₂	:	Péroxyde d'hydrogène
HDL	:	Lipoprotéine de haute densité
HETE	:	Acide hydroxyéicosatétraoïque
HMGR	:	«3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A» réductase ou HMG-CoA réductase
HNE	:	4-Hydroxynonénale
HOCl	:	Acide hypochlorique
HODE	:	Acide hydroxyoctadécadienoïque
HUVEC	:	«Human umbilical vascular endothelial cells»
ICAM-1	:	«Intercellular adhesion molecule 1»
IDL	:	Lipoprotéine de densité intermédiaire
I-FABP	:	«Intestinal-fatty acid binding protein»
Ig	:	Immunoglobuline
IL	:	Interleukine
IM	:	Infarctus du myocarde
IMC	:	Indice de masse corporelle
INF γ	:	Interféron gamma
iNOS	:	Oxyde nitrique synthase inductible
I κ B	:	«Inhibitor kappa B»
kDa	:	kilodalton
kg	:	kilogramme
L	:	Litre

LCAT	:	Lécithine : cholestérol acyltransférase
LDL	:	Lipoprotéine de faible densité
L-FABP	:	«Liver-fatty acid binding protein»
LH	:	Lipase hépatique
LOO•	:	Radical lipidique peroxyde
LOOH	:	Hydroperoxyde lipidique
LOX-1	:	«Lectin like-oxidized low density lipoprotein 1»
LPL	:	Lipoprotéine lipase
LPS	:	Lipopolysaccharide
LTB4	:	Leucotriène B4
LXR	:	«Liver X receptor»
LXRE	:	«LXR response element»
m	:	Mètre
MAPK	:	«Mitogen-activated protein kinase»
MCP-1	:	«Monocyte chemotactic protein 1»
M-CSF	:	«Macrophage colony stimulating factor»
MCV	:	Maladies cardiovasculaires
MDA	:	Malondialdéhyde
mg	:	Milligramme
MG	:	Monoglycéride
MGAT	:	Monoacylglycérol acyltransférase
ml	:	Millilitre
mM	:	Millimolaire

mmLDL	:	Lipoprotéine de faible densité minimalement modifiée
mmol	:	Millimole
MMP	:	Métalloprotéinase matricielle
Mn	:	Manganèse
MTP	:	«Microsomal triglyceride transfer protein»
NADH	:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite
NF- κ B	:	«Nuclear factor-kappa B»
nm	:	Nanomètre
nNOS	:	Oxyde nitrique synthase neuronale
NO	:	Oxyde nitrique
NPC1L1	:	«Niemann Pick C1-like 1»
NR	:	Non radicalaire
O ₂	:	Oxygène moléculaire
O ₂ ⁻	:	Anion superoxyde
OH ⁻	:	Radical hydroxyle
ONOOH	:	Acide peroxyntrique
oxLDL	:	LDL oxydée
PA	:	«Plasminogen activator»
PAF	:	«Platelet activating factor»
PAF	:	«Platelet activating factor acetylhydrolase»
PAI-1	:	«Plasminogen activator inhibitor-1»
PC	:	Phosphatidylcholine

PDGF	:	«Platelet-derived growth factor»
PDI	:	«Protein disulfide isomerase»
PECAM-1	:	«Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1»
PG	:	Prostaglandine
PGI ₂	:	Prostacycline
PHGPx	:	Glutathion peroxydase des hydroperoxydes phospholipidiques
PKA	:	Protéine kinase A
PL	:	Phospholipides
PLA ₂	:	Phospholipase A ₂
PLTP	:	«Phospholipid transfer protein»
PMA	:	Phorbol myristate acétate
PON	:	Paroxonase
PPAR	:	«Proliferator-activated receptor»
PPRE	:	«PPAR response element»
PSGL-1	:	«P-selectin glycoprotein ligand-1»
RAGE	:	Récepteur des « Advanced glycation products »
RE	:	Réticulum endoplasmique
RNS	:	Dérivés réactifs de l'azote
ROO•	:	Radical peroxyde
ROS	:	Dérivés réactifs de l'oxygène
RXR	:	«Retinoic X receptor»
SCP-2	:	«Sterol carrier protein-2»

SOD	:	Superoxyde dismutase
SOD1	:	Cu,Zn-SOD cytosolique
SOD2	:	Mn-SOD mitochondriale
SOD3	:	Cu,Zn-SOD extracellulaire
SRA	:	«Scavenger receptor class A»
SR-AI/II	:	«Scavenger receptor class A type I/II»
SR-BI	:	«Scavenger receptor class B type I»
SREBP	:	«Sterol regulatory element binding protein»
STAT	:	Signal transducers and activators of transcription
TG	:	Triacylglycérol
TNF- α	:	«Tumor necrosis factor alpha»
tPA	:	« tissue plasminogen activator »
TXA ₂	:	Thromboxane
TZD	:	Thiazolidinediones
UI	:	Unités internationales
UV	:	Ultra-violet
VCAM-1	:	«Vascular cell adhesion molecule 1»
VLDL	:	Lipoprotéine de très faible densité
XDH	:	Xanthine déshydrogénase
XO	:	Xanthine oxydase
XOR	:	Xanthine oxydoréductase
Zn	:	Zinc

Pour ma famille...

Remerciements

Je désire tout d'abord remercier mon directeur de thèse, le Dr Emile Levy, pour son appui et son intelligence scientifique. Le Dr Levy a été mon mentor au cours de toutes ces années et il a su me donner goût à la recherche. Il m'a aussi appris qu'il est toujours possible de repousser ses limites un peu plus loin. Je crois ne jamais pouvoir lui exprimer assez toute ma reconnaissance et ma gratitude.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe du laboratoire, anciens et actuels, pour leur aide, leurs encouragements et leur amitié. Je souhaite remercier d'une manière toute particulière Carole, qui avec toute sa patience, m'a appris une panoplie de techniques et qui, dès le début, m'a honorée de sa précieuse amitié. Je remercie aussi tout spécialement Zola, pour son indispensable aide au quotidien, mais surtout pour son énorme support moral et sa fidèle amitié.

Je voudrais aussi remercier mes parents, pour leur amour et leur appui inconditionnels. Ils m'ont enseigné à ne jamais abandonner et je leur dois toute la gratitude au monde. Je remercie aussi ma sœur Marie-Eve, Jean et bébé Victor, pour leurs encouragements, leur amour et leur fierté. Je désire remercier tous mes amis pour leur appui et leurs encouragements. Enfin, je remercie amoureusement mon mari Leonard pour son soutien quotidien, ses précieux conseils et son amour.

1. INTRODUCTION

1.1 LIPIDES ET LIPOPROTÉINES

1.1.1 Lipides alimentaires

Les graisses constituent de 30 à 40% des calories ingérées dans une diète occidentale. Les triacylglycérols, ou triglycérides (TG), constituent la source majeure de lipides alimentaires (120-150 g/jour). Parmi les autres lipides diététiques, on retrouve les phospholipides (PL) (4-8 g/jour) et le cholestérol (CHOL) (300-500 mg/jour). Les lipides d'origine biliaire déversés dans la lumière intestinale constituent une source quantitativement plus importante de CHOL (800-1200 mg/jour) et de PL (10-20 g/jour). Enfin, la desquamation des cellules du tractus digestif fournit un apport en CHOL non négligeable (250-400 mg/jour) [1,2].

1.1.1.1 Acides gras

Un acide gras (AG) consiste en une chaîne d'atomes de carbone et d'hydrogène possédant, à une extrémité, un groupement carboxyle (-COOH) et à un autre un groupe méthyle. La chaîne des acides gras peut être saturée (absence de double liaison) ou non saturée (présence d'une ou de plusieurs doubles liaisons). La longueur de la chaîne peut varier entre 2 et 30 atomes de carbone, mais les acides gras alimentaires les plus communs sont composés de 12 à 22 carbones [3]. On peut classer les acides gras selon la longueur de leur chaîne : les acides gras à chaîne courte (2 à 4 carbones), à chaîne moyenne (5 à 12 carbones) et à chaîne longue (> 12 carbones) [4,5]. Les acides gras remplissent plusieurs

fonctions dans l'organisme, tant au niveau énergétique, structurel que fonctionnel [6].

1.1.1.2 Triacylglycérols

Généralement, on ne retrouve que très peu d'acides gras libres dans l'alimentation. La plupart du temps, trois chaînes d'acides gras se lient à une molécule de glycérol pour former un triacylglycérol, une molécule non polaire insoluble dans l'eau. Les acides gras peuvent se trouver à trois positions stéréochimiques différentes sur la molécule de glycérol, soit sn-1, sn-2 et sn-3. L'aspect hydrophobe des TG influence leurs processus de digestion, d'absorption et de transport dans l'organisme [7]. Les TG jouent un rôle énergétique très important, car ils constituent la principale réserve énergétique des adipocytes et servent de substrat immédiat pour livrer les acides gras à l'oxydation [6].

Figure 1. Molécules de glycérol et de triacylglycérol

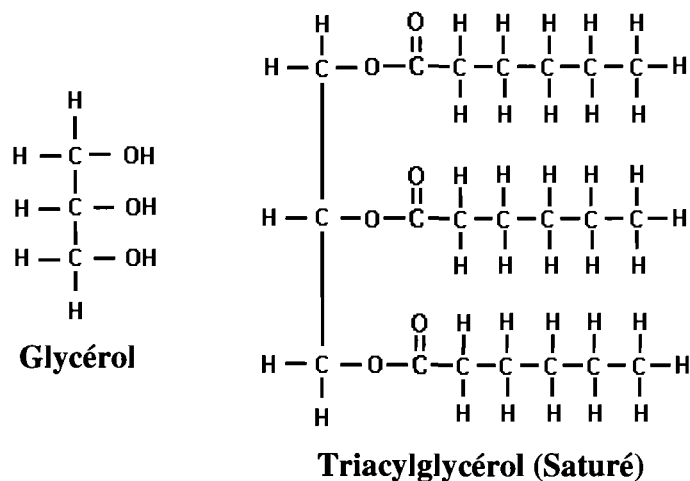


Figure 1 : La molécule de triacylglycérol est constituée de trois chaînes d'acides gras liés à un glycérol.

1.1.1.3 Phospholipides

Les phospholipides sont des molécules amphipatiques : ils peuvent interagir tant avec les milieux hydrophiles qu'hydrophobes. Ils sont composés d'un groupement phosphate qui constitue l'extrémité polaire, de deux chaînes d'acides gras représentant l'extrémité non-polaire, ainsi que d'un squelette de glycérol [7]. La phosphatidylcholine (PC) constitue le PL principal et est constituée d'un glycérol estérifié par l'acide phosphorique, de la choline et de deux acides gras. Étant amphipatiques, les PL sont des constituants fondamentaux des membranes plasmiques et des organites cellulaires et ils peuvent aussi servir de constituants énergétiques [6].

Figure 2. Molécule de phospholipide

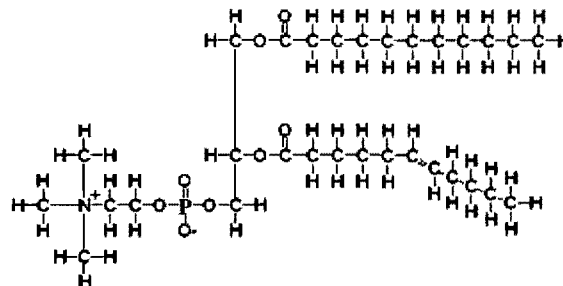


Figure 2 : Les phospholipides sont composés d'un groupement phosphate, de deux chaînes d'acides gras et d'un squelette de glycérol.

1.1.1.4 Cholestérol

Le cholestérol est une molécule composée d'atomes de carbone associés en forme de chaînes cycliques. Il est essentiel à la vie, car il est le principal constituant des membranes et le précurseur d'un grand nombre de stéroïdes [7]. Le CHOL peut être sous forme libre et lorsqu'un AG s'attache au groupement hydroxyle (-OH) du CHOL, il se trouve sous sa forme estérifiée. Le CHOL libre est une molécule amphipatique, mais les esters de CHOL sont pour leur part très hydrophobes [7].

Environ la moitié du CHOL de l'organisme est fourni par l'alimentation et le reste est synthétisé dans les différents tissus dont principalement le foie, l'intestin et la peau [6]. Les atomes de carbone utilisés pour la synthèse de cholestérol proviennent de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) et l'étape limitante de ce processus implique l'enzyme «3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme A» réductase (HMG-CoA réductase ou HMGR) [8]. Constituée d'une simple chaîne polypeptidique de 888 acides aminés, elle catalyse la réduction du HMG-CoA en coenzyme A et en mévalonate, réaction qui s'effectue via deux transferts successifs et qui nécessite deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite (NADPH). Il s'agit d'une enzyme hautement régulée : la transcription et la traduction de son gène sont diminuées quand les produits de la voie du mévalonate sont abondants et la dégradation de la protéine est augmentée lorsque les concentrations de stérols sont importantes [8]. L'activité de la HMG-CoA réductase est aussi modulée de manière post-transcriptionnelle par des processus de phosphorylation. *In vitro*, elle peut être phosphorylée par différentes

protéines kinases : la «AMP-activated protein kinase», la protéine kinase C et une protéine kinase dépendante de la calmoduline. Ces trois kinases ajoutent une molécule de phosphore au résidu S872, situé près de la portion C-terminale, et cette phosphorylation réduit l'activité de la protéine [8]. L'enlèvement du phosphate par la HMG-CoA phosphorylase réactive l'enzyme [8]. De plus, la HMG-CoA réductase est la cible de composés inhibiteurs appelés statines qui lient de façon compétitive le site actif de l'enzyme et qui sont efficaces pour faire diminuer les taux de cholestérol sanguins chez l'homme [8].

Le cholestérol constitue l'élément précurseur des hormones stéroïdiennes, comme les hormones sexuelles (œstrogène, testostérone) et les hormones surrénaliennes (progestérone) [6]. Il s'avère aussi un précurseur des acides biliaires qui sont essentiels à la digestion des lipides [6]. Par contre, le cholestérol ne participe pas aux fonctions énergétiques de l'organisme comme le font les TG et les PL [6].

Figure 3. Molécule de cholestérol

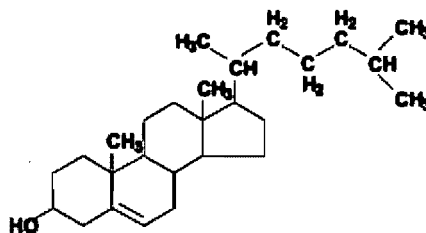


Figure 3 : La molécule de cholestérol est composée d'atomes de carbone associés en forme de chaînes cycliques. Il peut être sous forme libre, ou sous forme estérifiée, soit associé à un acide gras.

1.1.2 Digestion des lipides

Les lipides étant essentiellement hydrophobes, ils sont incompatibles avec les environnements aqueux de la lumière intestinale et de la circulation sanguine. De ce fait, ils doivent subir diverses transformations afin d'être digérés et absorbés, puis assemblés dans les lipoprotéines afin d'être transportés dans le sang.

Le processus de digestion est nécessaire pour transformer les aliments absorbés en leur plus petite unité. Lors de la phase digestive des graisses, deux processus interdépendants sont impliqués : l'hydrolyse des lipides par les enzymes hydrolytiques et la dispersion micellaire des produits de la lipolyse par les acides biliaires [1].

1.1.2.1 Hydrolyse des lipides

Chez l'humain, l'hydrolyse des TG débute dans l'estomac par l'action de la lipase gastrique. Cette enzyme agit principalement sur les liens en position sn-1 et sn-3 pour les AGCL alors qu'elle hydrolyse également les AGCM en position sn-1, sn-2 et sn-3 [4]. L'activité de la lipase gastrique est retrouvée principalement dans le fundus de l'estomac avec un pH optimal se situant entre 3,0 et 6,0 [2]. Cette hydrolyse engendre deux acides gras libres et un β -monoglycéride (2-MG). Toutefois, cette enzyme ne participe pas à l'hydrolyse des PL et des esters de CHOL [4]. À ce stade de la digestion, l'émulsion lipidique consiste en de grosses particules stabilisées par les produits de la lipase gastrique, tels les AG, les 2-MG et les PL [5]. L'émulsion gastrique ainsi formée

est indispensable pour permettre subséquemment une hydrolyse efficace des lipides par la lipase pancréatique [4].

Les AG contenus dans le chyme gastrique stimulent la libération de cholecystokinine (CCK) par les entérocytes de la muqueuse duodénale, ce qui provoque l'excrétion simultanée des enzymes pancréatiques et des composantes biliaires, soit les acides biliaires, le CHOL et les PL [2]. En effet, la CCK stimule la contraction de la vésicule biliaire, laquelle déverse la bile dans le duodénum. Les sels biliaires ont un pouvoir émulsifiant, dispersant ainsi les lipides et diminuant la taille des gouttelettes lipidiques [2]. Cette action permet d'augmenter la surface d'exposition des gouttelettes aux enzymes lipolytiques, stimulant davantage la lipolyse [2].

La lipase pancréatique qui est déversée dans le duodénum consiste en la principale enzyme pour la digestion des TG, assurant de 70 à 75% de l'hydrolyse totale des TG et des diglycérides (DG). Elle scinde les AGCL des positions sn-1 et sn-3 des TG, libérant ainsi les AG libres et le 2-MG [4]. La lipase pancréatique est activée lorsqu'elle se retrouve à l'interface des phases aqueuse et lipidique, mais les gouttelettes lipidiques couvertes de sels biliaires ne sont pas accessibles à l'enzyme; pour demeurer efficace, son association à une co-enzyme devient alors nécessaire. La co-lipase se lie aux sels biliaires et à la lipase dans un ratio moléculaire de 1:1, permettant à la lipase pancréatique d'interagir avec les TG [9]. Cette co-enzyme est sécrétée par le pancréas comme une pro-lipase qui, suite à son entrée dans la lumière de l'intestin, est clivée par l'action de la trypsine en une co-lipase et un pentapeptide nommé entérostatine [2,4,9].

Les PL, principalement les phosphatidylcholines, sont hydrolysés dans l'intestin grêle par l'action de la phospholipase A₂ (PLA₂) pancréatique. Cette enzyme scinde le lien de l'AG situé en position 2 seulement, libérant ainsi un AG et un lyso-PL, ce dernier détenant un rôle important dans la solubilisation des autres produits de la digestion lipidique [2,4,10]. La PLA₂ est sécrétée en tant que pro-enzyme dans le jus pancréatique, puis elle est activée dans l'intestin par la trypsine [4].

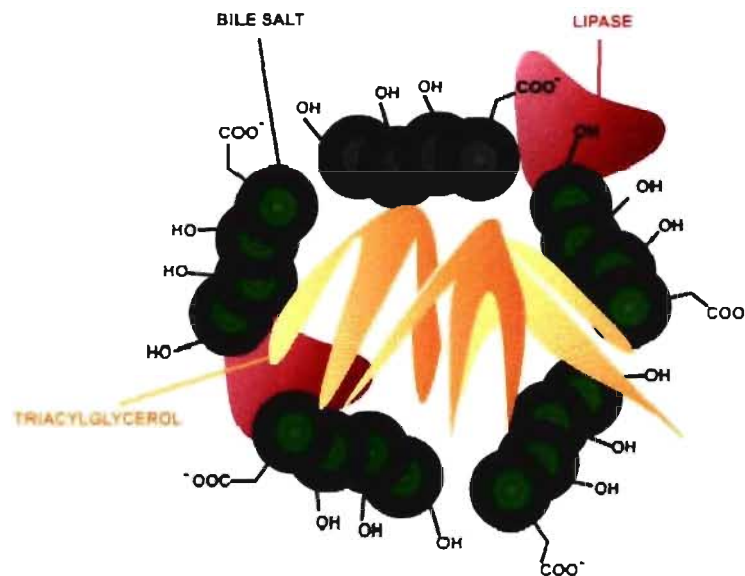
Seulement 10 à 15% du CHOL alimentaire se retrouve sous forme d'esters de CHOL [4]. Ainsi, la majorité du CHOL absorbé ne requiert pas d'hydrolyse pancréatique. Le cholestérol estérifié doit pour sa part être hydrolysé dans l'intestin par une enzyme d'origine pancréatique, la cholestérol estérase, afin que le CHOL libre puisse être absorbé [5].

1.1.2.2 Émulsification et solubilisation micellaire

Les micelles sont essentielles à l'absorption des lipides par les entérocytes, car elles permettent de garder en solution les produits provenant de la digestion des lipides qui seraient autrement insolubles [7]. Les TG étant non polaires, ils s'agrègent en grosses gouttelettes lipidiques, ce qui limite l'action des enzymes lipolytiques. Le processus de dispersion de ces grosses gouttelettes en petites particules est appelé émulsification. Les sels biliaires, produits par le foie et déversés dans le duodénum, constituent le principal agent émulsifiant, séparant ainsi les lipides et les empêchant de s'agréger [11].

Les produits de l'hydrolyse des lipides (2-MG et AG) s'associent avec les sels biliaires et forment de petites gouttelettes émulsifiées appelées micelles. À l'intérieur de celles-ci, les portions non polaires des sels biliaires s'associent avec le centre lipidique non polaire, laissant les portions polaires exposées à la surface interagir avec le milieu aqueux [4,12].

Figure 4. Micelle



Tiré de : www.med.unibs.it

Figure 4 : Les micelles sont constituées de sels biliaires, de triacylglycérols et de lipase pancréatique.

1.1.3 Absorption intestinale des lipides

Une fois le processus de digestion effectué, les lipides contenus dans les micelles sont absorbés par les entérocytes. La quasi-totalité des lipides alimentaires est absorbée dans le duodénum et dans le jéjunum [1]. La partie restante de l'intestin grêle sert de réserve d'absorption dans les cas où la quantité des graisses est trop élevée par rapport à la capacité de digestion et d'absorption [1].

1.1.3.1 Passage transmembranaire

Afin que les lipides contenus dans les micelles soient absorbés par la cellule épithéliale intestinale, ils doivent d'abord être dissociés des sels biliaires. À la surface de la bordure en brosse des entérocytes, existe un microclimat acide (pH 5,3 – 6,0) créé par les échanges Na^+/H^+ de la membrane. Cette acidité entraîne une diminution de la solubilité des micelles, ce qui permet aux AG de s'y dissocier et d'être transportés à travers la membrane microvillositaire de l'entérocyte [2,5]. Les 2-MG, les lyso-PC et le CHOL sont aussi transférés à travers les microvillosités, mais les acides biliaires sont pour la plupart absorbés au niveau de l'iléum terminal, puis transportés dans la veine porte jusqu'au foie [2].

Il semble que deux mécanismes agissent en complémentarité pour permettre aux lipides de traverser la membrane microvillositaire des entérocytes : la diffusion simple et le transport actif qui implique des transporteurs

membranaires [13,14]. Ainsi, les AG non chargés se déplacent de façon rapide et spontanée à travers la membrane plasmique, grâce à un mouvement de « flip-flop » non dépendant de l'énergie. Cette diffusion simple serait le résultat du gradient de concentration créé par l'abondance de lipides dans la lumière intestinale et leur faible concentration dans le milieu cytosolique [15]. Par contre, diverses évidences suggèrent la présence de transporteurs des acides gras sur la membrane apicale. Entre autres, la captation des acides gras par l'entérocyte apparaît être un procédé saturable et les mécanismes de « flip-flop » seuls semblent insuffisants pour satisfaire les besoins métaboliques de la cellule [16]. D'une manière similaire, la diffusion passive du CHOL relevait du modèle classique proposé [17], mais l'implication de protéines membranaires semble maintenant bien évidente.

Divers transporteurs membranaires des produits lipolytiques sont étudiés et les connaissances dans le domaine progressent d'années en années. La « Fatty acid binding protein » de la membrane plasmique (FABPpm) est une protéine de 40 kDa présente dans les tissus ayant un flux élevé d'acides gras, comme l'épithélium intestinal. Elle lie avec une grande affinité les AGCL, les lyso-PC, les 2-MG et le CHOL et elle pourrait faciliter leur transport membranaire [18,19].

La « Fatty acid-transport protein 4 » (FATP4), est largement exprimée dans l'intestin grêle et serait un transporteur important des acides gras dans cet organe [18,20].

Une des protéines candidates pour le transport transmembranaire du cholestérol est la lipase carboxyle ester, anciennement la cholestérol estérase pancréatique. Cependant, les souris chez lesquelles le gène de cette enzyme a été invalidé absorbent le CHOL avec la même efficacité que les souris contrôles [21], ce qui amène à se questionner sur le rôle physiologique réel de cette enzyme dans le transport de cholestérol.

Une autre protéine qui pourrait exercer les fonctions de transporteur de cholestérol au niveau intestinal est le «Scavenger receptor class B type I» (SR-BI). En effet, des études indiquent que cette protéine est présente au niveau de l'intestin humain et des cellules Caco-2 [22] et que les incubations des cellules avec des anticorps anti-SR-BI inhibent partiellement l'entrée de cholestérol libre et estérifié [23]. Dans le même modèle cellulaire, il a aussi été démontré que le SR-BI de la membrane apicale est modulé par différents effecteurs nutritionnels, hormonaux et inflammatoires [24]. De plus, la surexpression intestinale de SR-BI chez la souris a entraîné l'augmentation de l'absorption de cholestérol [25]. Néanmoins, des études additionnelles sont nécessaires pour permettre de confirmer le rôle du SR-BI comme transporteur microvillositaire de cholestérol dans l'intestin [26].

La «Fatty acid translocase» (FAT/CD36), une protéine clef du transport des acides gras à chaîne longue dans le muscle squelettique et le cœur, est aussi fortement exprimée dans les entérocytes. Les délétions ciblées pour ce gène chez les souris indiquent que la CD36 pourrait faciliter la captation intestinale des acides gras et du cholestérol. Par exemple, on rapporte chez ces souris une

diminution du transport lymphatique de cholestérol alimentaire, de l'apolipoprotéine (apo) B-48 et de l'assemblage des chylomicrons [27,28]. Le rôle de la CD36 dans le transport membranaire intestinal de ces produits lipolytiques reste toutefois à être prouvé de manière non équivoque [26].

Une protéine ayant attiré l'attention des chercheurs dans le domaine de l'absorption intestinale du cholestérol est la «Niemann Pick C1-like 1» (NPC1L1) qui pourrait potentiellement constituer la cible moléculaire de l'ezetimibe [29]. L'ezetimibe est une drogue qui inhibe de manière spécifique le transport de cholestérol et des phytostérols à travers la bordure en brosse des entérocytes et dont l'administration permet de diminuer les niveaux de LDL-cholestérol de 15 à 25% [30]. La NPC1L1 est exprimée de manière abondante dans le petit intestin des animaux, et les souris présentant une déficience pour cette protéine ont une réduction marquée de l'absorption de cholestérol [31]. Des études effectuées sur le modèle intestinal Caco-2 ont aussi permis de supporter le rôle de la NPC1L1 dans le transport de cholestérol chez l'humain [26].

1.1.3.2 Transport intracellulaire

En période post-prandiale, les molécules lipidiques exogènes et endogènes sont assemblées par l'intestin dans une lipoprotéine appelée chylomicron. Le processus d'assemblage des chylomicrons est très complexe et n'est pas encore entièrement élucidé.

Le transfert des lipides depuis la bordure en brosse jusqu'au réticulum endoplasmique (RE) à travers le milieu cytosolique aqueux requiert l'implication de transporteurs protéiques, afin de contrer le caractère hydrophobe des lipides. Deux «Fatty acid binding protein» cytosoliques (FABPc) semblent être impliqués dans le transport navette des AG, des MG et des lyso-PL à l'intérieur du cytosol : la «intestinal-FABP» (I-FABP) et la «liver-FABP» (L-FABP). La I-FABP est une protéine de 15 kDa composée de 132 acides aminés, exclusivement exprimée dans le grêle, tandis que la L-FABP, de 14,3 kDa et 127 acides aminés, est aussi exprimée dans le foie et les reins [32,33]. Le rôle de ces protéines dans le transport cytosolique des lipides n'est pas encore très bien compris, mais il est possible qu'elles aient des fonctions physiologiques différentes. Il a déjà été proposé que la I-FABP soit impliquée dans le transport des acides gras se dirigeant vers la synthèse et la sécrétion des TG, alors que la L-FABP soit engagée de manière préférentielle dans la synthèse des PL et la régulation des gènes par les AG [34]. Toutefois, les études récentes effectuées sur les modèles cellulaires et les animaux ne supportent pas un rôle substantiel de la I-FABP dans le transport cellulaire des lipides dans l'intestin [35]. Des études ultérieures pourront permettre de définir les rôles cellulaires exacts de ces protéines.

D'autres transporteurs cytosoliques font aussi l'objet d'études, telle la «Sterol carrier protein-2» (SCP-2) (13 kDa) qui joue différents rôles au niveau du métabolisme du CHOL. *In vitro*, la SCP-2 permet le transfert de CHOL et des PL entre les membranes [36,37] et elle pourrait entre autres participer aux processus de transport intracellulaire et d'estérification [37]. Finalement, l'«Acyl-

Coenzyme A binding protein» (ACBP) (10 kDa), distribuée de façon ubiquitaire dans les organes, possède une affinité de liaison élevée pour les esters d'acyl-CoA à chaîne moyenne et longue et divers résultats expérimentaux *in vitro* et *in vivo* indiquent que l'ACBP peut agir comme un transporteur intracellulaire d'acyl-CoA [38,39].

Table 1. Principaux transporteurs des lipides dans les entérocytes

Transporteur	Substrat de liaison	Rôle
<i>FABPpm</i>	AGLC, Lyso-PL, 2-MG, CHOL	Transport membranaire
<i>FATP4</i>	AG	Transport membranaire
<i>Lipase carboxyle ester</i>	CHOL	Transport membranaire
<i>SR-BI</i>	CHOL	Transport membranaire
<i>FAT/CD36</i>	AG, CHOL	Transport membranaire
<i>NPC1L1</i>	CHOL	Transport membranaire
<i>I-FABP</i>	AG, 2-MG, Lyso-PL	Transport cytosolique vers la synthèse des TG
<i>L-FABP</i>	AG, 2-MG, Lyso- PL	Transport cytosolique vers la synthèse des PL et des acides gras pour la régulation génique
<i>SCP-2</i>	CHOL, PL	Transport intracellulaire
<i>ACBP</i>	Esters d'acyl-CoA	Transport intracellulaire

1.1.3.3 Réestérification des lipides

Les produits lipolytiques transportés jusqu'à la membrane du réticulum endoplasmique y sont réesterifiés, c'est-à-dire qu'il y a resynthèse des triacylglycérols, des phospholipides et des esters de cholestérol.

1.1.3.3.1 Triacylglycérols

La resynthèse des TG passe tout d'abord par une acylation des AG sous forme d'acyl coenzyme A par une acyl-CoA synthétase dans le réticulum endoplasmique. La réestérification des TG peut s'effectuer selon deux mécanismes d'action. La première voie de synthèse est la voie du 2-monoacylglycérol [40]. Par l'action de l'enzyme monoacylglycérol acyltransférase (MGAT), le 2-MG est tout d'abord acylé en DG qui subit à son tour une acylation en TG par la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) [40,41]. La deuxième voie de synthèse des TG est appelée la voie de l' α -glycérophosphate [42]. Elle implique tout d'abord l'acylation du glycérol-3-phosphate par l'action de l'enzyme glycérophosphate acyltransférase (GPAT) afin de former l'acide phosphatidique. Ce dernier est hydrolysé en DG en présence de la phosphatidate phosphohydrolase, puis le DG est converti en TG. Cette deuxième voie s'active lorsque les 2-MG ne sont pas disponibles ou lors du jeûne, car la présence de 2-MG et des AG en quantités suffisantes favorise surtout la voie des monoglycérides [42,43]. Le processus de synthèse des TG implique donc les enzymes clefs MGAT, DGAT et GPAT qui permettent la lipogénèse au niveau de l'intestin, mais aussi au niveau du foie et du tissu adipeux. Leur activité et leur

contribution respectives varient en fonction des besoins des tissus et de la disponibilité des substrats [44].

À ce jour, deux enzymes DGATs structurellement distinctes ont été clonées chez les mammifères, la DGAT1 et la DGAT2, qui sont toutes deux exprimées dans le petit intestin. La DGAT2, aussi retrouvée entre autres au niveau du foie, semble essentielle à la vie : les souris déficientes en DGAT2 ne sont pas viables plus de 8 heures après la naissance [40,45,46]. Il est postulé que la DGAT2 soit engagée dans la synthèse des TG pour la mise en réserve cellulaire [40]. La DGAT1 constitue pour sa part l'isoforme le plus abondant dans l'intestin et serait importante dans le transport des lipides pour la formation des lipoprotéines [40,45,46].

De la même manière, trois isoformes de MGATs ont été reconnus : MGAT1, MGAT2 et MGAT3. La MGAT1 a été détectée dans l'estomac, les reins, le tissu adipeux et le foie, mais elle est absente du petit intestin [47-49]. Les MGAT2 et MGAT3, subséquentement identifiées, sont abondamment exprimées au niveau intestinal. Il semble que ces isoformes possèdent une grande activité dans ce tissu et qu'elles soient impliquées de manière importante dans l'absorption des graisses alimentaires [47-49].

Figure 5. Réestérification des triacylglycérols

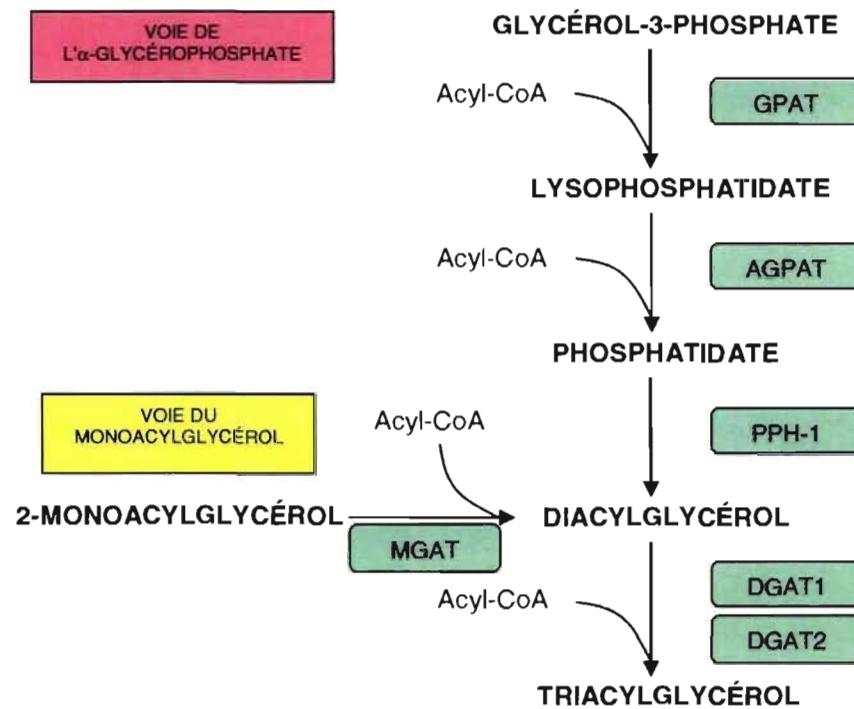


Figure 5 : La première voie de resynthèse des TG est la voie du monoacylglycérol. Le 2-MG est tout d'abord acylé en DG par l'action de la MGAT. Le DG subit à son tour une acylation en TG par la DGAT. La deuxième voie de synthèse est celle de l'α-glycérophosphate. Elle consiste en l'acylation du glycérol-3-phosphate par l'action de la GPAT pour former l'acide phosphatidique, qui est hydrolysé en DG en présence de la phosphatidate phosphohydrolase, puis le DG est converti en TG par l'action de la DGAT.

1.1.3.3.2 Phospholipides

Les lyso-PL, issus de l'hydrolyse par la phospholipase A₂, sont réacétylés par les enzymes lyso-PL acyltransférases [2]. Une portion des lyso-PC absorbés peuvent être hydrolysés pour former un acide gras et le glycéro-3-phosphorylcholine. L'AG ainsi libéré peut être utilisé pour la synthèse de TG et le glycéro-3-phosphorylcholine est transporté vers le foie pour utilisation [4]. De plus, deux molécules de lyso-PC peuvent être combinées pour former une molécule de PC et une molécule de glycéro-3-phosphorylcholine [2].

Figure 6. Réestérification des phospholipides

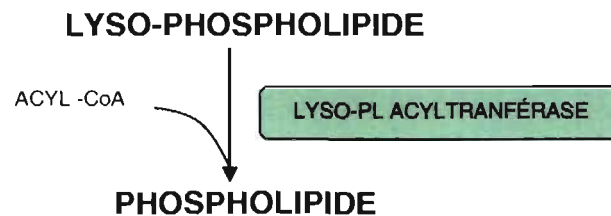


Figure 6 : Les lyso-PL sont acétylés par les enzymes lyso-PL acyltransférases.

1.1.3.3.3 Cholestérol

Les deux enzymes impliquées dans la réestérification du CHOL sont la cholestérol estérase et l'« Acyl-Coenzyme A cholesterol acyl transférase » (ACAT). Tel que préalablement indiqué, la première enzyme faciliterait, en plus de la réestérification, le déplacement des lipides dans l'entérocyte en les dirigeant

vers leur site fonctionnel intracellulaire et serait impliquée dans la captation microvillositaire du CHOL [2]. Pour sa part, l'ACAT catalyserait la synthèse d'esters de CHOL à partir du CHOL libre et de l'acyl CoA [50]. Le processus de réestérification intracellulaire est un phénomène physiologique très important, car approximativement 75% du CHOL nouvellement absorbé est retrouvé dans les chylomicrons (CM) sous la forme estérifiée [17].

Deux formes de ACATs, appelées ACAT1 et ACAT2, ont été identifiées dans différents tissus. L'ACAT1 est une protéine membranaire d'environ 65 kDa qui est ubiquitairement distribuée dans les tissus et principalement localisée au niveau du RE [51]. Chez l'humain, on la retrouve en grandes concentrations dans les macrophages et les cellules productrices d'hormones stéroïdiennes, mais elle est aussi détectable dans les hépatocytes et les entérocytes. L'ACAT2, qui possède environ 40% d'identité avec l'ACAT1, est principalement exprimée dans le foie et l'intestin grêle et elle semble constituer la forme prédominante dans les cellules de l'épithélium intestinal humain [52]. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que l'ACAT1 aurait pour fonction principale la synthèse des esters de CHOL utilisés dans la mise en réserve de gouttelettes cytosoliques de CHOL et que l'ACAT2 serait fonctionnellement associée aux esters de CHOL contenus dans les particules lipoprotéiques [50,53].

1.1.3.4 Assemblage des lipoprotéines intestinales

Afin d'être libérés dans la circulation, les lipides non polaires ayant été resynthétisés doivent être incorporés dans les lipoprotéines, des particules de transport pouvant interagir avec le milieu aqueux. L'intestin grêle a la capacité de sécréter la plupart des lipoprotéines : les chylomicrons, les lipoprotéines de très faible densité (VLDL, de l'anglais «Very low density lipoproteins») et les lipoprotéines de haute densité (HDL, de l'anglais «High density lipoproteins»). Toutefois, les CM sont les lipoprotéines majoritairement et exclusivement sécrétées par les entérocytes, constituant ainsi les principaux véhicules des graisses alimentaires et des vitamines liposolubles [5]. Les CM sont principalement composés de TG (85-88%), de PL (~ 8%) et de CHOL (~ 5%) [7]. Les protéines associées aux CM nouvellement synthétisés par la cellule sont les apolipoprotéines B-48, A-I, A-IV et C-III. Toutefois, c'est l'apo B-48 qui constitue la protéine structurale des CM indispensable à leur assemblage et à leur exocytose cellulaire [7].

1.1.3.4.1 « Editing » de l'apo B

L'apo B est une grande glycoprotéine essentielle à l'assemblage et à la sécrétion des lipides dans le foie et l'intestin. Deux formes d'apo B existent chez les mammifères : 1) l'apo B-100, une protéine de 4536 acides aminés, est synthétisée principalement dans le foie chez l'humain et 2) l'apo B-48, synthétisée exclusivement dans l'intestin grêle, est formée des 2152 résidus amino terminal de l'apo B-100 [51]. L'apo B-48 est le résultat d'une

modification post-transcriptionnelle de l'acide ribonucléique messager (ARNm) qui s'effectue dans l'intestin des mammifères et qui est appelée « editing » de l'apo B. Ce processus requiert la désamination d'une cytidine spécifique en position 6666, formant ainsi une uridine et entraînant, au codon 2153, la conversion d'une glutamine (CAA) en un codon stop (UAA) [2]. Cette conversion cytidine → uridine implique un complexe enzymatique dont l'«apoB mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 1» (APOBEC-1), une cytidine déaminase de 27 kDa, constitue la sous-unité catalytique [2,51]. Les deux types d'apo B sont exprimés dans le petit intestin, l'apo B-48 étant essentielle pour la formation des chylomicrons et l'apo B-100 permettant, à plus petite échelle, la formation de VLDL intestinaux [54].

1.1.3.4.2 Lipidation de l'apo B et formation des chylomicrons

Lors de la formation des lipoprotéines, les TG positionnés sur la membrane externe du RE sont internalisés dans la lumière et forment des gouttelettes lipidiques. Subséquemment, les gouttelettes s'associent aux PL et aux apos. Il est important de noter que les lipides sont synthétisés dans le RE lisse, tandis que les apos le sont dans le RE rugueux [10]. Le transfert des TG, des PL et des esters de CHOL à l'apo B-48 nécessite l'action de la « Microsomal triglyceride transfer protein » (MTP), une protéine hétérodimère composée d'une grosse sous-unité de 97 kDa conférant au complexe son activité de transfert des lipides, et du « Protein disulfide isomerase » (PDI), une enzyme multifonctionnelle de 58 kDa nécessaire à la formation de l'ensemble du

complexe soluble et actif [55]. La MTP joue un rôle important dans le processus d'assemblage des CM. En effet, l'apo B doit être lipidée en cours de synthèse afin de ne pas être dégradée par le protéasome [56]. La MTP assure ce rôle de lipidation, transférant les lipides de la membrane du RE jusqu'à l'apo B en cours de synthèse. D'après le modèle proposé à ce jour, l'assemblage des chylomicrons comporte deux étapes principales [57]. Dans une première étape, l'apo B-48 est lipidée grâce à la MTP et il y a formation d'une petite particule dense. Dans une deuxième étape, les lipides sont ajoutés à la particule naissante, soit par la fusion avec une gouttelette lipidique riche en TG, soit par l'ajout de molécules individuelles, soit par les deux. Le rôle de la MTP dans la première étape est assurément crucial, mais sa contribution dans la deuxième étape n'est pas certaine. En effet, l'équipe de Gordon a observé que l'inhibition de la MTP bloque la lipidation de l'apo B, mais n'exerce aucun effet sur la deuxième étape [58]. À la suite de la lipidation de l'apo B, les autres apos sont ajoutées à la surface des particules riches en TG, qui sont alors appelées pré-chylomicrons [57].

Figure 7. Assemblage des pré-chylomicrons dans le réticulum endoplasmique

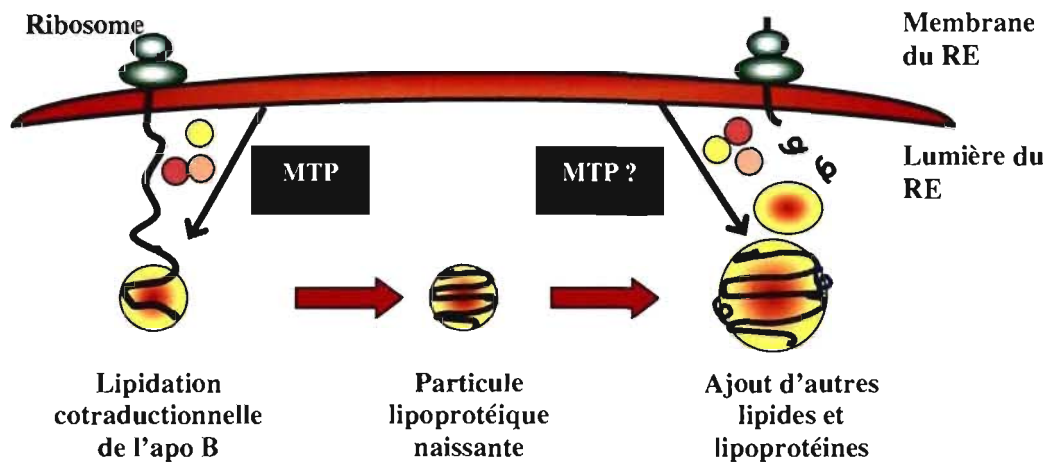


Figure 7 : L'assemblage des pré-chylomicrons comporte deux étapes principales. Dans une première étape, l'apo B-48 est lipidée grâce à la MTP et il y a formation d'une petite particule dense. Dans une deuxième étape, les lipides sont ajoutés à la particule naissante, soit par la fusion avec une gouttelette lipidique riche en TG, soit par l'ajout de molécules individuelles, soit par les deux. Le rôle de la MTP dans la deuxième étape n'est pas certain.

Les pré-CM sont par la suite transportés jusqu'à l'appareil de Golgi. Ce mouvement intracellulaire pourrait s'effectuer par des vésicules COPII, connues pour effectuer le transport cargo de molécules du RE vers le Golgi. Ces vésicules bourgeonneraient des tubules du RE lisse pour fusionner avec l'appareil de Golgi [59]. De plus, l'identification des mutations génétiques impliquées dans la maladie de rétention des chylomicrons indique que la protéine Sar1b jouerait un rôle crucial dans ce processus [60].

Des modifications importantes sont apportées aux pré-CM dans l'appareil de Golgi. À cet endroit, la composition en PL des particules est modifiée et la glycosylation des apos, entamée dans le RE rugueux, est complétée, conférant au CM sa maturité et permettant son exocytose [7]. Afin d'être sécrétés, les CM sont acheminés à travers le cytosol dans des vésicules dérivées de l'appareil de Golgi. Les vésicules golgiennes migrent vers la membrane basolatérale et les lipoprotéines peuvent alors être déchargées dans l'espace intercellulaire. Les membranes des vésicules golgiennes ne sont pas sécrétées avec les lipoprotéines et il est possible que ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique. Les CM sont ensuite déversés dans le canal chylifère et transportés dans la lymphe, aboutissant finalement dans la circulation sanguine [7,60].

Figure 8. Formation des chylomicrons

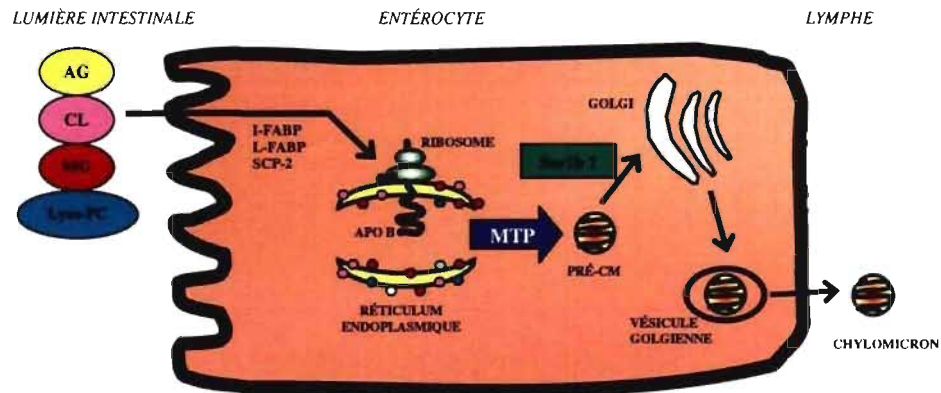


Figure 8 : Pour qu'il y ait formation des chylomicrons, les lipides alimentaires doivent être transportés à travers la membrane apicale, puis dans le cytosol. Ils sont par la suite réestérifiés sur la membrane du RE, puis assemblés en pré-chylomicrons par l'action de la MTP. Ces pré-CM sont transportés à l'appareil de Golgi pour y subir des modifications, dont la glycosylation, puis acheminés à travers le cytosol dans des vésicules golgiennes. Les CM sont déchargés dans les canaux chylifères, du côté basolatéral des entérocytes.

Figure 9. Chylomicron

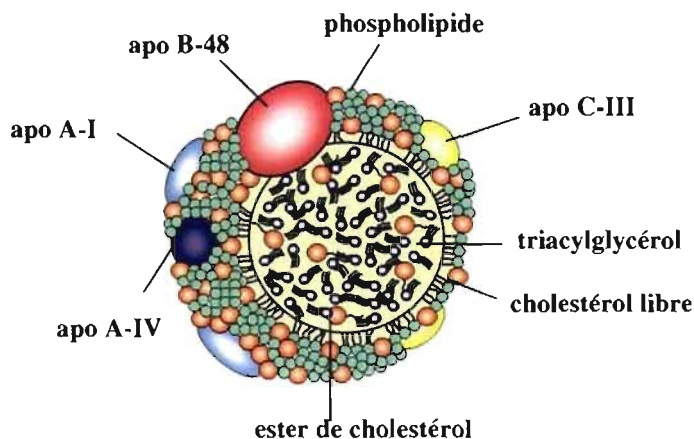


Figure 9 : Les chylomicrons sécrétés par les entérocytes sont principalement constitués de triacylglycérols, de phospholipides, de cholestérol libre, des esters de cholestérol et des apos B-48, A-I, A-IV et C-III.

1.1.3.5 Autres lipoprotéines intestinales

En période de jeûne, l'entérocyte produit les VLDL intestinales qui transportent principalement des lipides endogènes provenant de la dégradation des cellules dans la lumière de l'intestin, de la bile et des AG dérivés du plasma et qui sont composés des mêmes apos que les CM [56]. Ainsi, ces lipoprotéines ont une composition chimique et un catabolisme se rapprochant plus des CM que des VLDL d'origine hépatique [2].

En plus de la production de lipoprotéines riches en TG, l'intestin grêle a la capacité de synthétiser de petites particules de haute densité (<1.21 g/ml) de forme discoïdale. Leur métabolisme est encore peu connu, mais elles sont

considérées comme des HDL naissantes et sont principalement composées de PL, d'esters de CHOL et des apos A-I et A-IV [2]. De plus, certaines lignées de cellules intestinales sont capables de former les lipoprotéines de faible densité (LDL, de l'anglais «Low density lipoproteins») [7,61].

1.1.4 Transport et métabolisme des lipides dans la circulation

Le transport des lipides dans la circulation sanguine requiert la formation des lipoprotéines. Ces dernières constituent un spectre continu de particules possédant différentes tailles, densités, compositions et fonctions. Les constituants protéiques des lipoprotéines sont appelés apolipoprotéines et permettent d'améliorer la solubilité des particules ainsi que leur reconnaissance par les enzymes et les récepteurs cellulaires. Les lipoprotéines diffèrent dans leur composition, quoiqu'elles possèdent toutes des apolipoprotéines hydrophiles, des PL et du CHOL, dont les extrémités polaires sont en contact avec l'interface aqueux; et elles renferment toutes un centre hydrophobe composé de TG et d'esters de CHOL. Les classes majeures des lipoprotéines sont : les chylomicrons, les VLDL, les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL, de l'anglais «Intermediary density lipoproteins»), les LDL, ainsi que les HDL₂ et les HDL₃ [62]. Certaines de leurs caractéristiques principales sont présentées dans le tableau 2.

Table 2. Caractéristiques des lipoprotéines

<i>Lipoprotéines</i>	<i>Composition (% masse)</i>					<i>Apoprotéines principales</i>	<i>Densité</i>	<i>Taille (nm)</i>
	P	PL	CL	CE	TG			
Chylomicrons	2	5	1	2	90	B-48, C, E	<0.95	100-1000
VLDL	10	16	7	13	54	B-100, C, E	0.95-1.006	30-70
IDL	17	20	9	34	20	B-100, C, E	1.006-1.019	25
LDL	23	21	11	41	4	B-100	1.019-1.063	20
HDL₂	42	35	5	13	5	A-I, A-II	1.063-1.125	10
HDL₃	72	20	2	5	1	A-I	1.125-1.21	8

P: protéines, PL: phospholipides, CL: cholestérol libre, CE: cholestérol estérifié, TG: triacylglycérols.

Adapté de [62]

1.1.4.1 Chylomicrons

Les chylomicrons sécrétés par les entérocytes dans les vaisseaux lymphatiques rejoignent la circulation sanguine par la veine porte. Ils représentent la première lipoprotéine en période post-prandiale. Leur fonction consiste à transporter et à distribuer des lipides (surtout les TG) endogènes et exogènes. En circulation, les CM adhèrent aux molécules glycoaminoglycanes des cellules endothéliales, entraînant l'hydrolyse des TG par l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) [63]. Pour ce faire, les CM en circulation doivent acquérir, après interaction avec d'autres lipoprotéines plasmatiques, l'apo C-II qui agit comme co-facteur de la LPL et l'active [5,56]. La LPL est une enzyme

centrale dans le métabolisme lipidique, car elle catalyse l'hydrolyse des TG transportés dans la circulation sanguine dans les CM et les VLDL, fournissant de ce fait des AG et des 2-MG pour l'utilisation par les tissus. La surface luminale des vaisseaux sanguins, auxquels l'enzyme est attachée via les protéoglycanes héparane sulfate, constitue le site physiologique de l'action de la LPL [64].

Les acides gras libérés lors de la lipolyse sont utilisés comme source d'énergie ou sont mis en réserve par les tissus adipeux. Ainsi, dans la circulation, les chylomicrons s'appauvrissent de leur contenu en TG. Momentanément, les chylomicrons s'enrichissent relativement en esters de CHOL cédés par les particules HDL et LDL, auxquelles ils transfèrent une petite partie de leurs TG [4]. Cet échange bidirectionnel est permis par la « cholesteryl ester transfer protein » (CETP), une glycoprotéine présente en circulation qui a la capacité de transférer les lipides neutres (esters de CHOL et TG), et dans une moindre ampleur les PL, entre les lipoprotéines plasmatiques riches en TG (chylomicrons et VLDL) et les HDL [62,65]. Les changements apportés aux CM en circulation induisent une perte d'affinité pour les apos C et A, qui se détachent alors de la particule.

Les particules restantes sont nommées résidus de chylomicrons (de l'anglais «chylomicron remnants») qui acquièrent rapidement l'apo E des HDL. Ces résidus de CM se lient à des récepteurs, appelés récepteurs B/E (ou récepteurs de LDL), qui reconnaissent l'apo E et qui sont situés dans l'espace de Disse des cellules hépatiques [66]. Une fois captés par le foie, il y a internalisation des résidus et dégradation de toutes leurs composantes dans les

lysosomes des hépatocytes [56]. Ainsi, l'acquisition des apolipoprotéines C-II et E est primordiale pour le métabolisme et l'élimination des chylomicrons en circulation.

1.1.4.2 Lipoprotéines de très haute densité (VLDL)

Les particules VLDL fabriquées par le foie contiennent quatre classes majeures de lipides : les PL et le CHOL, qui se retrouvent à la surface des particules, et les TG et les esters de CHOL, qui sont contenus dans le centre de la particule en quantités variables [67]. Les VLDL sont sécrétées par les hépatocytes du foie en réponse à une synthèse endogène de TG ; l'assemblage des VLDL est étroitement relié à la quantité de TG contenus dans les hépatocytes. La plupart des TG transportés dans le plasma lors de la phase post-prandiale sont associés aux VLDL [62]. De plus, les hydrates de carbonés ont la capacité d'induire les gènes de la lipogénèse et stimulent la synthèse hépatique des VLDL [68].

1.1.4.2.1 Assemblage et sécrétion des VLDL

Chez les humains, l'apo B-48 participe à l'assemblage des chylomicrons par l'intestin, alors que l'apo B-100 est plutôt impliquée dans l'assemblage des VLDL par le foie [2]. Malgré de petites différences possibles dans les processus d'assemblage des CM et des VLDL, le mécanisme de base semble être le même, impliquant deux étapes relativement bien définies. Dans la première étape, deux

précurseurs des VLDL sont produits simultanément et indépendamment : les particules pré-VLDL contenant l'apo B-100 et les gouttelettes lipidiques de la taille des VLDL [69,70]. Dans la deuxième étape, les précurseurs de VLDL comportant l'apo B-100 fusionnent avec les gouttelettes sans apo B-100 afin de former la particule finale de VLDL [69,70].

Tout comme pour le pré-chylomicron, la particule de pré-VLDL est formée lors de la traduction et la translocation de l'apo B dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux. Lorsque l'apo B-100 synthétisée ne s'assemble pas immédiatement avec les lipides, elle subit immédiatement une dégradation protéosomale. Il a été démontré que ce processus implique l'ubiquitination de l'apo B et l'implication de chaperones cytosoliques [69].

De la même manière que pour le chylomicron, l'assemblage des VLDL requiert la MTP. Des sites de liaison pour cette interaction ont été identifiés tant sur l'apo B [71,72] que sur la MTP [71] et la délétion de ces sites bloque l'assemblage des VLDL, ce qui indique que l'association entre la MTP et l'apo B est essentielle pour l'assemblage des VLDL [71].

1.1.4.2.2 Métabolisme des VLDL

Les VLDL produites par le foie sont sécrétées dans la circulation générale et vont y subir une cascade lipolytique semblable à celle des CM [73]. L'hydrolyse des TG des VLDL s'effectue par l'action de la lipoprotéine lipase, tout comme pour les CM. Les acides gras libérés peuvent être utilisés comme source d'énergie, comme composantes structurales ou encore peuvent être

reconvertis en TG pour servir de réserve énergétique. À travers la déplétion en TG, les particules de VLDL sont converties en résidus plus petits, plus denses et plus riches en cholestérol [74]. Une partie des particules résiduelles des VLDL est reprise par le foie par l'intermédiaire des récepteurs hépatiques B/E et une autre partie demeure en circulation [74]. De plus, comme pour les chylomicrons, les VLDL en circulation s'enrichissent en esters de CHOL provenant des HDL, en échange de leurs TG grâce à la CETP [75]. Les effets athérogènes des VLDL sont causés par leur influence sur les niveaux de LDL et de HDL sanguins : l'augmentation de la sécrétion hépatique des VLDL avec l'effet combiné de la CETP et de la lipase hépatique, augmente la formation des LDL et réduit les niveaux plasmatiques de HDL [75].

1.1.4.3 Lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL)

L'hydrolyse des VLDL qui résident encore dans la circulation plasmatique génère les IDL, les résidus des VLDL, plus petits et plus denses, appauvris en TG en enrichis en esters de CHOL. Les IDL peuvent être internalisées par le foie après reconnaissance de leurs apo E par les récepteurs hépatiques, ou elles peuvent subir d'autres processus métaboliques qui impliquent l'hydrolyse des TG et des PL par une enzyme résidant à la surface des hépatocytes, appelée la lipase hépatique (LH) [73].

Ainsi, sous l'action de la LH, une certaine quantité de IDL est transformée en LDL de diamètres réduits et très riches en esters de cholestérol [76]. La durée de vie intra-plasmatique des LDL est dépendante des récepteurs de LDL, qui

reconnaissent l'apo B-100. Ces récepteurs permettent l'internalisation des particules dans les tissus périphériques, mais leur dégradation cellulaire est essentiellement hépatique [73].

1.1.4.4 Lipoprotéines de faible densité (LDL)

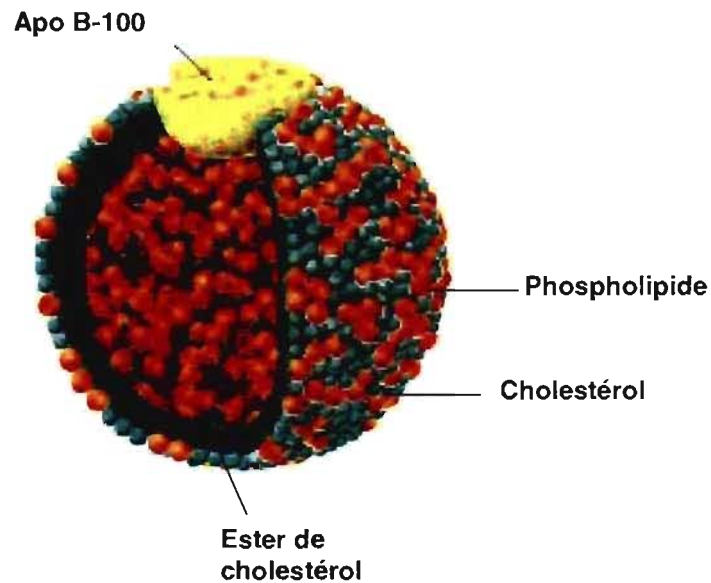
Le catabolisme des IDL donne naissance à des particules dépourvues de TG et très riches en esters de CHOL, appelées les LDL, qui constituent le principal transporteur du cholestérol plasmatique chez l'humain. Il est aussi important de noter qu'une partie des LDL peut être sécrétée directement par le foie [62]. Les niveaux de LDL sanguins sont associés à l'augmentation du risque cardiovasculaire.

Les LDL sont captées par le foie et par les tissus extra-hépatiques nécessitant le cholestérol. Ce processus se déroule par le biais d'un récepteur spécifique, le récepteur de LDL. À la suite de sa captation, toute la particule de LDL est internalisée et dégradée dans les lysosomes [62]. La présence de cholestérol intracellulaire permet de diminuer le nombre des récepteurs à la surface de la cellule, empêchant ainsi la captation exagérée des LDL [77]. De plus, l'expression hépatique du récepteur de LDL est étroitement associée à la régulation de l'activité de la HMG-CoA réductase : l'inhibition de la HMGR par les statines induit une nette augmentation des récepteurs de LDL à la surface des hépatocytes, stimulant la captation des LDL plasmatiques et, de ce fait, la réduction de leurs concentrations sanguines [78]. L'activité de l'ACAT est aussi

associée à l'expression des récepteurs de LDL. En effet, dans le foie, l'accumulation intracellulaire de lipides suite à une charge diététique entraîne une suppression partielle de l'activité du récepteur de LDL et une augmentation parallèle de l'estérfication du cholestérol par l'enzyme ACAT. De ce fait, les concentrations d'esters de cholestérol sont inversement et linéairement reliées à l'activité du récepteur de LDL [79].

De plus, la composition des LDL peut être affectée par la présence des autres lipoprotéines et par l'activité de la CETP. En effet, lorsque les niveaux de TG plasmatiques s'élèvent, les VLDL de grande taille (VLDL₁) s'accumulent, phénomène qui peut être causé par une surproduction hépatique ou par une diminution de l'enlèvement des particules de la circulation. La lipolyse des VLDL₁ entraîne la formation de particules de LDL nommées β , présentant une apo B altérée et une faible affinité pour le récepteur de LDL. Les LDL β résident donc plus longtemps en circulation, ce qui augmente leur susceptibilité au remodelage par la CETP [80]. Les LDL enrichies en TG deviennent alors de bons substrats pour l'hydrolyse par la LH, menant à la formation des LDL petites et denses, qui sont aussi mal reconnues par les récepteurs de LDL. Ces particules demeurent plus longtemps en circulation, ce qui les rend plus susceptibles à subir diverses modifications telles l'oxydation et la glucosylation [62].

Figure 10. LDL



Adapté de : www.educared.net

Figure 10 : Les LDL sont principalement constituées de phospholipides, de cholestérol libre, d'esters de cholestérol et de l'apo B-100.

1.1.4.5 Lipoprotéines de haute densité (HDL) et transport inverse du cholestérol

Les HDLs forment une famille de lipoprotéines hétérogènes, mais qui partagent certaines caractéristiques, comme une haute densité (>1.063 g/ml), une petite taille (diamètre de 5-17 nm) et l'absence d'apo B [62]. L'apo A-I représente l'apolipoprotéine quantitativement prédominante des HDL et son absence cause une déficience en HDL [62]. Les apolipoprotéines A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III et E sont aussi associées aux HDL [62].

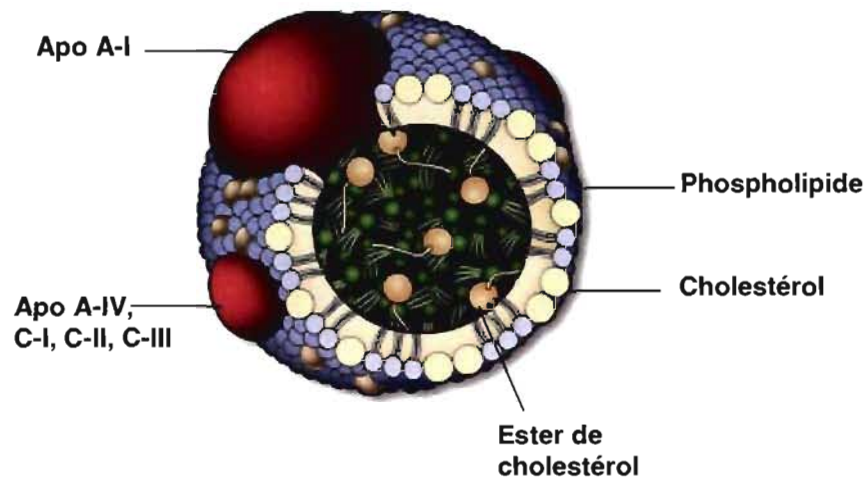
Figure 11. HDL

Figure 11 : Les HDL sont principalement constituées de phospholipides, de cholestérol libre, d'esters de cholestérol et des apos A-I, A-IV, C-I, C-II et C-III.

L'augmentation des concentrations plasmatiques de HDL est associée à la diminution du développement des maladies cardiovasculaires et l'un des principaux processus protecteur des HDL contre l'athérosclérose est le transport inverse du cholestérol. Ce processus permet : (1) la séquestration du cholestérol des tissus périphériques grâce à leur incorporation dans les HDL du plasma ; (2) son estérification par l'enzyme LCAT de la circulation ; (3) son transport vers le foie ; et (4) sa sécrétion subséquente dans la bile ou sa conversion en acides biliaires. Ce transport permet donc de débarrasser les tissus périphériques, principalement les vaisseaux sanguins où l'athérosclérose peut se développer, du cholestérol en excès [81].

Le métabolisme des HDL est complexe, car de nombreuses sous-fractions coexistent et possèdent des rôles métaboliques différents. Tout d'abord, les HDLs discoïdales sont libérées dans la circulation au moment de l'hydrolyse des CM et des VLDL par la LPL, mais elles sont aussi synthétisées par le foie et l'intestin. Dans ce dernier cas, l'apo A-I s'associe aux PL pour former une pré- β -HDL, la forme de HDL naissante dans le plasma [82]. La structure discoïdale de ces particules leur permet de pénétrer dans les espaces péri-cellulaires. Ces HDL captent ainsi le CHOL et les PL des membranes cellulaires des tissus périphériques [82]. Ce processus de transfert des lipides de la membrane plasmique cellulaire aux particules de HDL (appelé efflux de cholestérol et de phospholipides), est dépendant du transporteur ATP-binding cassette A1 (ABCA1) [83]. L'ABCA1 est primordiale pour la lipidation des HDL naissantes et pour le processus de transport inverse du cholestérol, étant donné que sa déficience résulte en de très faibles niveaux plasmatiques de HDL chez les humains et dans les modèles animaux [84]. À la suite de son efflux, le cholestérol libre à la surface est estérifié par la LCAT, une estérase synthétisée dans le foie et localisée sur les particules de HDL. La particule subit alors des changements morphologiques passant de la forme discoïdale à une forme plus sphérique ; les esters de cholestérol, hydrophobes, se positionnent au centre de la particule, tandis que les PL et le CHOL demeurent à la surface [82].

Ces HDL sphériques, appelées HDL₃ continuent à grossir dans la circulation au fur et à mesure qu'elles acceptent le cholestérol des cellules et deviennent de grosses HDL₂ transportant les esters de cholestérol en leur centre [73].

Les HDL₂ échangent leur CHOL et leurs PL avec les particules de LDL et de VLDL, dans un processus impliquant la CETP. Dans un autre mécanisme, les HDL₃ peuvent accepter le cholestérol libre et les phospholipides provenant de l'hydrolyse des VLDL par la LPL, un processus facilité par la « phospholipid transfer protein » (PLTP) [85]. Le lien entre les HDL et les LDL/VLDL est caractérisé par les échanges d'esters de CHOL, de PL et de TG, entraînés par la CETP et la PLTP. Les échanges dynamiques des lipides entre ces lipoprotéines sont importants, car ils permettent de déplacer le cholestérol de la périphérie pour subvenir aux besoins métaboliques [73,82].

La dégradation des HDL₂ prend place dans le foie à la suite de la captation sélective des esters de CHOL par le SR-BI. Le SR-BI lie les HDL avec une haute affinité, entraînant l'internalisation des esters de CHOL de la particule, sans dégradation de la partie apolipoprotéique. Le SR-BI permet donc la captation sélective des esters de CHOL des HDL par le foie et par les tissus stéroïdiens [73,82]. Le cholestérol peut alors être utilisé pour les besoins cellulaires, converti en acides biliaires ou sécrété directement dans la bile. Ce processus de transport de cholestérol de la périphérie vers le foie et les tissus stéroïdiens impliquant les HDL consiste au transport inverse du cholestérol.

Figure 12. Transport inverse du cholestérol

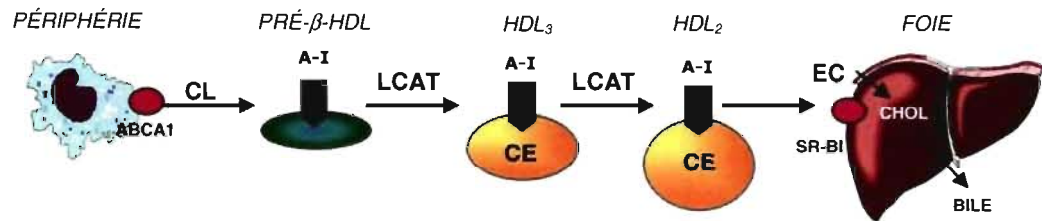


Figure 12 : Lors du transport inverse du cholestérol, les pré- β -HDL peuvent capter le cholestérol des cellules de la périphérie, dans un processus dépendant de l'ABCA1. Le cholestérol est estérifié par la LCAT, formant les HDL₃, qui continuent à grossir au fur et à mesure qu'elles acceptent le cholestérol libre, et deviennent de grosses HDL₂. Le cholestérol capté par le SR-BI hépatique peut être utilisé pour les besoins cellulaires, converti en acides biliaires ou sécrété directement dans la bile.

En plus d'être des accepteurs de cholestérol, il est important de noter que les HDL ont des effets additionnels qui contribuent à leur fonction athéroprotectrice. Les HDL normalisent l'environnement lipidique des membranes des cellules endothéliales et préservent l'intégrité de l'oxyde nitrique, une molécule de signalisation nécessaire au maintien des fonctions de l'endothélium vasculaire [86].

Une partie des effets protecteurs des HDL pourrait aussi provenir de leurs actions anti-inflammatoires [87,88]. En effet, elles lient et neutralisent les lipopolysaccharides pro-inflammatoires [89] et inhibent l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales [90]. Les HDL présentent aussi des fonctions anti-thrombotiques et pro-fibrinolytiques, en réduisant l'agrégation plaquettaire et la coagulation [91].

D'un autre côté, les HDL ont la capacité de protéger les LDL et les membranes cellulaires contre les dommages peroxydatifs des lipides, empêchant ainsi l'initiation et la progression des lésions athéromateuses. Les enzymes paraoxonases pourraient jouer un rôle majeur dans ce processus [92]. La famille des gènes paraoxonases consiste en trois membres *pon1*, *pon2* et *pon3*, localisés sur le chromosome 7. La paraoxonase 1 (PON 1) sérique est une estérase associée aux HDL et son activité est inversement reliée au risque de maladies cardiovasculaires. Les études démontrent que la PON1 peut protéger contre le stress oxydatif en hydrolysant de manière spécifique les lipides oxydés des lipoprotéines et des lésions athéromateuses, incluant ceux des macrophages [93]. Il semble que la PON1 soit responsable de la capacité des HDL à métaboliser les peroxydes lipidiques et à protéger contre leur accumulation au niveau des LDL. La PON1 contribue à la diminution de contenu en cholestérol des macrophages en inhibant la biosynthèse de cholestérol et la captation des oxLDL via le récepteur éboueur «Fatty acid translocase» (FAT/CD36) [92,93]. Les PON2 et PON3 ont été moins étudiées et leurs rôles ne sont pas encore clairement élucidés [92,93]. L'apo A-I exerce aussi des fonctions antioxydantes et a la capacité d'inhiber ou

d'extraire des molécules requises pour l'oxydation des LDL par les cellules vasculaires [94]. D'autres enzymes des HDL peuvent aussi dégrader les lipides oxydés, comme les «Platelet-activating factor acetylhydrolases» (PAF-AH) dont le rôle est associé à la protection antioxydante [94].

1.2 ATHÉROSCLÉROSE

1.2.1 Importance et impacts sociaux de la maladie

Les maladies du cœur consistent en des maladies chroniques permanentes de l'appareil circulatoire. Elles comprennent l'infarctus aigu du myocarde, les cardiopathies ischémiques, les valvulopathies cardiaques, les maladies vasculaires périphériques, l'arythmie, l'hypertension artérielle et les accidents vasculaires cérébraux (AVC). Ses traitements visent à soulager les symptômes, à améliorer la qualité de vie et à réduire le risque de décès prématuré.

Les maladies cardiovasculaires sont devenues un vrai fléau dans notre société et tout indique que cette épidémie s'accroîtra au cours des prochaines années, et ce malgré les avancements thérapeutiques. En 1999, elles étaient la cause initiale de décès de plus d'un Canadien sur trois (36%) [95]. D'ailleurs, au Canada, l'impact économique des maladies cardiovasculaires est plus que considérable. Leurs coûts ont été évalués à 18 472,9 milliards de dollars, soit 11,6% du coût total de toutes les maladies [95]. Elles ont représenté 18% de l'ensemble des hospitalisations au Canada pour les années 2000 à 2001, ce qui engendre des coûts de plus de 4 milliards de dollars par an [95]. Puisque le taux d'hospitalisation augmente avec l'âge et que le nombre de personnes âgées est en croissance au Canada, les dépenses hospitalières devraient vraisemblablement s'élever dans le futur. Les médicaments ajoutent aussi à la facture. En 2001, on a évalué à 43,5 millions le nombre d'ordonnances qui ont été délivrées pour le traitement des maladies cardiovasculaires, une progression de 34% par rapport à

1998 et de 45% par rapport à 1996 [95]. La diminution des facteurs de risque contrôlables dans la population pourrait réduire considérablement non seulement la morbidité et la mortalité, mais aussi les dépenses associées à ces maladies.

Huit canadiens sur dix affichent au moins un des principaux facteurs de risque de maladies cardiovasculaires, soit le tabagisme, la sédentarité, l'excès de poids, l'hypertension artérielle et le diabète. Il est aussi alarmant de constater qu'un Canadien sur dix présente trois de ces facteurs de risque ou plus. Par exemple, l'embonpoint (défini par un indice de masse corporelle (IMC) de 25 à 29,9) et l'obésité (IMC \geq 30) sont d'importants facteurs de risque [95]. En 2000, l'Enquête sur la santé dans les collectivités canadiennes a publié que 47,5% des adultes présentaient un excès de poids et que 15,2% d'entre eux étaient obèses [95]. Malheureusement, les risques cardiovasculaires ne sont plus que l'affaire des adultes et des personnes âgées. En 1998-1999, l'Enquête longitudinale nationale sur les enfants et les jeunes a révélé que 37% des enfants de 2 à 11 ans faisaient de l'embonpoint et que 18% étaient considérés obèses [95].

Des aspects nutritionnels sont aussi associés au risque cardiovasculaire. La consommation quotidienne de cinq à dix portions de fruits et de légumes par jour permet de réduire le risque de maladies cardiovasculaires. En 2000, 62,4% des Canadiens de 12 ans et plus affichaient une consommation de fruits et de légumes inférieure aux apports recommandés [95].

Un taux anormalement élevé de cholestérol total, de LDL-cholestérol et de triacylglycérols, ainsi qu'un faible taux de HDL constituent d'autres facteurs de risque majeurs. Selon les enquêtes canadiennes de santé cardiovasculaire de

1985 à 1990, 45% des hommes et 43% des femmes présentaient un taux de cholestérol plasmatique supérieur à celui recommandé de 5,2 mmol/L. Par contre, selon le rapport de la Fondation des maladies du cœur de 2003, des mises à jour s'imposent afin d'évaluer la proportion actuelle des Canadiens présentant des dyslipidémies [95].

La compréhension de la physiopathologie des maladies cardiovasculaires s'avère d'une importance capitale pour parvenir à freiner leurs développements. De plus, même si l'efficacité des traitements chirurgicaux et pharmacologiques s'est grandement améliorée au cours des dernières années, la prévention et la modification des habitudes de vie demeurent indispensables pour freiner l'incidence de ces maladies.

1.2.2 Physiopathologie de l'athérosclérose

La physiopathologie de l'athérosclérose implique plusieurs types cellulaires de la paroi vasculaire et différents événements qui s'influencent les uns les autres. Le développement de la maladie peut être divisé en étapes telles la dysfonction endothéliale, l'infiltration des lipoprotéines dans l'espace sous-endothélial, la modification des lipoprotéines, l'infiltration des monocytes, la formation des cellules spumeuses et la complication des lésions.

Figure 13. Lésions athéromateuses

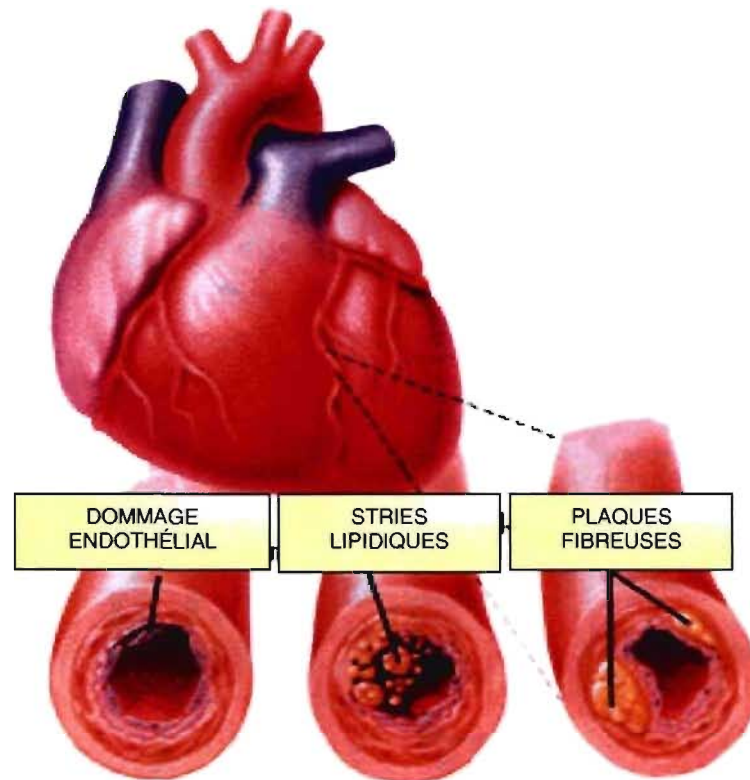


Figure 13 : Le processus de développement de l'athérosclérose débute avec un dommage endothélial, puis il y a formation des stries lipidiques et le développement des plaques fibreuses.

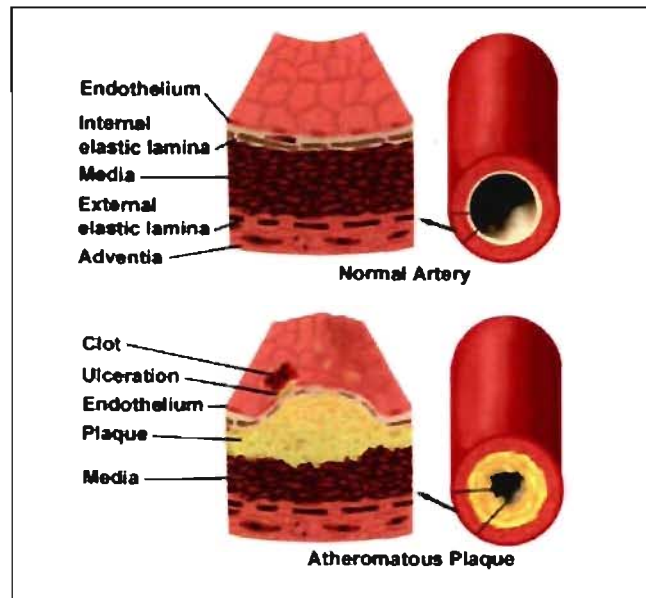
1.2..2.1 Anatomie de la paroi vasculaire

Le fonctionnement adéquat du système circulatoire est extrêmement important pour le maintien de la vie, car il est responsable de la livraison de l'oxygène et des nutriments aux cellules de tous les tissus, ainsi que du retrait du dioxyde de carbone et des déchets. Il permet aussi la circulation de plusieurs éléments, comme les protéines et les cellules du système immunitaire [96].

Les artères consistent en des vaisseaux sanguins musculaires qui transportent le sang du cœur vers les tissus. Toutes les artères, à l'exception des artères pulmonaires et ombilicales, transportent le sang oxygéné, en contraste avec les veines qui conduisent plutôt le sang vers le cœur [96].

La couche externe des vaisseaux sanguins est appelée «tunica adventitia», ou adventitia, et est composée de tissus conjonctifs. Sous cette couche se trouve la «tunica media», ou média qui est composée de cellules musculaires lisses et de tissus élastiques. La couche interne, qui est en contact direct avec le flux sanguin est la «tunica intima», communément appelée intima. Cette couche est principalement composée de cellules endothéliales. La cavité interne dans laquelle le sang circule est nommée lumière [96].

Figure 14. Anatomie de la paroi vasculaire



Tiré de : your surgery.com

Figure 14 : La paroi vasculaire est constituée d'une couche interne de cellules endothéliales, d'une couche médiane composée de cellules musculaires lisses et de tissus élastiques et d'une couche externe de tissus conjonctifs.

1.2.2.2 Dysfonction endothéliale

1.2.2.2.1 Endothélium vasculaire

Les cellules endothéliales vasculaires consistent en un organe structurellement simple, mais aux fonctions sophistiquées. Sous des conditions physiologiques, l'endothélium sert non seulement de barrière passive entre le sang et les tissus adjacents, mais il exerce aussi plusieurs fonctions actives [97].

Les cellules endothéliales sont exposées de manière constante aux substances contenues dans le sang. Ces dernières exercent de multiples fonctions régulatrices de façon endocrine, paracrine et autocrine [97]. Un défaut de l'intégrité morphologique et fonctionnelle de l'endothélium vasculaire en réponse à des attaques mécaniques, immunologiques ou chimiques consiste en la première étape de la cascade physiopathologique du développement de l'athérosclérose : la dysfonction endothéliale [98].

Une des principales fonctions de l'endothélium normal est de régulariser la dilatation des vaisseaux sanguins en réponse aux forces de cisaillement (de l'anglais «shear stress») ou à l'augmentation du flux sanguin. Les forces de cisaillement endothéliales sont des forces hémodynamiques tangentielles dérivées de la friction du flot sanguin sur la surface endothéliale des artères. Un très grand nombre d'études confirment l'implication mécanistique de faibles forces de cisaillement sur la progression de l'athérosclérose [99]. Des études cellulaires et moléculaires récentes ont permis de clarifier de manière détaillée les voies de régulation de forces de cisaillement déficientes, entre autres leurs capacités à promouvoir l'inflammation, le stress oxydatif et l'activation endothéliale [99].

La dilatation vasculaire dépendante de l'endothélium en réponse à l'augmentation des forces hémodynamiques est étroitement liée à l'intégrité de l'enzyme oxyde nitrique synthase endothéliale et à la bioactivité de l'oxyde nitrique (NO), un puissant vasodilatateur synthétisé entre autres par l'endothélium [98]. Ce dernier génère aussi d'autres régulateurs du tonus vasculaire, dont des vasodilatateurs, comme le «endothelium-derived

hyperpolarization factor » et la prostacycline, et des vasoconstricteurs, comme l'angiotensine II et l'endothéline [98].

L'endothélium est non seulement responsable du tonus vasculaire, mais il contribue aussi au contrôle de la coagulation humorale par la synthèse du « plasminogen activator inhibitor 1 » (PAI-1), du « tissue plasminogen activator » (tPA), du facteur von Willebrand et de la trombomoduline [100]. Il est aussi impliqué dans la régulation de la fonction plaquettaire, de la croissance des cellules musculaires lisses et de l'invasion leucocytaire [98].

1.2.2.2 Fonction endothéliale : oxyde nitrique

L'oxyde nitrique est une molécule de signalisation très importante qui participe à plusieurs fonctions cellulaires dans l'organisme. Par exemple, le NO produit par les cellules endothéliales régularise la relaxation et la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) vasculaires, en plus de moduler l'adhésion leucocytaire, l'agrégation plaquettaire, l'angiogenèse et la thrombose [101]. Le NO produit par les neurones sert de neurotransmetteur alors que le NO généré par les macrophages activés est un important médiateur de la réponse immunitaire. Par contre, une formation excessive de NO est dommageable pour les tissus et pour l'intégrité cardiovasculaire, car cette molécule peut agir comme oxydant ou comme inhibiteur de certaines enzymes [102].

Le NO est synthétisé par les enzymes NO synthase (NOS) qui existent sous trois formes distinctes : la NOS neuronale (nNOS), la NOS inducible (iNOS) et la NOS endothéliale (eNOS). Ces enzymes sont encodées par des

gènes distincts et elles diffèrent dans leurs propriétés moléculaires, catalytiques et immunologiques, ainsi que dans leur distribution cellulaire, la régulation de leur activité et leur sensibilité aux inhibiteurs [102]. La nNOS est reconnue comme une enzyme constitutive du tissu neuronal, alors que la iNOS est inductible par les cytokines pro-inflammatoires et les lipopolysaccharides (LPS) dans les macrophages et les hépatocytes [102]. Pour sa part, la eNOS est une enzyme constitutive des cellules endothéliales vasculaires [102].

Les NOS synthétisent le NO à partir de l'atome terminal d'hydrogène de la L-arginine en présence de NADPH et d'oxygène moléculaire (O₂). Pour permettre leur activité enzymatique, les NOS lient des co-facteurs, soit la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN), la (6R)-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH₄) et la calmoduline [101,102].

La synthèse de NO peut être engendrée par un mécanisme dépendant d'un récepteur (par exemple en réponse à l'acétylcholine) ou non dépendant d'un récepteur (par exemple en réponse à la contrainte de cisaillement). Le NO synthétisé par les cellules endothéliales diffuse aux cellules musculaires lisses et entraîne la relaxation musculaire par des mécanismes impliquant la guanosine monophosphate cyclique (cGMP). L'endothélium normal peut répondre à plusieurs stimuli physiologiques et pharmacologiques par la vasodilatation dépendante du NO [98]. L'inhibition de la relaxation endothéliale due à une diminution de la biodisponibilité du NO est un phénomène très important de la dysfonction endothéliale [97].

Figure 15. Biosynthèse de l'oxyde nitrique

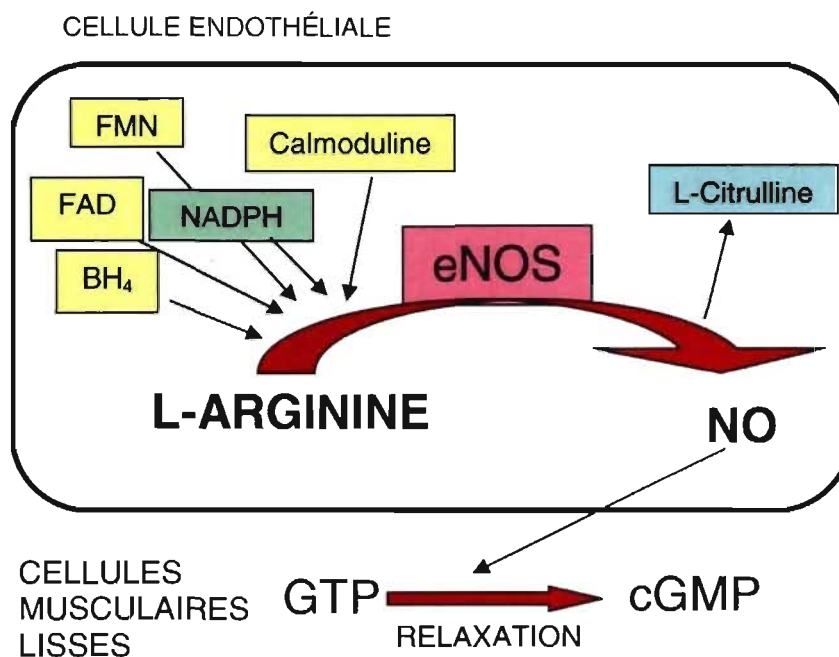


Figure 15 : La NO synthase endothéliale permet la synthèse de NO à partir de l'atome terminal d'hydrogène de la L-arginine en présence de NADPH et des cofacteurs FAD, FMN, BH₄ et calmoduline. Le NO synthétisé par les cellules endothéliales diffuse aux cellules musculaires lisses et entraîne la relaxation musculaire par des mécanismes impliquant la cGMP.

1.2.2.2.3 Fonction endothéliale : prostaglandines

Les prostaglandines (PG) sont des dérivés lipidiques générés à partir de l'acide arachidonique par les enzymes cycloxygénases (COX) et PG synthases. Ces enzymes sont responsables de la production de cinq prostaglandines bioactives : la PGE₂, la PGF_{2a}, la PGD₂, la prostacycline (PGI₂) et la thromboxane A₂ (TXA₂) [103]. Les PG sont impliquées dans la régulation des réactions inflammatoires et la vasodilatation.

Il existe 2 isoenzymes cycloxygénases (COX-1 et COX-2) produites par deux gènes différents localisés sur les chromosomes 9 et 1, respectivement. Elles diffèrent dans la régulation de leur expression et dans leur distribution tissulaire. La COX-1 est exprimée de manière constitutive au niveau du système gastrointestinal, des reins, du muscle lisse vasculaire et des plaquettes, alors que la COX-2 est indétectable dans la plupart des tissus, mais son expression peut être induite par une variété de stimuli, incluant l'inflammation [104]. La COX-1 démontre des effets protecteurs sur la muqueuse gastrique et est impliquée dans la régulation du flux sanguin rénal et la fonction plaquettaire. La COX-2 est pour sa part responsable de la synthèse de PG lors de l'inflammation et elle est impliquée dans plusieurs voies de signalisation intracellulaires [104]. Certains de ses produits, spécialement ceux élaborés par les cellules inflammatoires, ont des effets pro-inflammatoires et probablement pro-athérogènes qui peuvent mener à la rupture de la plaque et à la thrombose dans les artères (TX), alors que d'autres de ses produits ont des effets plutôt anti-inflammatoires (PGD₂) et anti-thrombotiques (PGI₂) [104].

La prostacycline est une prostaglandine synthétisée par les cellules endothéliales et un dérivé de l'acide arachidonique. Elle agit sur des récepteurs des cellules musculaires lisses pour activer l'adénylate cyclase et inhiber la contraction [103,104]. De plus, tout comme le NO, la PGI₂ agit sur les plaquettes circulatoires pour inhiber l'agrégation plaquettaire. La PGI₂ est le principal produit de l'enzyme COX-2 [103,104]. L'expression de la prostacycline synthase, une enzyme impliquée dans sa formation, est modulée par les cytokines pro-inflammatoires comme le «Tumor necrosis factor alpha» (TNF- α), l'interleukine (IL)-1 et l'IL-6. La PGI₂ a une très courte demi-vie et agit d'une manière paracrine [103]. Elle a aussi pour effet d'augmenter la synthèse de NO par les cellules endothéliales, qui induit à son tour l'activité de la PGI₂ sur la relaxation du muscle lisse [103,104]. D'une manière générale, la PGI₂ est reconnue pour ses effets cardioprotecteurs.

La thromboxane A₂ est une autre prostaglandine produite par les cellules endothéliales et les plaquettes activées. La TXA₂ est aussi un dérivé de l'acide arachidonique, mais sa synthèse est catalysée par l'enzyme COX-1. Contrairement à la prostacycline, la TXA₂ est un vasoconstricteur potentiel, un activateur de l'agrégation plaquettaire et un activateur de la prolifération des cellules musculaires lisses [97,103,104].

Il est suggéré que la balance entre la PGI₂ et la TXA₂ soit un facteur critique pour l'homéostasie cardiovasculaire. Leur relation est cruciale pour les interactions entre les plaquettes et les vaisseaux et pour la réparation du dommage épithélial [103,105].

L'effet net de l'inhibition de la COX-2 dépend de la maladie en processus et du type cellulaire impliqué. Malgré les effets anti-inflammatoires des inhibiteurs de la COX-2, les études cliniques montrent qu'ils sont associés à l'augmentation des événements cardiovasculaires [104]. Un dérèglement entre le TXA₂ et la PGI₂ pourrait être une des raisons, mais non la seule, expliquant l'augmentation des événements cardiovasculaires observés ces molécules. Des inhibiteurs de la COX-2 sélectifs pour les cellules inflammatoires pourraient toutefois entraîner des effets bénéfiques sans affecter le système cardiovasculaire [104].

1.2.2.2.4 Fonction endothéliale : endothéline

L'endothéline fait partie d'une famille de peptides vasoconstricteurs qui sont produits par les cellules endothéliales et qui induisent des effets pro-inflammatoires. L'endothéline active l'adhésion des macrophages et contribue au remodelage de la matrice extracellulaire lors de la réparation tissulaire et, de ce fait, pourrait participer au dommage intimal dans les maladies vasculaires [98].

1.2.2.2.5 Perte de la fonction endothéliale

Sous certaines conditions, et particulièrement en réponse aux pathologies représentant des facteurs de risque pour l'athérosclérose, l'endothélium peut présenter des défauts de son intégrité morphologique et/ou fonctionnelle, ce qui constitue la dysfonction endothéliale. Ceci consiste en la première étape de la physiopathologie de l'athérosclérose et initie une cascade d'événements athérogènes [98].

Les causes du dysfonctionnement endothélial sont multiples et imparfaitement comprises. La première cause est la perte du flux laminaire qui entraîne une diminution des forces de cisaillement locales [106]. Ce phénomène induit la variation de gènes sous le contrôle du « shear-stress response element » et inhibe la transcription de gènes protecteurs (eNOS, Mn-SOD, COX-2), mais induit des gènes inflammatoires (cytokines, molécules d'adhésion). Cette première étape du dysfonctionnement endothélial augmente la perméabilité vasculaire aux protéines et aux lipoprotéines de la circulation, l'expression des molécules d'adhésion endothéliales et des facteurs de croissance [106,107]. Des dérivés toxiques dans l'environnement des cellules peuvent aussi entraîner une dysfonction endothéliale. Ces dérivés toxiques sont augmentés dans les conditions constituant des facteurs de risque de l'athérosclérose, les principaux étant les hyperlipidémies, le diabète, la résistance à l'insuline, l'hypertension et le tabagisme [106,107]. Les mécanismes par lesquels ces états constituent des facteurs de risque seront décrits ultérieurement.

1.2.2.3 Infiltration des LDL

Les conséquences de la dysfonction endothéliale sont multiples, la première fonction altérée étant la capacité de l'endothélium à induire une vasodilatation, associée à la diminution de la biodisponibilité du NO et de la diminution de la eNOS [108]. Les autres fonctions de perméabilité et d'adhérence endothéliale sont aussi touchées, ce qui favorise l'infiltration des particules de LDL dans la paroi artérielle [108]. Les lipoprotéines de la circulation peuvent pénétrer au niveau de l'intima des vaisseaux sanguins à travers les espaces endothéliaux et possiblement via transcytose. Le diamètre des particules de LDL est l'un des facteurs limitant de leur entrée dans l'intima : les LDL de petites tailles avec un contenu élevé en cholestérol sont plus athérogènes, car elles peuvent s'introduire plus facilement dans l'espace sous-endothélial [108].

1.2.2.4 Rétention des LDL

Une des hypothèses du développement de l'athérosclérose propose que les lipoprotéines du sérum soient retenues dans l'espace sous-endothélial par les protéoglycanes. Ces LDL retenues se modifient subséquemment et provoquent une cascade de réponses qui mènent au développement de la maladie [109]. Il a en effet été démontré que l'association des LDL ou leur agrégation aux protéoglycanes de la paroi artérielle augmente leur taux d'oxydation et leur captation par les macrophages [110,111]. De plus, les souris exprimant une apo B-100 mutée produisant des particules de LDL avec une faible affinité pour les

protéoglycanes développent moins fortement l'athérosclérose que les souris contrôles [112,113].

Des changements dans la composition de la matrice pourraient aussi augmenter la capacité de rétention des LDL dans l'espace sous-endothélial. Certaines protéoglycanes, comme la biglycane et la versicane, qui sont élevées dans les plaques d'athérome comparativement aux vaisseaux sanguins normaux, pourraient engendrer une plus grande rétention des LDL que d'autres protéoglycanes comme l'héparane sulfate [109,114,115].

1.2.2.5 Modification des LDL et propriétés des LDL oxydées

Lorsqu'elles sont dans l'intima, les LDL sont susceptibles aux processus d'oxydation enzymatique et non-enzymatique. L'oxydation des LDL est une étape cruciale du processus d'athérosclérose. Elle se produit majoritairement *in situ*, dans la paroi, car les LDL oxydées (oxLDL) sont présentes en abondance dans la plaque, mais retrouvées en faibles quantités dans la circulation [116]. Les LDL peuvent être oxydées par contact avec les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses ou les macrophages [100]. Le processus d'oxydation s'effectue d'abord à la surface de la particule. Les LDL dont seulement la partie lipidique est modifiée, sans changement de l'apo B, sont appelées « LDL minimalement modifiées » (mmLDL) [100]. Les modifications minimales, avant l'oxydation massive, sont induites par les métaux de transition, les anions superoxydes, les hémoprotéines et l'activité lipoxygénase en présence

d'hydropéroxydes lipidiques. Par la suite, il y a propagation du phénomène par l'action de l'enzyme phospholipase A₂ [100]. À la suite de la peroxydation de quelques fragments lipidiques, l'activité phospholipase A₂ provoque une amplification de la peroxydation, ce qui entraîne la fragmentation des acides gras polyinsaturés et la production d'aldéhydes. Ces aldéhydes se lient aux résidus lysine de l'apo B, ce qui entraîne une modification conformationnelle de l'apolipoprotéine. De ce fait, il y a perte de la reconnaissance par les récepteurs de LDL natives, mais gain de la capacité de se lier aux récepteurs éboueurs des macrophages [117].

In vitro, plusieurs expériences utilisent les LDL acétylées, qui sont reconnues par différents récepteurs des macrophages. Toutefois, une acétylation significative des LDL ne se produit pas *in vivo* et il est maintenant clair que la modification la plus physiologique consiste en l'oxydation des particules, quoique la glycation soit aussi un phénomène observé *in vivo* [118].

La glycation de l'apo B des LDL est une anomalie retrouvée chez les patients diabétiques qui peut modifier le métabolisme des LDL de manière significative [119]. Principalement, les LDL glyquées présentent une réduction de leur affinité pour le récepteur de LDL [120], sont préférentiellement captées par les macrophages [121] et sont très facilement oxydées [122,123].

Selon l'hypothèse de l'oxydation des LDL, les oxLDL contribuent à l'athérogenèse en (1) permettant le recrutement des monocytes circulatoires dans l'espace sous-endothélial ; (2) inhibant la capacité des macrophages résidents de quitter l'intima ; (3) augmentant la captation de lipoprotéines par les macrophages

menant à la formation des cellules spumeuses ; et (4) par leur toxicité, menant à la perte de la fonction endothéliale [124].

Les LDL oxydées présentes dans l'intima attirent les monocytes par l'induction de l'expression des molécules chimiotactiques, comme la « Monocyte chemotactic protein-1 » (MCP-1), et des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales [125]. Conséquemment, les monocytes circulatoires sont recrutés et envahissent la paroi vasculaire, où ils se différencient en macrophages [125]. La réaction inflammatoire provoquée par les lipoprotéines modifiées consiste en une réponse physiologique, car elle permet l'attraction des macrophages afin de capter les particules dommageables. Les cytokines sécrétées par les macrophages dans la plaque affectent l'expression d'une multitude de protéines impliquées dans les mécanismes de défense. En modulant l'expression de ces molécules, les cytokines amplifient l'accumulation de lipides dans les macrophages et favorisent la formation des cellules spumeuses [126].

De plus, des mécanismes impliquant les oxLDL entraînent un défaut dans la production de NO bioactif, ce qui détériore la fonction endothéliale. En présence de oxLDL, les radicaux libres se lient au NO disponible pour produire un produit toxique, le peroxy-nitrite. Ce dernier déstabilise la production de la eNOS et cause un découplage de l'enzyme, générant des radicaux libres qui vont réagir à leur tour avec le NO [108]. Aussi, l'augmentation du contenu en cholestérol membranaire mène à l'augmentation de la protéine cavéoline qui lie la eNOS et qui limite la production de NO. Les co-facteurs de la production de NO

à partir de l'arginine deviennent oxydés et interfèrent dans la fonction de la eNOS [108].

Au niveau des cellules endothéliales, les oxLDL ont aussi pour effet d'induire l'apoptose [127] et d'entraîner des changements qui se caractérisent par un état pro-coagulant incluant une diminution du tPA, de l'augmentation de la sécrétion du PAI-1, une augmentation de la réactivité aux plaquettes et de la production locale de facteur tissulaire [108].

De plus, parce que les HDL ont la capacité d'extraire les produits de peroxydation des oxLDL [92-94], ces derniers déplètent les HDL en circulation de leurs capacités antioxydantes et protectrices.

Subséquentement à l'oxydation des LDL, la progression des lésions athéromateuses est associée à plusieurs phénomènes dont l'infiltration des cellules inflammatoires, les monocytes/macrophages et les lymphocytes. Cette infiltration est associée à la poursuite de l'infiltration lipidique, à la formation des cellules spumeuses et à l'implication des cellules musculaires lisses vasculaires qui, par la synthèse de la matrice extracellulaire, entraîneront la formation d'une chape fibreuse plus ou moins abondante.

Table 3. Activités pro-athérogènes des oxLDL

-
- 1.1 Les oxLDL entraînent la formation des cellules spumeuses.
 - 1.2 Les produits dérivés des oxLDL sont chimiotactiques pour les monocytes et les cellules T.
 - 1.3 Les produits dérivés des oxLDL sont cytotoxiques et peuvent induire l'apoptose.
 - 1.4 Les oxLDL sont mitogènes pour les macrophages et les cellules musculaires lisses.
 - 1.5 Les oxLDL altèrent l'expression des gènes inflammatoires dans les cellules vasculaires.
 - 1.6 Les oxLDL augmentent l'expression des récepteurs éboueurs.
 - 1.7 Les oxLDL peuvent s'agréger, ce qui augmente leur captation par les macrophages.
 - 1.8 Les oxLDL induisent l'expression du facteur tissulaire et l'agrégation plaquettaire.
 - 1.9 Les produits des oxLDL amoindrent la bioactivité du NO.
 - 1.10 Les oxLDL déplètent les HDL de leurs capacités antioxydantes.
-

Adapté de [128]

Figure 16. LDL et formation de l'athérosclérose

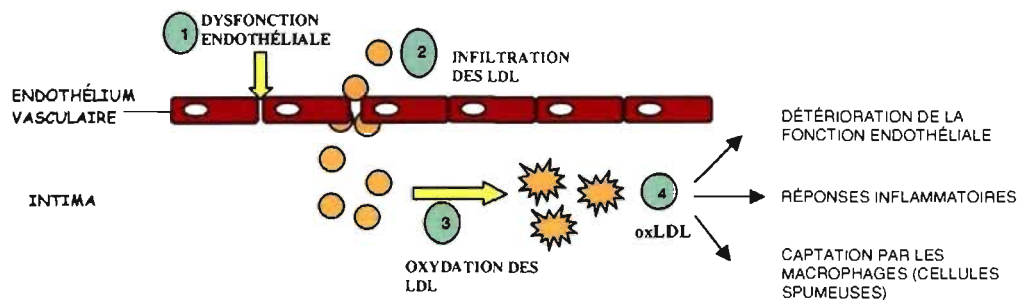


Figure 16 : En raison d'une dysfonction endothéliale, les LDL de la circulation peuvent s'infiltrer dans l'espace sous-endothélial où elles subissent des modifications comme l'oxydation. Ces LDL oxydées détériorent la fonction endothéliale, induisent des réponses inflammatoires et sont captées par les macrophages, menant à la formation des cellules spumeuses.

1.2.2.6 Adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales

La présence de LDL modifiées au niveau de l'intima initie des réponses inflammatoires par les cellules endothéliales vasculaires, ce qui augmente leur affinité pour les leucocytes de la circulation qui adhèrent et migrent à travers l'endothélium, formant ultimement les cellules spumeuses, puis les stries lipidiques. L'adhésion des monocytes à l'endothélium implique la liaison des molécules de structure exprimées à la surface des cellules endothéliales à des ligands de la famille des intégrines présents sur la membrane des leucocytes. Ces molécules ne sont que peu ou pas exprimées à la surface de l'endothélium

normal, mais leur expression peut être induite par les LDL oxydées ou par les cytokines pro-inflammatoires [129].

L'implication des interactions cellulaires dans le développement de l'athérosclérose a suscité un vif intérêt depuis les deux dernières décennies. Les molécules d'adhésion ont reçu une grande attention, non seulement pour leur participation aux processus physiologiques normaux, mais aussi pour leurs rôles potentiels comme modulateurs des interactions cellulaires qui contribuent à la dysfonction endothéliale et aux dommages tissulaires associés aux différentes maladies vasculaires [129].

Le processus d'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales peut être schématisé en trois étapes séquentielles: (1) le roulement des leucocytes sur les cellules endothéliales ; (2) leur adhésion ferme et (3) leur migration dans l'espace sous-endothélial [129]. Pour qu'il y ait adhésion avec les cellules endothéliales, les leucocytes de la circulation doivent d'abord s'accrocher à la paroi vasculaire. Les sélectines et leurs ligands permettent cette adhésion faible qui se manifeste par un roulement des leucocytes de la circulation. Une fois accrochés, ils sont exposés à de faibles concentrations de médiateurs inflammatoires et chimiotactiques, ce qui entraîne leur activation et l'adhésion de leurs intégrines aux immunoglobulines des cellules endothéliales. Par la suite, la locomotion des leucocytes adhérents à travers les jonctions cellulaires permet leur migration transendothéliale [129].

Figure 17. Interactions leucocytes – cellules endothéliales

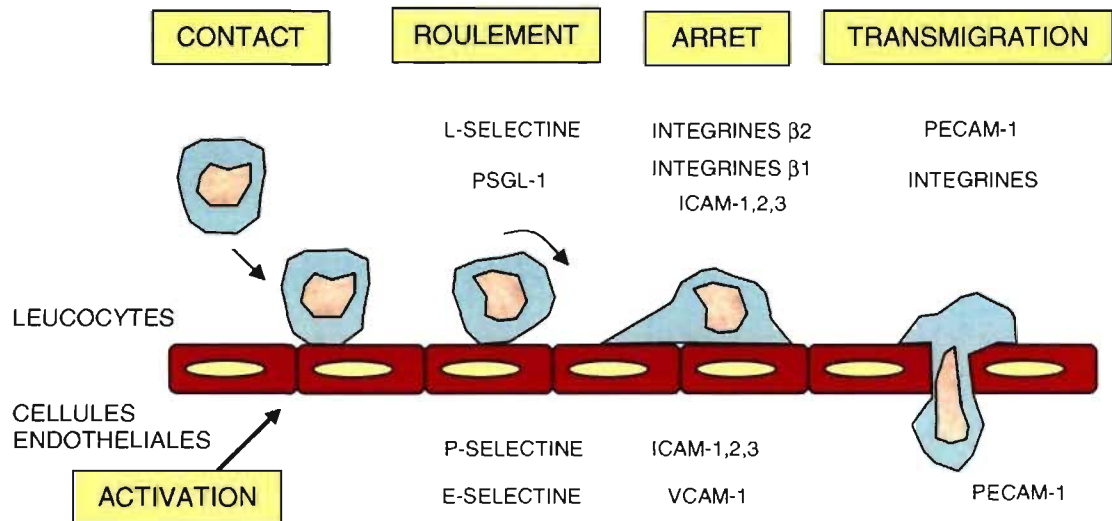


Figure 17 : À la suite d'un contact avec l'endothélium, il y a roulement des leucocytes sur les cellules endothéliales, leur adhésion ferme et leur migration dans l'espace sous-endothélial.

1.2.2.6.1 Expression des molécules d'adhésion

Les principales molécules d'adhésion exprimées sur l'endothélium sont la E-sélectine, la P-sélectine, la « vascular cell adhesion molecule-1 » (VCAM-1) et la « intracellular adhesion molecule-1 » (ICAM-1). Les E- et P-sélectines, membres de la famille des sélectines, sont des contre-récepteurs des L-sélectines des leucocytes. Les VCAM-1 et ICAM-1 appartiennent à une superfamille d'immunoglobulines et sont des contre-récepteurs des intégrines leucocytaires. Ces molécules d'adhésion solubles présentes en circulation peuvent être utilisées

comme marqueurs moléculaires de l'athérosclérose, particulièrement la ICAM-1 et la E-sélectine, dont les taux sanguins corrèlent fortement avec l'incidence des maladies coronariennes [97].

1.2.2.6.1.1 Sélectines

Le recrutement des leucocytes s'effectue par une cascade d'événements qui débute par la capture des cellules en circulation par la paroi vasculaire, suivi par le roulement des leucocytes à l'endothélium. La capture et le roulement sont permis par un groupe de glycoprotéines appelées sélectines. Lors du processus de roulement, les leucocytes sont engagés de façon intime avec l'endothélium, ce qui permet aux chimiokines des cellules endothéliales de se lier à leurs récepteurs respectifs [130]. Ceci entraîne l'expression des intégrines, menant à l'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium et à leur transmigration à travers celui-ci. L'étape de roulement est possible grâce aux sélectines et est importante pour le recrutement leucocytaire [130].

Les molécules sélectines sont exprimées sur les leucocytes (L-sélectine), les cellules endothéliales (E-sélectine, P-sélectine) et sur les plaquettes (P-sélectine). Ces molécules d'adhésion sont reconnues pour entraîner le roulement des leucocytes sur l'endothélium vasculaire (L-, P-, E-sélectine) et pour l'agrégation des plaquettes avec les leucocytes (P-sélectine). Des formes solubles de ces sélectines sont détectées dans le plasma et l'élévation de leurs niveaux sanguins est associée à la présence de maladies inflammatoires [129]. Les cytokines, les toxines bactériennes et les oxydants stimulent la synthèse des E- et

P-sélectines sur les cellules endothéliales [130]. Sur les cellules leucocytaires, les ligands majeurs des sélectines consistent aux glycanes de surface, possédant une structure spécifique de type sialyl-Lewis, ainsi que la L-sélectine qui peut aussi servir de ligand pour les P- et E-sélectines [129]. Deux facteurs de transcription sont impliqués de manière importante dans la régulation de l'expression de certaines molécules d'adhésion endothéliale, soit le «Nuclear factor kappa B» (NF- κ B) et l'«Activated protein 1» (AP-1) [131]. Des sites de liaison au NF- κ B ont été identifiés sur les régions promotrices des gènes *e-sélectine*, *vcam-1* et *icam-1* et des sites de liaison pour AP-1 sont retrouvés sur les régions promotrices des gènes *icam-1* et *e-sélectine*. Aussi, des inhibiteurs de l'activation de NF- κ B et de AP-1 ont atténué l'expression des molécules d'adhésion induite par les cytokines, la LPS et les oxydants, tant *in vitro* que *in vivo* [131].

La P-sélectine est exprimée par les cellules endothéliales vasculaires et les plaquettes. Elle consiste en la plus grande des sélectines, avec un poids moléculaire de 140 kDa. Elle est conservée au niveau cellulaire dans des granules spéciales présentes dans les plaquettes (les α -granules) et les cellules endothéliales (les corps Weibel-Palade), desquelles elles peuvent être rapidement mobilisées à la surface après stimulation, par exemple par des cytokines [132]. Le NO est aussi un régulateur des P-sélectines : des inhibiteurs de eNOS augmentent leur expression [133]. Le ligand primaire de la P-sélectine est le « P-selectin glycoprotein ligand-1 » (PSGL-1) qui est exprimé de manière constitutive par les leucocytes [134,135]. La P-sélectine est fortement exprimée sur l'endothélium entourant les plaques athéromateuses humaines, mais elle n'a

pas été détectée dans l'endothélium artériel normal ou dans l'endothélium entourant des plaques fibreuses stables [132].

La P-sélectine a été définie au départ comme une molécule d'adhésion des plaquettes. Elle constitue un marqueur de l'activation plaquettaire, car elle n'est exprimée que sur les cellules activées. En plus d'être impliquée dans l'adhésion des plaquettes aux leucocytes, elle permet l'agrégation inter-plaquettaire et la formation d'agrégats plaquettaires stables [132].

Alors que la P-sélectine serait impliquée dans le processus de roulement précoce des leucocytes sur les cellules endothéliales, la E-sélectine servirait plutôt au roulement lent et à l'adhésion plus marquée. Il n'existe toutefois pas de pools d'entreposage pour la E-sélectine sur les cellules endothéliales, mais l'augmentation de son expression à la surface cellulaire se produit en réponse à une synthèse protéique dépendante de la transcription du gène [129]. La E-sélectine n'est pas exprimée de manière constitutive sur l'endothélium au repos, mais son expression est stimulée avec le TNF- α , la LPS, l'IL-1 et d'autres médiateurs pro-inflammatoires. La PSGL-1, exprimée sur la plupart des leucocytes, peut aussi servir de ligand pour la E-sélectine. Par contre, la transition entre le roulement et l'arrêt ferme des leucocytes avec la E-sélectine n'est pas dépendante du PGSL-1 [134,136].

En plus du PSGL-1, plusieurs autres ligands de P- et E-sélectines ont été identifiés *in vitro*. Le CD44 et le CD43 ont été proposés comme des ligands pour la E-sélectine, mais leur existence *in vivo* est moins certaine [130,137].

La L-sélectine est retrouvée sur les leucocytes et permet leur roulement lors de l'inflammation d'une manière dépendante du PSGL-1 [138]. L'utilisation de modèles *in vivo* a permis de démontrer que le roulement dépendant de la L-sélectine se produit majoritairement via des interactions entre les leucocytes en circulation et les leucocytes adhérents, processus qui est appelé attachement secondaire [138]. La L-sélectine pourrait aussi influencer l'adhésion ferme des leucocytes et leur transmigration lors de l'inflammation [130].

1.2.2.6.1.2 Superfamille des immunoglobulines

La superfamille des immunoglobulines (Ig) comprend une vaste variété de molécules. Certains membres de cette superfamille sont impliqués dans les maladies vasculaires, comme la ICAM-1, la ICAM-2, la VCAM-1 et la « platelet-endothelial cell adhesion molecule » (PECAM-1).

Les molécules ICAM permettent l'adhésion des leucocytes à l'endothélium activé en établissant de forts liens avec les intégrines, en induisant l'arrêt ferme des cellules inflammatoires à la surface vasculaire et en participant à leur infiltration. Chaque protéine de ICAM est capable de lier plus d'un ligand en utilisant différents domaines [139]. La ICAM-1 est fortement exprimée à l'état basal sur les leucocytes et sur les cellules endothéliales et son expression est stimulée par des cytokines pro-inflammatoires [139]. Pour sa part, la ICAM-2, une forme tronquée de la ICAM-1, est aussi exprimée sur les leucocytes, les plaquettes et les cellules endothéliales, mais son expression n'est pas augmentée lors de leur activation [129]. La ICAM-3 est détectée au niveau des cellules

endothéliales et des leucocytes et est la seule molécule ICAM présente sur les neutrophiles [139,140].

La VCAM-1 permet elle aussi l'adhésion des monocytes et des lymphocytes aux cellules endothéliales et participe au recrutement des cellules de la circulation en favorisant leur adhésion ferme. Son expression est négligeable sur les cellules endothéliales non stimulées, mais elle est grandement augmentée à la suite d'une stimulation avec des cytokines par une régulation transcriptionnelle [140]. Elle est aussi exprimée sur d'autres types cellulaires comme les macrophages, les myoblastes et les cellules dendritiques. La VCAM-1 lie principalement l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ des leucocytes, aussi connue sous le nom de «very late antigen-4». La liaison des cellules immunitaires à la VCAM-1 induit des changements de conformation sur les cellules endothéliales et permet la migration leucocytaire [140]. De plus, il a été démontré que la VCAM-1 active la flavoprotéine NADPH oxydase dans les cellules endothéliales, entraînant la formation de dérivés réactifs de l'oxygène, et que cette fonction est requise pour la migration des leucocytes dépendante de la VCAM-1 [139,140].

La PECAM-1 est exprimée de manière constitutive sur les plaquettes, sur la plupart des leucocytes et sur les cellules endothéliales [129]. Les molécules de PECAM-1 sont particulièrement denses au niveau des jonctions entre les cellules endothéliales où elles participent majoritairement à la liaison homophile des cellules adjacentes [140]. Ainsi, la PECAM-1 serait impliquée dans le maintien de l'intégrité endothéliale et dans la migration des cellules de la circulation dans la paroi vasculaire [139].

1.2.2.6.2 Expression des intégrines

La famille des intégrines comprend des protéines hétérodimères qui sont composées de sous-unités α et β liées par des liens non-covalents. Huit différentes chaînes α et dix-huit β ont été décrites à ce jour, alors que seulement 24 hétérodimères ont été observés [141]. Les intégrines possèdent plusieurs états conformationnels. Dans les cellules au repos, elles sont habituellement non-adhésives, présentes à la surface cellulaire en une conformation permettant une faible affinité pour les ligands. Des changements de l'activité cellulaire entraînent le relâchement de médiateurs qui modifient la conformation des intégrines et leur permettent de développer une haute affinité [141].

La spécificité des ligands aux intégrines est fortement déterminée par les sous-unités α et ces ligands peuvent être de deux groupes principaux : les molécules de surface cellulaire de la superfamille des immunoglobulines (la ICAM-1, la ICAM-2 et la VCAM-1) et une variété de grosses protéines matricielles extracellulaires (la fibronectine, la thrombospondine, la vitronectine, le fibrinogène et le composé du complément iC3b) [129].

Les intégrines sont exprimées sur une grande variété de cellules, où elles accomplissent plusieurs fonctions. Entre autres, les β_2 -intégrines jouent un rôle au niveau de l'athérosclérose [142]. Ces intégrines, strictement exprimées sur les cellules blanches du sang, interagissent avec les molécules ICAMs et permettent l'arrêt ferme à la surface de l'endothélium, étape qui se produit à la suite de l'activation des intégrines par l'intervention des sélectines [129,143,144]. Les

cellules peuvent alors modifier leur forme, adhérer à la surface de l'endothélium, puis rejoindre les jonctions cellulaires.

L'intégrine $\alpha_4\beta_1$, aussi appelée «very late antigen-4», est impliquée dans l'adhésion des éosinophiles, des lymphocytes et des monocytes aux cellules endothéliales. Elle est l'intégrine majeure exprimée sur les lymphocytes T et B non stimulés et interagit principalement avec la VCAM-1 [145].

1.2.2.6.3 Molécules d'adhésion solubles

La reconnaissance du rôle de l'inflammation à tous les stades du développement de l'athérosclérose a stimulé la recherche de marqueurs de protéines circulatoires reflétant les processus d'inflammation de la paroi vasculaire et fournissant des indications sur les patients à haut risque d'événements cardiovasculaires. Plusieurs études ont examiné le rôle des molécules d'adhésion comme prédicteurs des maladies cardiovasculaires. En général, les études tendent à démontrer que : (1) seulement l'élévation des niveaux sanguins de ICAM-1 s'avère un prédicteur d'événements chez les sujets sains [146-148] ; (2) les taux de VCAM-1 et ICAM-1 sont des prédicteurs chez les sujets avec maladies cardiovasculaires [139,149] ; (3) ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine et P-sélectine sont élevées chez les patients présentant un état cardiovasculaire instable [150-157] et (4) les niveaux sanguins de VCAM-1 et ICAM-1 sont corrélés avec la sévérité de l'athérosclérose [158]. Il semble logique que la VCAM-1 ne soit pas un facteur de risque chez les individus en santé, étant donné qu'elle n'est pas exprimée à l'état basal, mais qu'elle est

rapidement induite dans des conditions pro-athérosclérotiques chez les animaux et les humains [159,160]. Aucune intégrine soluble n'a été détectée en circulation à ce jour [139].

1.2.2.7 Transmigration chimiotactique

Lors de la réponse inflammatoire classique, l'adhésion est suivie par la transmigration des leucocytes à travers les jonctions inter-endothéliales vers l'intima. Cette transmigration est gouvernée par des facteurs chimiotactiques produits dans l'espace sous-endothélial [161]. Plusieurs cytokines chimiotactiques, appelées chimiokines, sont synthétisées par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages présents dans l'intima pendant le processus de formation de lésion [162]. Cette migration des cellules mononucléées dans l'intima est dépendante des chimiokines et constitue un autre phénomène important de l'athérogenèse.

Les chimiokines (cytokines chimiotactiques) sont de petites protéines qui dirigent la migration directe des leucocytes circulatoires vers le site d'inflammation ou de dommage. Environ 50 chimiokines humaines ont été caractérisées et elles sont divisées en trois familles majeures selon leur structure et leur fonction [162]. La chimiokine la mieux connue à ce jour est la MCP-1 qui permet le recrutement des monocytes et des cellules T. La MCP-1 est exprimée en quantités significatives à tous les stades du développement de l'athérosclérose [161].

La MCP-1 est impliquée dans le recrutement des monocytes de la circulation vers les lésions athéromateuses précoces, dans le développement de l'hyperplasie de l'intima après angioplastie, dans la vasculogénèse et dans certains aspects du processus de thrombose [162]. La MCP-1 est largement exprimée par les macrophages et les CML des lésions d'athérosclérose. Les mmLDL, mais non les LDL natives, peuvent induire la production de MCP-1 par les cellules endothéliales et par les CML de la paroi vasculaire [162]. De plus, des études chez les souris transgéniques surexprimant la MCP-1 ou chez les souris déficientes en MCP-1 apportent de fortes évidences de son rôle dans l'athérogenèse. Par exemple, la délétion de la MCP-1 chez les souris récepteur de LDL *-/-* a atténué la progression des lésions [163-165], alors que la surexpression de la MCP-1 chez les souris apo E *-/-* a augmenté la formation des cellules spumeuses et l'athérogenèse [166]. De plus, des niveaux sériques élevés de MCP-1 sont retrouvés chez les patients avec maladies coronaires artérielles [167].

1.2.2.8 Formation des cellules spumeuses et des stries lipidiques

Les macrophages sont des joueurs clés dans les processus d'inflammation et de réponses immunitaires. Leurs actions propres dépendent largement de leur capacité à produire des radicaux libres, des protéases, des facteurs du complément et des cytokines [161]. Les macrophages peuvent aussi initier des réponses immunitaires adaptatives en présentant des antigènes étrangers aux cellules T [161]. Toutes ces activités sont importantes dans le développement de l'athérosclérose.

La différenciation des monocytes en macrophages est gouvernée par le « macrophage colony stimulating factor » (M-CSF), une cytokine produite par les macrophages, mais aussi par les cellules vasculaires et les cellules musculaires lisses. Le M-CSF est un facteur hématopoïétique de différenciation et de prolifération des monocytes [168]. Il a été démontré par des études chez la souris que la différenciation des monocytes est nécessaire pour le développement de l'athérosclérose et que les monocytes/macrophages présents dans la plaque ont la capacité de s'y multiplier. [169].

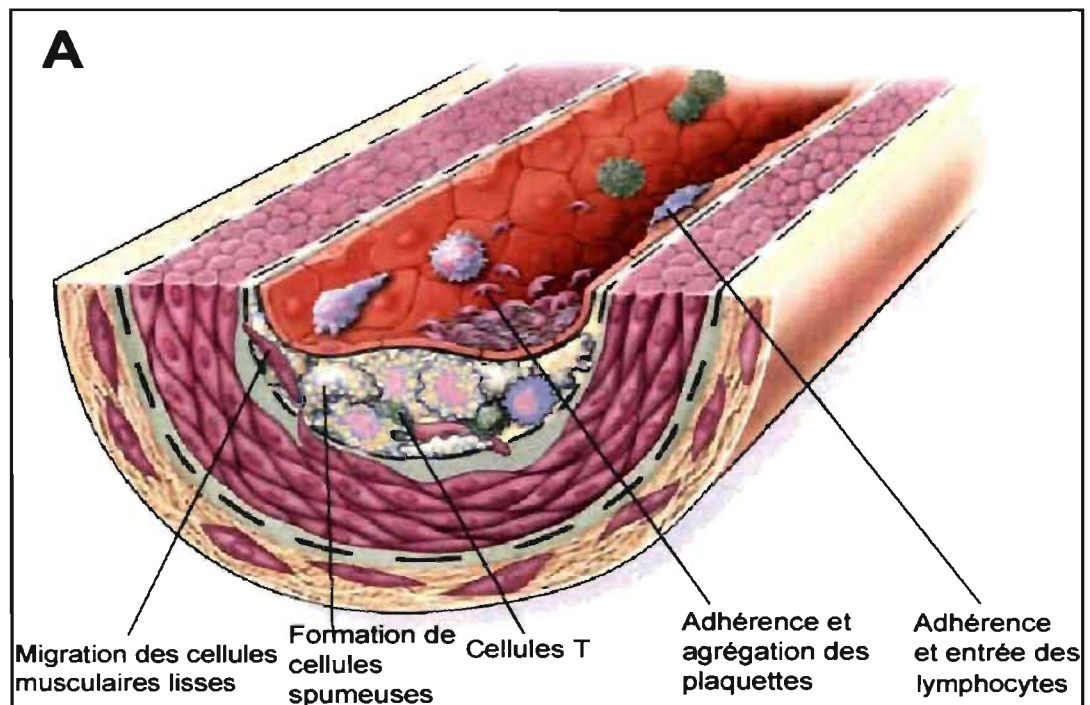
Afin de se transformer en cellules spumeuses, les macrophages captent et internalisent de grandes quantités de LDL oxydées par l'intermédiaire de récepteurs dits « éboueurs » qui, à l'inverse du récepteur des LDL normales, ne sont pas sous le contrôle négatif du contenu intracellulaire en cholestérol [170]. Cette accumulation de cholestérol dans les macrophages entraîne la formation des cellules spumeuses, responsables des dépôts lipidiques de la plaque athéromateuse.

Les macrophages de la paroi artérielle permettent d'épurer l'intima de la surcharge en cholestérol, mais ils entretiennent aussi un cercle vicieux en activant les cellules endothéliales et en augmentant leur perméabilité aux LDL par le biais de la production de cytokines pro-inflammatoires dont de nombreuses sont présentes dans la plaque, telles $TNF-\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 et interféron γ (IFN γ) [161]. Les cytokines peuvent, d'une part, provoquer le recrutement des monocytes en stimulant la libération de la chimiokine MCP-1 par les cellules de la plaque et, d'autre part, favoriser leur adhérence à l'endothélium en induisant

l'expression de la ICAM-1 et de la VCAM-1 par les cellules endothéliales [161]. Les cytokines peuvent aussi moduler l'activité des cellules musculaires lisses, entraînant une dégradation de la matrice extracellulaire et une fragilisation de la chape fibreuse [161]. De plus, les cytokines pro-inflammatoires interviennent dans les complications thrombotiques associées à l'athérosclérose [171].

L'accumulation dans le sous-endothélium des cellules spumeuses et des lymphocytes T entraîne les premières manifestations histologiques de l'athérosclérose, appelées les stries lipidiques. Les stries lipidiques représentent des lésions réversibles de l'athérosclérose et n'ont pas de conséquences cliniques [172]. Toutefois, elles peuvent évoluer vers des lésions plus avancées, les lésions fibreuses. Ces dernières se caractérisent par l'accumulation de débris cellulaires et de lipides extracellulaires, surtout le cholestérol et ses esters, généralement recouverts d'une chape fibreuse constituée des cellules musculaires lisses et d'une matrice protéique extracellulaire sécrétée par ces cellules [172]. La présence de nombreux macrophages (spumeux ou non) et de quelques cellules T est aussi observée [172]. L'athérosclérose est donc le résultat d'une réaction inflammatoire mal contrôlée ayant pour but, à l'origine, l'épuration de la surcharge lipidique intinale.

Figure 18 A. Développement de l'athérosclérose



Adapté de [173]

Figure 18 A : Lors du développement précoce de l'athérosclérose, on observe les phénomènes d'adhérence et d'entrée des lymphocytes, l'agrégation plaquettaire, la formation des cellules spumeuses et la migration des cellules musculaires lisses.

1.2.2.9 Prolifération et migration des cellules musculaires lisses: formation de la chape fibreuse

La prolifération des cellules musculaires lisses est un processus important dans le développement de la plaque d'athérosclérose. La fonction principale de ces cellules est de maintenir le tonus et la résistance vasculaire.

Le rôle exact de la prolifération des CML dans le développement de l'athérosclérose est encore sujet à débats. D'un côté, l'accumulation de CML au niveau de l'intima consiste en une étape du développement précoce de la lésion. Les CML peuvent stimuler la progression de la plaque en produisant des médiateurs pro-inflammatoires et en synthétisant des molécules matricielles requises pour la rétention des lipoprotéines [174]. D'un autre côté, les CML s'avèrent importantes dans le maintien de la stabilité de la plaque pour la formation d'une chape fibreuse ferme [175]. La prolifération locale des CML peut se produire en réponse à des dommages biochimiques (nicotine, insuline et cholestérol), mécaniques (hypertension systémique, angioplastie, placement de stent) ou immunologiques [176].

Les cytokines et les médiateurs d'inflammation au niveau de l'espace sous-endothélial ont des effets chimiotactiques sur les CML, ce qui résulte en leur migration vers l'intima pour former la chape fibreuse recouvrant le corps lipidique et inflammatoire. De plus, les CML synthétisent des facteurs de croissance qui facilitent leur prolifération et elles produisent différentes protéines matricielles comme le collagène et l'élastine qui sont utilisées dans la réparation du dommage tissulaire [175]. Ce rôle des CML constitue un mécanisme de défense important contre les complications de l'athérosclérose, car il permet de

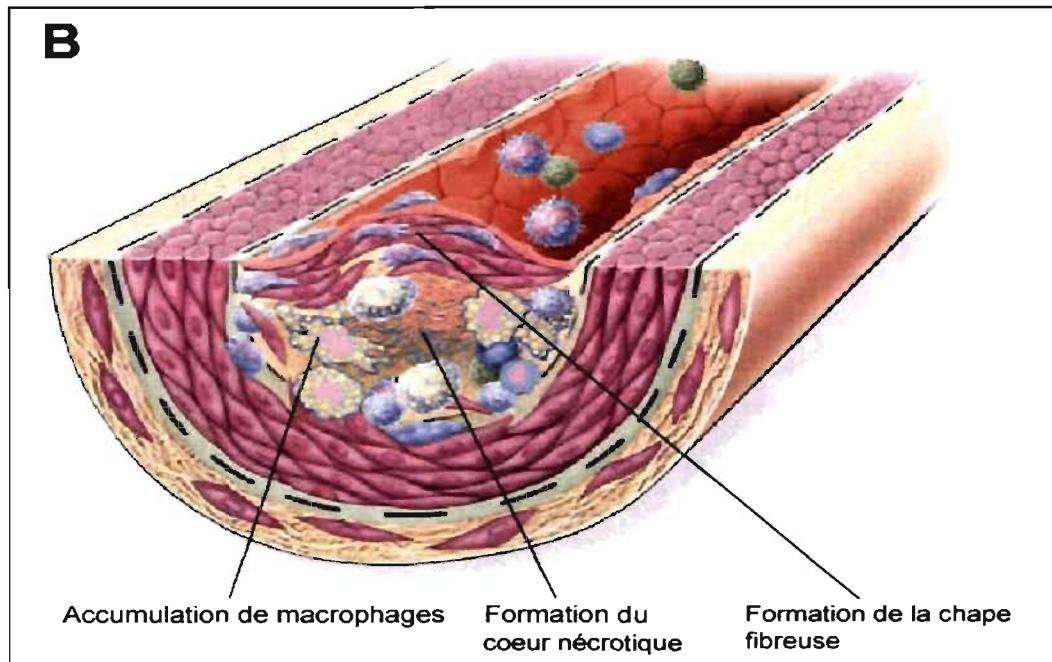
séparer le corps lipidique hautement thrombogénique des plaquettes en circulation et des protéines pouvant engendrer une cascade de coagulation, en plus de conférer une stabilité structurale à la plaque. En fait, les CML sont les seules capables de synthétiser la chape fibreuse, leur attribuant un rôle important dans le maintien de la stabilité plaquettaire [175,177].

1.2.2.10 Formation du corps nécrotique

À ce stade, les lésions sont caractérisées par la présence de CML en surface, entourant des pools acellulaires riches en lipides dans lesquels il y a accumulation de cholestérol libre et le commencement du processus de calcification.

La formation du corps nécrotique est majoritairement attribuée à la mort des macrophages. Au niveau du corps lipidique, la combinaison de l'infiltration des macrophages et de leur mort par apoptose ou par nécrose, entraîne le développement de lésions avancées fibro-athéromateuses [178]. À mesure que la plaque progresse de stries lipidiques à corps nécrotique, le contenu en cholestérol libre des plaques augmente, alors que celui en esters de cholestérol diminue, ce qui pourrait être étroitement lié à l'instabilité des lésions [179]. Il s'ensuit une hypoxie et une infiltration de cellules inflammatoires, entraînant une néo-vascularisation. Les vaisseaux sanguins naissants immatures permettent l'extravasation des érythrocytes dans la plaque, ce qui contribue à l'élargissement du corps nécrotique [179].

Figure 18 B. Développement de l'athérosclérose



Adapté de [173]

Figure 18 B : À la suite du développement des stries lipidiques, on observe la formation du corps nécrotique et de la chape fibreuse.

1.2.2.11 Stabilité des plaques athéromateuses

La croissance des plaques est graduelle et associée à la mort par apoptose des cellules macrophagiques dans le corps lipidique, ainsi qu'à la migration des cellules musculaires lisses en réponse aux stimuli inflammatoires présents au niveau de la plaque. Lors de rupture ou d'érosion de la lésion, il y a exposition du corps lipidique thrombogène à la circulation. Ceci entraîne une accumulation rapide de plaquettes, un dépôt de fibrine et une thrombose, menant aux syndromes coronaires aigus [180]. Il semble que la balance entre les effets réparateurs des CML et les effets destructeurs des cellules inflammatoires détermine l'intégrité de la chape fibreuse et, de ce fait, la stabilité des plaques [177].

En effet, les cellules inflammatoires peuvent fragiliser ou détruire la chape fibreuse par différents mécanismes. Premièrement, les lymphocytes T produisent des cytokines pro-inflammatoires, comme l'INF- γ , qui inhibent directement la prolifération des CML et qui peuvent diminuer de manière marquée la synthèse de collagène. Deuxièmement, les cytokines inflammatoires, comme l'IL-1 β et le TNF- α des macrophages et l'INF- γ des lymphocytes T, sont cytotoxiques pour les CML et entraînent l'apoptose des cellules. Troisièmement, les macrophages peuvent induire l'apoptose des CML par contact cellulaire direct. Quatrièmement, les macrophages produisent des métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui peuvent dégrader les composantes de la matrice de la chape fibreuse. Cette production de MMPs est régulée par des médiateurs inflammatoires comme le TNF- α [177].

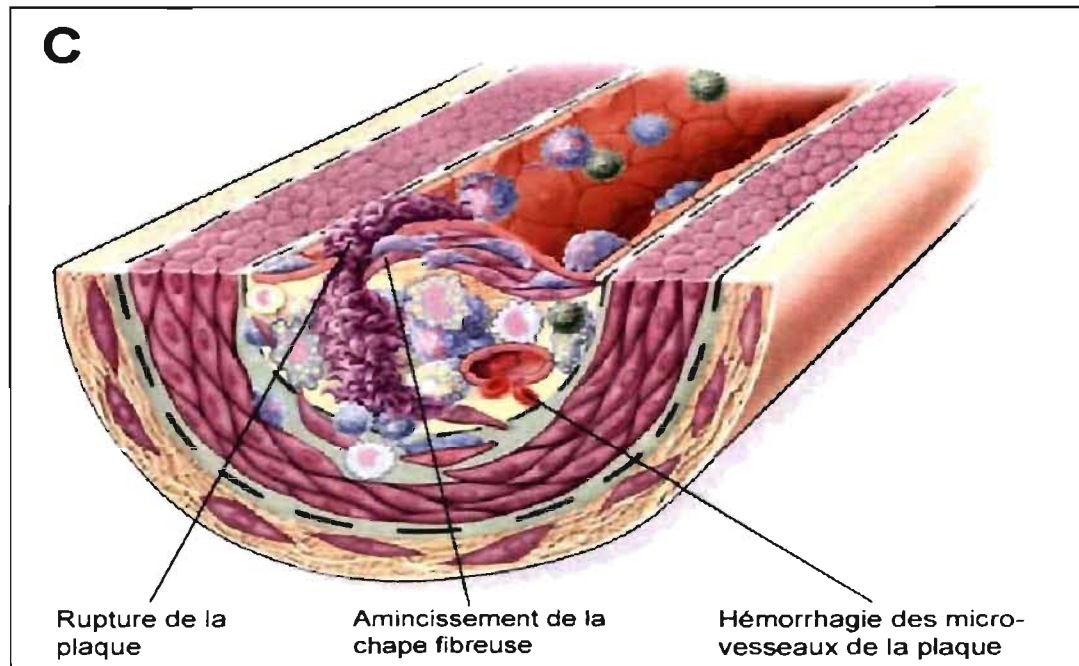
Les lésions présentant une mince chape fibreuse sont promptes à la rupture. Le risque d'événements vasculaires chez les patients avec des plaques stables est moindre que chez ceux présentant des plaques instables [181].

À la suite de la rupture de la plaque, il y a une exposition immédiate de la matrice extracellulaire thrombogénique de la chape fibreuse et du corps lipidique aux protéines et plaquettes de la cascade de coagulation, ce qui entraîne l'agrégation des plaquettes, leur activation et la formation d'un caillot [177].

1.2.2.12 Complication et rupture des plaques athéromateuses

L'athérosclérose devient vraiment une maladie au stade des lésions compliquées. Les phénomènes de calcification, d'ulcération, d'hémorragie, et la formation d'hématomes peuvent compliquer d'avantage la plaque d'athérome. Les lésions avancées continuent à croître en volume et en taille, progressent vers l'adventice et la lumière artérielle et peuvent grossir suffisamment au point de créer des ischémies [172,180]. Cependant, les complications cliniques majeures, telles que les accidents myocardiques et cérébraux, sont causées par des occlusions aiguës provoquées par la formation d'un thrombus ou d'un caillot de sang. Ces thromboses sont généralement déclenchées par la rupture ou l'érosion d'une plaque [180].

Figure 18 C. Développement de l'athérosclérose



Adapté de [173]

Figure 17 C : Les lésions athéromateuses formées peuvent se compliquer et se rompre, menant aux complications cliniques de l'athérosclérose.

1.2.3 Transport de cholestérol dans les macrophages et les cellules endothéliales vasculaires

Les macrophages jouent un rôle crucial dans le développement de l'athérosclérose, entre autres par la formation des cellules spumeuses. Le cholestérol, dérivé principalement des LDL, entre dans le macrophage via certaines voies impliquant des récepteurs. Ces récepteurs reconnaissent les lipoprotéines naissantes et modifiées et ils répondent différemment à l'augmentation des niveaux de cholestérol cellulaire [126]. La mobilisation du cholestérol cellulaire vers la membrane plasmique et son efflux aux accepteurs extracellulaires HDL constituent des mécanismes importants dans la régulation des niveaux de cholestérol cellulaires [126]. Les principales protéines membranaires permettant le transport de cholestérol au niveau des macrophages sont le récepteur de LDL, le SRAI/II, la CD36, le SR-BI, l'ABCA1, l'ABCG1 et l'apo E.

Les cellules endothéliales vasculaires ne subissent pas les modifications phénotypiques de l'accumulation de cholestérol comme le font les macrophages ; ces cellules transportent le cholestérol, mais ne l'emmagasinent pas. Ainsi, elles doivent être dotées de mécanismes permettant l'homéostasie et le transport du cholestérol. Les principaux transporteurs de cholestérol retrouvés sur ces cellules sont le LOX-1, l'ABCA1, l'ABCG1 et le SR-BI.

Ainsi, certains de ces récepteurs sont communs aux deux types cellulaires : l'ABCA1, l'ABCG1 et le SR-BI. Le récepteur de LDL, les récepteurs éboueurs de classe A et l'apo E sont spécifiques aux macrophages, alors que le LOX-1 n'est retrouvé que sur les cellules endothéliales vasculaires.

1.2.3.1 Influx de cholestérol

1.2.3.1.1 Récepteurs de LDL

Les macrophages captent les LDL à l'aide du récepteur de LDL par un processus d'endocytose. Pour ce faire, l'apo B lie le récepteur, le complexe ligand-récepteur est endocytosé, puis dissocié dans la cellule, et les lipoprotéines sont dégradées dans les organelles. La transcription du gène *ldlr* est régulée par le contenu cellulaire en stérols : lorsque le contenu en cholestérol est abondant, l'expression du récepteur de LDL diminue. Ainsi, la captation de cholestérol via le récepteur de LDL ne mène pas à une accumulation lipidique excessive [126].

Il semble que, de manière globale, le récepteur de LDL protège contre l'athérogenèse, car des mutations inactivant le gène *ldlr* entraîne une élévation plasmatique marquée des niveaux de LDL et le développement précoce de l'athérosclérose chez les humains et les souris [182].

1.2.3.1.2 Récepteurs éboueurs

Dans les macrophages, les récepteurs éboueurs jouent un rôle dans la captation excessive de cholestérol. Le terme « récepteur éboueur » (de l'anglais « scavenger receptor ») a été judicieusement choisi, car ces récepteurs reconnaissent un large éventail de ligands. Les récepteurs éboueurs de classe A et B sont exprimés dans la plaque d'athérosclérose [183]. Les LDL modifiées par acétylation, oxydation ou glycation sont captées par les récepteurs éboueurs sans auto-régulation par le contenu cellulaire en cholestérol [183].

L'expression des récepteurs éboueurs n'est pas limitée aux cellules de la plaque d'athérome, ce qui rend difficile l'application d'une thérapie impliquant leur inhibition. Ils sont aussi présents au niveau du foie où ils ont plutôt un rôle athéroprotecteur, car ils permettent de capter les lipoprotéines de la circulation. De plus, les récepteurs éboueurs sont impliqués dans les processus d'adhésion et d'enlèvement de cellules mortes et dans la défense de l'hôte contre l'infection bactérienne [183].

1.2.3.1.2.1 «Scavenger receptors class A» (SRA)

En plus de lier les lipoprotéines modifiées, les «scavenger receptors class A» (SRA) sont impliqués dans d'autres processus affectant la formation des lésions vasculaires, comme le recrutement des monocytes, l'adhésion des macrophages et la sécrétion des cytokines [126]. Les SRA sont exprimés par les macrophages tissulaires, les cellules endothéliales aortiques, les cellules endothéliales sinusoïdales hépatiques et les cellules de Kupffer. Les SR-A sont hautement exprimés au niveau des cellules spumeuses des lésions athéromateuses humaines et il a aussi été retrouvé sur les cellules musculaires lisses [183]. Plusieurs molécules polyanioniques lient les récepteurs éboueurs de classe A, mais leur affinité pour les lipoprotéines modifiées varie, liant de manière préférentielle les oxLDL [183].

Les SRA sont considérés comme critiques dans les étapes initiales de la formation de la plaque, mais dans les modèles animaux, les délétions totales de SRA ont mené à des résultats controversés. Par exemple, chez les souris

déficientes en apo E, la délétion en SRA a entraîné une augmentation modérée des niveaux de cholestérol plasmatique, coïncidant avec une forte diminution (60%) du développement des lésions [184]. Par contre, chez les souris déficientes en récepteur de LDL, la délétion en SRA a réduit de 20% les niveaux de cholestérol plasmatique et d'athérosclérose [185]. Ces discordances montrent que, probablement, en plus de la captation des lipoprotéines, les SRA possèdent d'autres propriétés fonctionnelles qui influencent l'athérogenèse.

Il existe trois formes connues de SRA. Les SR-AI, SR-AII et SR-AIII sont tous des produits du même gène, générés par épissage alternatif. Le SR-AI contient une séquence C-terminale de 110 acides aminés riches en cystéine qui est absente du SR-AII. Le SR-AII est fortement et constamment exprimé lors de la différenciation des monocytes en macrophages, alors que l'expression de SR-AI est augmentée de manière graduelle [186]. Le SR-AIII n'est pour sa part pas retrouvé sur la membrane plasmatique et n'entraîne pas l'endocytose des ligands [186].

Le niveau d'expression des SRA macrophagiques est influencé par différentes cytokines. Le TNF- α et l'INF γ inhibent l'activité des SRA des macrophages par des régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles [187,188]. Il a aussi été démontré que le «Proliferator-activated receptor γ » (PPAR γ) inhibe l'expression des SRA [189]. Le M-CSF augmente les SRA dans les macrophages murins [190,191], alors que le facteur de croissance «Transforming growth factor β » les diminue et que le «Platelet-derived growth factor» (PDGF) les amplifie [192-194].

1.2.3.1.2.2 «Fatty acid translocase» (CD36)

La «Fatty acid translocase» (CD36) est un récepteur éboueur de type B. Elle consiste en une glycoprotéine membranaire d'un poids moléculaire de 78-88 kDa qui est exprimée sur les monocytes/macrophages, les plaquettes, les cellules endothéliales et le tissu adipeux. Ses fonctions physiologiques principales connues sont de transporter les acides gras à longue chaîne, de lier et d'internaliser les oxLDL. Elle peut aussi lier les LDL naissantes, les HDL et les VLDL [195]. Au niveau cellulaire, la CD36 colocalise avec la cavéoline-1 dans les micro-domaines de la membrane plasmique appelés les cavéoles [196].

La CD36 a d'abord été identifiée comme une « Fatty acid translocase » nécessaire pour le transport des acides gras à longue chaîne [197]. Elle facilite la translocation des acides gras non seulement dans les adipocytes, mais aussi dans le cœur et le muscle squelettique, où les acides gras à longue chaîne constituent d'importants substrats pour la production d'énergie. Les souris transgéniques qui surexpriment la CD36 dans le muscle squelettique démontrent une augmentation de l'oxydation des acides gras, une réduction des taux plasmatiques en acides gras et en triacylglycérols et un abaissement du dépôt des graisses [198].

Les souris déficientes en CD36 présentent une diminution de 6 fois du développement d'athérome comparativement aux contrôles, probablement à cause d'une réduction de la captation des oxLDL, ce qui inhibe la formation des cellules spumeuses [199]. Par contre, les humains déficients en CD36 ont une résistance à l'insuline considérable, des taux sanguins de triacylglycérols et de glucose élevés, des niveaux de HDL réduits et une pression sanguine beaucoup plus

élevée que les sujets normaux [200]. La délétion de CD36 est également reliée à la résistance à l'insuline chez les animaux [201].

La CD36 est exprimée en grandes quantités dans les macrophages. Il semble que les oxLDL stimulent leur propre captation en augmentant l'expression de CD36 par un processus dépendant de PPAR γ [202] ; le gène de la CD36 contient un élément de réponse au PPAR γ fonctionnel dans les macrophages. L'incubation de macrophages déficients en CD36 avec les oxLDL résulte en seulement 40 à 60% de la liaison, de l'internalisation et de l'accumulation d'esters de cholestérol, comparativement aux cellules exprimant la CD36 [203]. De plus, il a été démontré par des modèles murins que la CD36 joue un rôle central dans le développement des plaques athéromateuses et la formation des cellules spumeuses [199].

L'expression de CD36 est hautement modulée lors de la différenciation des monocytes en macrophages par les cytokines, les facteurs de croissance et les lipoprotéines modifiées présentes dans la plaque [203]. La CD36 des macrophages participe aussi à la reconnaissance des cellules apoptotiques [203]. Ces activités multifonctionnelles de CD36 au niveau des monocytes/macrophages suggèrent que la modulation de son expression peut mener à une série d'effets bénéfiques ou nuisibles dans les processus d'athérosclérose, d'inflammation et d'angiogenèse [204].

1.2.3.1.2.3 «Scavenger receptor class B type I» (SR-BI)

Le SR-BI est un autre récepteur éboueur impliqué dans le métabolisme du cholestérol. Il lie les HDL et permet la captation sélective des esters de cholestérol dans plusieurs types cellulaires. Au niveau global dans l'organisme, son expression semble être athéroprotectrice. Une surexpression hépatique de SR-BI chez la souris entraîne la réduction du HDL-cholestérol, augmente la sécrétion du cholestérol dans la bile et diminue l'athérosclérose [205].

Le SR-BI est fortement exprimé au niveau du foie, mais aussi des tissus stéroïdiens ayant un besoin constant en cholestérol comme les glandes surrénales, les ovaires et les testicules [205]. Il est aussi exprimé dans les macrophages murins [205] et dans les lésions athéromateuses humaines [206,207]. Le SR-BI lie les HDL avec une grande affinité, contrairement aux récepteurs éboueurs de classe A qui n'interagissent pas du tout avec les lipoprotéines naissantes. Il se lie aussi aux lipoprotéines modifiées, aux phospholipides anioniques et aux cellules apoptotiques [183].

Le SR-BI est un membre de la superfamille CD36. Il consiste en une large boucle extracellulaire et deux domaines transmembranaires C- et N-terminaux avec de courtes queues cytoplasmiques. Initialement, le SR-BI a été caractérisé pour sa capacité à capter les esters de cholestérol des HDL, de manière unidirectionnelle et sélective, sans internalisation de la particule ; il permet aussi l'entrée de phospholipides et de triacylglycérols [207,208]. Il engendrerait aussi les échanges bidirectionnels de cholestérol libre entre les cellules et les particules de HDL, mouvement qui serait dépendant d'un gradient de concentration. Au

niveau cellulaire, le SR-BI a été localisé dans les cavéoles qui sont des microdomaines de la membrane plasmique riches en cholestérol et en sphingomyéline [207].

Le SR-BII est un isoforme de SR-BI issu du même gène, qui diffère seulement par la queue cytoplasmique. Il semble qu'il soit plus difficilement traduit en protéine que le SR-BI [209].

Figure 19. SR-BI

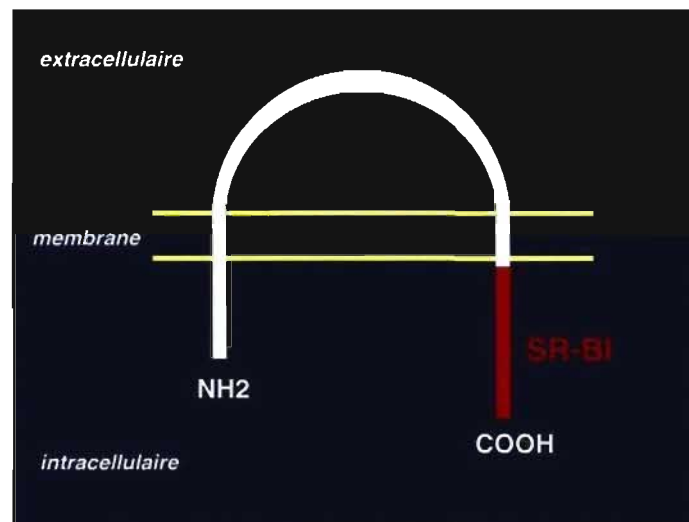


Figure 19 : Le SR-BI consiste en une large boucle extracellulaire et deux domaines transmembranaires C- et N- terminaux avec de courtes queues cytoplasmiques

Le rôle de SR-BI dans les macrophages n'a pas encore été totalement élucidé. Alors qu'il avait été postulé au départ qu'il puisse permettre l'entrée des esters de cholestérol des HDL, menant à la formation des cellules spumeuses, des études ultérieures ont plutôt démontré qu'il entraîne l'efflux de cholestérol libre des macrophages vers les HDL et l'initiation du processus de transport inverse de cholestérol. En effet, dans les macrophages, le SR-BI est impliqué dans les processus d'efflux de cholestérol lorsque le gradient est favorable [210]. L'inactivation du SR-BI des macrophages entraîne le développement de l'athérosclérose chez les souris déficientes en apo E, et ce en l'absence de changement au niveau des lipides plasmatiques, des sous-populations de HDL et de l'efflux de cholestérol [211]. Par contre, chez les souris SR-BI^{-/-}, aucune différence dans l'export de cholestérol des macrophages aux HDL n'a été notée, comparativement aux souris normales [211,212]. Toutefois, les macrophages J774 surexprimant de manière stable le SR-BI exportent plus de cholestérol que leurs contrôles [213]. Des études supplémentaires sont nécessaires pour établir les fonctions exactes de ce transporteur dans les échanges de cholestérol des macrophages.

Au niveau des cellules endothéliales vasculaires, le SR-BI sert, entre autres, à maintenir l'intégrité de la eNOS par sa liaison aux HDL [86]. En effet, des travaux indiquent que les HDL causent une grande activation de la eNOS et que cet effet est induit dans les cavéoles cellulaires par le SR-BI, dans un processus nécessitant sa liaison à l'apo A-I, suivie d'une phosphorylation de la eNOS par la protéine kinase C [86,214]. Par contre, le rôle de SR-BI dans le

transport de cholestérol des cellules endothéliales vasculaires n'est pas encore connu.

1.2.3.1.3 «Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1» (LOX-1)

Le « Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 » (LOX-1) est un récepteur éboueur pour les LDL oxydées présent sur les cellules endothéliales vasculaires. Le LOX-1 peut reconnaître une variété de macromolécules, incluant les LDL modifiées, les plaquettes activées, les cellules apoptotiques ou âgées, les bactéries, ainsi que les produits terminaux avancés de glycation. Malgré leur utilité semblable, le LOX-1 ne partage pas d'homologie structurale avec les autres récepteurs éboueurs. Le LOX-1 consiste en une glycoprotéine membranaire de type II appartenant à la famille des lectines de type C. Ce récepteur est composé de quatre régions fonctionnelles : un domaine intracellulaire N-terminal, un domaine transmembranaire hydrophobe, un domaine de connection et un domaine « type-C lectin-like domain » qui est hautement conservé entre les espèces et qui constitue l'unité fonctionnelle pour la reconnaissance des ligands [127]. Il est traditionnellement reconnu que le LOX-1 existe et fonctionne comme un monomère, mais il a aussi été démontré qu'il peut se présenter comme un dimère ou un oligomère. Le LOX-1 est présent dans l'endothélium des artères coronaires et une très faible quantité a été identifiée dans les macrophages, les plaquettes et les cellules musculaires lisses [127].

Le LOX-1 est considéré comme le récepteur majeur des oxLDL sur les cellules endothéliales des artères, desquels il reconnaît la partie protéique. Il agit comme un récepteur de surface pour l'endocytose des oxLDL. *In vivo*, il est exprimé dans les artères aortiques, carotidiennes et thoraciques, ainsi qu'au niveau des artères et des veines coronaires. Son expression est augmentée dans les conditions pathologiques affectant le système vasculaire, comme l'hypertension, le diabète et l'athérosclérose. Des analyses fonctionnelles ont révélé que le LOX-1 supporte la liaison, l'internalisation et la dégradation protéolytique des oxLDL. Il semble que sa plus grande affinité soit pour les LDL moyennement modifiées [215].

L'expression de LOX-1 est relativement faible dans les cellules endothéliales au niveau basal, mais elle peut être induite *in vitro* par les cytokines pro-inflammatoires et des peptides vasoconstricteurs, et *in vivo* dans les conditions pro-athérogènes comme l'hypertension, le diabète et les hyperlipidémies. Dans les cellules endothéliales en culture, l'expression de LOX-1 est augmentée par ses ligands, les oxLDL. Ces derniers amplifient tant l'expression génique que protéique de LOX-1, suggérant une régulation transcriptionnelle. Les LDL natives n'ont par contre aucun effet sur son expression. Dans les modèles de cellules endothéliales vasculaires, l'induction de l'expression de LOX-1 par des stimuli variés stimule l'incorporation des oxLDL dans les cellules, entraînant une activation cellulaire, la dysfonction et le dommage endothélial [216]. En ce sens, il a été démontré que la liaison des oxLDL au LOX-1 induit la génération d'anions superoxydes et active le NF- κ B

des cellules endothéliales [217]. De plus, il est suggéré que l'activation de LOX-1 diminue le relâchement du NO, non seulement en augmentant son catabolisme, mais aussi en atténuant l'activité de la eNOS [218]. L'activation de LOX-1 dans les cellules endothéliales induit aussi l'expression de l'endothéline-1, de la E-sélectine, de la P-sélectine, de la VCAM-1, de la ICAM-1 et de la MCP-1 [219-221].

Des modèles *in vitro* ont permis de démontrer que le LOX-1 peut capter les leucocytes et les plaquettes, ce qui peut en faire une nouvelle molécule impliquée dans le recrutement cellulaire et dans le processus inflammatoire de l'athérosclérose [222].

1.2.3.2 Efflux de cholestérol

Le principal mécanisme par lequel les macrophages se débarrassent de leur excès en cholestérol est son efflux vers les accepteurs dans le fluide interstitiel, initiant le processus de transport inverse, critique pour débarrasser les sites périphériques en cholestérol.

L'efflux de phospholipides et de cholestérol des macrophages est facilité par au moins trois mécanismes en plus du processus de diffusion passive entre les membranes. Un mécanisme majeur dépend de la présence des particules réceptrices lipophiles contenant l'apo A-I, impliquant l'ABCA1. Le deuxième mécanisme consiste en un processus d'efflux en absence d'accepteur lipoprotéique, indépendant de l'ABCA1, qui pourrait impliquer d'autres transporteurs protéiques, comme l'ABCG1 ou l'ABCG4. Un troisième

mécanisme par lequel les cellules de la périphérie peuvent éliminer le cholestérol implique la génération mitochondriale d'oxystérols, ces derniers activant la transcription de l'ABCA1. La formation de ces oxystérols constitue un mécanisme significatif par lequel les macrophages peuvent éliminer l'excès de cholestérol via sa sécrétion aux particules de HDL [223].

1.2.3.2.1 «ATP-Binding cassette transporter A1» (ABCA1)

Les transporteurs ABC sont des protéines membranaires qui utilisent l'adénosine triphosphate (ATP) comme source d'énergie afin de transporter des substrats variés à différents compartiments cellulaires dans un processus consommant de l'énergie. Ils font partie d'une grande famille qui inclut 49 transporteurs et qui est divisée en huit sous-familles basées sur leurs séquences en acides aminés. Les transporteurs ABC présentent deux domaines transmembranaires et des domaines de liaison aux nucléotides qui interagissent avec l'ATP et qui contiennent deux motifs caractéristiques Walker A et Walker B. Par contraste, les demi-transporteurs ne contiennent qu'un seul domaine transmembranaire et un feuillet de liaison aux nucléotides, mais ils peuvent se combiner en hétérodimères ou en homodimères pour former des transporteurs fonctionnels [224,225].

Un de ces transporteurs, l'ABCA1, est muté dans la maladie de Tangier, un syndrome rare dans lequel les patients présentent des niveaux de HDL circulatoires très bas, des taux élevés de TG, une augmentation du catabolisme de l'apo A-I faiblement lipidée, ainsi qu'une accumulation de cellules spumeuses à

plusieurs sites dans l'organisme [226]. Ce défaut génétique souligne le rôle central de l'ABCA1 dans la production des HDL par le foie et l'intestin, dans l'extraction du cholestérol des macrophages et dans la prévention de l'athérosclérose [224,227]. Dans les fibroblastes normaux exposés à l'apo A-I, il y a efflux de cholestérol et de phospholipides, entraînant la formation de particules de HDL naissantes [228]. Par contre, les fibroblastes des patients souffrant de la maladie de Tangier n'effectuent pas cet efflux de cholestérol et de phospholipides aux particules de HDL [226]. De plus, chez les sujets avec maladie de Tangier, des gouttelettes d'esters de cholestérol s'accumulent au niveau du foie, de l'intestin et des macrophages [226].

Figure 20. ABCA1

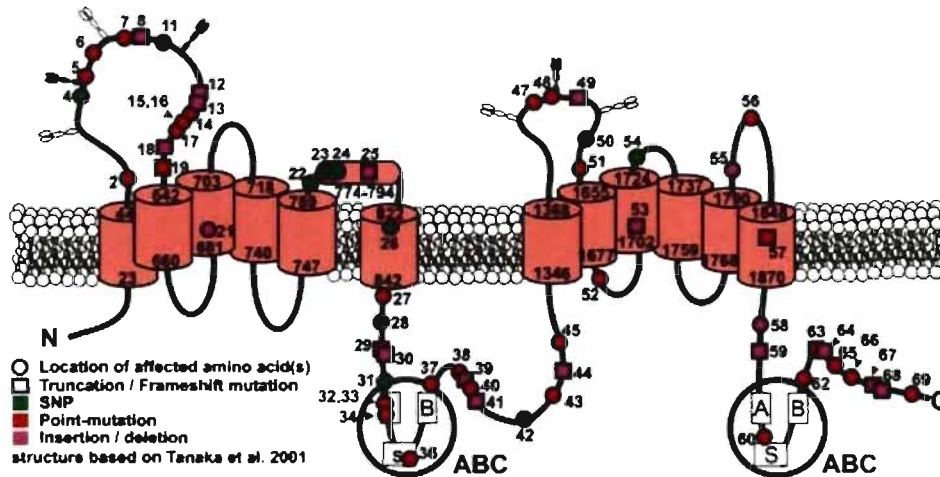


Figure 20 : L'ABCA1 est un transporteur de phospholipides et de cholestérol constitué de deux domaines transmembraires et de domaines de liaison aux nucléotides qui interagissent avec l'ATP et qui contiennent deux motifs caractéristiques Walker A et Walker B.

L'ABCA1 joue aussi un rôle dans l'absorption intestinale de cholestérol. Les drogues qui augmentent l'expression de l'ABCA1 inhibent l'absorption de cholestérol de la lumière intestinale aux cellules épithéliales intestinales [229]. Cette observation suggère que l'ABCA1 agit au niveau du pôle apical des cellules épithéliales pour rejeter le cholestérol vers la lumière intestinale. Par contre, une étude plus récente montre qu'une ablation tissulaire de l'ABCA1 n'entraîne pas d'effet sur l'absorption intestinale de cholestérol [230]. Une autre hypothèse stipule donc que l'ABCA1 pourrait se trouver sur le côté basolatéral des entérocytes et agir comme transporteur de cholestérol vers la circulation sanguine, comme il le fait dans les hépatocytes [231].

Les macrophages expriment de hauts niveaux d'ABCA1, qui est activé par le facteur de transcription LXR. Le rôle de l'ABCA1 macrophagique dans l'athérosclérose a été examiné chez les souris déficientes pour le gène, spécifiquement au niveau des macrophages. Cette déficience a eu un impact minime sur les niveaux de HDL circulatoires, ce qui montre l'importance primaire de l'ABCA1 hépatique et intestinal dans la production de HDL [232]. Par contre, lorsque ces souris ont aussi subi une délétion du récepteur de LDL, elles ont souffert d'une augmentation de plus de 60% des lésions athéromateuses, soulignant la protection de l'ABCA1 des macrophages, et ce même sans changement des niveaux de HDL sanguines [233].

L'expression de l'ABCA1 est augmentée lors de la différenciation des monocytes en macrophages et dans les macrophages chargés en lipides [227]. Dans les macrophages normaux, les agonistes de PPAR α et PPAR γ augmentent

l'expression d'ARNm et l'efflux de cholestérol vers l'apo A-I, alors qu'aucun effet n'est observé dans les macrophages provenant de sujets avec la maladie de Tangier [234]. L'INF- γ supprime l'expression de l'ABCA1, réduisant ainsi l'efflux de cholestérol vers l'apo A-I, dans les macrophages de souris et les cellules spumeuses [235].

Il n'est pas encore clair si l'ABCA1 transporte activement tant le cholestérol que les phospholipides. Plusieurs expériences démontrent des efflux de cholestérol et de phospholipides non appariés. Dans une étude, un inhibiteur de la protéine kinase A (PKA) a bloqué l'efflux de cholestérol, mais non celui des phospholipides [236]. Une déplétion des membranes en cholestérol par l'utilisation d'un accepteur artificiel de cholestérol, la cyclodextrine, a aboli l'efflux de cholestérol induit par l'ABCA1, mais non celui des phospholipides [237]. Ces résultats indiquent que l'ABCA1 permet la sortie des phospholipides et que celle du cholestérol se produit indirectement. Ainsi, l'ABCA1 pourrait être en mesure de se lier aux deux types de lipides, mais ne faire le transport actif que des phospholipides [224].

Il a aussi été suggéré que l'ABCA1 travaille de manière séquentielle, stimulant premièrement l'efflux de phospholipides à l'apo A-I pour générer un accepteur capable de recevoir le cholestérol. Le transfert de cholestérol subséquent pourrait requérir la présence d'autres transporteurs comme l'ABCG1 ou le SR-BI. De plus, l'ABCA1 pourrait être active au niveau de la membrane plasmatique comme une translocase de lipides, ou bien travailler au niveau interne en stimulant le transport intracellulaire de cholestérol à la membrane

plasmatique. Des études ont démontré une interaction physique étroite entre l'ABCA1 et l'apo A-I, mais il n'a pas été directement prouvé qu'une interaction est nécessaire pour qu'il y ait efflux [238]. Il a aussi été suggéré que l'efflux de cholestérol dépendant de l'ABCA1 se produit par endocytose de l'apo A-I et aussi qu'une ABCA1 interne pourrait être requise pour effectuer l'efflux de cholestérol à partir des réserves intracellulaires [208,239].

La transcription du gène *abca1* et l'expression de la protéine à la surface des cellules sont étroitement contrôlées par une stimulation de la charge cellulaire en cholestérol [240]. Cette réponse est facilitée par le récepteur nucléaire « Liver X Receptor » (LXR) et est renversée lorsque les cellules sont déplétées en cholestérol par l'incubation avec les HDL. La régulation de ce facteur de transcription est discutée en détail dans une section ultérieure de cette thèse. En plus de la régulation par les stérols, l'expression de l'ABCA1 est modulée par d'autres métabolites comme les agonistes des PPARs et l'IFN- γ . L'ARNm et la protéine ABCA1 sont très instables, ce qui indique que les processus de transcription et de traduction sont deux facteurs importants pour assurer son expression constante et inductible [223].

Dans les macrophages de souris (mais non humains), l'expression de l'ABCA1 est induite par des analogues de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) [241]. Cette réponse est médiée par une séquence cible dans le « AMPC responsive-element-binding protein » (CREB) au niveau de l'intron 2 du gène *abca1* [242]. Le gène humain de l'ABCA1 ne répond pas à l'AMPC, à cause d'une insertion de huit paires de bases dans l'intron 2. En plus d'activer la

transcription du gène de l'ABCA1, l'AMPc augmente aussi la phosphorylation de la protéine à travers l'activation de la PKA, étant donné que l'ABCA1 est phosphorylée de manière constitutive par le PKA [243]. Au niveau des macrophages THP-1, les oxLDL stimulent l'expression de l'ABCA1 par l'activation du dimère LXR/RXR [244].

La quantité protéique d'ABCA1 est aussi sujette à régulation. Le «turn-over» de l'ABCA1 est rapide (demi-vie d'environ 1 heure) et sa liaison à l'apo A-I réduit sa dégradation [237,245]. De plus, l'ABCA1 peut subir une dégradation protéolytique à travers une protéase [245]. *In vitro*, la supplémentation des macrophages avec des acides gras mono- et polyinsaturés, mais non avec des acides gras saturés, accélère la dégradation de l'ABCA1 et supprime l'efflux de cholestérol et de phospholipides dépendant de l'apo A-I [246], ce qui est corrélé à une augmentation de la phosphorylation des sérines de l'ABCA1.

L'ABCA1 est exprimée au niveau des cellules endothéliales vasculaires et sa surexpression dans des modèles cellulaires a permis de prévenir l'accumulation de cholestérol par l'augmentation de son efflux cellulaire [247]. L'expression d'ABCA1 dans ces cellules est stimulée par les LDL et les oxystérols, mais est diminuée par la déprivation de stérols et le flux oscillatoire [247,248]. Les oxLDL diminuent la transcription du gène *abca1* via le LXR [249]. Le facteur de transcription «Sterol regulatory element binding protein» (SREBP)-2 peut aussi inhiber la transcription d'ABCA1 dans les cellules endothéliales vasculaires : un flot oscillatoire important cause l'activation de la SREBP-2 et l'inhibition de l'ABCA1 [248].

Dans les cellules endothéliales vasculaires, malgré la démonstration d'une régulation de l'ABCA1, son rôle dans l'efflux de cholestérol aux HDL n'a pas été caractérisé [214]. Il a toutefois été proposé qu'elle puisse participer au processus de transcytose de l'apo A-I à travers l'endothélium vasculaire [250]. Des recherches plus poussées sont nécessaires pour établir un portrait clair de son rôle dans le transport de cholestérol des cellules endothéliales vasculaires.

1.2.3.2.2 «ATP-Binding cassette transporter G1» (ABCG1)

Au niveau des macrophages, l'ABCG1 répond aussi aux changements du statut en cholestérol cellulaire, suggérant un rôle dans son transport. L'ABCG1 est un membre de la sous-famille des demi-transporteurs ABC ne contenant qu'un domaine de liaison à l'ATP et un simple domaine transmembranaire à 6 hélices. Tout comme l'ABCA1, l'expression de l'ABCG1 est détectée dans tous les tissus, mais de manière prédominante dans les macrophages, les cellules endothéliales et les lymphocytes [251].

La suppression par vecteur anti-sens de l'ABCG1 dans les macrophages humains a entraîné une réduction de l'efflux de cholestérol aux HDL₃ [227]. La surexpression de l'ABCG1 stimule par contre l'efflux de cholestérol aux HDL [252-255]. Il semble que l'activité de l'ABCG1 soit distincte, quoiqu'elle complète celle de l'ABCA1 ; alors que l'ABCA1 exporte le cholestérol à l'apo A-I, mais peu aux HDL, l'ABCG1 ne fonctionne pas en présence d'apolipoprotéine sans lipides [252,254,255]. La capacité de l'ABCG1 à faire la

sortie de lipides n'est pas claire : certains auteurs rapportent un efflux de phospholipides dépendant de l'ABCG1 [227,252], alors que d'autres le refutent [251]. Un modèle d'efflux des lipides propose que l'ABCA1 permette la lipidation initiale de l'apo A-I sans lipides afin de générer le pré- β -HDL, qui deviendrait alors un substrat pour le transport de cholestérol induit par l'ABCG1. De plus, le contrôle de son expression ressemble à celui de l'ABCA1. Dans les macrophages humains, il est induit par la différenciation cellulaire [227], le chargement en cholestérol [227,256] et les ligands aux LXRs [256].

La délétion du gène *abcg1* chez la souris transgénique entraîne des dépositions massives de lipides neutres et de phospholipides au niveau du foie, des poumons et des macrophages tissulaires [251]. Les animaux surexprimant l'ABCG1 humain se sont avérés protégés contre les accumulations lipidiques induites par la diète [251]. L'homodimérisation de l'ABCG1 a déjà été démontrée [254], mais il est aussi possible qu'elle interagisse avec un autre demi-transporteur, comme l'ABCG4, car ces protéines sont toutes deux exprimées dans les mêmes tissus [257].

L'ABCG1 est aussi exprimée sur les cellules endothéliales vasculaires et cette expression est modulable par le contenu en cholestérol et en oxystérols. Il est postulé que, dans ces cellules, l'ABCG1, par la voie du LXR/RXR, puisse entraîner l'efflux cellulaire de cholestérol aux HDL, mais non à l'apo A-I [214]. Cette implication demeure encore controversée [258], quoique peu d'études s'y soient consacrées.

1.2.3.2.3 Apolipoprotéine E

L'apo E est une apolipoprotéine majeure des résidus de chylomicrons, des VLDL et des LDL et elle favorise leur enlèvement dans la circulation. L'apo E est aussi présente dans certaines sous-populations de HDL. Elle fonctionne comme un antioxydant, possède des effets anti-inflammatoires et anti-prolifératifs, ce qui contribue à ses propriétés athéroprotectrices.

L'apo E est sécrétée par le foie mais aussi par les macrophages. L'expression de l'apo E spécifique aux macrophages diminue la grosseur des plaques d'athéromes en l'absence de changements majeurs dans les lipides plasmatiques. L'expression de l'apo E est augmentée par la différenciation des monocytes en macrophages, par le chargement en cholestérol et par les cytokines inflammatoires [259]. L'apo E participerait aussi au transport intracellulaire de cholestérol dans les macrophages, car lorsqu'un accepteur de cholestérol est présent, comme les HDL ou l'apo A-I, l'apo E endogène augmente l'efflux de cholestérol de manière marquée, probablement en coopération avec l'ABCA1. [259]. Jusqu'à présent, les mécanismes par lesquels l'apo E endogène des macrophages stimule l'efflux de cholestérol demeurent obscurs, mais ils pourraient impliquer la mobilisation du cholestérol intracellulaire et la facilitation de sa sécrétion [260].

Figure 21. Récepteurs de cholestérol des macrophages

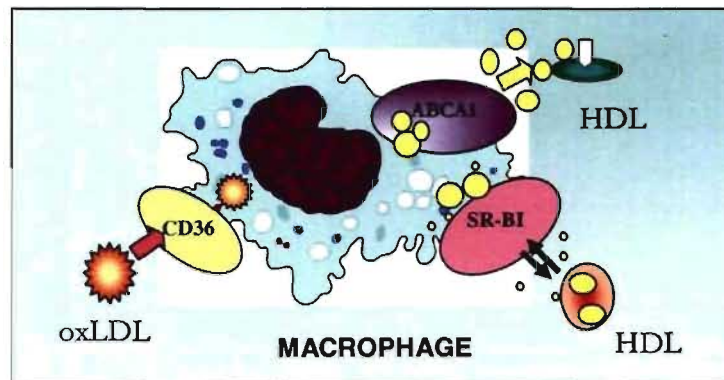


Figure 21 : Certains des récepteurs de cholestérol présents sur les macrophages : la CD36 capte les oxLDL ; l'ABCA1 permet l'efflux de cholestérol libre ; le SR-BI est impliqué dans l'entrée des esters de cholestérol et les échanges bidirectionnels de cholestérol libre.

1.2.4 Facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme lipidique

1.2.4.1 «Peroxisome Proliferator-Activated Receptors» (PPARs)

Les « Peroxisome Proliferator-Activated Receptors » (PPARs) ont été découverts en 1990 et identifiés comme des joueurs clés dans la réponse aux « peroxisome proliferators ». Les péroxisomes consistent en des organelles intracellulaires impliquées dans le retrait des molécules d'oxygène. Chez les rongeurs, la prolifération des péroxisomes se produit en réponse à l'activation de

certaines récepteurs nucléaires par des molécules spécifiques, les « peroxisome proliferators ». Les travaux subséquents de plusieurs équipes de recherche ont permis de constater la présence des PPARs chez l'humain ainsi que leur rôle dans le métabolisme lipidique et lipoprotéique, dans l'homéostasie du glucose et dans la différenciation cellulaire [261]. Ils ont aussi été impliqués dans le développement du cancer et le contrôle des réponses inflammatoires [262].

Les PPARs consistent en une sous-famille de la grande famille des récepteurs nucléaires. Trois PPARs distincts nommés PPAR α , PPAR δ (ou PPAR β) et PPAR γ sont codés par des gènes différents et se caractérisent par leur distribution tissulaire et leurs rôles spécifiques. Les PPARs sont des facteurs de transcription activés par leurs ligands qui contiennent des éléments structuraux communs, incluant un domaine de liaison au ligand et un domaine de liaison à l'acide désoxyribonucléique (ADN). À la suite de l'activation par les ligands, les PPARs forment un complexe hétérodimère avec un autre récepteur nucléaire le « Retinoic X Receptor » (RXR). Ce complexe se lie aux éléments de réponse des PPARs sur le promoteur de gènes cibles spécifiques, les « PPAR Response Elements » (PPREs) localisés sur le promoteur des gènes cibles, modulant ainsi leur expression [261,263,264].

Figure 22. Régulation transcriptionnelle par les PPARs

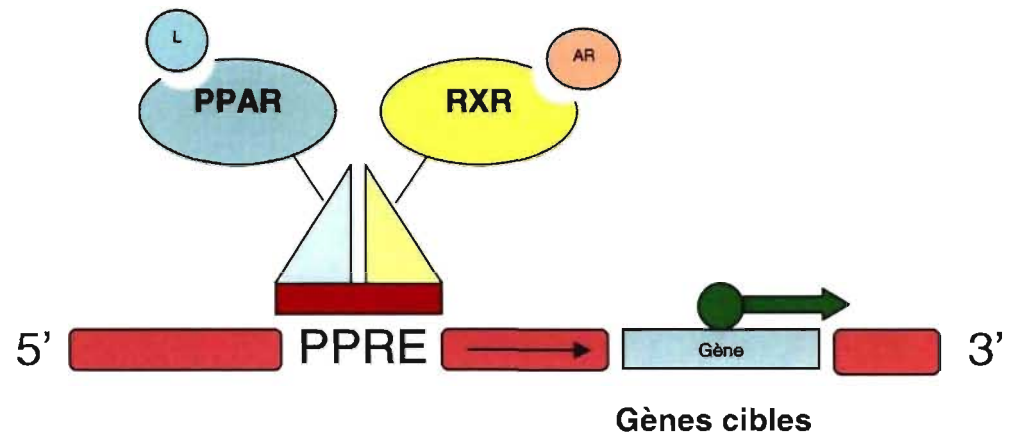


Figure 22 : À la suite de leur activation par un ligand, les PPARs forment un complexe hétérodimère avec le RXR. Ce complexe se lie aux PPRES sur le promoteur de gènes cibles spécifiques, activant ainsi leur expression.

Les PPARs peuvent aussi réprimer la transcription génique en interférant de manière négative avec les voies de signalisation de NF- κ B, «Signal transducers and activators of transcription» (STAT), AP-1 et «CCAAT/enhancer binding protein» (C/EBP), d'une manière indépendante de la liaison à l'ADN, probablement par une combinaison d'interactions protéiques qui préviennent leur liaison sur leurs gènes cible. Cette transrépression de l'activité constitue un mécanisme de base par lequel les PPARs exercent leurs effets anti-inflammatoires [261]. De plus les PPARs induisent l'expression du I κ B qui est l'inhibiteur majeur de la voie du NF- κ B [265].

1.2.4.1.1 PPAR α

Le PPAR α est exprimé dans une grande variété de tissus comme le cœur, le foie, l'intestin, les reins, le tissu adipeux, le muscle squelettique et les cellules vasculaires. Il joue un rôle très important dans le catabolisme des acides gras et le métabolisme lipidique. Ses cibles moléculaires comprennent les enzymes impliquées dans l'activation de la β -oxydation des acides gras et l'expression des apolipoprotéines (apo A-I, apo A-II, apo C-III). Les ligands spécifiques naturels au PPAR α incluent les éicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique à travers la voie de la lipoxgénase, comme l'acide 8-S-hydroxyéicosatétraenoïque (8S-HETE) et le leucotriène B₄ (LTB₄), ainsi que les phospholipides dérivés des oxLDL et certains acides gras à longue chaîne. Ses ligands synthétiques sont les fibrates, des dérivés de l'acide fibrique [263,266]. Le PPAR α stimule le catabolisme hépatique des acides gras, mais participe aussi au métabolisme des HDL en augmentant l'expression de certains gènes comme ceux de l'apo A-I, de l'apo A-II, du SR-BI, de l'ABCA1 et de la lipoprotéine lipase [126].

Les fibrates sont utilisés en clinique comme drogues hypolipémiants. Ils diminuent efficacement les niveaux de triacylglycérols sanguins, augmentent les concentrations de HDL-cholestérol et sont sans effet significatif sur les niveaux de cholestérol total. Le PPAR α permet l'action des fibrates sur les niveaux de triacylglycérols en augmentant l'expression du gène de la lipoprotéine lipase et en diminuant les niveaux d'apo C-II, ce qui entraîne la stimulation de l'activité lipolytique. De plus, plusieurs gènes impliqués dans les voies métaboliques de l'oxydation des acides gras, comme les voies de β - et de ω -

oxydation, présentent un PPRE dans leur région promotrice et peuvent être stimulés par les fibrates [261].

1.2.4.1.2 PPAR γ

Le PPAR γ est principalement exprimé au niveau des adipocytes, du pancréas, du muscle squelettique, des cellules vasculaires, des macrophages, des cellules T, des neutrophiles, des cellules épithéliales et des cellules musculaires lisses. Le PPAR γ est un régulateur clef du syndrome métabolique, incluant le diabète et l'obésité, et est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des adipocytes. Ses actions contribuent à l'augmentation de la synthèse des triacylglycérols et à leur accumulation dans les tissus adipeux [265]. Il influence aussi le métabolisme lipidique par le biais de gènes cibles comme ceux de la HMG-CoA synthétase, l'apo A-I et la lipoprotéine lipase. Ses ligands naturels comprennent les métabolites de l'acide arachidonique dérivés des voies de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase, comme le «15-deoxy- Δ -12,14-prostaglandin J2» (15d-PGJ₂) et le 15-HETE et les composés dérivés des acides gras contenus dans les oxLDL, comme l'acide 9-hydroxyoctadécadiénoïque (9-HODE) et l'acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque (13-HODE).

Les thiazolidinediones (TZDs) sont des ligands synthétiques de haute affinité pour le PPAR γ . Ces molécules, qui incluent la troglitazone et la rosiglitazone, sont de solides agonistes de PPAR γ [266,267] et ces drogues sont utilisées dans le traitement du diabète de type II. Les TZDs sont considérées comme des sensibilisateurs de récepteur de l'insuline, car elles augmentent la

captation du glucose de manière dépendante de l'insuline dans le muscle squelettique. Elles diminuent aussi les triacylglycérols plasmatiques et les niveaux d'acides gras libres en augmentant leur catabolisme par l'expression du gène de la lipoprotéine lipase dans le tissu adipeux [261,268].

1.2.4.1.3 PPAR δ

Le PPAR δ , aussi nommé PPAR β , est exprimé dans les tissus de manière ubiquitaire. Aucune drogue connue n'a jusqu'à maintenant été identifiée comme cible de ce récepteur nucléaire et ses rôles physiologiques spécifiques demeurent obscurs. Il est par contre suggéré que les acides gras natifs et modifiés constituent des ligands endogènes de PPAR δ , en plus des prostaglandines, comme le PGJ2, et du ligand synthétique carbaprostacycline [265].

L'identification d'agonistes synthétiques a permis d'améliorer les connaissances sur les fonctions de PPAR δ . Certaines études ont associé le PPAR δ au contrôle des niveaux de HDL. Par exemple, l'administration d'un agoniste à des singes rhésus obèses a augmenté de manière dramatique les niveaux de HDL-cholestérol, a diminué ceux de LDL-cholestérol et réduit les niveaux de triacylglycérols à jeun [269]. Le mécanisme proposé par les auteurs implique l'induction de l'expression de l'ABCA1 et du transport inverse de cholestérol. Les souris qui présentent une délétion de PPAR δ sont viables, mais ont une faible masse adipeuse, des défauts de myélination au cerveau, sans toutefois exhiber des altérations significatives des niveaux de HDL-cholestérol ou

de triacylglycérols [270,271]. Des travaux ont aussi montré que le PPAR δ module l'oxydation des acides gras et l'utilisation de l'énergie dans de multiples tissus incluant le tissu adipeux brun [272]. Ainsi, les ligands de PPAR δ pourraient promouvoir l'utilisation des graisses et de ce fait protéger contre le développement de l'obésité [273].

Figure 23. Régulations et fonctions des PPARs

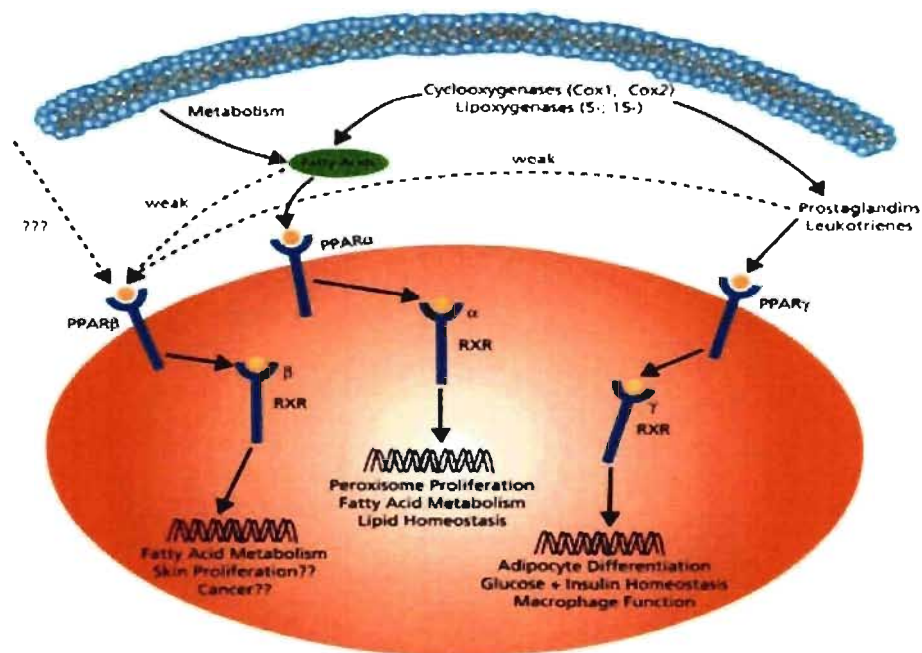


Figure 23 : L'activation de PPAR α par ses ligands joue un rôle très important dans le catabolisme des acides gras et le métabolisme lipidique. L'activation de PPAR γ contribue à l'augmentation de la synthèse des triacylglycérols, à leur accumulation dans les tissus adipeux, à la différenciation des adipocytes et il constitue un régulateur de l'homéostasie glucidique et insulinique. Les rôles de PPAR δ demeurent peu définis, mais il pourrait moduler l'oxydation des acides gras et l'utilisation d'énergie par les tissus.

1.2.4.1.4 PPARs et athérosclérose

Tous les PPARs sont exprimés dans les principaux constituants cellulaires de la paroi artérielle (cellules endothéliales, CML, monocytes/macrophages) ainsi que dans les lésions athéromateuses humaines [274]. Le traitement avec les fibrates diminue la progression des lésions tant chez les humains que dans les modèles animaux. De plus, la troglitazone inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses et diminue l'épaisseur de l'intima et de la média au niveau des artères carotidiennes humaines [261]. Ces observations cliniques confirment le rôle des PPARs dans l'inhibition du développement de l'athérosclérose.

1.2.4.1.4.1 PPAR α et athérosclérose

De manière générale, les activateurs de PPAR α réduisent le risque de développer l'athérosclérose et la mortalité cardiovasculaire, leurs effets étant de diminuer les triacylglycérols sanguins et d'augmenter les niveaux de HDL-cholestérol. Le PPAR α exerce aussi d'autres influences directes sur les cellules de la paroi vasculaire, avec un impact sur la formation des lésions. Un des effets principaux de l'activation de PPAR α au niveau des cellules de la paroi vasculaire est de stimuler l'efflux de cholestérol dépendant de l'apo A-I par l'augmentation de l'ABCA1, via l'induction du LXR α [234,273,275,276]. De plus, dans les macrophages humains, les activateurs de PPAR α induisent l'expression du SR-BI qui lie les HDL avec haute affinité [206]. Aussi, les fibrates augmentent

l'expression de la LPL dans le foie [277], ce qui permet la lipolyse et la formation des pré- β -HDL.

Les agonistes de PPAR α possèdent aussi des propriétés anti-inflammatoires. L'activation de PPAR α inhibe la production de marqueurs des réponses inflammatoires, comme l'endothéline-1, la ICAM-1 et la VCAM-1 au niveau des cellules endothéliales, ainsi que du facteur tissulaire, de la MMP-9, et du TNF- α dans les macrophages [278]. L'expression du facteur tissulaire dans les monocytes/macrophages, qui est un contributeur majeur de la thrombogénèse, est aussi diminuée par le PPAR α [279,280]. Dans les cellules musculaires lisses, l'activation de PPAR α par les fibrates interfère de manière négative avec le NF- κ B et inhibe la sécrétion d'IL-6 stimulée par l'IL-1 et la transcription génique de la COX-2 [281,282]. L'activation de PPAR α inhibe aussi l'endothéline-1, un inducteur potentiel de la prolifération des CML [279]. Dans l'ensemble, ces observations soulignent le rôle anti-inflammatoire de PPAR α sur les différents types cellulaires de la paroi artérielle.

1.2.4.1.4.2 PPAR γ et athérosclérose

Quoiqu'il soit exprimé principalement dans le tissu adipeux, le PPAR γ est aussi retrouvé au niveau de l'endothélium vasculaire, des macrophages et des cellules musculaires lisses [283]. De plus, sa stimulation entraîne des effets autres que ceux associés au métabolisme du glucose et des lipides. Les ligands des PPAR γ inhibent le processus d'athérosclérose par l'amélioration de la

fonction endothéliale, l'atténuation de la migration et de la croissance des cellules vasculaires, l'inhibition des voies majeures impliquées dans l'inflammation vasculaire et l'augmentation du transport inverse du cholestérol [283].

Le traitement avec les TZDs diminue la formation de lésions dans les modèles animaux d'athérosclérose diabétiques [284,285] et non diabétiques [286,287], en plus de réduire l'épaississement de la lumière artérielle [288] et la pression sanguine des patients diabétiques [289]. La troglitazone et la rosiglitazone améliorent la vasodilatation endothéliale chez les humains [290] et chez les rats Zucker [291]. La rosiglitazone a permis de réduire le stress oxydatif vasculaire et d'améliorer la dysfonction endothéliale dans un modèle de souris diabétiques et ce en absence d'effets métaboliques significatifs [292].

Il a initialement été rapporté que la stimulation de PPAR γ induit l'expression génique de la CD36 et l'accumulation de lipides dans les macrophages, ce qui a entraîné des questionnements sur les effets anti-athérogènes des TZDs [293]. Par contre, les études révèlent que le développement des cellules spumeuses ne nécessite pas l'activation de PPAR γ [276] et que, de manière globale, ses agonistes diminuent l'athérosclérose dans les modèles animaux [284,287,294,295]. Ceci peut s'expliquer par le fait que le PPAR γ active la transcription du LXR α , ce qui induit l'expression de l'ABCA1 et l'efflux de cholestérol aux particules contenant l'apo A-I [234,296]. Le PPAR γ augmente aussi l'expression de l'ABCG1, qui pourrait aussi permettre le processus d'efflux de cholestérol [297]. De plus, le PPAR γ diminue l'expression des SRA, tout comme le PPAR α [266]. Tant les activateurs de PPAR α que

PPAR γ augmentent l'expression de SR-BI [206] et de l'ABCA1 dans les macrophages humains. Ainsi, l'activation de PPAR γ dans les macrophages inhibe la formation des cellules spumeuses par une élévation de l'efflux de cholestérol, malgré l'augmentation de la captation des oxLDL [298]. Il semble donc que l'impact global de PPAR γ au niveau des macrophages soit athéroprotecteur.

Dans les cellules endothéliales vasculaires, les glitazones inhibent l'expression de la MCP-1 et de l'endothéline-1[299]. Aussi, l'activation de PPAR γ supprime l'induction des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1, ainsi que les interactions entre les leucocytes et l'endothélium [299,300].

Les ligands de PPAR γ inhibent la croissance des cellules musculaires lisses, ainsi que la migration des CML, des cellules endothéliales vasculaires et des monocytes [274,301], ce qui freine la formation d'une néointima par les CML [302], empêche l'angiogenèse par les cellules endothéliales [303] et prévient l'infiltration des monocytes [304].

In vitro, les agonistes de PPAR γ suppriment le relâchement par les monocytes de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6 [266]. Les ligands de PPAR γ inhibent l'induction de la iNOS, de la MMP-9 et des SRA dans les macrophages par l'inhibition des facteurs de transcription AP-1, NF- κ B et STAT1 [261]. Chez les souris déficientes pour le récepteur de LDL, l'administration de ligands synthétiques de PPAR γ a permis de réduire le développement de l'athérosclérose, ce qui s'est avéré associé à la réduction de certains marqueurs inflammatoires comme le TNF- α et la MMP-9 [273]. De

plus, des études suggèrent que des agonistes des PPAR γ abaissent l'expression de marqueurs d'inflammation systémique, comme la protéine C réactive (CRP), l'IL-6, le PAI-1 et la MMP-9 [108]. Toutes ces études supportent le rôle anti-inflammatoire de l'activation de PPAR γ .

De hauts niveaux de l'inhibiteur de fibrinolyse, le PAI-1, créent un état favorable à la thrombose. Les taux de PAI-1 sont élevés dans le diabète de type II et la troglitazone s'est avérée capable de les réduire [305]. Un autre effet favorable des agonistes de PPAR γ sur les événements cardiovasculaires pourrait donc résider dans l'amélioration de l'état pro-thrombique.

1.2.4.1.4.3 PPAR δ et athérosclérose

Le rôle de PPAR δ dans l'athérosclérose demeure encore controversé ; certaines études concluent à des actions pro-athérogènes et d'autres à des effets athéroprotecteurs. Des auteurs ont rapporté que l'activation de PPAR δ entraîne des effets similaires à ceux observés avec les ligands de PPAR γ , soit l'augmentation de l'expression de la CD36, du LXR α et de l'ABCA1 [269,273]. Toutefois, d'autres ont noté que l'activation de PPAR δ induit l'expression de l'« adipose differentiation-related protein » (ADRP ou adipophiline), ce qui pourrait potentiellement permettre l'accumulation de triacylglycérols dans les macrophages [273,306]. De plus, dans les cellules musculaires lisses, le PDGF induit la surexpression de PPAR δ qui, en retour, stimule la prolifération des

cellules confluentes. Ainsi, il est possible que le PPAR δ puisse contribuer au développement de l'athérosclérose en jouant un rôle sur la modulation de la prolifération des cellules musculaires lisses [307].

1.2.4.2 «Liver X Receptors» (LXRs)

Les LXRs sont des récepteurs nucléaires activés par les oxystérols qui jouent un rôle central dans le contrôle du métabolisme lipidique. La sous-famille des récepteurs nucléaires LXR comprend deux membres : LXR α et LXR β . Les hétérodimères LXR/RXR se lient aux « LXR Response Elements » (LXREs) situés dans les promoteurs des gènes cibles. Les domaines de liaison de LXR α et de LXR β partagent un haut degré de similarité dans leurs séquences et ils sont activés par des ligands endogènes similaires. Alors que le cholestérol comme tel n'a aucun effet sur l'activité des LXRs, différentes formes de cholestérol modifié, les oxystérols comme le 22-(R), le 20-(S) et le 27-hydroxycholestérol, ainsi que les 24-(S),25-epoxycholestérol, peuvent induire l'activité transcriptionnelle des LXRs à des concentrations physiologiques. Le LXR α est hautement exprimé dans le foie, mais il est aussi retrouvé en quantités moindres dans le tissu adipeux, les reins, les poumons, l'intestin, la rate et les macrophages, alors que le LXR β est exprimé dans l'organisme de manière ubiquitaire [273,308].

1.2.4.2.1 LXRs et athérosclérose

La balance dynamique entre l'entrée et la sortie du cholestérol dans les macrophages est sans aucun doute un facteur déterminant qui gouverne la progression de l'athérosclérose. Il a été démontré que les LXRs contrôlent l'expression de plusieurs gènes clés du transport du cholestérol, dont l'ABCA1. Au niveau des macrophages, l'activation de l'ABCA1 par le LXR α et le LXR β induit l'efflux de cholestérol vers l'apo A-I et les HDL, contribuant au transport inverse du cholestérol. L'AGCG1 et l'ABCG4 ont aussi été identifiées comme des gènes cibles des LXRs au niveau des macrophages [256,308]. Un autre mécanisme par lequel les LXRs peuvent contrôler le transport inverse de cholestérol est son implication dans la régulation de l'expression de l'apo E : les ligands des LXRs augmentent l'expression de l'apo E dans les macrophages humains, un effet induit via deux LXREs présents dans les régions promotrices de son gène [309]. Fait intéressant, aucun site de liaison aux LXRs n'est présent dans les sections promotrices de l'apo E hépatique et cette dernière n'est pas modulée par l'activation des LXRs [273]. L'activation des LXRs augmente l'expression de SR-BI dans les hépatocytes, les cellules pré-adipocytaires [310] et dans les macrophages humains [311], démontrant une autre implication des LXRs dans le processus de transport inverse de cholestérol.

Les oxLDL causent une élévation de l'expression de LXR α dans les macrophages humains THP-1 [312]. Il semble que cet effet s'effectue via les PPAR α et PPAR γ . Les PPARs peuvent donc jouer un rôle important dans l'activation du LXR α , mais aucune étude n'a révélé un tel mécanisme de

régulation pour le LXR β [313]. D'un autre côté, dans les macrophages, la « sterol 27-hydrolase » (CYP27) peut modifier le cholestérol en oxystérols, qui sont des ligands naturels des LXR [314,315].

Au niveau de la paroi artérielle, les LXR démontrent des propriétés anti-inflammatoires. Les agonistes des LXR inhibent la réponse aux agents pathogènes bactériens et bloquent l'activation de différents gènes inducteurs d'inflammation dans les macrophages, comme l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF- α , la MMP-9, la iNOS, la COX-2 et la MCP-1 [311,316]. Il semble que l'activation de plusieurs de ces effecteurs implique la voie de NF-kB [317].

En contraste des effets bénéfiques des LXR sur la sortie de cholestérol, leur activation augmente la synthèse des acides gras. Le LXR α stimule l'expression d'un isoforme de la SREBP, la SREBP-1c qui stimule la transcription des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras [318]. De plus, les LXR modulent indirectement l'expression de gènes lipogéniques, comme la «fatty acid synthase», à travers la régulation de la transcription génique de la SREBP-1c. En effet, les LXR stimulent la transcription du gène *srebp-1c* en liant une séquence de reconnaissance consensus dans la région activatrice [318]. Les acides gras insaturés antagonisent la liaison des oxystérols aux LXR, neutralisant leurs effets. Il a aussi été démontré que ces acides gras interfèrent avec la liaison du complexe LXR α /RXR au LXRE [318,319].

Figure 24. Régulations et fonctions de LXR α

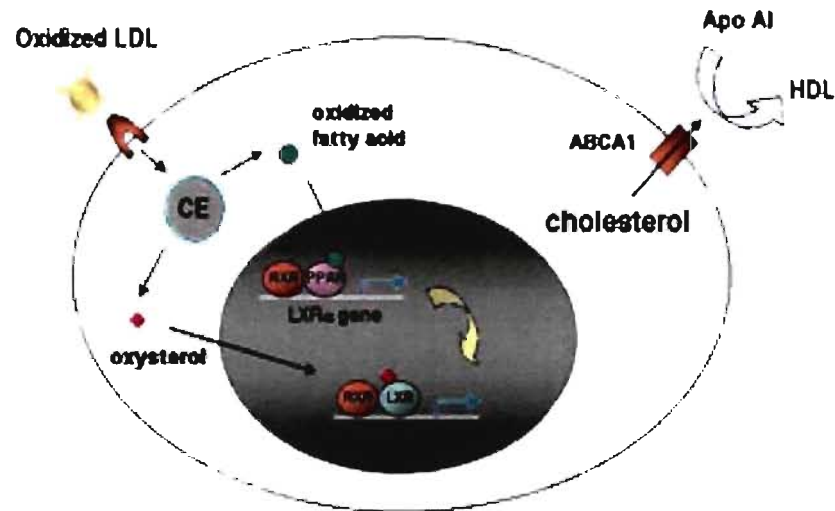


Figure 24 : Dans les macrophages, le LXR α contrôle l'expression de plusieurs gènes clés du transport du cholestérol, dont l'ABCA1. Les oxystérols, synthétisés par l'action de la CYP27, sont des ligands activateurs de LXR α . Cette activation entraîne l'élévation de la transcription génique d'ABCA1 et, conséquemment, de sa masse protéique.

1.2.5 Facteurs de risque de l'athérosclérose

1.2.5.1 Résistance à l'insuline et diabète

La progression de la résistance à l'insuline vers le diabète est parallèle au développement de la dysfonction endothéliale vers l'athérosclérose qui est la cause principale de mortalité chez les individus présentant un diabète. En effet, la mortalité associée aux maladies cardiovasculaires augmente de 2 fois dans les cas d'intolérance au glucose et de 3 à 4 fois dans les cas de diabète de type II [320]. De plus, à cause d'une plus grande oxydation, inflammation et thrombose, les plaques des patients diabétiques tendent à être plus instables, entraînant leur rupture et les complications cliniques [320].

La dysfonction endothéliale, représentée par la relaxation endothéliale dépendante de l'oxyde nitrique, est présente dans les modèles expérimentaux de diabète [321-323]. Chez les sujets sains, l'insuline augmente la vasodilatation dépendante de l'oxyde nitrique, mais chez les sujets résistants à l'insuline, cette vasodilatation endothéliale est réduite [324]. Les thérapies pharmacologiques qui permettent d'augmenter la sensibilité à l'insuline, comme la metformine et les TZD, améliorent aussi la vasodilatation endothéliale [325,326]. Dans le diabète, la dysfonction des cellules endothéliales est caractérisée non seulement par une diminution du NO, mais aussi par une augmentation de la synthèse des vasoconstricteurs prostanoïques et de l'endothéline-1 [320].

Plusieurs des dérangements présents dans le diabète, comme l'hyperglycémie, la libération excessive d'acides gras libres et la résistance à

l'insuline, entraînent des anomalies de la fonction endothéliale vasculaire, ce qui affecte la synthèse et la dégradation du NO. L'hyperglycémie induit une série d'événements qui stimulent la production de dérivés réactifs de l'oxygène, comme les anions superoxydes qui inactivent le NO pour former le peroxy-nitrite. L'hyperglycémie peut initier ce processus en augmentant la production d'anions superoxydes via le transport mitochondrial d'électrons [320].

La production mitochondriale d'anions superoxydes augmente aussi la production intracellulaire de produits avancés de glycation (« advanced glycation products », AGEs). Ces protéines glyquées nuisent à l'intégrité cellulaire, en affectant la fonction protéique et en activant le récepteur des AGEs (RAGE). De ce fait, les AGEs augmentent la production de dérivés réactifs de l'oxygène et l'activation des RAGEs induit la production enzymatique intracellulaire de superoxydes [320].

Les impacts du diabète sur la fonction vasculaire ne sont pas limités à l'endothélium. Des études ont démontré une augmentation des interactions des leucocytes aux cellules endothéliales dans les modèles animaux avec diabète et dans les monocytes provenant d'individus diabétiques [327]. Des niveaux élevés de glucose induisent aussi les molécules pro-inflammatoires TNF- α , MCP-1, NF-kB et AP-1 dans les monocytes [327]. L'hyperglycémie pourrait donc aussi entraîner l'activation et l'adhésion monocyttaire. Le diabète stimule l'activité de la protéine kinase C, la production de NF-kB et la génération de radicaux libres dans les cellules musculaires lisses [328,329]. Les patients diabétiques tendent à présenter des lésions athéromateuses possédant moins de CML en raison d'une

plus grande apoptose, ce qui rend les lésions plus susceptibles à la rupture [330]. Chez les diabétiques, il y a effectivement une diminution de la production de collagène et une augmentation de la synthèse des MMPs par les CML, menant à la déstabilisation et à la rupture des plaques [331,332].

La fonction plaquettaire est aussi anormale dans le diabète. L'expression des glycoprotéines Ib et IIb/IIIa est élevée, ce qui augmente le facteur de von-Willebrand plaquettaire et les interactions entre la fibrine et les plaquettes [333]. De plus, l'hyperglycémie change la fonction plaquettaire en altérant l'homéostasie du calcium, ce qui nuit à l'activation et à l'agrégation plaquettaire [334]. Dans le diabète, la production du PAI-1, un inhibiteur de fibrinolyse, est augmentée. Ainsi, la tendance pour l'activation et l'agrégation plaquettaire, couplée à un profil pro-coagulant, augmente les chances de rupture des plaques [320].

1.2.5.2 Dyslipidémies athérogènes

L'hypercholestérolémie est indéniablement un facteur de risque majeur dans le développement des maladies cardiovasculaires, sinon le facteur principal. D'autres désordres athérogènes ont aussi été identifiés, comme la baisse des taux sériques de HDL et l'augmentation des niveaux de triacylglycérols à jeun. En effet, les niveaux de cholestérol total ne prédisent pas adéquatement le risque de maladies cardiovasculaires, car ils constituent la somme du cholestérol transporté dans toutes les lipoprotéines, soit celles qui sont athérogènes (VLDL, IDL et LDL), mais aussi anti-athérogènes (HDL).

La dyslipidémie athérogénique est caractérisée par l'augmentation plasmatique des VLDL, la présence des petites particules LDL denses et la diminution du HDL-cholestérol. Cette triade lipidique est souvent observée chez les patients avec de l'athérosclérose prématurée et semble constituer un phénotype athérogénique typique, et ce indépendamment des concentrations élevées de LDL-cholestérol [126].

1.2.5.2.1 Hypercholestérolémie

Parmi les nombreux facteurs de risque impliqués dans l'athérosclérose, l'hypercholestérolémie est sans équivoque un facteur capital. En effet, la morbidité et la mortalité cardiovasculaire sont directement liées à l'augmentation du LDL-cholestérol, les LDL étant les lipoprotéines qui assurent à elles seules 70% du transport de cholestérol dans la circulation sanguine [73]. Le diamètre des particules de LDL est l'un des facteurs limitant leur entrée dans l'intima ; la petite taille et le haut contenu en cholestérol (LDL petites et denses) rendent les LDL fortement athérogènes [126].

De plus, l'oxydation des LDL amplifie le profil athérogène, car les oxLDL sont impliquées dans les mécanismes du développement de la maladie. Les lipides contenus dans les lipoprotéines ayant subi des dommages oxydatifs semblent être d'une importance centrale dans l'athérogenèse. Certaines études ont montré des variations dans la susceptibilité des LDL à l'oxydation *ex vivo*, même s'il n'a pas encore été prouvé que de telles variations sont associées à un risque accru de développer l'athérosclérose. La vitamine E est l'antioxydant

principal transporté par les LDL et pourrait être un facteur influençant la susceptibilité des LDL à l'oxydation [335].

D'autres caractéristiques des lipoprotéines comme leur taille et leur densité influencent aussi leur potentiel d'oxydation. Les LDL petites et denses sont plus susceptibles à l'oxydation que les grosses LDL. L'augmentation de la susceptibilité des petites particules semble être associée à l'élévation de leur contenu en triacylglycérols et en acides gras polyinsaturés [335]. La consommation d'un repas contenant des lipides oxydés ou oxydables augmente les concentrations en hydroperoxydes lipidiques et, dans ces conditions, les LDL deviennent plus sensibles à la peroxydation, à moins que la capacité antioxydante du plasma n'augmente [336,337].

1.2.5.2.2 Niveaux plasmatiques de HDL

Une multitude d'études épidémiologiques ont établi que de faibles niveaux de HDL-cholestérol constituent un facteur de risque indépendant pour les maladies cardiovasculaires. Par exemple, l'étude «Framingham Heart Study» a révélé qu'environ 44% des événements coronariens se produisent chez les personnes avec des niveaux de HDL inférieurs à 40 mg/dl (1,036 mmol/L). Les individus ayant des HDL à moins de 35 mg/L (0,9065 mmol/L) présentent un taux d'incidence de maladies cardiovasculaires 8 fois plus élevé comparativement à ceux ayant des HDL-cholestérol à des niveaux supérieurs à 65 mg/dL (1,68 mmol/L) [91].

Tel que déjà élaboré antérieurement, l'effet protecteur des HDL contre le développement des maladies coronariennes est complexe. Il semble que les HDL soient bénéfiques par de multiples voies, tant par le transport inverse de cholestérol, que par des mécanismes anti-inflammatoires et antioxydants [91]. Les particules HDL varient substantiellement en taille, densité, composition et propriétés fonctionnelles, affectant potentiellement leur rôle dans l'athérosclérose. Il apparaît que les grosses HDL, riches en cholestérol, sont les particules de HDL présentant le facteur de risque le plus élevé pour les maladies cardiovasculaires [338].

1.2.5.2.3 Hypertriglycéridémie

Il est maintenant reconnu que l'élévation des niveaux plasmatiques de TG constitue un risque indépendant des maladies cardiovasculaires. Cette hausse du risque cardiovasculaire semble être reliée aux effets athérogènes des résidus des lipoprotéines riches en triacylglycérols d'origine intestinale et hépatique, les chylomicrons et les VLDL. Ces particules résiduelles ont cédé des TG par l'action de la lipoprotéine lipase et ont capté les esters de cholestérol par l'action de la CETP.

Une variété d'études *in vitro* et cliniques suggèrent que les CM post-prandiaux et les VLDL entraînent des effets délétères sur l'endothélium. Les études *in vitro* montrent que les lipoprotéines riches en TG et leurs produits d'hydrolyse ont le potentiel de promouvoir la dysfonction endothéliale.

L'incubation des cellules endothéliales vasculaires avec ces lipoprotéines résiduelles, mais non avec des VLDL ou des LDL, a induit l'élévation de l'expression de la ICAM-1, de la VCAM-1 et du facteur tissulaire [339]. Les évidences cliniques démontrent que ces lipoprotéines peuvent endommager l'endothélium par des changements dans le tonus vasculaire, en partie par la réduction de la production de NO. La dysfonction endothéliale induite par un repas riche en lipides est associée à l'élévation des concentrations de cytokines pro-inflammatoires et des molécules d'adhésion solubles [340].

1.2.5.3 Hyperhomocystéinémie

L'homocystéine consiste en un acide aminé formé lors du métabolisme de la méthionine. Une fois formée, l'homocystéine peut subir une reméthylation en méthionine par une réaction catalysée par la méthionine synthétase, qui utilise l'acide méthyle tétrahydrofolique comme donneur de méthyle et la cobalamine comme co-facteur essentiel [341]. Certains désordres génétiques peuvent entraîner l'hyperhomocystéinémie, une maladie vasculaire thrombotique souvent fatale dès l'enfance et l'adolescence. Cette hyperhomocystéinémie sévère est rare. Par contre, une hyperhomocystéinémie est retrouvée chez les sujets avec maladies cérébrovasculaires, coronaires ou vasculaires périphériques. L'élévation des niveaux d'homocystéine peut être causée par des déficiences en acide folique, en pyridoxine ou en cobalamine. La supplémentation en ces nutriments permet généralement de normaliser les niveaux d'homocystéine [341].

Les effets néfastes de l'homocystéine sont induits par des mécanismes impliquant des dommages oxydatifs. Le groupe sulfhydryle de l'homocystéine peut être oxydé, ce qui engendre la formation d'anions superoxydes et de peroxyde d'hydrogène, des radicaux libres qui initient la peroxydation lipidique. Aussi, l'homocystéine peut convertir l'endothélium normal en un phénotype plus prothrombique, entre autres en augmentant l'activité du facteur V, du facteur XII et l'expression du facteur tissulaire, ainsi qu'en inhibant l'activation de la protéine C, l'expression de la thrombomoduline et de l'héparine sulfate. De plus, l'exposition de l'endothélium à l'homocystéine augmente la production d'anions superoxydes, qui par la suite inactivent le NO, processus inducteur de la dysfonction endothéliale [341].

1.2.5.4 Hypertension artérielle et angiotensine II

L'endothélium normal a la capacité de maintenir la santé vasculaire en fournissant la balance entre la vasodilatation et la vasoconstriction. Dans l'hypertension, il y a une perte de cet équilibre et une absence de la capacité de vasoconstriction normale [221].

Le système rénine-angiotensine joue un rôle vital dans les processus physiologiques du système cardiovasculaire. La molécule effectrice primaire de ce système, l'angiotensine II, est une hormone critique qui influence la fonction de tous les organes, incluant les vaisseaux sanguins et qui est impliquée dans la physiopathologie de l'hypertension et de l'insuffisance rénale chronique. Une

stimulation aiguë de l'angiotensine II régule l'homéostasie sel/eau et la vasoconstriction, module la pression sanguine, alors que sa stimulation chronique entraîne l'hyperplasie et l'hypertrophie des CML [221]. De plus, l'exposition à long terme à l'angiotensine II est impliquée dans l'hypertrophie cardiaque, le remodelage vasculaire et la diminution de la fibrolyse [221].

Une des fonctions majeures de l'angiotensine II est la vasoconstriction des cellules musculaires lisses induite par la voie de signalisation classique dépendante de la protéine G [221]. Il s'avère que l'angiotensine II est aussi un inducteur de stress oxydatif et de signalisation oxydative. Entre autres, elle active les NADPH oxydases membranaires des CML, stimulant la production de ROS [221]. L'angiotensine II active aussi la cascade de signalisation des «Mitogen-activated protein kinases» (MAPKs), qui sont impliquées dans la différenciation, la prolifération, la migration et la fibrose des CML [221].

Dans les monocytes, les macrophages, les CML et les cellules endothéliales vasculaires, l'angiotensine II active le NF- κ B, qui à son tour induit la production des molécules d'adhésion comme la ICAM-1, la VCAM-1 et la E-sélectine, et des chimiokines comme la MCP-1, l'IL-6 et l'IL-8 [221]. L'augmentation du stress oxydatif causée par l'angiotensine II nuit aussi à la relaxation vasculaire, entraîne la dysfonction de l'endothélium et stimule la sécrétion du TNF- α et de la MMP-2 par les cellules endothéliales [221]. Chez les humains hypertendus, l'interruption du système rénine-angiotensine avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou avec des bloqueurs du récepteur à l'angiotensine restaure la fonction endothéliale [221].

1.2.6 Athérosclérose et pédiatrie

Les attitudes par rapport à l'athérosclérose prennent maintenant en considération le fait que la pathogenèse de la maladie débute plus tôt qu'assumé auparavant. Plusieurs grandes études ont établi la prévalence de lésions athéromateuses lors de l'enfance [342-344] et la présence de stries lipidiques dans les artères humaines fœtales, particulièrement lorsque la mère présente une hypercholestérolémie au cours de la grossesse [345]. Ainsi, les interventions thérapeutiques qui débutent à l'âge adulte pourraient cibler des lésions déjà établies. Il est donc important de considérer l'athérosclérose comme une maladie qui peut s'initier dès l'enfance, et non plus comme une maladie strictement réservée aux adultes.

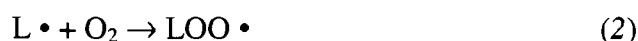
1.3 STRESS OXYDATIF

On peut définir le stress oxydatif comme un déséquilibre entre les composés oxydants et antioxydants, en faveur des oxydants, entraînant potentiellement des dommages cellulaires [128]. Cette définition implique un bris dans l'équilibre des réactions de réduction et d'oxydation.

1.3.1 Formation des radicaux libres

Un radical libre consiste en un composé pouvant exister avec un ou plusieurs électrons non paillés. Dans les systèmes biologiques, plusieurs radicaux peuvent être générés et leur réactivité dépend de leur nature et des molécules qui les composent. Lorsque deux radicaux se rencontrent, ils peuvent joindre leurs électrons non paillés et former un lien covalent dans des réactions rapides, entraînant la formation de produits non radicalaires. D'un autre côté, un radical peut s'ajouter à une molécule non radicalaire ou bien enlever un atome d'hydrogène des liens C-H, O-H ou S-H de molécules non radicalaires. Ces réactions sont communes dans les systèmes biologiques où la plupart des molécules sont des espèces non radicalaires. Les molécules potentiellement affectées sont entre autres des composés de faibles poids moléculaires comme les antioxydants et les co-facteurs des enzymes, les lipides, les protéines, les acides nucléiques et les sucres. Dans ces cas, un nouveau radical est généré, ce qui peut entraîner une réaction en chaîne. Un radical peut être un agent oxydant, acceptant un électron simple d'un non-radical, ou un agent réducteur, donnant un électron simple à un non-radical [128].

Un exemple typique de ces réactions en chaînes est la peroxydation lipidique qui peut être initiée, par exemple, par le radical hydroxyle (OH \cdot), soustrayant un atome d'hydrogène de la chaîne d'acides gras (LH) contenant des atomes de carbone avec des hydrogènes bisallyques (*réaction 1*). De cette réaction, il en résulte un radical avec centre de carbone (L \cdot) qui réagit rapidement avec l'oxygène moléculaire (O $_2$) pour générer un radical lipidique peroxyde (LOO \cdot) (*réaction 2*). Ce dernier peut propager la réaction en chaîne en réagissant avec les molécules lipidiques environnantes et générer un autre L \cdot et un hydroperoxyde lipidique (LOOH) (*réaction 3*). De cette façon, plusieurs molécules de LOOH peuvent être générées par chacun des radicaux initiaux [128].



Alors que le OH \cdot hautement réactif soustrait les atomes d'hydrogène presque sans discrimination, des radicaux moins réactifs, comme le LOO \cdot soustraient de manière préférentielle les atomes d'hydrogène des molécules avec des liens plus faibles, comme par exemple le lien O-H du chromanol contenu dans la molécule d'alpha-tocophérol (α -TOH). Dans ce cas, un radical α -tocophéryle (α -TO \cdot) et un LOOH sont produits (*réaction 4*) [128].

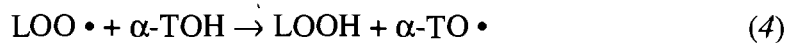


TABLE 4. Radicaux libres dans les systèmes biologiques

Nom	Formule	Description
Radical avec centre de carbone	$\begin{array}{c} \\ - C \cdot \\ \end{array}$	L'électron non pairé de ces radicaux réside sur le carbone et réagit rapidement avec l'O ₂ pour former des radicaux peroxydes.
Anion superoxyde et radical hydroperoxyde	O ₂ ⁻ , HO ₂ ⁻	Radicaux primaires aux centres d'oxygène dans leurs formes anioniques et protonées.
Radicaux peroxyde et alkoxyde	RO ₂ ⁻ , RO-	Radicaux avec centre d'oxygène qui peuvent être formés à partir de la réaction des radicaux aux centres de carbone ou de la dégradation des peroxydes organiques, comme le LOOH.
Radical hydroxyle	OH-	Hautement réactif, radical avec centre d'oxygène qui réagit avec toutes les biomolécules.
Oxyde nitrique (monoxyde d'azote) et dioxyde d'azote	NO-, NO ₂ ⁻	L'oxyde nitrique est formé à partir de la L-arginine et le dioxyde d'azote de la réaction du NO- avec le O ₂ ⁻ .
Radicaux thiyle et perthiyle	RS-, RSS-	Ils consistent à un groupe de radicaux avec des électrons non pairés résidant sur le soufre.
Ions des métaux de transition	Fe, Cu, etc	Radicaux qui permettent d'accepter ou de donner des électrons simples et qui peuvent être des catalyseurs des réactions de radicaux libres.

Adapté de [128]

1.3.2 Oxydants non radicalaires

En plus des radicaux, certains oxydants non radicalaires contribuent de manière importante aux modifications qui se produisent dans la paroi vasculaire. Le plus important est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dérivé de l'action des oxydases ou de la dismutation de l'anion superoxyde (*réaction 5*).



Comme c'est le cas avec les radicaux, la réactivité des différentes espèces non radicalaires varie. Le peroxyde d'hydrogène est généralement un oxydant faible, même s'il peut directement oxyder les groupes thiols (-SH). Le peroxyde d'hydrogène peut aussi réagir avec certaines protéines hémiques (ex : myoglobine et cytochrome c), ce qui peut entraîner la libération du fer et/ou la formation d'hème ferreux et de radicaux d'acides aminés qui peuvent propager les réactions d'oxydation. Par contre, la décomposition des métaux de transition avec la formation de radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) est généralement considérée comme le dommage oxydant le plus important généré par le H_2O_2 [128].

Tout comme le H_2O_2 , le peroxyde nitrique (ONOO^-) est un oxydant plutôt faible à pH alcalin. Par contre, sous sa forme protonée, soit en acide peroxyde nitrique (ONOOH), il est extrêmement réactif. Les oxydants non radicalaires comme le ONOOH et l'acide hypochlorique (HOCl) semblent réagir de manière préférentielle avec les protéines plutôt qu'avec les lipides, car les résidus de cystéine et de méthionine sulfoxyde sont ses cibles de choix. Cette préférence pour les réactions avec les protéines différencie les oxydants non

radicalaires des radicalaires, ces derniers étant généralement responsables de la peroxydation lipidique [128].

Table 5. Oxydants non radicalaires

Nom	Formule	Description
Péroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂	Oxydant diffusible et faible agent oxydant généralement peu réactif qui participe à la signalisation cellulaire et, en présence des métaux de transition, peut entraîner l'élévation de OH ⁻ . Agent oxydant puissant qui réagit avec les groupements Fe-S, les ions métalliques tenus dans les protéines, l'hème, les résidus d'acides aminés (méthionine, cystéine) des protéines et le GSH. Il peut entraîner la formation de dérivés réactifs secondaires incluant les chloramines et les aldéhydes dérivés des acides aminés.
Hypochlorite, acide hypochlorique	-OCl, HOCl	Puissant oxydant qui attaque les protéines et les lipides incluant le cholestérol. L'oxygène simplet peut être formé comme produit intermédiaire. Il réagit chimiquement avec les molécules ou par transfert de son énergie d'excitation. Sa réaction avec les doubles liens de carbone est la mieux connue.
Ozone	O ₃	Il peut être formé via la réaction du O ₂ ⁻ avec le NO ⁻ . La forme protonée est hautement réactive.
Oxygène simplet	¹ ΔO ₂	Ils constituent d'autres dérivés réactifs de l'azote.
Péroxynitrite, acide péroxinitrique	ONOO ⁻ , ONOOH	Ils sont formés via la réaction du RS ⁻ avec le NO ⁻ , ou des thiols avec des oxydes de l'azote. Les nitrosothiols sont des oxydants faibles.
Alkylpéroxynitrites, trioxyde d'azote, chlorure nitryle et ion nitronium	ROONO, N ₂ O ₃ , NO ₂ Cl et NO ₂ ⁺	
Nitrosothiols	RSNO	

Adapté de [128]

1.3.3 Sources des dérivés réactifs de l'oxygène dans la paroi vasculaire

Les réactions d'oxydation sont essentielles au métabolisme cellulaire normal, car l'oxygène est l'accepteur d'électrons ultime dans le mécanisme permettant de produire de l'ATP. Des problèmes peuvent survenir lorsque le flux d'électrons et la production d'énergie deviennent non couplés et qu'il y a production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). En fait, les ROS sont produits de manière continue dans les cellules, résultants des processus de transfert mitochondrial d'électrons ou comme produits des enzymes comme la xanthine oxydase, les lipoxigénases et du découplage de la eNOS. Aussi, les ROS peuvent être générés conséquemment au métabolisme intracellulaire de composés étrangers, de toxines ou de drogues par le cytochrome P450, les monooxigénases ou à cause de l'exposition à des facteurs environnementaux tels l'excès de sels ferriques ou l'irradiation UV. Une autre source de ROS dans l'organisme provient des macrophages et des neutrophiles qui contiennent des enzymes, comme la NADPH oxydase, pouvant générer des radicaux superoxydes et du peroxyde d'hydrogène [346]. Certains ROS, comme l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, le radical peroxyde et l'oxyde nitrique ont des électrons non pairés sur leur orbite externe. D'autres, comme le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde nitrite, ne possèdent pas d'électrons pairés mais sont tout de même des pro-oxydants.

Les ROS peuvent jouer des rôles positifs pour la cellule, car ils sont impliqués dans la production d'énergie, la phagocytose, la croissance cellulaire et la régulation de la signalisation intracellulaire. Ils peuvent aussi s'avérer hautement nocifs, car ils peuvent attaquer les macromolécules comme les lipides,

les protéines et l'ADN, induire l'oxydation et causer des dommages membranaires et l'inactivation d'enzymes [346]. Lorsque les niveaux de ROS excèdent la capacité antioxydante cellulaire, l'homéostasie rédox de la cellule est altérée et un stress oxydatif en résulte. Le stress oxydatif est connu pour jouer un rôle clef dans la pathogenèse du vieillissement et de plusieurs pathologies dégénératives comme l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, le diabète de type II et le cancer [346].

Afin de maintenir l'homéostasie du statut rédox, plusieurs mécanismes de protection peuvent intervenir. Ils peuvent permettre de capter ou de détoxifier les ROS, de bloquer leur production ou de séquestrer les métaux de transition qui sont une source de radicaux libres [346]. Ces protections incluent les défenses antioxydantes enzymatiques et non-enzymatiques (endogènes) et les défenses apportées par la diète (exogènes).

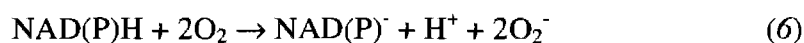
Les désordres tels l'hypercholestérolémie, l'hypertension, le diabète et le vieillissement sont associés à une élévation de la production de ROS. Ces conditions contribuant pour une grande partie de la mortalité et de la morbidité, il s'avère extrêmement important et urgent de comprendre de quelle façon le stress oxydatif se produit et comment les ROS affectent le système vasculaire. De plus, les ROS peuvent promouvoir l'inflammation, altérer la vasomotion, activer les métalloprotéinases de la matrice, induire l'apoptose, causer l'agrégation plaquettaire et stimuler la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. Tous ces événements contribuent à la formation des lésions athéromateuses [347].

1.3.3.1 Transport mitochondrial d'électrons

Dans plusieurs organes et tissus, le transport d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale représente la source prédominante de O_2^- et conséquemment de H_2O_2 . Il est estimé que de 1% à 4% de l'oxygène impliqué dans la chaîne respiratoire est incomplètement réduit en O_2^- . Des défauts dans l'ADN mitochondrial, innés ou acquis par la résultante d'une maladie, pourraient augmenter la production de ROS par ces organelles [348,349]. Fait intéressant, l'exposition des cellules endothéliales ou musculaires lisses au ONOO⁻ ou au H_2O_2 exogènes mène à des dommages de l'ADN mitochondrial [350]. Par contre, au niveau de la paroi vasculaire, la contribution de la mitochondrie à la production totale de ROS demeure incertaine, mais diverses évidences montrent qu'elle joue un rôle important dans la production vasculaire de ROS. Des stimuli comme un taux élevé de glucose, la leptine et la fumée de cigarette entraînent des dommages à l'ADN mitochondrial aortique et altèrent l'activité enzymatique mitochondriale [347]. Les niveaux de O_2^- dépendent aussi de l'activité de la superoxyde dismutase mitochondriale, une enzyme localisée au niveau de la matrice mitochondriale qui converti le O_2^- en H_2O_2 et en oxygène moléculaire (O_2). Les propriétés de cette enzyme seront discutées dans la section des antioxydants [128].

1.3.3.2 NADPH oxydases

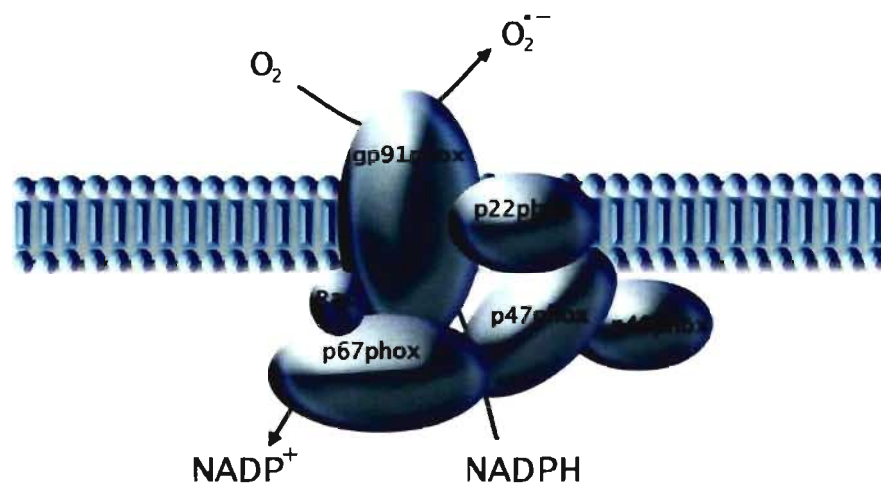
Les enzymes NADPH oxydases, aussi connues sous le nom des enzymes Nox, représentent une source majeure de ROS dans les cellules de la paroi vasculaire. Il est connu depuis longtemps que les phagocytes, incluant les neutrophiles, les monocytes et les macrophages, possèdent une oxydase liée à la membrane plasmatique qui utilise des électrons dérivés de la NADPH afin de réduire l'oxygène moléculaire en O_2^- . La NADPH oxydase, une source majeure de production de O_2^- , utilise la NADPH comme donneur d'électrons (*réaction 6*) [351].



La NADPH oxydase des phagocytes doit être activée afin de produire le O_2^- , un processus qui débute avec la phosphorylation de $p47^{phox}$ entraînant son association avec le cytochrome b_{558} . À ce jour, il est généralement accepté que les enzymes Nox requièrent le $p22^{phox}$ qui sert de protéine d'arrimage pour les autres sous-unités et stabilise les protéines Nox [352]. Une fois activées, les cellules phagocytaires produisent de grandes quantités de O_2^- dans une courte période de temps, un phénomène impliqué dans la défense cellulaire [128]. Les stimuli patho-physiologiques comme l'angiotensine II, l'hypercholestérolémie, les facteurs de croissance et le sérum peuvent aussi stimuler l'expression de certaines des sous-unités de la NADPH oxydase, incluant le $p22^{phox}$, entraînant une augmentation de la production de ROS [347,353].

D'une manière analogue aux phagocytes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales contiennent une NADPH oxydase associée à la membrane qui utilise la NADP ou la NADPH comme donneur d'électron afin de générer le O_2^- , via la réduction de l'oxygène moléculaire [128]. Leurs niveaux protéiques sont assez faibles dans les cellules vasculaires, mais ils peuvent être induits par des stimuli tels le PDGF, l'angiotensine II et le sérum [353].

Figure 25. NADPH oxydase



Tiré de www.clinsci.org

Figure 25 : Les enzymes NADPH oxydases utilisent la NADPH comme donneur d'électrons. Leur activation débute avec la phosphorylation de la sous-unité p47^{phox}, ce qui permet la production de grandes quantités de O_2^- dans une courte période de temps. Le p22^{phox} sert de protéine d'arrimage pour les autres sous-unités.

La surproduction de ROS par la NAD(P)H vasculaire contribue à la pathogenèse des maladies cardiovasculaires. Les électrons des phagocytes sont transférés à travers la membrane vers l'espace extracellulaire, mais dans les cellules musculaires lisses, le O_2^- et le H_2O_2 produits restent principalement dans la cellule. Les cellules endothéliales, pour leur part, relâchent le O_2^- au niveau extracellulaire [128].

En contraste des phagocytes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires et les fibroblastes présentent une faible activité basale pour la génération de O_2^- . Par contre, de manière similaire aux phagocytes, les NADPH oxydases des cellules vasculaires peuvent être aussi activés par des stimuli comme l'angiotensine II, la thrombine, le «platelet-derived growth factor», le $TNF-\alpha$, l'IL-1 et, spécifiquement pour les cellules endothéliales, les forces mécaniques (incluant les forces de cisaillement) et le facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires. Par contre, même sous des conditions de stimulation, les quantités de O_2^- produites par les cellules vasculaires ne représentent qu'une fraction de celles générées par les phagocytes activés et ces anions superoxydes sont communément considérés comme des seconds messagers pour un nombre de protéines régulatrices et de réponses cellulaires, plutôt que des espèces toxiques causant des dommages oxydatifs [128].

1.3.3.3 Xanthine oxydase

L'activité de la xanthine oxydoréductase (XOR) consiste en une autre source importante de ROS dans les cellules des mammifères. La xanthine oxydoréductase existe sous deux formes inter-convertibles, soit la xanthine déshydrogénase (XDH) et la xanthine oxydase (XO) [354]. Un des rôles primaires de la XOR consiste en la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique [355]. La XDH utilise la NAD⁺ pour intercepter les électrons de l'hypoxanthine et de la xanthine, formant la NADH et l'acide urique. Par contre, la XO utilise l'oxygène comme accepteur d'électrons de ces mêmes substrats pour former le O₂⁻ et le H₂O₂. Le ratio XO/XDH dans les cellules s'avère donc critique pour déterminer la quantité de ROS produite par ces enzymes. La conversion de XDH en XO est stimulée par les cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α , et aussi par l'oxydation de résidus cystéine par les oxydants comme le peroxy-nitrite [356,357].

Il existe un débat substantiel à savoir si la XDH est exprimée dans les cellules de la paroi vasculaire. Des études d'immunocytochimie effectuées sur des tissus normaux humains n'ont pas permis de démontrer la présence de XDH sur les cellules endothéliales ou sur d'autres tissus cardiovasculaires [358]. Par contre, il a été démontré que la XO produit des ROS et affecte la fonction endothéliale dans l'athérosclérose [359-362], possiblement à cause de la stimulation de l'expression de la XO par les cytokines inflammatoires ou par d'autres stimuli présents dans ces conditions. Par exemple, l'hypoxie induit l'activité de la XO dans les cellules HUVEC [363]. Il a été postulé que la XO

présente dans les cellules endothéliales provient d'autres organes et que l'enzyme est probablement captée par les sites de liaison de l'héparine [359,364,365]. Il semble que la XO en circulation se lie aux glycosaminoglycanes sur la surface des cellules endothéliales où elle acquiert des modifications de ses caractéristiques cinétiques. La XO liée à l'endothélium continue de produire des oxydants, ce qui peut mener à la dysfonction endothéliale et contribuer à endommager les organes. La XO circulatoire serait impliquée de manière plus importante dans la pathogenèse du dommage endothélial, comparativement à la XO constitutive des cellules endothéliales, qui se retrouverait en faibles quantités [355]. Peu importe la provenance de la XO, son activité vasculaire est inversement corrélée à la fonction endothéliale chez les sujets présentant de l'athérosclérose [347,359,366].

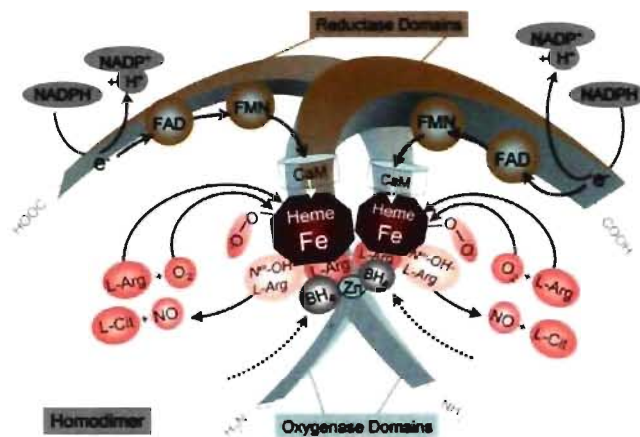
1.3.3.4 Découplage de l'oxyde nitrique synthase endothéliale

Une autre enzyme contribuant de manière importante à la production de ROS est l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) découplée. Le produit de cette enzyme dans des conditions normales est l'oxyde nitrique (NO). Le découplage de la eNOS a pu être identifié dans plusieurs pathologies comme le diabète [347], l'hypercholestérolémie [367] et l'hypertension [368].

Lors du découplage de la eNOS, il y a production importante de ROS. En absence de quantités suffisantes de co-facteurs, telle la tétrahydrobioptérine (BH₄) nécessaire pour l'action catalytique, l'enzyme peut réduire l'oxygène moléculaire plutôt que de transférer des électrons à la L-arginine, générant ainsi des anions

superoxydes, car la génération de O_2^- par le domaine oxygénase de l'enzyme est normalement stabilisée par la BH_4 .

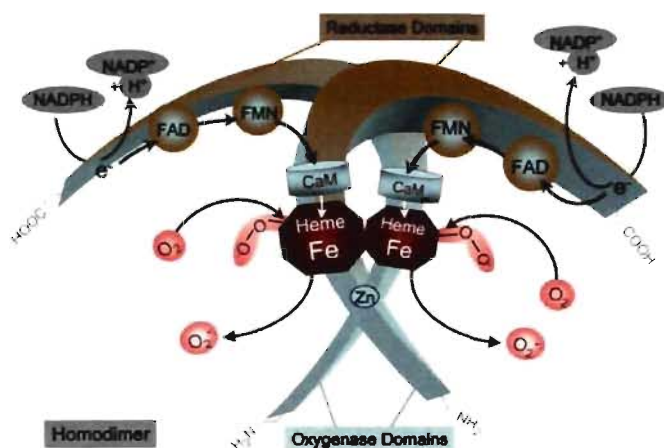
Figure 26. *Structure de la eNOS*



Tiré de [369]

Figure 26 : La eNOS synthétise l'oxyde nitrique à partir de l'atome terminal d'hydrogène de la L-arginine en présence de NADPH et d'oxygène moléculaire. Son activité enzymatique requiert les co-facteurs FAD, FMN, calmoduline et BH_4 .

Figure 27. Découplage de la eNOS



Tiré de [369]

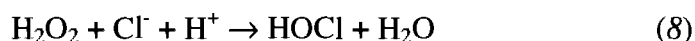
Figure 27 : En absence de quantités suffisantes de co-facteurs, comme la BH_4 , la eNOS peut réduire l'oxygène moléculaire plutôt que de transférer des électrons à la L-arginine, générant ainsi des anions superoxydes.

De plus, le NO formé par la eNOS peut réagir avec les complexes métalliques, l'oxygène moléculaire ou l'anion superoxyde afin de former les dérivés réactifs de l'azote (RNS). Biologiquement, ces réactions impliquent la liaison du NO avec des protéines hémiques comme la guanylyle cyclase, la NOS et l'hémoglobine. Par exemple, la liaison du NO à l'hème de la NOS entraîne l'inhibition réversible de son activité enzymatique [128]. De plus, le NO réagit rapidement avec le O_2^- pour générer le peroxy-nitrite ($ONOO^-$) (réaction 7). Ce dernier peut oxyder la BH_4 , menant au découplage de la eNOS et à la diminution de la production de NO, contribuant au dysfonctionnement endothélial. Aussi, le peroxy-nitrite est un pro-oxydant qui oxyde les lipides et les thiols en plus de réagir avec les domaines fer-soufre d'une panoplie d'enzymes [128].



1.3.3.5 Myéloperoxydase

La myéloperoxydase est une enzyme hémique qui catalyse la conversion du chlore (Cl^-) en acide hypochlorique (HOCl), un oxydant non radicalaire (réaction 8) :



La myéloperoxydase est la seule enzyme connue pour générer le HOCl chez les humains et cette molécule est considérée comme un marqueur spécifique des réactions d'oxydation catalysées par cette enzyme. Le HOCl peut générer une série de produits d'oxydation secondaires qui ont la capacité d'attaquer les biomolécules, comme par exemple les LDL [128].

1.3.3.6 Lipoxygénases

Les lipoxygénases sont des enzymes contenant le fer qui catalysent l'insertion de l'oxygène moléculaire dans les acides gras polyinsaturés afin de former une famille complexe de lipides biologiquement actifs, incluant les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes. Lors de l'action catalytique des lipoxygénases, des hydroperoxydes lipidiques (LOO^\bullet) sont générés, relâchés et peuvent participer à une peroxydation lipidique non enzymatique [128].

1.3.3.7 Métaux de transition

Les métaux de transition libres comme le fer et le cuivre sont de puissants catalyseurs des réactions d'oxydation en présence des hydroperoxydes, comme le LOOH. Ils catalysent la rupture homolytique du LOOH en radicaux alkoyles lipidiques, ce qui peut initier la peroxydation lipidique et d'autres réactions d'oxydation. En plus du fer libre, les formes biologiques du fer, comme l'hémoglobine et la myoglobine, peuvent potentiellement catalyser les réactions oxydatives dans la paroi vasculaire, car, *in vitro*, ces molécules peuvent oxyder les LDL [128].

1.3.4 Défenses antioxydantes

Il est important de considérer les sources d'oxydants dans un contexte de disponibilité des antioxydants, car plusieurs substances peuvent prévenir ou du moins retarder l'oxydation d'autres substrats. Un antioxydant est défini comme une substance efficace contre le dommage oxydatif lorsque présente en quantités bien inférieures que la substance qu'elle protège. En ce qui concerne l'athérosclérose, les antioxydants vasculaires doivent protéger contre les substances radicalaires et non radicalaires, tant à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule [128]. Afin de maintenir l'homéostasie du statut rédox, plusieurs mécanismes de protection peuvent intervenir. Ils peuvent permettre de capter ou de détoxifier les ROS, de bloquer leur production ou de séquestrer les métaux de transition [346]. Ces protections incluent les défenses antioxydantes

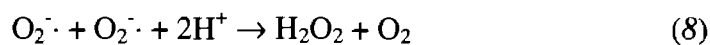
enzymatiques et non-enzymatiques (endogènes) et les défenses apportées par la diète (exogènes).

1.3.4.1 Enzymes antioxydantes

Les principales enzymes antioxydantes présentes dans les cellules sont les superoxydes dismutases (SOD), la catalase, les glutathion peroxydases (GPx) et la glutathion réductase (GR). Sous des conditions de stress oxydatif exogène, les cellules peuvent modifier les événements métaboliques pour augmenter leurs défenses antioxydantes afin de restaurer la balance entre l'expression des enzymes antioxydantes, la biosynthèse de glutathion et la production de ROS. Ces modifications métaboliques peuvent être considérées comme un phénomène d'adaptation cellulaire au stress oxydatif [370].

1.3.4.1.1 Superoxydes dismutases

Les SOD catalysent la réduction et l'oxydation du O_2^- en H_2O_2 et en O_2 (réaction 8) :



Il existe trois formes de SOD chez les mammifères : la cuivre-zinc cytosolique (Cu, Zn-SOD), la manganèse mitochondriale (Mn-SOD) et la cuivre-zinc extracellulaire (ec-SOD). La Cu,Zn-SOD (SOD1) est virtuellement présente dans

toutes les cellules, où elle est principalement localisée au niveau du cytosol, présentant tout de même une certaine activité au niveau des lysosomes, des péroxysomes, du noyau et de l'espace entre les feuillets internes et externes de la membrane mitochondriale. L'ion cuivre est impliqué dans la réaction de dismutation en alternant entre ses états oxydé et réduit, ce qui est à la base de la capacité des agents chélateurs du cuivre d'inhiber la SOD [128].

La Mn-SOD (SOD2) est principalement localisée au niveau de la mitochondrie et contribue à environ 10% de l'activité cellulaire totale [128].

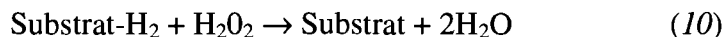
Comme indiqué par son nom, la ec-SOD (SOD3) consiste en la forme extracellulaire de l'enzyme, qui contient aussi le zinc et le cuivre. Elle est liée aux protéoglycanes héparane sulfate dans une variété de cellules, incluant les cellules endothéliales, les monocytes/macrophages et les cellules musculaires lisses. Il semble que l'une des fonctions clefs de la ec-SOD consiste en sa protection contre l'inactivation du NO des cellules endothéliales par le O_2^- [128].

1.3.4.1.2 Catalase et peroxydases

Deux enzymes métabolisent généralement le H_2O_2 résultant de la dismutation du O_2^- ou généré par les enzymes oxydases incluant la xanthine oxydase. La catalase décompose directement le H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire (*réaction 9*) :



Par contre, les peroxydases éliminent le H_2O_2 en l'utilisant pour oxyder un autre substrat (*réaction 10*) :



La balance entre l'activité de la SOD et celle de la GPx et/ou la catalase est, du moins au niveau théorique, très critique. Une activité trop faible de SOD par rapport à celle de la GPx et/ou la catalase peut mener à l'augmentation de la production de O_2^- toxique pour les macromolécules. Une activité trop élevée de SOD par rapport à celle de la GPx et/ou la catalase peut causer l'accumulation de l'intermédiaire H_2O_2 , pouvant lui-même engendrer la genèse de ROS encore plus toxiques que le O_2^- . En effet, la conversion du H_2O_2 en OH^- est catalysée par le Fe^{2+} dans la réaction de Fenton [371]. Un déséquilibre entre les activités de ces étapes antioxydantes se produit dans différents processus pathologiques et pourrait contribuer de manière directe ou indirecte à leur étiologie. Par exemple, les individus présentant un syndrome de Down possèdent trois copies du gène *sod1* et seulement deux copies du gène *gpx1* [372,373]. De plus, il a été démontré que l'augmentation du ratio de l'activité de la SOD1 par rapport à celle de la GPx est parallèle à l'augmentation de la peroxydation lipidique [374,375].

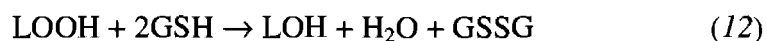
1.3.4.1.3 Défenses antioxydantes dépendantes du glutathion

Les enzymes du cycle du glutathion consistent en un système cellulaire complexe permettant de maintenir des niveaux intracellulaires de GSH et de thiols adéquats.

Les glutathion peroxydases coopèrent avec la catalase pour se débarrasser du H₂O₂, en utilisant le glutathion réduit (GSH), afin de réduire le H₂O₂ en H₂O et en glutathion oxydé (GSSG) (*réaction 11*) :



Les glutathion peroxydases sont largement distribuées au niveau des tissus et elles peuvent agir sur des peroxydes autres que le H₂O₂. Entre autres, elles peuvent catalyser la réduction, dépendante du GSH, du LOOH en son alcool correspondant (LOH) (*réaction 12*) :



Cette conversion représente une défense antioxydante, car elle limite le potentiel de formation de pro-oxydants à partir de la dégradation des hydroperoxydes [128].

Les glutathion peroxydases sont des enzymes tétramériques qui contiennent et nécessitent une molécule de sélénium pour leur activité. Le sélénium participe activement à la réaction catalytique, ce qui est à la base de la protection antioxydante qu'offrent les suppléments de sélénium. Les peroxydases contenant le sélénium consistent en une famille d'enzymes d'au moins quatre

types. La glutathion peroxydase « classique » (cGPx) agit sur le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes des acides gras et du cholestérol, mais non sur les lipides estérifiés comme ceux présents dans les lipoprotéines. Chez la souris, une déficience hétérozygote de cette enzyme est associée à la dysfonction endothéliale et à l'augmentation des niveaux circulatoires et aortiques de F₂-isoprostanes, soit des produits d'oxydation secondaires formés lors de l'oxydation non-enzymatique de l'acide arachidonique qui sont utilisés comme marqueur de stress oxydant [128]. La glutathion peroxydase des hydroperoxydes phospholipidiques (PHGPx) est la seule enzyme connue qui permet de réduire le complexe des hydroperoxydes lipidiques dans les lipoprotéines. En plus du GSH, la PHGPx peut utiliser plusieurs autres agents réducteurs de faible poids moléculaire. Cet isoforme est lié à la membrane et, comme la cGPx, il n'est pas retrouvé dans les fluides extracellulaires. La glutathion peroxydase gastrointestinale est exprimée dans les lignées cellulaires du tractus intestinal et est principalement impliquée dans la détoxification des peroxydes alimentaires. De plus, le plasma humain contient de faibles concentrations d'une peroxydase glycosylée, appelée peroxydase extracellulaire, qui agit sur le H₂O₂ et sur les hydroperoxydes phospholipidiques [128].

Les glutathion peroxydases agissent de concert avec la glutathion réductase (GR) pour catalyser la réduction de GSSG en utilisant la NADPH (*réaction 13*):



La NADPH est fournie principalement par la voie du pentose phosphate qui est initiée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase et qui maintient la balance cellulaire du couple rédox NADPH/NADP⁺. Dans ce contexte, la glucose-6-phosphate déshydrogénase peut être considérée comme un antioxydant. Par exemple, la surexpression de glucose-6-phosphate déshydrogénase dans les cellules endothéliales diminue le stress oxydatif et augmente la biodisponibilité du NO [376].

En plus de son rôle central dans l'activité de la GPx, le GSH est impliqué dans plusieurs autres voies antioxydantes, incluant la neutralisation directe des oxydants, le métabolisme de l'ascorbate, le maintien des groupes protéiques sulfhydryles et de la détoxification des xénobiotiques via l'activation des glutathion S-transférases. Certaines glutathion transférases démontrent une activité peroxydase contre les hydroperoxydes phospholipidiques, suggérant que ces enzymes peuvent aussi contribuer aux défenses cellulaires antioxydantes [128].

1.3.4.1.4 Séquestration des métaux

Les métaux de transition, spécifiquement le fer et le cuivre, sont essentiels pour la synthèse d'une large variété de protéines, incluant des enzymes comme la eNOS qui joue un rôle central dans le maintien de la fonction adéquate des vaisseaux sanguins. Par contre, ces métaux peuvent subir des réactions de transfert qui entraînent des réactions d'auto-oxydation ou la décomposition des peroxydes en peroxydes, alkoxydes et radicaux hydroxydes. Par exemple, les métaux de transition peuvent induire un dommage oxydatif aux lipoprotéines et le cuivre est communément utilisé *in vitro* pour oxyder les LDL. Ainsi, la liaison des agents chélateurs aux métaux de transition et leur inactivation dans la paroi vasculaire peuvent constituer une défense antioxydante. Certaines protéines, comme la ferritine, la transferrine, l'haptoglobine, l'hémopexine et la céruloplasmine, lient de manière spécifique les complexes de fer et de cuivre et sont considérées comme des systèmes de défenses antioxydantes biologiques [128].

1.3.4.2 Antioxydants non enzymatiques

Tout comme les antioxydants protéiques, différents composés de faibles poids moléculaires contribuent aux défenses antioxydantes de l'organisme. Ces antioxydants consistent en des molécules liposolubles et hydrosolubles. Les composés antioxydants hydrosolubles sont principalement la vitamine C, l'acide urique et la bilirubine ; les liposolubles sont essentiellement la vitamine E et la coenzyme Q₁₀.

1.3.4.2.1 Ascorbate (vitamine C)

L'ascorbate, ou vitamine C, est généralement connu pour sa fonction d'agent réducteur, capable d'augmenter l'activité enzymatique en maintenant le centre de l'enzyme à l'état ferreux, soit sous sa forme active. L'ascorbate est un cofacteur pour plusieurs enzymes impliquées dans les réactions d'hydroxylation. Dans la paroi vasculaire, il est requis pour la biosynthèse du collagène via la proline et lysine hydrolases. Le collagène synthétisé en absence de l'ascorbate n'est pas suffisamment hydroxylé et ne forme pas des fibres convenables, entraînant la formation de vaisseaux sanguins fragiles [128].

L'ascorbate est généralement considéré comme une ligne protectrice de premier plan, qui répare ou neutralise les radicaux libres en donnant un simple électron, suivi par un proton, afin d'obtenir un produit chimiquement réduit, non radicalaire. Le radical ascorbyle peut ensuite subir une dismutation en ascorbate et en acide déhydroascorbique. Tant le radical ascorbyle que l'acide déhydroascorbique peuvent être réduits par les systèmes enzymatiques

dépendants du glutathion, ce qui permet de recycler efficacement le pool de vitamine C biodisponible [128]. L'ascorbate constitue la première ligne de défense antioxydante dans le plasma humain [377-379] où il est considéré comme l'antioxydant hydrosoluble le plus efficace [380,381].

L'ascorbate a la capacité de réduire le radical α -tocophéryle en α -tocophérol, constituant un mécanisme de protection de l'oxydation de la vitamine E dans les micelles [382,383] et dans les membranes biologiques isolées [384,385]. Un autre exemple de l'activité synergétique de l'ascorbate est le maintien du glutathion cellulaire via la réduction du radical glutathion thiyle, ce qui permet de maintenir le GSH dans sa forme réduite active [128].

L'ascorbate présente aussi différentes activités protectrices en relation avec l'athérosclérose. Les patients avec syndromes coronariens stables ou avec hypertension ont de faibles concentrations plasmatiques d'ascorbate et les suppléments de vitamine C ont le potentiel d'atténuer une vasodilatation endothéliale anormale [386]. Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués, incluant le maintien de l'activité de la eNOS, l'atténuation du stress oxydatif cellulaire, l'inhibition de l'oxydation des LDL et la préservation de composés qui ont une bioactivité similaire à celle du NO, comme les S-nitrosothiols [387]. L'ascorbate peut aussi entrer en compétition avec le O_2^- pour réagir avec le NO, quoique cette compétition n'est observée qu'à des concentrations supraphysiologiques de vitamine C (> 10 mM) [388]. De plus, l'ajout d'ascorbate aux cellules endothéliales aortiques *in vitro* améliore l'activité de la

eNOS, ce qui est dû à la stabilisation chimique de la tétrahydrobioptérine cellulaire [389].

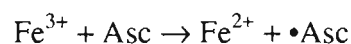
Par contre, la propriété d'agent réducteur de métaux est à la base de l'activité pro-oxydante de l'ascorbate *in vitro*, ce qui est attribué à la réduction du fer de manière cyclique et à la production de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton. Il semble par contre que cette activité pro-oxydante ne soit pas retrouvée *in vivo*, où l'ascorbate protège de manière générale les molécules biologiques de l'oxydation [390].

Figure 28. Activité pro-oxydante de l'ascorbate

**Réaction de
Fenton**



**Réduction par
l'ascorbate**



FORMATION DU RADICAL HYDROXYLE
FORMATION DU RADICAL ASCORBYLE

Figure 28 : L'ascorbate peut amplifier le potentiel oxydatif du fer en permettant sa réduction, ce qui entraîne la production du radical ascorbyle, ainsi que la régénération du système de production de radical hydroxyle via la réaction de Fenton.

1.3.4.2.2 Acide urique

L'acide urique est produit par l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine, réaction catalysée par la xanthine oxydase et déshydrogénase. À un pH physiologique, presque tout l'acide urique est présent comme monoanion urate. Le rôle de l'urate comme antioxydant est investigué, car celui-ci peut directement réagir avec l'oxygène singlet, le radical hydroxyle, les radicaux peroxydes et avec le $\text{NO}_2\bullet$ dérivé du peroxyde d'azote [391,392]. La réaction de l'urate avec les oxydants entraîne la formation du radical urate, qui peut être réduit par l'ascorbate [128].

1.3.4.2.3 Bilirubine

La bilirubine consiste en un produit terminal de la dégradation de l'hémoglobine. Chez les humains, environ 275 mg de bilirubine sont produits chaque jour [128]. La bilirubine est un puissant agent réducteur et un antioxydant physiologique potentiel. Au niveau des fluides extracellulaires, il est principalement lié à l'albumine, ce qui rend ce pigment hydrophobe hydrosoluble. La bilirubine libre et liée à l'albumine a la capacité de réduire l' α -tocophérol et d'inhiber la peroxydation lipidique du plasma et des LDL [393], cela même si elle constitue une seconde ligne de défense antioxydante derrière l'ascorbate. Par contre, à ce jour, peu d'études ont apporté des évidences directes que la bilirubine agit comme un antioxydant important *in vivo*, quoique les rats présentant une hyperbilirubinémie présentent un dommage oxydatif réduit en réponse à l'hyperoxie [128,394].

1.3.4.2.4 Vitamine E

En plus des antioxydants aqueux, les antioxydants liposolubles jouent un rôle important dans la prévention des dommages oxydatifs. Les tocophérols et les ubiquinols sont les sources majeures d'antioxydants liposolubles dans les cellules et dans les lipoprotéines. De plus, les lipoprotéines sont les principaux véhicules pour le transfert de la vitamine E du foie vers les tissus périphériques. Les lipoprotéines transportent aussi des caroténoïdes qui pourraient être des antioxydants importants dans un contexte de maladies cardiovasculaires. Par contre, comparativement à la vitamine E et aux ubiquinols, les caroténoïdes sont de faibles antioxydants, sauf pour l'oxygène simplet. La relation entre l'athérosclérose et les caroténoïdes demeure très controversée [128,395,396].

Huit différentes substances naturelles démontrent une activité de la vitamine E chez les animaux : les *d-α*-, *d-β*-, *d-γ* et *d-δ*-tocophérols et les *d-α*-, *d-β*-, *d-γ* et *d-δ*-tocotriénols. Les tocophérols possèdent trois atomes de carbone asymétriques, ce qui permet huit isomères optiques, desquels le *d-α*-tocophérol est la forme la plus active de vitamine E. Les termes α -tocophérol et vitamine E sont communément utilisés et, quoique incorrectement, interchangeables [128].

Figure 29. Alpha-tocophérol

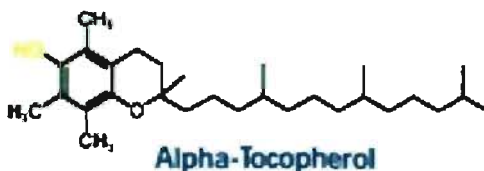


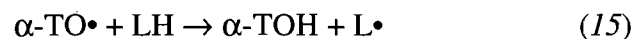
Figure 29 : L'alpha-tocophérol est la forme la plus active de vitamine E.

Étant une molécule liposoluble, l' α -tocophérol a tendance à se localiser au niveau des membranes et des lipoprotéines. De ce fait, l' α -tocophérol possède un rôle central dans le contrôle de la peroxydation lipidique. Les tocophérols et les tocotriénols sont d'excellents capteurs de $\text{LOO}\cdot$, ce qui est considéré comme une action antioxydante très importante de la vitamine. Dans le cas de l' α -tocophérol, il peut réagir avec les peroxydes lipidiques ou une autre espèce radicalaire, et ainsi former un produit non radicalaire (NR) (*réaction 14*) :



En plus de réagir avec les radicaux peroxydes, l' α -tocophérol peut réagir avec l'oxygène singlet, le HOCl et le ONOO⁻ [128].

L' α -tocophérol démontre aussi des effets pro-oxydants. Tout comme l'ascorbate, l' α -tocophérol permet la réduction des métaux de transition tels le fer et le cuivre, ce qui constitue un effet pro-oxydant de la vitamine. L' α -tocophérol peut aussi, de manière importante, réagir avec les lipides et peut soustraire l'atome d'hydrogène du LH (*réaction 15*), réaction considérablement impliquée dans l'oxydation des LDL:



En plus de l' α -tocophérol, le γ -tocophérol est présent dans les lipoprotéines, mais constitue un antioxydant moins actif que l' α -tocophérol et serait moins en mesure de contrôler la peroxydation lipidique dans les LDL [128]. Par contre, le γ -tocophérol pourrait s'avérer important pour la détoxification du $\text{NO}_2\cdot$ [397,398], même si l'importance physiologique de cet effet reste à être déterminée. Il a été rapporté que le γ -tocophérol, mais non l' α -tocophérol, inhibe l'inflammation induite chez les rats, ainsi que l'augmentation des éicosanoïdes pro-inflammatoires associée à la peroxydation lipidique [399], ce qui pourrait avoir un effet important sur l'inhibition de l'athérosclérose [128]. Il semble aussi que, *in vitro*, le γ -tocophérol soit plus efficace que l' α -tocophérol pour protéger contre les dérivés réactifs de l'azote [397,398]. Plusieurs études tentent maintenant d'évaluer son potentiel de protection contre l'inflammation et les maladies cardiovasculaires *in vivo* [400].

Figure 30. Alpha- et gamma-tocophérol

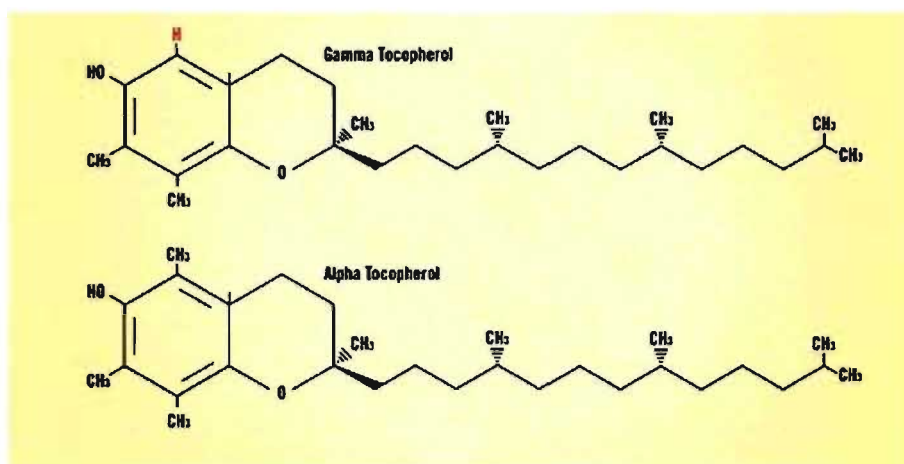


Figure 30 : L' α - et le γ -tocophérol sont des isomères optiques.

1.3.4.2.5 Coenzyme Q₁₀

La coenzyme Q₁₀ appartient à une famille de composés connus sous le nom de ubiquinones, qui sont des molécules liposolubles synthétisées par les animaux, incluant les humains, et qui contiennent une structure benzoquinone possédant de 1 à 12 unités d'isoprène. La coenzyme Q₁₀ possède 10 unités isoprène et constitue la forme prédominante d'ubiquinone chez les humains. Elle est retrouvée virtuellement dans toutes les membranes cellulaires, ainsi que dans les lipoprotéines. Sa capacité à donner et à recevoir des électrons est critique pour les fonctions physiologiques. Elle joue aussi un rôle important comme agent de transfert d'électrons et de protons au niveau de la production mitochondriale d'ATP et dans le maintien d'un pH optimal dans les lysosomes [401].

Dans sa forme réduite, l'ubiquinol (forme entièrement réduite de la coenzyme Q₁₀) est un antioxydant efficace qui peut inhiber l'oxydation des protéines et des lipides membranaires [402]. Il consiste aussi en une ligne de défense antioxydante liposoluble primaire de la peroxydation lipidique des LDL, même s'il est présent en plus petites quantités que l' α -tocophérol [403]. L'ubiquinol réduit l' α -tocophérol et cette propriété compte probablement fortement pour sa capacité de contrôler la peroxydation lipidique [128,404].

1.3.5 Dérivés réactifs de l'oxygène et athérosclérose

L'inflammation est reconnue comme un phénomène majeur participant au développement de l'athérosclérose. En effet, les lésions caractéristiques de l'athérosclérose sont constituées d'un grand nombre de cellules immunitaires, principalement les macrophages et les lymphocytes T. De plus, plusieurs médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines et les chimiokines sont impliqués dans la formation et la progression des lésions [405].

D'un autre côté, plusieurs évidences montrent l'influence du stress oxydatif dans le développement de l'athérosclérose. Par exemple, les différents facteurs de risque de l'athérosclérose sont associés à une augmentation du stress oxydatif comme le diabète, les hyperlipidémies, l'hypertension artérielle et l'hyperhomocystéinémie. Les conséquences d'une augmentation du stress oxydatif dans les cellules artérielles sont bien documentées *in vitro* et s'avèrent généralement consistantes avec les observations effectuées au niveau des lésions athéromateuses [262].

L'importance des ROS dans l'atteinte vasculaire est reliée au fait que leur production est contrôlée de manière positive par plusieurs cytokines inflammatoires. De faibles niveaux de ROS sont nécessaires pour la fonction vasculaire normale, mais un excès de leur production ou un désordre de leur séquestration, dans un environnement pro-inflammatoire, module les réponses cellulaires, entre autres l'adhésion des monocytes, l'agrégation plaquettaire, l'induction de gènes pro-inflammatoires, l'apoptose des cellules du muscle lisse, leur prolifération et leur migration, la dégradation de la matrice et la relaxation

endothélium-dépendante [406]. L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont les deux ROS les plus importants d'un point de vue biologique dans le système cardiovasculaire.

Les cytokines, comme les IL, le TNF- α , l'angiotensine II et le facteur de croissance endothélial induisent tous l'expression des molécules d'adhésion d'une manière dépendante des ROS. De plus, la contrainte de cisaillement oscillatoire entraîne l'induction de NF- κ B et la production continue de O₂⁻ par la NADPH oxydase [406]. Aussi, la formation de peroxyde d'azote, par la réaction du O₂⁻ avec le NO, mène à la perte des effets bénéfiques et vasodilatateurs du NO. Il est postulé que ce phénomène est responsable de la réduction de la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans plusieurs conditions et qu'il peut contribuer au développement de l'hypertension [347].

Les ROS influencent aussi la migration des CML via l'induction de la MCP-1 qui est sensible au statut rédox. En plus d'entraîner la migration cellulaire, la MCP-1 augmente aussi les réponses inflammatoires, menant au cercle vicieux de la production de ROS. Les ROS contribuent aussi à la rupture de la matrice extracellulaire, qui est causée en partie par la sécrétion des MMPs dont l'expression et l'activité sont stimulées par les ROS [128].

1.3.5.1 Péroxydation lipidique

Plusieurs évidences suggèrent que les produits de la dégradation peroxydative des acides gras polyinsaturés, résultant de la peroxydation lipidique, soient impliqués dans le développement de la dysfonction endothéliale et des maladies cardiovasculaires [407]. En effet, la génération de ROS à proximité des membranes peut entraîner l'attaque de ses lipides par un radical libre, menant à une réaction en chaîne et à la formation d'hydropéroxydes lipidiques. Les acides gras polyinsaturés contenus dans les esters de cholestérol, les phospholipides et les triacylglycérols sont particulièrement sujets à l'oxydation par les radicaux libres. Subséquemment, la décomposition de ces hydropéroxydes génère plusieurs produits de dégradation qui causent divers effets dommageables. Ces produits sont entre autres les aldéhydes, dont les mieux caractérisés et les plus puissants sont le malonyldialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénale (HNE). Plusieurs aldéhydes réactifs ont été impliqués dans des processus cytotoxiques : ils réagissent avec diverses molécules incluant les protéines, l'ADN et les phospholipides. Ainsi, ces produits de la peroxydation lipidique sont impliqués dans les processus menant à la formation des cellules spumeuses et au développement de l'athérosclérose. En plus d'être eux-mêmes engagés dans des mécanismes régulateurs, il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que ces aldéhydes favorisent les modifications oxydatives des LDL [407].

Figure 31. Péroxydation lipidique et formation des aldéhydes

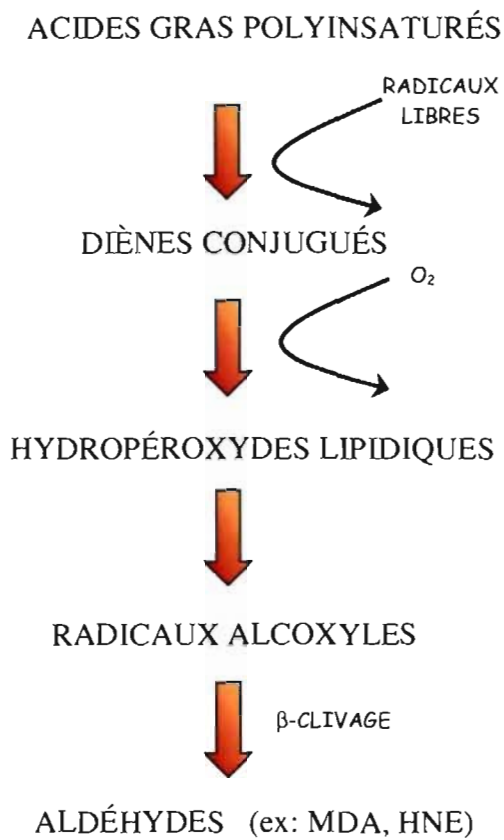


Figure 31 : Les acides gras polyinsaturés sont sujets à l'oxydation par les radicaux libres, formant subséquentement les diènes conjugués, les hydroperoxydes lipidiques, les radicaux alcoxyles et finalement les aldéhydes comme le MDA et le HNE.

1.3.5.2 LDL oxydées

L'hypothèse de l'oxydation des LDL leur attribue un rôle central dans le développement de l'athérosclérose. En effet, les LDL modifiées, le plus souvent par l'oxydation, constituent une cause majeure de dommage à l'endothélium. *In vitro*, les cellules principalement retrouvées dans les vaisseaux peuvent oxyder les LDL, comme les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. L'attaque des acides gras polyinsaturés et de l'apolipoprotéine B des LDL par les radicaux libres des ROS entraîne plusieurs changements structuraux au niveau de la lipoprotéine. Par rapport aux LDL normales, les oxLDL présentent les caractéristiques suivantes : une charge plus négative, une plus grande densité, un enrichissement en peroxydes lipidiques, une perte du cholestérol estérifié, une fragmentation de l'apolipoprotéine B et une diminution de leur contenu en acides gras polyinsaturés. Ces oxLDL sont cytotoxiques et, au niveau de l'intima, peuvent altérer le statut rédox en partie par la génération de superoxydes et engendrer les processus menant à l'athérosclérose [408,409].

L'oxydation induite par la lipoxygénase cellulaire représente un mécanisme potentiel pour la formation des oxLDL. Les cellules endothéliales vasculaires expriment des quantités considérables de 15-lipoxygénase et cette enzyme oxyde directement les phospholipides des lipoprotéines. L'oxydation par les myelopéroxydases est aussi considérée comme une source de oxLDL. Les anions superoxydes, les métaux de transition et les dérivés réactifs de l'azote sont aussi présents dans les lésions vasculaires et peuvent aussi participer à

l'oxydation des LDL [128].

1.3.6 Réactions rédox et signalisation cellulaire

Les dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote peuvent entraîner des dommages oxydatifs, mais ils sont aussi impliqués dans la régulation des événements cellulaires. La « signalisation rédox » est achevée par un circuit rédox local, plutôt que par le stress oxydatif généralisé. Cette notion change le concept pour lequel les ROS sont simplement des sous-produits du métabolisme oxydatif normal, ou encore un outil des phagocytes à accomplir leur action antimicrobienne [128].

Le O_2^- est chargé, difficilement perméable et possède une demi-vie extrêmement courte. À l'opposé, le H_2O_2 , produit au niveau intracellulaire et extracellulaire, n'est pas chargé, a une demi-vie plus longue et est facilement diffusible. Comme pour le NO, cette propriété fait du H_2O_2 une molécule idéale pour la signalisation cellulaire. Par exemple, le H_2O_2 produit par les cellules musculaires lisses peut diffuser vers l'endothélium et moduler les fonctions des cellules endothéliales. Cette capacité du H_2O_2 , dérivé des cellules vasculaires adjacentes, de moduler la fonction endothéliale, lui confère un rôle unique dans la signalisation vasculaire [410]. Plusieurs cascades de signalisation sont activées par le H_2O_2 et induisent des changements dans la fonction vasculaire incluant la croissance de l'endothélium, l'angiogenèse, la prolifération et l'hypertrophie des cellules musculaires lisses, la dysfonction de la barrière endothéliale, la réorganisation du cytosquelette, l'apoptose endothéliale, l'induction de protéines

inflammatoires, les interactions leucocytes-endothélium et le remodelage vasculaire [410].

La modification de protéines spécifiques peut aussi entraîner la signalisation cellulaire par les ROS, les groupes thiols des protéines représentant une cible des ROS. Par exemple, la guanylyle cyclase soluble est activée par les ROS. Elle constitue l'enzyme responsable de la synthèse du second messager cGMP, qui régule plusieurs fonctions physiologiques incluant la vasorelaxation, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et la prolifération des cellules musculaires lisses [411]. D'autres protéines sensibles aux ROS et aux RNS sont les Ras GTPases qui contrôlent plusieurs aspects de la fonction cellulaire incluant la prolifération, la motilité, la différenciation et la mort cellulaire. Les tyrosines kinases, qui permettent la phosphorylation des tyrosines de plusieurs protéines, sont aussi des cibles fréquentes des ROS [412]. Ce processus de phosphorylation est impliqué dans l'activation de plusieurs kinases comme la famille des MAPKs, la protéine kinase B et la protéine kinase C. Les protéines tyrosine phosphatases sont aussi importantes dans la signalisation impliquant les tyrosines kinases, car elles sont sous le contrôle inhibiteur des phosphatases. Ces protéines peuvent aussi être modulées par les ROS, et plus spécifiquement par le H₂O₂ [128,413,414].

Il est aussi connu que différents dérivés réactifs de l'azote participent à la signalisation cellulaire dans les cellules de la paroi vasculaire. L'oxyde nitrique est le dérivé azoté typiquement impliqué dans la signalisation cellulaire. Le NO peut interagir avec une variété de composés et entraîner leur oxydation ou leur

réduction. À des concentrations physiologiques, le NO réagit principalement avec les centres hème et hème-cuivre. La cible hémique la mieux caractérisée du NO est l'isoforme soluble de la guanylyle cyclase, qui active l'enzyme. L'augmentation résultante de la cGMP est largement responsable de la vasodilatation, ainsi que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et de la prolifération des cellules musculaires lisses [128,415,416].

1.3.7 Stress oxydatif et régulation transcriptionnelle

Tant les ROS, les aldéhydes que les LDL oxydées peuvent induire un stress oxydatif dans les cellules des vaisseaux et, de ce fait, participer à la régulation des processus inflammatoires associés à la formation de l'athérosclérose. Ceci s'effectue principalement par la modulation de facteurs de transcription sensibles à l'oxydation comme le NF- κ B, l'AP-1 et les PPARs.

1.3.7.1 «Nuclear factor-kappa B» (NF- κ B)

Tout d'abord, le «nuclear factor-kappa B» (NF- κ B) est un facteur de transcription directement impliqué dans l'activation de gènes responsables des réponses immunitaires et inflammatoires, comme les molécules d'adhésion [409]. Plusieurs évidences supportent l'implication du NF- κ B dans l'athérogenèse. Tout d'abord, les niveaux de NF- κ B sont augmentés dans les lésions athéromateuses, alors qu'une très faible quantité peut être détectée au niveau des vaisseaux sains [417]. De plus, des cytokines et des facteurs de croissance retrouvés dans les

lésions, comme le TNF- α et l'IL-1 β , activent le NF- κ B *in vitro* dans les différents types cellulaires comme les macrophages, les lymphocytes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales vasculaires [418]. Enfin, plusieurs gènes modulés par le NF- κ B codent pour des protéines qui jouent un rôle crucial dans l'athérogenèse, comme par exemple le TNF- α , l'IL-1, le M-CSF, le facteur tissulaire et les molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine [418].

L'altération du statut rédox par les aldéhydes et les LDL oxydées module le NF- κ B dans les cellules endothéliales et immunitaires [407,419,420]. L'activation du NF- κ B par le stress oxydatif s'effectue par un mécanisme impliquant sa dissociation du I κ B, sa sous-unité inhibitrice, au niveau du cytosol. Ceci permet au NF- κ B d'être transloqué au noyau où il lie une séquence d'ADN qui lui est spécifique. Un milieu oxydé favorise l'activation du NF- κ B, mais il a aussi été démontré que les ROS peuvent directement l'induire en agissant comme seconds messagers [421], un mécanisme dont la validité est par contre sujet de controverses [422]. De plus, plusieurs travaux effectués *in vitro* démontrent que les LDL oxydées affectent les gènes stimulés par le NF- κ B, comme les cytokines inflammatoires et les facteurs de croissance [173,423], et que l'expression du NF- κ B peut être inhibée par des antioxydants [424].

1.3.7.2 «Activator protein-1» (AP-1)

Parallèlement, le stress oxydatif induit par les ROS, les aldéhydes ou les oxLDL stimule l'«activator protein-1» (AP-1), un autre facteur de transcription sensible à l'oxydation [425-429] dont l'expression est diminuée par les antioxydants [430]. L'activité de l'AP-1 est contrôlée par des mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels en réponse à une variété de stimuli, incluant des facteurs mitogènes, des esters de phorbol et des signaux de différenciation cellulaire [418]. Dans les cellules endothéliales, le H₂O₂, les LDL et les oxLDL activent la liaison de l'AP-1 à l'ADN [431-433]. Au niveau des cellules musculaires lisses, les oxLDL, le H₂O₂ et le HNE ont tous induit l'expression d'AP-1 ou sa liaison à l'ADN [428,434,435]. De plus, les «activator protein-1 binding elements» sont des domaines de liaison retrouvés au niveau des promoteurs de plusieurs gènes de l'inflammation vasculaire, comme la MCP-1 et la ICAM-1 [409,434-438]. Il existe très peu d'informations concernant les mécanismes exacts de l'activation de l'AP-1 par le stress oxydatif, mais il est possible que des modifications post-transcriptionnelles modulent aussi son activité [418].

1.3.7.3 «Peroxisome proliferator-activated receptors» (PPARs)

Les ligands activateurs des PPARs démontrent généralement des effets antioxydants [304]. En effet, les PPARs peuvent réprimer la transcription de gènes en interférant avec la liaison à l'ADN des facteurs de transcription pro-inflammatoires NF- κ B et AP-1 [189,282,439].

Le PPAR γ est présent dans toutes les cellules des lésions athérosclérotiques humaines [440]. De manière générale, les travaux portant sur le PPAR γ concluent que son activation induit des effets anti-inflammatoires et anti-athérogènes. En effet, il a été démontré qu'il limite l'induction de cytokines, comme le TNF- α et l'IL-1 β , dans les cellules inflammatoires [441,442].

Les ligands synthétiques des PPAR α ont aussi des propriétés anti-inflammatoires, par l'inhibition de NF- κ B, ce qui peut contrer les effets du stress oxydatif [264,281]. En ce sens, il a été démontré que certaines des réponses inflammatoires des cellules musculaires lisses aortiques, soit l'IL-6, les prostaglandines et la cyclooxygénase-2, sont bloquées par des activateurs spécifiques des PPAR α [281]. De plus, l'activation de PPAR α chez la souris âgée rétablit l'équilibre rédox à un niveau similaire à celui des jeunes animaux, ce qui a pu être déterminé par la réduction de la peroxydation lipidique tissulaire, des niveaux de NF- κ B actif et de la production des cytokines [443].

1.3.8 Épidémiologie des maladies cardiovasculaires et supplémentation en antioxydants

Dans les études ayant comparé des populations affichant des valeurs de cholestérol plasmatique similaires, les taux de maladie et de mort cardiovasculaire varie, ce qui est relié à différents facteurs diététiques et non diététiques. Une découverte constante de ces études de populations est que la consommation d'une diète riche en antioxydants protège contre les maladies cardiovasculaires [444] et que les niveaux plasmatiques d'antioxydants reflètent ces bienfaits [445]. Ceci a mené à l'élaboration de nombreuses études investiguant l'impact des antioxydants alimentaires, et particulièrement de la vitamine E, sur les maladies cardiovasculaires. Les résultats obtenus dans les études animales ont permis d'anticiper un bienfait des suppléments de vitamine E. Par contre, de manière générale, les grandes études contrôlées et randomisées ont révélé des résultats décevants [128].

1.3.8.1 Études de cohortes prospectives

Les grandes études de cohorte prospectives ont examiné la relation entre les apports rapportés en antioxydants et les taux de maladies cardiovasculaires. Dans l'étude de population effectuée sur 87,000 infirmières, la « Nurses' Health Study » [446] et dans l'étude de population de 40,000 hommes, la « Health Professionals' Follow-up Study » [447], des bienfaits cardiovasculaires ont été observés avec un supplément de vitamine E de l'ordre de 100 UI/jour, mais les faibles doses de vitamine E se sont avérées inefficaces. En contraste, une étude

de population effectuée sur 35,000 femmes post-ménopausées a démontré une diminution significative du risque cardiovasculaire avec une augmentation modeste de l'apport alimentaire en vitamine E, sans supplémentation [448].

De manière similaire à la situation observée avec la vitamine E, les évidences reliant la vitamine C à la protection cardiovasculaire sont inconsistantes. Certaines études de cohorte prospectives rapportent que des apports élevés ou la supplémentation en vitamine C alimentaire sont associés à la réduction du risque cardiovasculaire (n=8), alors que d'autres études ne rapportent pas d'association entre la vitamine C et l'incidence cardiovasculaire (n=8) [128].

1.3.8.2 Études randomisées contrôlées : prévention primaire

La plupart des études cliniques qui ont étudié la protection antioxydante contre les maladies cardiovasculaires ont porté leur attention sur la vitamine E, se basant entre autres sur les études scientifiques décrivant la peroxydation lipidique comme un déterminant clef du développement de l'athérosclérose.

En résumé, parmi les essais cliniques majeurs, deux études ont investigué les effets d'une supplémentation en vitamine E sur le développement des maladies cardiovasculaires, les événements du myocarde et des accidents vasculaires cérébraux. Pour ces deux études, 50 ou 448 UI/jour de vitamine E, ou un placebo, étaient donnés. Les populations variaient entre 4,500 à 29,000 sujets qui présentaient tous des facteurs de risque vasculaire. Ces études n'ont pas pu démontrer d'effet bénéfique de la supplémentation en vitamine E sur le risque

cardiovasculaire. De plus, l'étude « Alpha-Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention (ATBC) Study » [449] n'a rapporté aucun effet de la vitamine E sur l'incidence des événements du myocarde. Pire encore, une augmentation des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques avec la supplémentation en vitamine E a été observée dans cette étude de population. La « Collaborative Primary Prevention Project » (PPP) n'a, de manière similaire, montré aucun effet de la vitamine E sur la mort cardiovasculaire [450].

En plus des points cliniques traditionnels (AVC, mort cardiovasculaire, événements du myocarde), l'épaisseur carotidienne de l'intima à la média (EIM) a été utilisée comme marqueur du développement de l'athérosclérose. L'étude « Antioxydant Supplementation in Atherosclerosis Prevention » (ASAP) a examiné les effets de la vitamine E et de la vitamine C. À la suite d'un suivi de 3 ans, le taux de progression de l'épaisseur de l'intima à la média n'a pas diminué suite à la supplémentation avec ces antioxydants [450,451]. L'étude « Vitamine E Atherosclerosis Prevention Study » (VEAPS) a investigué les effets d'une supplémentation avec l' α -tocophérol chez des femmes avec des niveaux élevés de LDL-cholestérol ne présentant pas de signes ou de symptômes de maladies cardiovasculaires. Chez ces sujets, la supplémentation n'a pas diminué la progression de la maladie [450-452]. Dans une autre étude effectuée chez des patients homozygotes pour l'hypercholestérolémie familiale, l'administration de suppléments de vitamine E pendant deux ans n'a pas ralenti la progression de la maladie, alors que les statines ont permis une amélioration. De ces études, nous retenons que la supplémentation en vitamine E n'a pas réussi à ralentir ou à

inhiber le développement de l'athérosclérose chez les hommes et les femmes présentant un faible risque cardiovasculaire.

Table 6. Études cliniques sur la supplémentation en vitamine E et les maladies cardiovasculaires : prévention primaire

Essai	Sujets	Histoire	Suivi	Vitamine E	Observations	Risque relatif
ATBC	29,133	H, fumeurs	6,1 ans	50 mg (D,L- α)	IM/MCV fatal	0.94 (0.70-1.25)
PPP	4,495	Risque élevé de MCV	3,6 ans	300 mg (D,L- α)	Mortalité MCV	1.07 (0.74-1.56)
ASAP	260	H/F, CHOL \geq 5 mM	3,0 ans	91 mg (D- α)	Progression EIM	0.56 (0.23-1.36)
VEAPS	353	H/F, CHOL \geq 3,4 mM	3,0 ans	268 mg (D,L- α)	Progression EIM	1.74*

* Effet significatif

1.3.8.3 Études randomisées contrôlées : prévention secondaire

À ce jour, six essais cliniques de prévention secondaire ont été conduits pour investiguer les effets de la supplémentation de vitamine E chez les patients avec maladies cardiovasculaires préexistantes. Parmi celles-ci, deux études ont démontré un effet favorable de la vitamine E. L'étude « Cambridge Heart Antioxydant Study » (CHAOS) a rapporté une réduction majeure du risque d'infarctus du myocarde (IM) non fatal par la supplémentation, alors qu'elle a causé une augmentation non significative du risque d'infarctus du myocarde fatal [453]. De manière similaire, dans un petit groupe de patients sous hémodialyse (étude SPACE), les suppléments de vitamine E ont diminué les taux d'infarctus du myocarde [454], ce qui permet de supposer que pour certains patients, comme par exemple ceux avec insuffisance rénale présentant peut-être un stress oxydatif plus élevé, un supplément de vitamine E pourrait être bénéfique.

L'étude ATBC n'a permis de démontrer aucun effet bénéfique sur les événements cardiovasculaires en prévention secondaire [455]. L'étude « GISSI Prevenzione trial » a étudié les effets de la supplémentation en vitamine E et en acides gras polyinsaturés oméga-3 chez 11,000 patients avec une histoire récente d'infarctus du myocarde [456]. Cette étude a démontré que la consommation d'acides gras polyinsaturés diminue le risque d'événements cardiovasculaires, alors que la vitamine E seule n'a pas eu d'effet. La combinaison de vitamine E et des acides gras n'a pas apporté le bénéfice additionnel attendu.

Dans l'étude « Heart Outcomes Prevention Evaluation » (HOPE), les patients souffrant de maladies cardiovasculaires ou de diabète et d'un autre

facteur de risque ont reçu un supplément de vitamine E ou un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ramipril), ou une combinaison des deux [457]. Le traitement avec la vitamine E n'a pas affecté les événements cardiovasculaires, alors que le ramipril a significativement réduit le risque d'infarctus du myocarde, de mort cardiovasculaire et d'accidents vasculaires cérébraux. De la même manière, une sous-étude (SECURE) de l'étude HOPE, n'a pas permis de démontrer un effet bénéfique de la vitamine E sur la progression de l'EIM en prévention secondaire, alors que le ramipril l'a significativement réduite [458]. En parallèle, une méta-analyse des différentes études randomisées et des essais cliniques impliquant la vitamine E, considérant un total de 81,788 patients, a conclu que la supplémentation en vitamine E ne réduit pas les risques cardiovasculaires [459].

Table 7. Études cliniques sur la supplémentation en vitamine E et les maladies cardiovasculaires : prévention secondaire

Essai	Sujets	Histoire	Suivi	Vitamine E	Observations	Risque relatif
CHAOS	2,002	Patients avec MCV	1,4 an	800/400 UI	Mortalité MVC IM non fatals	1.18 (0.62-2.27) 0.23* (0.11-0.47)
ATBC _{SOUS-GROUPE}	1,862	H, fumeurs	5,3 ans	50 mg (D,L- α)	Événements coronariens	0.97 (0.80-1.19)
GISSI	11,324	IM récent	3,5 ans	300 mg (D- α)	Mortalité MCV, IM non fatals	1.00 (0.88-1.14)
HOPE	9,541	MCV	4,5 ans	400 UI	Mortalité MCV	1.05 (0.95-1.16)
SPACE	196	Hémodialyse + MCV	1,4 an	800 UI	MCV, IM	0.46 * (0.27-0.78)
SECURE	732	MCV	4,5 ans	400 UI	Progression EIM	1.03

* Effet significatif

1.3.8.4 Vitamine E en combinaison avec d'autres antioxydants

L'effet de la vitamine E sur la santé cardiovasculaire a aussi été examiné en combinaison avec d'autres antioxydants, tant en prévention primaire que secondaire. Dans l'étude ASAP, la combinaison de vitamine C et E a été testée et a permis de diminuer significativement la progression de l'épaisseur intima-média [451]. Chez les femmes post-ménopausées (étude WAVE), la progression de l'athérosclérose coronaire a été aggravée de manière non significative avec un apport quotidien de 800 UI de vitamine E combiné à 1 g de vitamine C pour 2,8 ans, comparativement au placebo [460]. L'étude clinique ATBC a utilisé, chez les hommes, une combinaison de vitamine E et de β -carotène dans une stratégie de prévention secondaire, mais aucun effet bénéfique coronaire majeur n'a été trouvé [455]. La grande étude de prévention secondaire « MRC/BHF Heart Protection Study » a examiné les effets d'une combinaison d'antioxydants (vitamines E et C et β -carotène) ; alors que la supplémentation a augmenté les niveaux plasmatiques en antioxydants, aucune réduction significative de la mortalité ou de l'incidence des maladies vasculaires, ni autre résultat majeur, n'ont pu être démontrés [461].

Deux autres études ont investigué la combinaison de suppléments d'antioxydants et d'une thérapie visant à abaisser les lipides sanguins. Dans l'étude de prévention secondaire « HDL Atherosclerosis Treatment Study » (HATS), les sujets ont soit reçu un traitement combinant une statine et la niacine, soit un traitement antioxydant (vitamine C, α -tocophérol, β -carotène et sélénium), soit les deux. La supplémentation seule en antioxydants n'a pas eu

d'effet bénéfique et, lorsqu'utilisés en combinaison avec le simvastatin et la niacine, les antioxydants ont annulé les effets bénéfiques des médicaments sur le profil lipidique et la progression de la sténose. De plus, la combinaison des antioxydants avec le simvastatin n'a pas ajouté d'effet bénéfique à ce dernier [461].

En résumé, des apports alimentaires élevés en vitamines E et C sont associés à la réduction du risque cardiovasculaire. Par contre, les études d'intervention portant sur le développement de l'athérosclérose indiquent que la supplémentation en vitamines E et C n'apporte pas d'effet bénéfique sur la progression de la maladie. Toutefois, il pourrait être possible que certaines sous-populations de patients puissent bénéficier d'une supplémentation.

Table 8. Études cliniques sur la combinaison de suppléments d'antioxydants et les maladies cardiovasculaires

Essai	Histoire des sujets	Suivi	Antioxydants	Observations (Intervalle de confiance à 95%)
ASAP/Primaire	128 H, CHOL \geq 5 mM	3,0 ans	Vitamine E (D- α , 91 mg), vitamine C (250 mg)	50% diminution de la progression EIM
WAVE/Secondaire	423 F post-ménopausées, \geq 15-75% sténose	2,8 ans	Vitamine E (800 UI), vitamine C (1 g)	Progression non significative de l'athérosclérose coronaire
HATS/Secondaire	73, Maladie coronarienne	3,5 ans	Vitamine E (800 UI), vitamine C (1 g), β -carotène (25 mg), sélénium (100 μ g)	Pas de différence sur les événements cardiovasculaires avec le placebo
HPS/Secondaire	20,536, Maladie coronarienne	5,5 ans	Vitamine E (600 mg), vitamine C (250 mg), β -carotène (20 mg)	Pas d'effets sur les événements vasculaires majeurs et les AVC

D'une manière globale, les essais cliniques ont échoué dans leur but de démontrer un effet protecteur des antioxydants chez les humains. Cet échec peut être expliqué par différents facteurs. En effet, il est encore très difficile d'identifier les sujets qui présentent un déséquilibre entre la production de ROS et les défenses antioxydantes et qui pourraient bénéficier d'une thérapie antioxydante. De plus, la majeure partie des patients enrôlés dans ces études cliniques ont une maladie cardiovasculaire établie. L'intervention antioxydante pourrait s'avérer trop tardive pour être efficace. Dans la plupart des études animales, le traitement antioxydant est administré avant l'initiation de la maladie. Ceci suggère que la thérapie antioxydante pourrait être bénéfique comme mesure préventive, plutôt que comme outil thérapeutique. Le peu de connaissances sur le dosage optimal des différents antioxydants s'avère aussi un handicap. De plus, la biodisponibilité et la distribution des antioxydants administrés pourraient aussi limiter leur utilité. Afin d'être efficaces, les antioxydants doivent atteindre les compartiments cellulaires, où les ROS sont générés; pour plusieurs cellules vasculaires, il s'agit du cytoplasme et des vésicules. Parce que la vitamine E est liposoluble, les niveaux de vitamine E plasmatique ne reflètent pas nécessairement son action dans la lumière vasculaire ou sa capacité à pénétrer les membranes intracellulaires. Même si la vitamine C est liposoluble et de ce fait a accès aux compartiments intracellulaires, sa fenêtre d'absorption demeure étroite. Une augmentation de son administration orale pourrait même diminuer sa biodisponibilité. Le fait que tous les antioxydants peuvent devenir des oxydants dans certains environnements et à des doses particulières constitue une autre

complication. Par exemple, à forte dose, la vitamine C augmente les dommages à l'ADN chez les volontaires en santé [406] et la vitamine E peut se comporter comme un pro-oxydant chez les fumeurs [462]. L'échec thérapeutique avec les antioxydants classiques a mené à la recherche de nouveaux composés plus efficaces. Par exemple, le nouvel antioxydant succinobucol (AGI-1067) a apporté des résultats prometteurs dont les issues cliniques sont à suivre [463] [406]. Un rapport très récent rapporte que l'AGI-1067 permet la régression de l'athérosclérose et la diminution de l'inflammation chez les patients traités [464].

1.4 Choix des modèles in vitro

1.4.1 Système pro-oxydant fer-ascorbate

Dans la présente étude, le système utilisé pour engendrer un stress oxydatif et une peroxydation lipidique, sans l'implication des oxLDL, est celui du fer-ascorbate. Le fer est un catalyseur connu de l'oxydation des molécules biologiques, comme les protéines, l'ADN et les lipides [465]. Cet oligo-élément est peu abondant dans l'organisme (2 à 6 g), mais est essentiel à de nombreux processus physiologiques [466].

À la suite de son ingestion, le fer, sous forme de Fe^{2+} , est absorbé sous le contrôle rigoureux de la muqueuse intestinale. Il est transporté dans la circulation vers les tissus par la transferrine, une β_1 -globuline glycoprotéinée synthétisée par le foie. Alors que le catabolisme des érythrocytes libère environ 25 mg de fer par jour, l'homme adulte en bonne santé n'en perd qu'un mg quotidiennement. L'emmagasinage du fer dans les tissus s'effectue grâce à la ferritine ; plus les réserves corporelles en fer sont augmentées, plus on trouve des concentrations élevées de ferritine dans les tissus. Cependant, lors de la surcharge en fer, le plasma qui ne renferme généralement que peu de ferritine, voit sa concentration augmenter, ce qui est un indicateur des réserves corporelles de fer [467,468].

L'excès de fer peut être dangereux, car il promeut la génération de radicaux libres qui, par la suite, entraînent des dommages aux différents tissus. Dans des conditions normales, la majorité des molécules de fer sont complexées aux protéines d'hémoglobine, de myoglobine et de transferrine empêchant ainsi

leur toxicité. De leur côté, les cellules sont protégées des effets peroxydatifs du fer par la présence assidue de la ferritine. Cependant, des molécules de faibles poids moléculaires sont capables de détacher le fer de ces protéines, à savoir le citrate et l'ascorbate. En outre, l'anion superoxyde peut soustraire le fer à la ferritine [469-471] et le peroxyde d'hydrogène peut mobiliser le fer de l'hème [470,472]. De plus, le fer sérique est augmenté dans des maladies héréditaires comme l'hématochromatose et des réserves abondantes en fer sont souvent accompagnées de désordres cardiovasculaires, car il peut peroxyder les particules de LDL [473,474]. Aussi, une charge élevée en fer consiste en un modèle de stress oxydatif bien établi chez les rats [475].

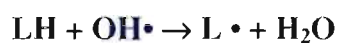
Il a été proposé que l'oxydation des lipides par le fer est induite par la formation des radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) via la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les ions ferreux, qui réagissent subséquemment avec les lipides polyinsaturés afin d'initier une réaction en chaîne menant à la formation des hydroperoxydes lipidiques (LOOH) [476]. L'acide ascorbique peut amplifier le potentiel oxydatif du fer en permettant sa réduction, entraînant la régénération du système [477-479]. Différents travaux ont souligné la combinaison de l'acide ascorbique et des métaux, incluant le fer, dans l'implication de l'oxydation des lipides insaturés *in vivo* [480-483] et dans les composantes alimentaires [484].

Figure 32. Système pro-oxydant fer-ascorbate et peroxydation lipidique

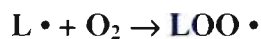
Étape 1 : Réaction de Fenton



Étape 2 : Attaque d'un hydrogène de la chaîne d'acide gras par le radical hydroxyle (OH•)

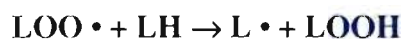


Étape 3 : Génération d'un radical lipidique peroxyde (LOO•) :



Étape 4 : Propagation de la réaction en chaîne et formation d'un hydroperoxyde

lipidique (LOOH)



Étape 5 : Réduction du fer ferrique par l'ascorbate

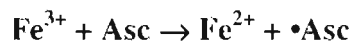


Figure 32 : Le système pro-oxydant fer-ascorbate induit la peroxydation lipidique par la production des radicaux hydroxyles et ascorbyles. La réduction du fer ferrique par l'ascorbate permet la régénération du système.

Dans notre système de génération de radicaux libres, le fer-ascorbate est placé dans le milieu de culture ; le Fe^{2+} peut ainsi réagir avec le H_2O_2 relâché par les cellules macrophagiques THP-1 [485] ou HUVEC [486]. Les radicaux hydroxyles ainsi formés peuvent attaquer les lipides membranaires, entraînant la peroxydation lipidique.

Les radicaux hydroxyles sont hautement réactifs et, conséquemment, ont une courte demi-vie (approximativement 10^{-9} secondes) [487]. Ces radicaux peuvent virtuellement endommager tous les types de macromolécules telles les hydrates de carbone, les acides nucléiques, les lipides et les acides aminés [488]. Lorsque le plasma humain est exposé à des oxydants hydrosolubles, l'acide ascorbique dans le plasma disparaît rapidement et la peroxydation lipidique débute. Les niveaux de radicaux ascorbyles sont élevés chez les rats ayant reçu un agent pro-diabétique [489] et le ratio radical ascorbyle/acide ascorbique augmente lorsqu'une charge en fer est induite aux rats, ce qui indique la présence de stress oxydatif [490].

Dans notre modèle de peroxydation, nous avons utilisé des concentrations de $100 \mu\text{M}$ de sulfate de fer, ce qui correspond à une quantité d'environ $5,5 \text{ mg}$ de fer. Chez les rats, le contenu en fer plasmatique se trouve entre 32 et $213 \mu\text{M}$ [475] et, chez un homme de taille moyenne en bonne santé, la quantité de fer transportée dans l'hémoglobine est d'environ 2 g [466]. De plus, nous avons utilisé des concentrations de $1000 \mu\text{M}$ d'acide ascorbique. Il est connu que, avec une concentration plasmatique de l'ordre de $57 \mu\text{M}$, les réserves corporelles maximales d'ascorbate peuvent être atteintes chez 95% des hommes ayant des

apports de 100 mg/jour [491]. Toutefois, les concentrations plasmatiques peuvent être plus élevées, pouvant atteindre 227 μM .

1.4.2 Modèles cellulaires

Afin de tester nos hypothèses de recherche, nous avons utilisé principalement deux modèles cellulaires bien caractérisés : les THP-1 et les HUVEC. Les THP-1 consistent en une lignée immortalisée de monocytes, lesquels peuvent être différenciés en macrophages en présence de «phorbol myristate acetate» (PMA) [492]. Les macrophages ainsi formés présentent les caractéristiques typiques des macrophages humains [298,493-497] et, fait important pour la réalisation de nos travaux, ils transportent le cholestérol et expriment les différents récepteurs au cholestérol et aux lipoprotéines des macrophages [214,498,499]. Les cellules THP-1 ont été utilisées dans plusieurs études portant sur le transport de cholestérol et le développement de l'athérosclérose [500-503].

Les cellules HUVEC ont été choisies comme modèle de cellules endothéliales vasculaires, car elles sont d'origine humaine et elles expriment les transporteurs de cholestérol d'intérêt pour nos études [504]. De plus, des expériences sur le métabolisme du cholestérol avaient déjà utilisé ce modèle cellulaire [258] qui est aussi fréquemment retrouvé dans les études portant sur le stress oxydatif et l'athérosclérose [505-507]. Elles ont été préférées aux cellules

endothéliales vasculaires «Human aortic endothelial cells» (HAEC) qui ne sont pas d'origine ombilicale, étant donné que la mise en culture de ces dernières s'avère beaucoup plus longue et fastidieuse.

2. BUTS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

L'importance des oxLDL dans la pathogenèse de l'athérosclérose soulève un intérêt concernant l'implication du phénomène oxydatif dans son développement. En effet, il a été postulé que le statut oxydatif des différentes cellules impliquées dans l'athérosclérose (cellules endothéliales vasculaires, monocytes/macrophages et cellules musculaires lisses) peut influencer leur prédisposition à développer des lésions. En ce sens, il a déjà été démontré que les dérivés réactifs de l'oxygène sont impliqués dans plusieurs aspects de la dysfonction endothéliale et de l'athérogenèse en modulant l'expression de gènes qui influencent le tonus vasculaire, le recrutement des monocytes dans la paroi artérielle, la prolifération cellulaire et l'apoptose [418,508,509]. Le statut oxydatif intracellulaire altère effectivement les réponses inflammatoires des macrophages [510] ainsi que l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales [511], deux types cellulaires dont les interactions se retrouvent au cœur de l'initiation de l'athérosclérose. De plus, les différents facteurs de risque de l'athérosclérose (hypercholestérolémie, diabète, hypertension, tabagisme et vieillissement) sont tous associés à une élévation de la production de ROS [512].

L'athérosclérose consiste en une maladie lipidique, caractérisée entre autres par une accumulation abondante de cholestérol dans les lésions. De ce fait, les mécanismes de transport cellulaire de cholestérol revêtent une importance

capitale dans la physiopathologie de la maladie. L'effet du stress oxydatif sur ce mécanisme demeure toutefois peu connu.

Plusieurs récepteurs sont impliqués dans le processus de transport de cholestérol, et parmi eux, on retrouve l'ABCA1 et le SR-BI qui sont exprimés dans toutes les cellules de la paroi vasculaire [214], mais leur rôle n'a pas encore été bien caractérisé. De plus, malgré l'avancement des connaissances concernant les mécanismes impliqués dans la formation de l'athérosclérose et de leur modulation par le stress oxydatif, très peu d'études ont cerné son impact sur les récepteurs ABCA1 et SR-BI dans la pathogenèse de la maladie.

Dans ce contexte, l'objectif global de l'étude consiste à déterminer l'impact du statut oxydatif des macrophages THP-1 et des cellules aortiques endothéliales HUVEC sur (1) leur prédisposition à des processus athérosclérotiques impliquant entre autres le transport du cholestérol ; (2) la régulation des principaux récepteur de cholestérol, dont l'ABCA1 et le SR-BI ; (3) les interactions entre les monocytes et les cellules endothéliales; (4) les processus inflammatoires ; et (5) les défenses antioxydantes cellulaires. Ceci permettra de définir, avec plus de précision, les mécanismes par lesquels le stress oxydatif régit l'activité des macrophages et des cellules endothéliales vasculaires et son implication dans les étapes précoces de l'athérogenèse.

Le premier but de notre étude consiste à évaluer l'impact de la peroxydation lipidique, induite avec le système pro-oxydant fer-ascorbate, sur le transport de cholestérol dans les macrophages THP-1. Nous avons exploré l'influence du stress oxydatif sur les processus d'influx et d'efflux de cholestérol,

sur la régulation des récepteurs ABCA1, SR-BI et sur d'autres récepteurs importants impliqués dans les échanges de cholestérol (CD36 et SR-AI/II). Pour compléter le tableau, nous avons investigué les mécanismes gouvernant la mobilité du cholestérol, soit les facteurs de transcription PPARs et LXRs. Les observations du premier article vérifient nos hypothèses de travail, soit que la peroxydation lipidique amplifie la prédisposition des macrophages à devenir des cellules spumeuses, suite à la diminution de l'ABCA1 et de l'efflux de cholestérol ainsi qu'à la stimulation de SR-BI, d'autres récepteurs éboueurs (CD36, SR-AI/II) et de l'influx de cholestérol. Nous proposons aussi que les modifications des facteurs de transcription à l'étude constituent les mécanismes déclenchés par le stress oxydatif.

Puisque l'endothélium vasculaire représente la première ligne conduisant aux maladies cardiovasculaires, nous avons dans une deuxième étape examiné si l'état peroxydatif des cellules endothéliales les incline à développer l'athérosclérose. Plus spécifiquement, nous avons vérifié, dans les HUVEC, si le stress oxydatif dérange le flux de cholestérol et ses transporteurs comme l'ABCA1, le SR-BI et le LOX-1. La nature des mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation a été investiguée en ciblant les facteurs de transcription PPARs et LXRs. Nous avons testé l'hypothèse de travail selon laquelle la peroxydation lipidique entraîne (1) une diminution de l'efflux en lipides en inhibant, entre autres, l'expression de l'ABCA1; (2) provoque des changements des facteurs de transcription ; (3) module les molécules d'inflammation comme la VCAM-1, la ICAM-1, la E-sélectine, la P-sélectine et

la MCP-1; et (4) amplifie l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales vasculaires. Les conclusions de cette partie de notre travail sont rapportées par le deuxième article.

Dans un troisième temps, nous avons tenté d'évaluer les réponses cellulaires des macrophages au stress oxydatif. Les macrophages permettent la réponse inflammatoire et participent à toutes les étapes du développement de l'athérosclérose. Toutefois, leur réaction au stress oxydatif et l'ampleur de leur capacité de défense antioxydante demeurent énigmatiques. Nous avons donc évalué de quelle façon la peroxydation lipidique des macrophages THP-1 perturbe les différentes enzymes antioxydantes, l'équilibre rédox et les réponses inflammatoires, comme le TNF- α et le NF- κ B. Nous avons avancé l'hypothèse que les macrophages possèdent une capacité accrue de s'adapter au stress oxydatif. Cette partie de notre travail se retrouve dans le troisième article de la section subséquente.

Les articles inclus dans ce document représentent la majeure partie du travail de doctorat de l'auteure principale de cette thèse. La quasi-totalité des expériences et de l'écriture des articles a été réalisée par l'auteure principale.

3. ARTICLE 1

Article publié dans Circulation Research, 2006, 72 (3) : 473-482

**Oxidative stress influences cholesterol efflux in THP-1
macrophages: Role of ATP-binding cassette A1 and
nuclear factors**


**Valérie Marcil^{1,2}, Edgard Delvin^{1,3}, Alain Théophile Sané^{1,2}, André
Tremblay^{1,4}, and Emile Levy^{1,2*}**

⁽¹⁾Centre de Recherche, CHU-Sainte-Justine, Departments of ⁽²⁾Nutrition,
⁽³⁾Biochemistry and ⁽⁴⁾Obstetrics and Gynecology, Université de Montréal, 3175,
Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), Canada, H3T 1C5

Running Head: Iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation and cholesterol flux

This paper was supported by research grants from the Canadian Institutes of
Health Research (CIHR).

Address correspondence to:

Dr. Emile Levy
Centre de Recherche
CHU-Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine
Montréal, Québec, Canada H3T 1C5
Tel.: (514) 345-4626
Fax: (514) 345-4999
E-mail: 

Key words: ABCA1, SR-BI, CD36, PPAR, LXR, macrophage, oxidative stress.

ABSTRACT

OBJECTIVES: Understanding the mechanisms involved in oxidative stress-induced foam cell formation is of fundamental importance for atherosclerosis. Our aim was to characterize the effects of oxidative stress on key receptors of macrophage cholesterol homeostasis, on the nuclear transcription factors PPAR and LXR regulating their expression, and on macrophage cholesterol handling.

METHODS AND RESULTS: The incubation of macrophages derived from the human monocyte cell line THP-1 with iron (100 microm)/ascorbate (1000 microm) for a period of 4 h induced a strong peroxidation, as demonstrated by the elevation of malondialdehyde (220%, $P < 0.001$). The production of lipid peroxidation affected cholesterol efflux, which was probably due to decreased ABCAI gene and protein expression. On the other hand, cholesterol influx remained unchanged as did the mRNA and protein levels of SR-BI and CD36, important protein receptors that participate in cholesterol import. Experiments using RT-PCR showed that the ABCAI modulation was orchestrated by the nuclear receptors LXRA, LXRbeta, PPARalpha, and PPARgamma. Treatment with powerful antioxidants (Trolox and BHT) prevented the adverse effects of iron-ascorbate on cholesterol movement, conceivably supporting the role of oxidative stress.

CONCLUSION: Our results show that oxidative stress can directly be induced in macrophages and concomitantly impairs the expression of receptors involved in cholesterol flux, which could influence foam cell formation and atherosclerosis development.

INTRODUCTION

Cardiovascular complications are characterized by endothelial dysfunction and accelerated atherosclerosis, and remain among the leading causes of morbidity and mortality. Reactive oxygen species generated in and around vascular endothelium appear as important causative factors in endothelial dysfunction underlying the development of atherosclerosis [1]. In fact, oxidized lipids and lipoproteins in the arterial wall increase adhesion molecules, recruitment of mononuclear cells to the endothelium, and inflammation response and foam cell formation, potentially leading to acute plaque rupture, thrombosis and ischemic heart disease [2].

A key determinant of the atherosclerotic lesion occurrence consists in foam cell formation, which is associated with enhanced macrophage cholesterol [3] and probably reflects imbalance between lipid influx and efflux. The acquisition and evacuation of cholesterol by macrophages is mediated by a number of cell surface receptors, including scavenger receptor class B type I (SR-BI), CD36 and ATP-binding cassette A1 (ABCA1) [4-6]. The first step in the reverse cholesterol transport is linked to ABCA1, a transmembrane protein mediating lipid efflux from cells to apolipoproteins (apo). Mutations in the ABCA1 gene, discovered in patients with Tangier disease and familial high-density lipoprotein (HDL) deficiency, caused impaired cholesterol efflux to apo A-I, which results in a near absence of plasma HDL [7]. It has been concluded that ABCA1 plays an important role in cholesterol homeostasis and atherogenesis.

SR-BI, a member of the CD36 superfamily, is predominantly expressed in the liver and steroidogenic tissues, where it mediates selective uptake of cholesteryl ester from HDL [8, 9]. SR-BI is also expressed in macrophages, including tissue macrophages, monocyte-derived macrophages, and macrophages in atherosclerotic lesions [10, 11]. SR-BI plays a dual role in macrophages, as it has been described that it can bind and internalize modified lipoproteins [6] and also mediate the efflux of free cholesterol to HDLs [12]. The regulation of SR-BI in response to sterol loading is still a matter of debate [13, 14].

CD36 consists in a scavenger receptor which is expressed, among other cell types, in monocytes and macrophages. It has been identified to bind and internalize oxidized low-density lipoproteins (oxLDL), but also a broad variety of ligands including anionic phospholipids, apoptotic cells, long-chain fatty acids and other modified LDL [14-16]. CD36 recognizes lipid moieties of oxLDL and seems to be the dominant scavenger receptor in the uptake of oxLDL by macrophages during foam cell [14, 15, 17-21]. Additionally, growing evidence suggests that peroxisome proliferator-activated receptor (PPARs) exert antiatherogenic effects by enhancing cholesterol efflux via activation of the liver X receptor (LXR)-ABCA1 pathway [22, 23]. Although numerous reports have emphasized the remarkable capacity of oxLDL to trigger proatherogenic events, little is known about the direct effect of oxidative stress per se on atherogenesis without the involvement of LDL, which may not be obligatory in the induction of vascular lesions [24]. The main objective of the present investigation was, therefore, to determine the role of iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation in cholesterol influx and efflux in macrophages.

Furthermore, the gene and protein expression of SR-BI, ABCA1 and CD36 were examined. Finally, the gene expression of PPAR α , PPAR β and PPAR γ , as well as LXR α and LXR β were assessed.

METHODS

THP-1 Cell Culture

THP-1 human monocytes (American Type Culture Collection (ATCC) TIB 202) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.05 mM 2-mercaptoethanol. The cell line was cultivated at 37°C, 95% humidity and 5% CO₂ and used between passages 4 and 12. Cells (1x10⁶ cells/ml) were differentiated into macrophages in 100 mm-dishes by the addition of 100 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma) for a 72-hour period.

Isolation of Monocytes

Monocytes were isolated from buffy coats as described previously [25]. Purified monocytes were differentiated into macrophages by culturing them with 100 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate and 10% human serum (v/v) for 9-10 days. Culture conditions of human macrophages were similar to those prevailing in THP-1.

Estimation of Lipid Peroxidation

THP-1 cells were incubated for 4 hours in the presence or absence of Fe²⁺ (100 µM)-ascorbate (1000 µM) and the antioxidants Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,9-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid, 0.5 mM) and butylated hydroxytoluene (2,6-di-*t*-butyl-*p*-cresol, BHT, 0.5 mM). The reaction was terminated by the addition of 0.2% BHT to measure malondialdehyde (MDA), as an index of lipid peroxidation. The amount of free MDA formed during the reaction was determined by HPLC as described previously [26]. Briefly, proteins were first

precipitated with a 10% sodium tungstate (Na_2WO_4) (Aldrich Chemical) solution, and protein-free supernatant was then reacted with an isovolume of 0.5% thiobarbituric acid (Sigma) solution at 90°C for 60 min. After cooling to room temperature, chromogene was extracted with 1-butanol and dried over a stream of nitrogen at 37°C. The dry extract was then resuspended in KH_2PO_4 /methanol (70:30, pH 7.0) mobile phase before MDA detection by HPLC.

Isolation and modification of lipoproteins

Human LDL ($1.019 < d < 1.063$ g/ml), HDL₃ fraction ($1.125 < d < 1.210$ g/ml) and lipoprotein-deficient serum (LPDS, $d > 1.125$ g/ml) were prepared from plasma of healthy human subjects and isolated by differential ultracentrifugation as described previously [27-29]. The lipoprotein fractions were dialyzed intensively against phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 150 mM NaCl and 0.3 mM ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA). In order to generate oxLDL, plasma LDL (3 mg apo B/ml) was extensively dialyzed against PBS (pH 7.4) containing 150 mM NaCl and 5 μM EDTA and then incubated with 10 μM CuSO_4 for 18 hours at 37°C. Its modification was verified by its mobility on agarose gel electrophoresis (Paragon, Beckman Instruments). All lipoprotein fractions were filtered through a 0.2 μM Millipore membrane and stored at 4°C.

Cholesterol-HDL₃ uptake

THP-1 cells were cultured in 12-well plates at 1.8×10^6 cells per well. After the 72-hour differentiation period, cells were incubated for 4 hours at 37°C with or without Fe^{2+} -ascorbate and antioxidants in 0.5 ml RPMI. Then, cells were supplemented

with 5% v/v LPDS containing [³H]-cholesteryl hexadecyl ether-HDL₃ (25 µg/ml) for 4 hours. To determine the non-specific binding, cells and labeled-HDL₃ were incubated in the presence of a 50-fold excess of unlabeled HDL₃. The assays were essentially carried out as previously described [30].

Cholesterol efflux

The differentiated cells were loaded with radiolabeled cholesterol by incubation for 24 hours in 0.5 ml of supplemented RPMI with 5% v/v LPDS and 2.64×10^6 dpm/ml [¹⁴C]-cholesteryl oleate oxLDL (50 µg apo B/ml). After a 16-hour equilibration period of time without radioactivity, cells were washed with PBS and treated for 4 hours with or without Fe²⁺-ascorbate and antioxidants. Cells were washed again and incubated with HDL₃ (25 µg/ml) for 24 hours. The media were centrifuged at 4000 g for 10 min to remove any suspended or dead cells. The assays were performed as previously described [30]. Briefly, after incubation, cells were washed twice with cold PBS, detached from the plate by gentle pipetting with PBS solution containing anti-proteases (phenylmethylsulfonyl fluoride, pepstatin, EDTA, aminocaproic acid, chloramphenicol, leupeptin, glutathione, benzamidine, dithiothreitol, sodium azide, and trasylol, all at a final concentration of 1 mM) and homogenized by sonication on ice (3x10 s, lowest power setting). For each well, radioactivity was counted and protein was determined by Bio-Rad protein assay kit with BSA as a standard. The specific uptake of [³H]-cholesteryl hexadecyl ether-HDL₃ by cells was calculated by subtracting the non-specific value.

Western blot analysis

To determine the protein expression of SR-BI, ABCA1 and CD36, cells were homogenized and proteins (30 μ g) were denatured at 95°C for 5 min in SDS, dithiothreitol and β -mercaptoethanol-containing sample buffer, separated on a 4-7.5% gradient SDS-PAGE, and electroblotted onto Hybond-C Extra nitrocellulose membranes (Amersham) [30]. The blots were then incubated overnight at 4°C in blocking solution with the antibodies for SR-BI (Novus Biologicals) (1:2000), ABCA1 (Novus Biologicals) (1:1000), CD36 (Santa Cruz Biotechnology) (1:200), and β -actin (Sigma-Aldrich) (1:5000). The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Blots were developed and the mass of the aforementioned proteins was quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and software.

RT-PCR expression analysis

Levels of specific mRNAs were semi-quantitatively assessed by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Briefly, complementary DNA was synthesized in a total volume of 20 μ l, from RNA samples by mixing 2 μ g of total RNA, 2 μ l of reverse transcriptase buffer (10 X) supplemented with dNTPs (0.5mM each), oligo(dT) primers (2.5 μ M), RNase inhibitor (10 units) and Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen). The first strand DNA synthesis was carried out at 37°C for 60 min. PCR amplification was performed in 50 μ l volume using 5 μ l PCR Buffer Hot Star (10 X), 10 μ l Q Solution (5 X), dNTPs (200 μ M), 0.4 μ M of each corresponding primer and 2.5 units of HotStarTM DNA

Polymerase (Qiagen). The PCR amplifications were performed using a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) under the following profile: 33-36 cycles of amplification were used at 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 40 s. Amplicons were visualized on standard ethidium bromide stained 1.5% agarose gel and analysed using Scion Image software.

Apolipoproteins

The levels of apolipoproteins A-I and B were estimated by nephelometry as described previously [31].

Statistical analysis

Data from the experiments were analyzed by using a student's *t*-test. Reported values are expressed as means \pm SEM. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

RESULTS

MDA generation after iron-ascorbate exposure

The effectiveness of iron-ascorbate in initiating lipid peroxidation was tested after incubation with THP-1 cells. At the end of a 4-h culture period, the degree of lipid peroxidation was determined by measuring MDA in cells. As illustrated in Figure 1A) iron-ascorbate promotes the production of peroxidation above control values, and the formation of MDA increased with rising iron-ascorbate concentrations in a dose-dependent manner. Neither iron nor ascorbate alone could induce marked lipid peroxidation (Data not shown). The concentration-response relationship for THP-1 cell peroxidation for 100/1000 μ M (iron-ascorbate complex) was 9.2-fold higher ($P < 0.0001$) in the presence than in the absence of iron-ascorbate. We, therefore, selected this concentration of iron-ascorbate for the following studies since it does not represent a pharmacological dose. The efficiency of powerful antioxidants in preventing or reducing lipid peroxidation induced by iron-ascorbate was then evaluated (Figure 1B). Trolox and BHT significantly ($P < 0.0001$) suppressed cellular peroxidation (7.9-fold and 15.3-fold, respectively) induced by iron-ascorbate at the concentrations tested. Thus, they were chosen for the subsequent experiments. It is important to note that other antioxidants such as vitamin E (0.5 mM) and N-acetylcysteine (5 mM) were far less effective than BHT and Trolox in counteracting iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation (data not shown).

Cholesterol influx and efflux

We next investigated if cholesterol flux is influenced by iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation. THP-1 macrophages were exposed to iron-ascorbate for 4 h and

were incubated for 4 h with 25 μ g of protein/ml HDL₃-[³H]-cholesteryl ether and cholesterol influx was then measured. As shown in Figure 2A, the incorporation of [³H]-cholesteryl ether remained unchanged either with iron-ascorbate or antioxidants. On the other hand, cholesterol efflux to HDL₃ after loading cells with oxLDL-[¹⁴C]-cholesteryl oleate and washing was decreased by iron-ascorbate (Figure 2B) and restored with Trolox or BHT. We concluded that lipid peroxidation affected the efflux process only.

Assessment of gene and protein expression of ABCA1, SR-BI and CD36

We attempted to define the mechanisms for the alterations in receptor-mediated cell efflux from THP-1 macrophages following exposure to iron-ascorbate. To this end, ABCA1 was characterized as the rate limiting unidirectional cellular cholesterol exporter. Similarly, we evaluated mRNA and protein mass of SR-BI that may promote the bidirectional flux of free cholesterol between macrophages and lipoproteins and is particularly of importance for macrophage efflux, together with CD36 implicated in oxidized lipid uptake. Iron-ascorbate significantly reduced the protein (Figure 3A). However, Trolox and BHT were able to prevent iron-ascorbate-induced ABCA1 protein fall. Similar trends were noted with respect to ABCA1 mRNA, but BHT was less efficient than Trolox in opposing lipid peroxidation (Figure 3B). Interestingly, BHT alone was able to significantly increase ABCA1 mRNA and its combination with iron-ascorbate enhanced ABCA1 protein levels. No significant alterations were recorded in mRNA and protein mass of SR-BI in the presence of iron-ascorbate (Figure 4), but CD36

protein mass was reduced by peroxidation without changing the gene transcription (Figure 5).

Gene expression of nuclear factors

We further tested PPAR and LXR, which represent nuclear receptors extensively involved in the control of lipid metabolism. The mRNA levels of PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ , LXR α , and LXR β were quantified by RT-PCR. Iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation downregulated the expression of PPAR α (Figure 6A), PPAR γ (Figure 6C), LXR α (Figure 6D), and LXR β (Figure 6E) in comparison with controls, whereas the incubation with BHT prevented its decline or even enhanced it. PPAR β/δ mRNA was not changed following the treatment of THP-1 with iron-ascorbate (Figure 6B).

Protein expression in human monocyte-derived macrophages

Studies were also carried out to determine whether iron-ascorbate was able to induce lipid peroxidation and caused changes in ABCA1, SR-BI and CD36 in monocytes isolated from human blood and differentiated in culture. Using the same experimental conditions as employed with THP-1, we could observe that human macrophages exhibited high MDA levels in the presence of iron-ascorbate (Figure 7). Besides, the protein expression of ABCA1 and CD36 was lowered whereas the protein mass of SR-BI remained unchanged (Figure 8). Therefore, data on human monocyte-derived macrophage confirmed the findings in THP-1.

DISCUSSION

Experimental data support a role for oxLDL in the pathogenesis of atherosclerosis. This is based on several lines of evidence, including the demonstration that (1) oxidatively modified LDL exists in atherosclerotic lesions [32-35]; (2) inhibition of oxidation by several antioxidants can slow the progression of the disease [36-38]; (3) the susceptibility of LDL to oxidation correlates with the severity of coronary atherosclerosis [39]; and (4) the ability of oxLDL to transform macrophages into foam cells [40]. However, the direct impact of oxidative stress, without the implication of oxLDL, as a causal factor for the alterations of cholesterol metabolism in macrophages, has poorly been examined. Noticing this prompted us to explore whether iron-catalyzed free radical-mediated lipid peroxidation provoked abnormalities in cholesterol trafficking in THP-1 with an attention on the mechanisms associated. In this study we showed that exposure of THP-1 macrophages to iron-ascorbate: (i) induced lipid peroxidation as assessed by the rise of MDA; (ii) decreased cholesterol efflux without effect on cholesterol influx; (iii) diminished the gene and protein expression of ABCA1 among other unaffected receptors that regulate cholesterol homeostasis investigated; and (iv) downregulated the expression of PPAR α , PPAR γ , LXR α , and LXR β . Treatment with powerful antioxidants (Trolox and BHT) prevented the adverse effects of iron-ascorbate, conceivably supporting the role of oxidative stress.

We employed iron-ascorbate, a well-established model for the induction of lipid peroxidation [26]. It initiates peroxidation, as demonstrated by the increased

values of MDA, probably by producing highly reactive hydroxyl radicals from hydrogen peroxide via Fenton-type reactions. Ascorbic acid can amplify the oxidative potential of iron by promoting metal ion-induced lipid peroxidation [41]. In the experiments described herein, iron-ascorbate complex was very effective in inducing lipid peroxidation, as demonstrated by high MDA levels, a well-established measure of lipid peroxidation. Supporting evidence was provided by the scavenger activity of Trolox and BHT antioxidants. Furthermore, we employed THP-1 cells that represent a well-known model of human macrophages[42], widely used in studies of foam cell formation [43-47], but the cholesterol regulation by oxidative stress in this model has not yet been established.

The integrity of cholesterol movement in THP-1 seems compromised under the iron-ascorbate prooxidant effect, which suggests that oxidation of LDL is an important, but not obligatory, event in foam cell formation. Interestingly, only the efflux path was disturbed. The important clinical corollary is that inhibition of oxidation can inhibit atherosclerosis independent of lowering plasma cholesterol levels. Inconclusive results have been obtained with clinical trials, but remarkable efforts are still necessary to design the appropriate combination of antioxidant molecules.

As mentioned before, foam cell formation from macrophages is a critical event in the initiation of atherosclerosis. The modulation by oxidative stress of the expression of genes involved in the import and export of cholesterol may have a great impact on foam cell formation and lesion development. We, therefore,

decided to simultaneously investigate the regulation of genes and receptor proteins that participate in cholesterol influx and efflux. CD36 is a major class of scavenger receptors that internalize modified LDL [47, 48]. Our results show that only CD36 protein expression in THP-1 macrophages was significantly modified by exposure to iron-ascorbate. The mechanism of induction of CD36 by oxLDL was shown to be due to the ability of oxLDL to activate the transcription factor PPAR γ [49, 50], potentially leading to foam cell formation, cell death, release of lipids and matrix-metalloproteinases, all features of unstable plaques. Interestingly, in our study, PPAR γ gene expression was down-regulated by iron-ascorbate while no change in CD36 gene expression could be noticed.

Similarly, the iron-ascorbate stimulus could not promote changes in the gene and protein expression of SR-BI that mediates the bidirectional flux of cholesterol across the plasma membrane [12]. The expression of SR-BI in macrophages appears to be regulated by cholesterol loading [10], as well as by the PPAR α , PPAR γ and LXR α pathways [11, 51]. However, its regulation is incompletely understood as it is also inversely correlated with ABCA1 expression [52, 53]. Under our experimental conditions, no significant regulation of SR-BI by oxidative stress has been noticed even if the PPAR and LXR pathway has been modified.

In contrast, oxidative stress reduced the gene and protein expression of ABCA1, a crucial unidirectional cholesterol exporter in macrophages, which could account for the decrease in cholesterol efflux. Therefore, cholesterol outflow could not keep pace with uptake in order to avoid intracellular cholesterol accumulation

given the downregulation of ABCA1 expression elicited by oxidative stress. Expression of the ABCA1 gene is transcriptionally regulated. PPAR was shown recently to induce the expression of ABCA1 in macrophages through a transcriptional cascade mediated by the nuclear receptor LXR that heterodimerizes with retinoic-X-receptor (RXR) [22, 23, 54-56]. Therefore, we determined whether the oxidative stress-mediated decreases in ABCA1 mRNA expression and cholesterol efflux were dependent on the inactivation of PPAR and/or LXR. Our data clearly demonstrated that iron-ascorbate down-regulated the LXR- and PPAR- dependent transcription, since decreased mRNA levels of PPAR α , PPAR γ , LXR α , and LXR β were recorded.

Studies have provided evidence that the nuclear receptors LXR α and LXR β , which bind with the RXR as obligate heterodimers, mediate the lipid induction of ABCA1 [54, 55]. PPAR α and PPAR γ have also been demonstrated to stimulate cholesterol efflux in cultured macrophages by inducing the expression of LXR α [22, 23]. However, other studies demonstrated that PPAR γ enhances HDL-dependant cholesterol efflux from macrophages in a LXR-independent mechanism [57].

Since caution should be taken in directly extrapolating the results obtained in THP-1 to human macrophages, we have also carried out experiments in human monocytes-derived macrophages. This approach allowed us to confirm that iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation provoked a decline of ABCA1 and CD36 proteins.

As a result of oxidative stress, cholesterol accumulation in THP-1 should be viewed as reflecting imbalance between influx and efflux, which originates from decreased delivery. The diagram in Figure 9 depicts the possible mechanisms for such an occurrence: oxidative stress limits cholesterol outflow through a molecular cascade involving inhibition of LXR gene expression, leading to a decline in PPAR mRNA, which in turn decreased ABCA1 expression and lower cholesterol efflux. In conclusion, iron-ascorbate catalyzed lipid peroxidation appears to play an important role in regulating cholesterol efflux from THP-1 macrophages.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mrs Schohraya Spahis for her technical assistance.

REFERENCES

1. Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84:1381-478.
2. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
3. Tabas I. Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell Death Differ* 2004;11 Suppl 1:S12-S16.
4. Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, et al. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* 2002;277:49982-8.
5. Linsel-Nitschke P, Tall AR. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:193-205.
6. Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem* 1994;269:21003-9.
7. Hayden MR, Clee SM, Brooks-Wilson A, Genest J, Jr., Attie A, Kastelein JJ. Cholesterol efflux regulatory protein, Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:117-22.

8. Krieger M. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem* 1999;68:523-58.
9. Krieger M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* 2001;108:793-7.
10. Fluiter K, van der Westhuijzen DR, van Berkel TJ. In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J Biol Chem* 1998;273:8434-8.
11. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, et al. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 2000;101:2411-7.
12. Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, et al. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 1997;272:20982-5.
13. Hirano K, Yamashita S, Nakagawa Y, Ohya T, Matsuura F, Tsukamoto K, et al. Expression of human scavenger receptor class B type I in cultured human monocyte-derived macrophages and atherosclerotic lesions. *Circ Res* 1999;85:108-16.
14. Yu L, Cao G, Repa J, Stangl H. Sterol regulation of scavenger receptor class B type I in macrophages. *J Lipid Res* 2004;45:889-99.

15. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2001;108:785-91.
16. Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP, et al. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest* 2000;105:1095-108.
17. Batt KV, Patel L, Botham KM, Suckling KE. Chylomicron remnants and oxidised low density lipoprotein have differential effects on the expression of mRNA for genes involved in human macrophage foam cell formation. *J Mol Med* 2004;82:449-58.
18. Osterud B, Bjorklid E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* 2003;83:1069-112.
19. Parthasarathy S, Fong LG, Otero D, Steinberg D. Recognition of solubilized apoproteins from delipidated, oxidized low density lipoprotein (LDL) by the acetyl-LDL receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:537-40.
20. Tsukamoto K, Kinoshita M, Kojima K, Mikuni Y, Kudo M, Mori M, et al. Synergically increased expression of CD36, CLA-1 and CD68, but not of SR-A and LOX-1, with the progression to foam cells from macrophages. *J Atheroscler Thromb* 2002;9:57-64.
21. Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the

- macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem* 1997;272:21654-9.
22. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, et al. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 2001;7:161-71.
23. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, et al. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 2001;7:53-8.
24. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:93-102.
25. He Y, Kwan WC, Steinbrecher UP. Effects of oxidized low density lipoprotein on endothelin secretion by cultured endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis* 1996;119:107-18.
26. Courtois F, Suc I, Garofalo C, Ledoux M, Seidman E, Levy E. Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G12-G19.
27. Levy E, Thibault L, Roy CC, Letarte J, Lambert M, Seidman EG. Mechanisms of hypercholesterolaemia in glycogen storage disease type I: defective metabolism of low density lipoprotein in cultured skin fibroblasts. *Eur J Clin Invest* 1990;20:253-60.

28. Levy E, Thibault L, Garofalo C, Messier M, Lepage G, Ronco N, et al. Combined (n-3 and n-6) essential fatty deficiency is a potent modulator of plasma lipids, lipoprotein composition, and lipolytic enzymes. *J Lipid Res* 1990;31:2009-17.
29. Levy E, Rizwan Y, Thibault L, Lepage G, Brunet S, Bouthillier L, et al. Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71:807-15.
30. Suc I, Brunet S, Mitchell G, Rivard GE, Levy E. Oxidative tyrosylation of high density lipoproteins impairs cholesterol efflux from mouse J774 macrophages: role of scavenger receptors, classes A and B. *J Cell Sci* 2003;116:89-99.
31. Stan S, Lambert M, Delvin E, Paradis G, O'loughlin J, Hanley JA, et al. Intestinal fatty acid binding protein and microsomal triglyceride transfer protein polymorphisms in French-Canadian youth. *J Lipid Res* 2005;46:320-7.
32. Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:1372-6.
33. Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989;84:1086-95.

34. Haberland ME, Fong D, Cheng L. Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Science* 1988;241:215-8.
35. Rosenfeld ME, Palinski W, Yla-Herttuala S, Butler S, Witztum JL. Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. *Arteriosclerosis* 1990;10:336-49.
36. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998;141:1-15.
37. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997;272:20963-6.
38. Sasahara M, Raines EW, Chait A, Carew TE, Steinberg D, Wahl PW, et al. Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probucol. I. Is the extent of atherosclerosis related to resistance of LDL to oxidation? *J Clin Invest* 1994;94:155-64.
39. Regnstrom J, Nilsson J, Tornvall P, Landou C, Hamsten A. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* 1992;339:1183-6.
40. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1815-26.

41. Bachowski GJ, Thomas JP, Girotti AW. Ascorbate-enhanced lipid peroxidation in photooxidized cell membranes: cholesterol product analysis as a probe of reaction mechanism. *Lipids* 1988;23:580-6.
42. Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 1991;47:22-31.
43. Argmann CA, Sawyez CG, McNeil CJ, Hegele RA, Huff MW. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor results in net depletion of cellular cholesteryl esters in macrophages exposed to oxidized lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:475-82.
44. Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF, Garvey WT. The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2002;165:259-69.
45. Llaverias G, Jove M, Vazquez-Carrera M, Sanchez RM, Diaz C, Hernandez G, et al. Avasimibe and atorvastatin synergistically reduce cholesteryl ester content in THP-1 macrophages. *Eur J Pharmacol* 2002;451:11-7.
46. Llaverias G, Noe V, Penuelas S, Vazquez-Carrera M, Sanchez RM, Laguna JC, et al. Atorvastatin reduces CD68, FABP4, and HBP expression in oxLDL-treated human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:265-74.

47. Llaverias G, Lacasa D, Vinals M, Vazquez-Carrera M, Sanchez RM, Laguna JC, et al. Reduction of intracellular cholesterol accumulation in THP-1 macrophages by a combination of rosiglitazone and atorvastatin. *Biochem Pharmacol* 2004;68:155-63.
48. Nicholson AC, Hajjar DP. CD36, oxidized LDL and PPAR gamma: pathological interactions in macrophages and atherosclerosis. *Vascul Pharmacol* 2004;41:139-46.
49. Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, et al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:717-26.
50. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 1998;93:229-40.
51. Malerod L, Juvet LK, Hanssen-Bauer A, Eskild W, Berg T. Oxysterol-activated LXRA/alpha/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299:916-23.
52. Chen W, Silver DL, Smith JD, Tall AR. Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1- mediated cholesterol efflux in macrophages. *J Biol Chem* 2000;275:30794-800.
53. Yancey PG, Kawashiri MA, Moore R, Glick JM, Williams DL, Connelly MA, et al. In vivo modulation of HDL phospholipid has opposing

- effects on SR-BI- and ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res* 2004;45:337-46.
54. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 2000;275:28240-5.
55. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, et al. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000;289:1524-9.
56. Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, Mak PA, Wilpitz DC, Edwards PA, et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:12097-102.
57. Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, Brown KK, Plotkin CR, Pattison JW, et al. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest* 2004;114:1564-76.

FIGURE LEGENDS**FIGURE 1:** Lipid peroxidation in THP-1 cells challenged with iron-ascorbate.

THP-1 cells were incubated with increasing concentrations of iron-ascorbate for 4 h at 37 °C. Iron concentrations shown on *x*-axis represent actual iron concentration along with a corresponding 10-fold higher ascorbate concentration at each iron amount. Lipid peroxidation was monitored by measuring malondialdehyde (MDA) formation in cells. A concentration-dependent increase in equivalent MDA formed was observed between 50 and 200 μM of Fe²⁺ in cells (A). The effects of antioxidants (Trolox and BHT) on iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation were also tested (B). To this end, cells were incubated for 4 h with Trolox or BHT in addition to iron-ascorbate. Cells were then treated to determine MDA by HPLC. Values are means ± SEM for 4-6 different experiments.

*P < 0.0001 vs. controls.

FIGURE 2: Effect of iron-ascorbate on macrophage cholesterol influx (A) and cholesterol efflux (B). Macrophages were treated with LPDS and 25 μg/ml HDL₃ [³H]-cholesteryl hexadecyl ether at 37°C for 4 h. The cholesterol influx content was calculated by assessing radioactivity in cell lysate. The cholesterol efflux content was assessed after loading cells with 50 μg apo B/ml oxLDL [¹⁴C]-cholesteryl oleate. Values are means ± SEM for 5 separate experiments.

*P < 0.05 vs. controls.

FIGURE 3: Influence of gene and protein expression of ABCA1. THP-1 macrophages were exposed to iron-ascorbate and antioxidants for 4h at 37 °C. Thereafter, protein and mRNA levels of the receptors were determined by Western blotting (A) and RT-PCR (B). Values are means \pm SEM for 3 separate experiments.

*P < 0.05, †P < 0.01 and ‡P < 0.001 vs controls. A representative blot is shown.

FIGURE 4: Influence of gene and protein expression of SR-BI. THP-1 macrophages were exposed to iron-ascorbate and antioxidants for 4h at 37 °C. Thereafter, protein and mRNA levels of the receptors were determined by Western blotting (A) and RT-PCR (B). Values are means \pm SEM for 3 separate experiments.

*P < 0.05, †P < 0.01 and ‡P < 0.001 vs controls. A representative blot is shown.

FIGURE 5: Influence of gene and protein expression of CD36. THP-1 macrophages were exposed to iron-ascorbate and antioxidants for 4h at 37 °C. Thereafter, protein and mRNA levels of the receptors were determined by Western blotting (A) and RT-PCR (B). Values are means \pm SEM for 3 separate experiments.

*P < 0.05 vs controls. A representative blot is shown.

FIGURE 6: Regulation of nuclear factors by iron-ascorbate. Iron-ascorbate was administered to THP-1 in the presence or absence of Trolox or BHT. Following the period culture (4h) the mRNA levels of

PPAR α (A), PPAR β/δ (B), PPAR γ (C), LXR α (D), and LXR β (E) were examined by RT-PCR as described in Methods. Values are means \pm SEM for 4 separate experiments.

*P < 0.05, †P < 0.01 vs controls. A representative blot is shown.

FIGURE 7: Lipid peroxidation in monocytes-derived macrophages following incubation with iron-ascorbate. Lipid peroxidation was assessed by the measurement of malondialdehyde (MDA). Values are means \pm SEM for 4 separate experiments.

†P < 0.01 vs controls

FIGURE 8: Effects of iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation on the protein expression of ABCA1, SR-BI and CD36. Protein mass of ABCA1 (A), SR-BI (B) and CD36 (C) was estimated by Western blot as described in Methods. Values are means \pm SEM for 4 separate experiments.

*P < 0.05 vs controls.

FIGURE 9: Diagram of the main players influencing cholesterol accumulation in THP-1 macrophages. Oxidative stress could influence ABCA1 gene transcription by repressing PPAR α and γ , which would influence LXR α and β , or by diminishing directly the LXR receptors. This reduction in gene transcription could in term limit the protein translation and expression and then cholesterol efflux, leading to its cellular accumulation.

Figure 1

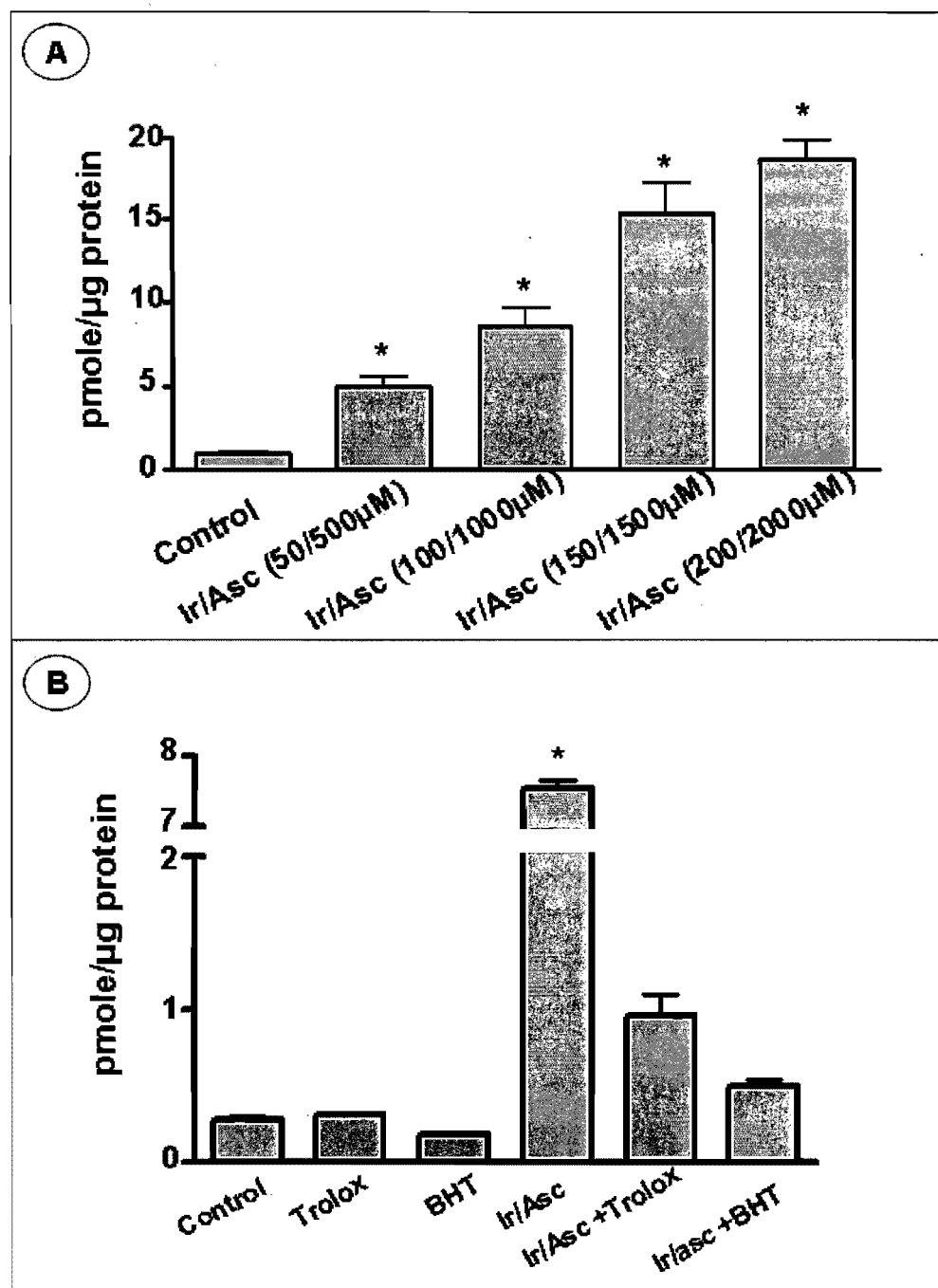


Figure 2

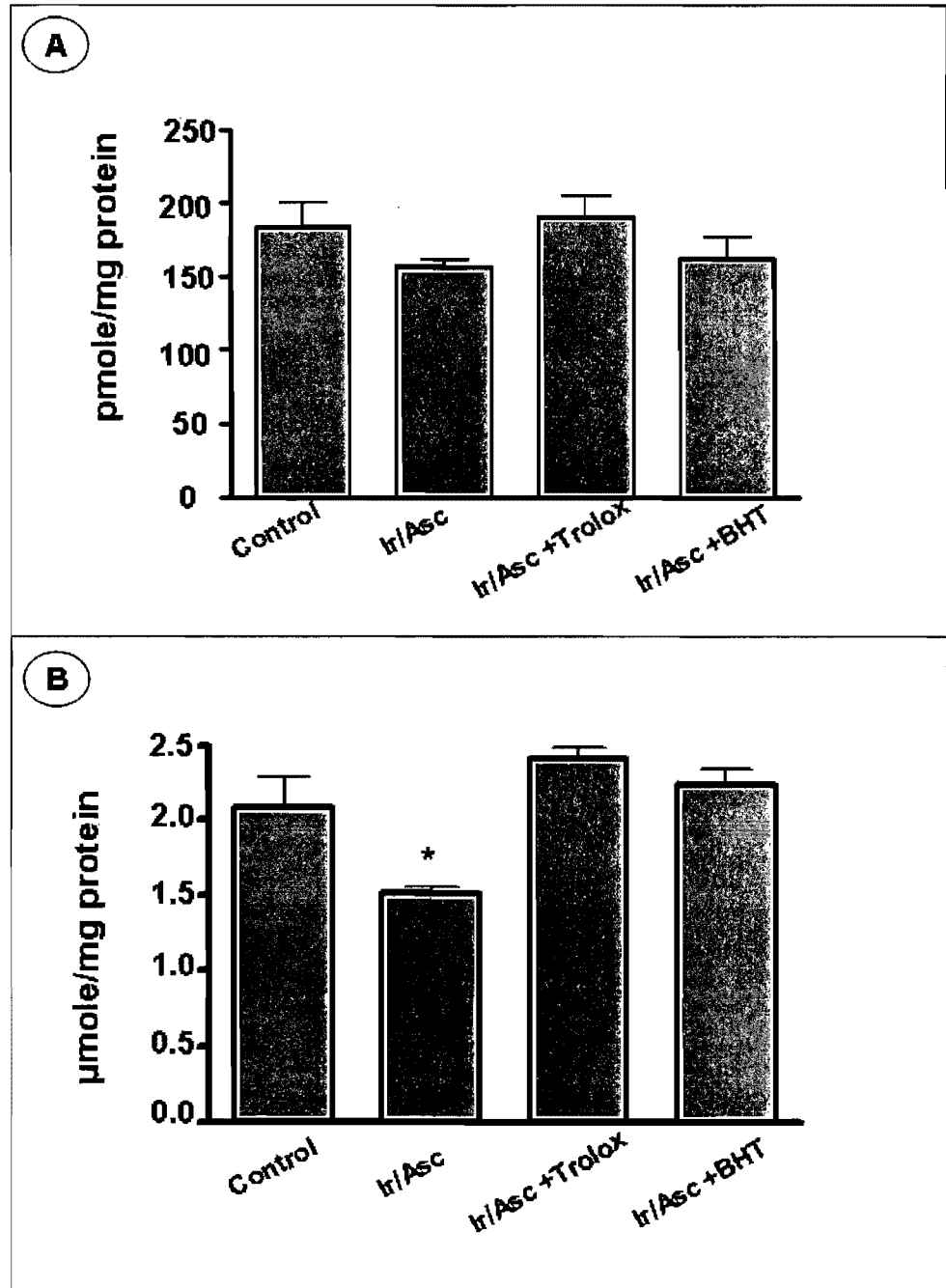


Figure 3

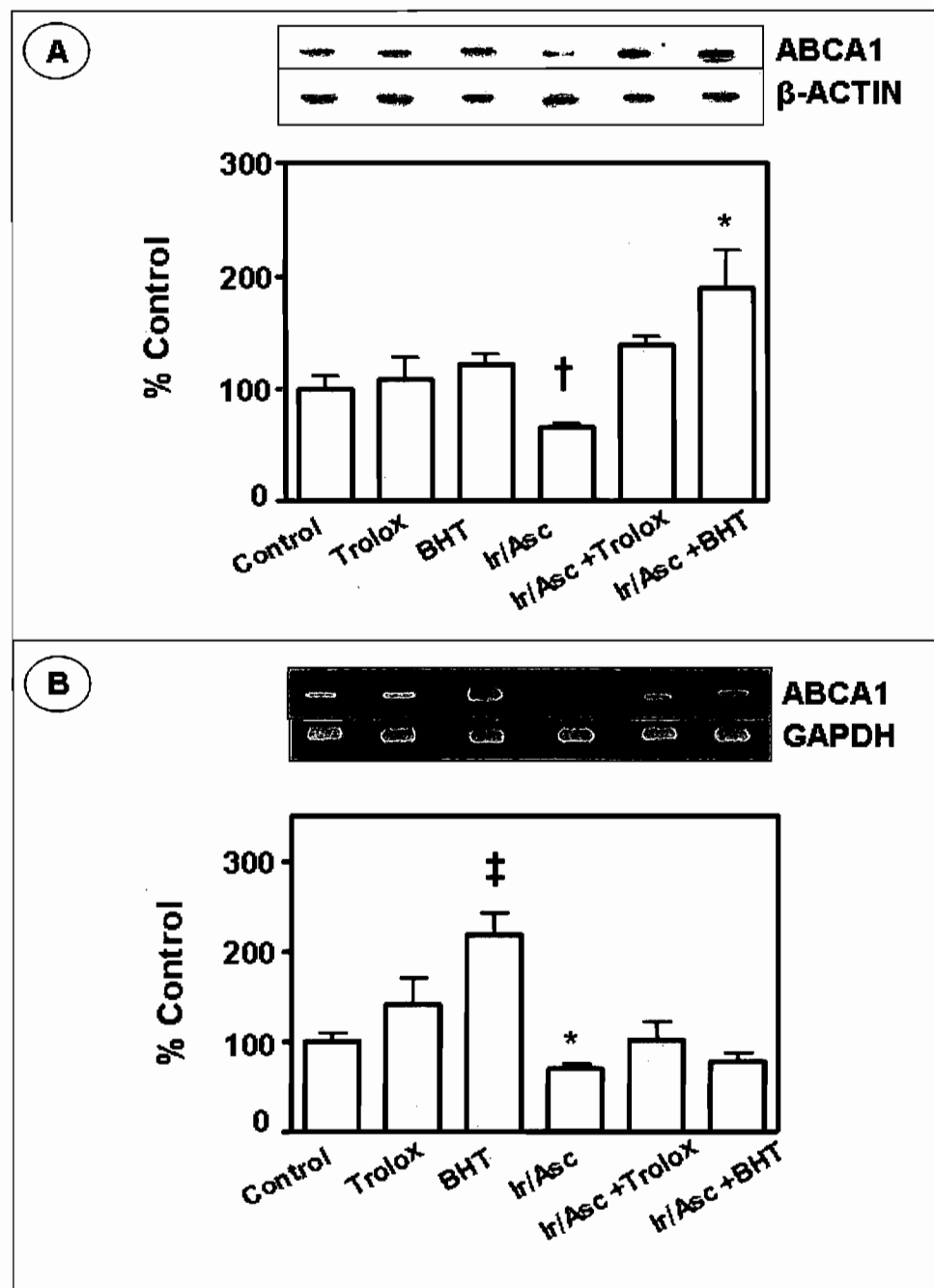


Figure 4

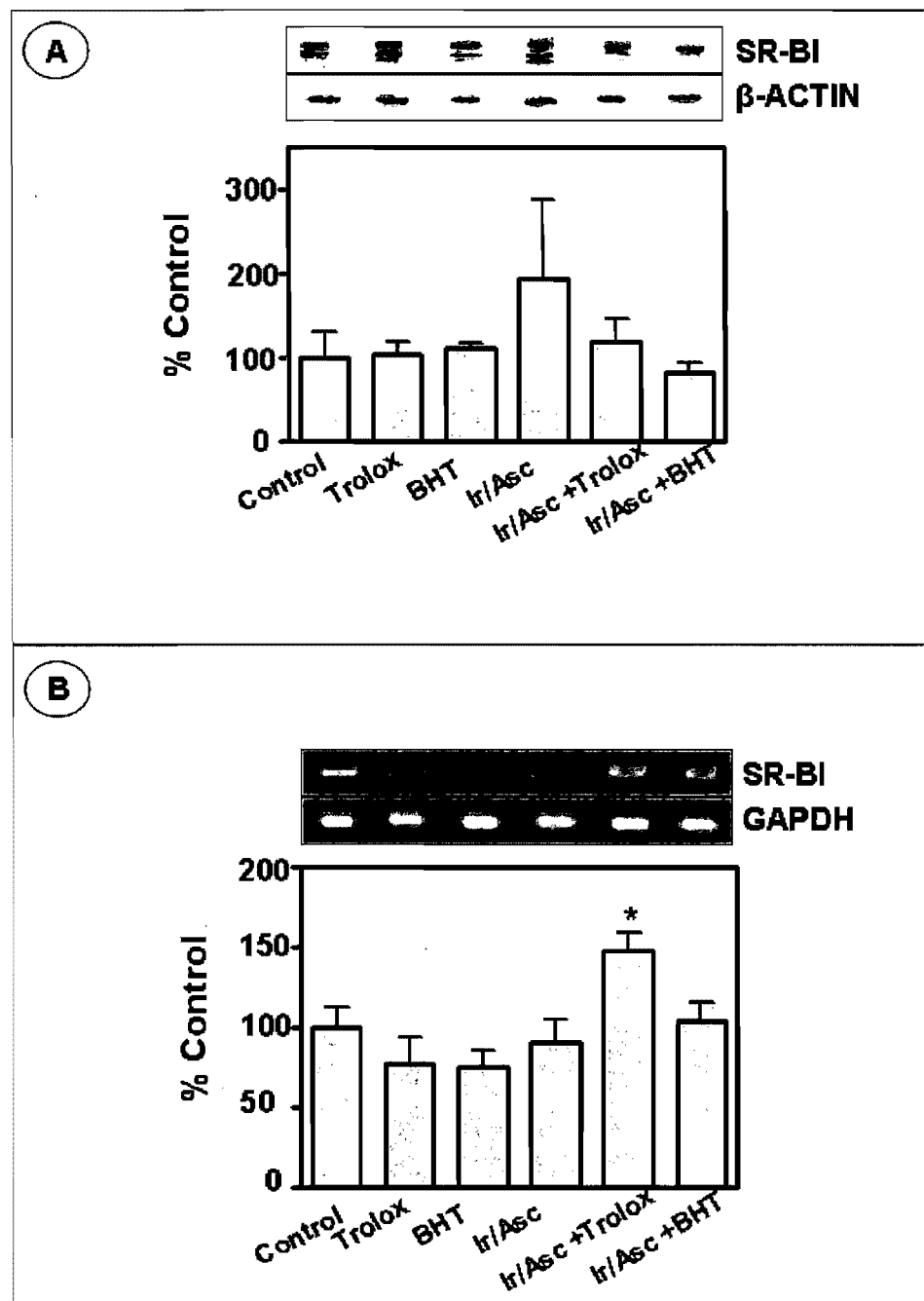


Figure 5

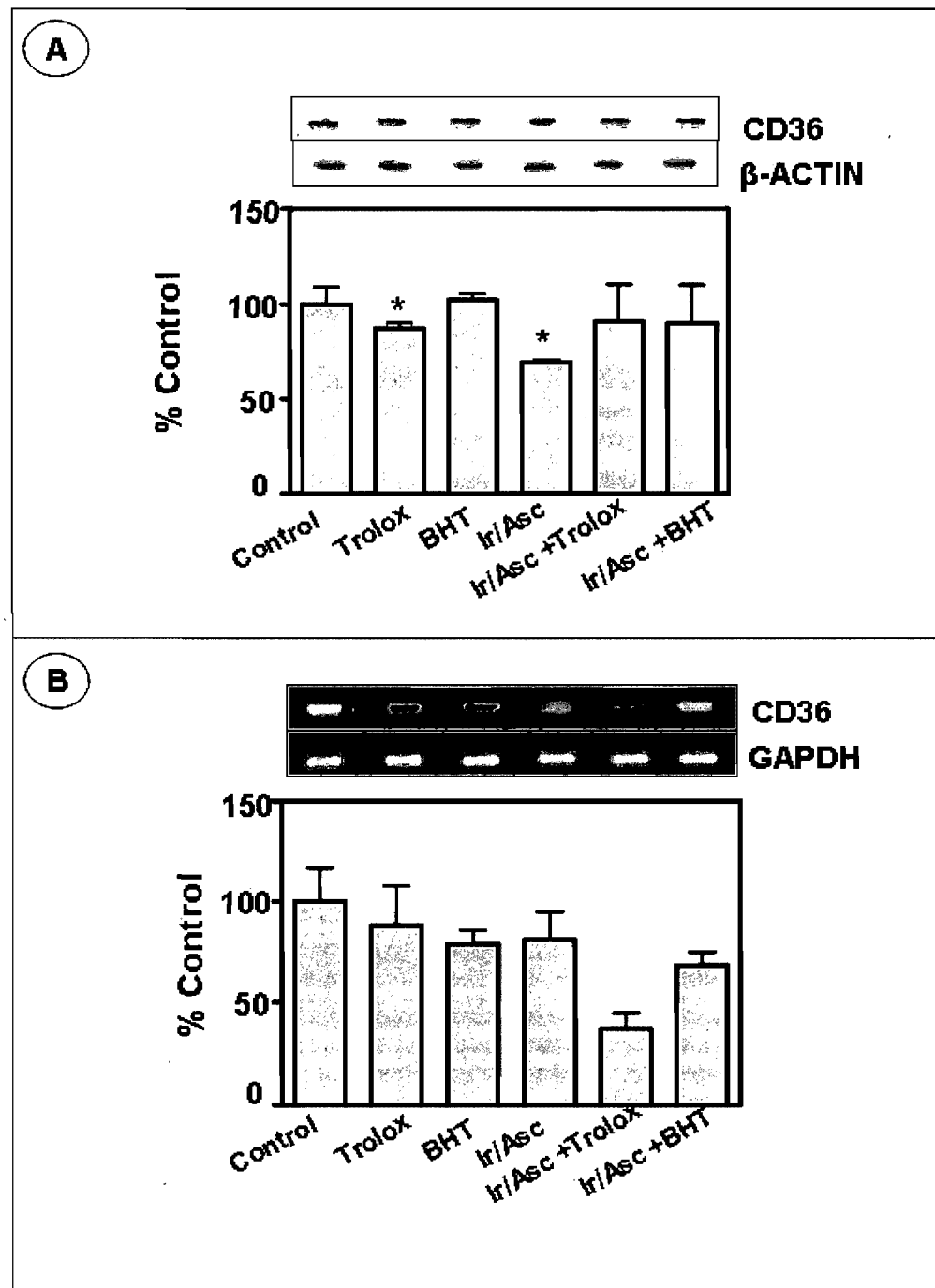


Figure 6

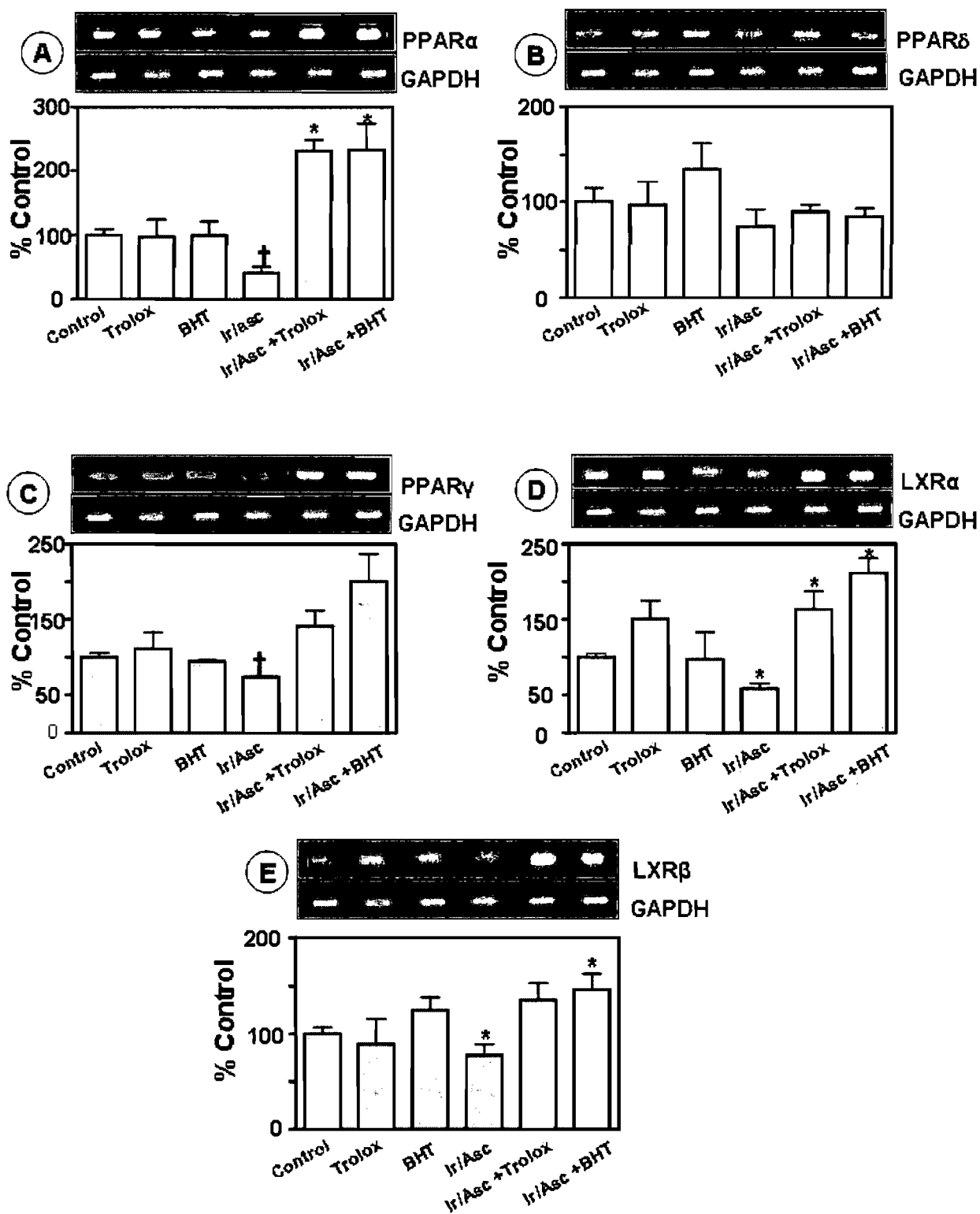


Figure 7

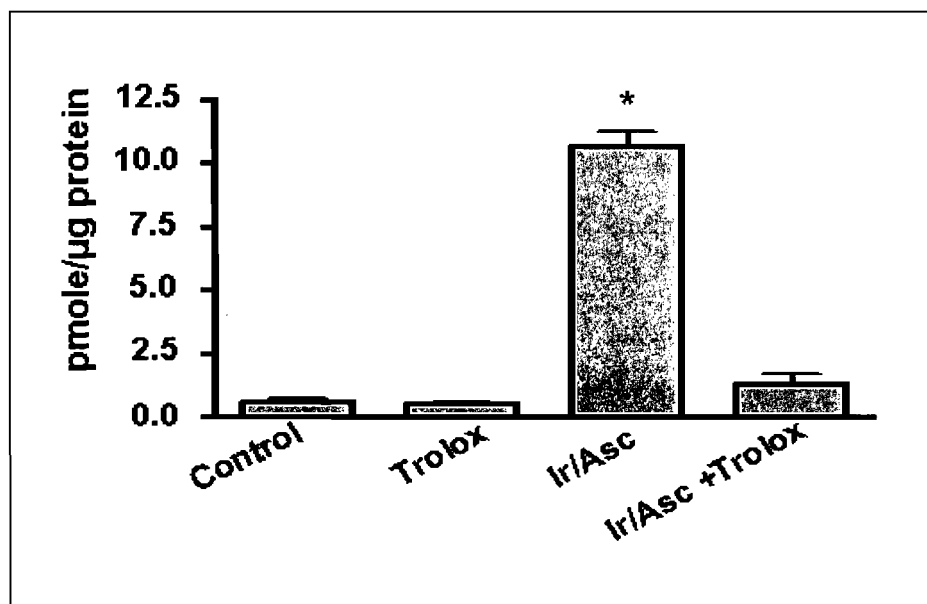


Figure 8

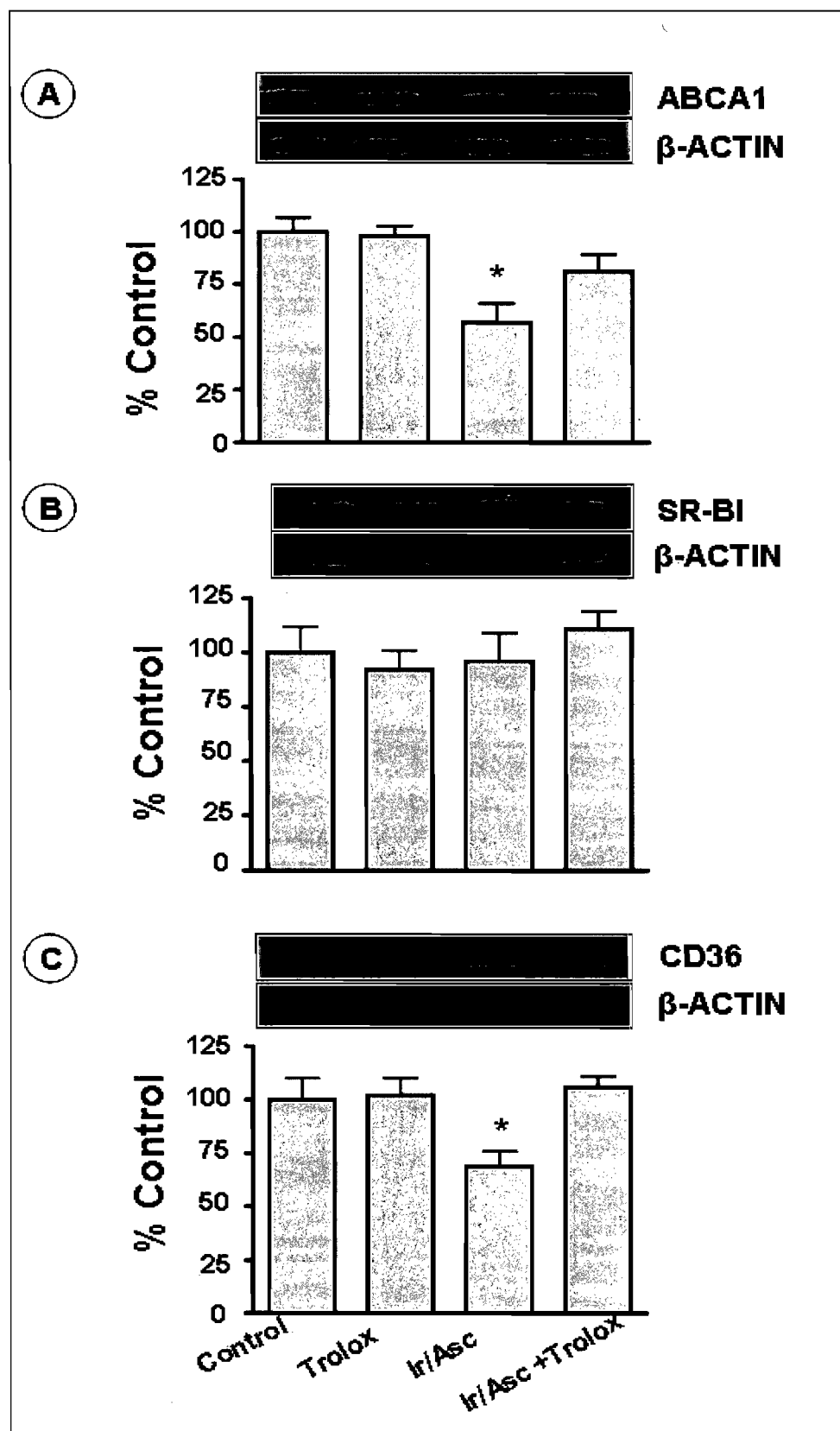
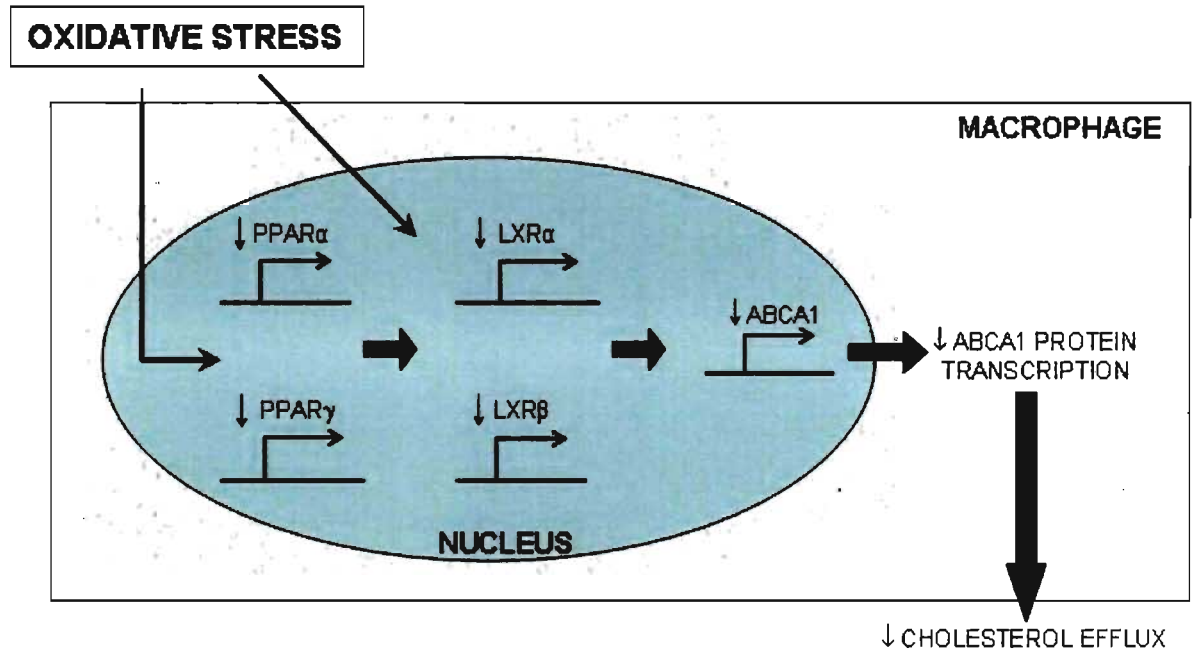


Figure 9



4. ARTICLE 2

**Article soumis à The American Journal of Physiology – Heart
and Circulatory Physiology, janvier 2008**

**Effect of oxidative stress on the status of adhesion
molecules, nuclear receptors and cholesterol flux in
endothelial cells: Priming of monocytes**

Marcil V¹, Delvin E², Amre D³, Seidman E^{4,5}, Levy E^{1,4}

From the Departments of ¹Nutrition, ²Biochemistry and ³Pediatrics, CHU
Sainte-Justine, Université de Montréal, 3175 Côte Sainte Catherine, Montreal,
Quebec, H3T 1C5, Canada

⁴Group on the Intestinal Epithelium, Canadian Institute of Health Research
and Department of Cellular Biology, Faculty of Medicine, Université de
Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec J1H 5N4, Canada

⁵Research Institute, McGill University, Campus MGH, C10.148.6, Montreal,
Quebec, Canada

Running Title: Influence of oxidative stress on endothelial cell reactivity

Address correspondence to:

Dr. Emile Levy
Research Centre
Gastroenterology, hepatology and nutrition
Unit
CHU-Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine
Montréal, Québec, Canada H3T 1C5
Tel.: (514) 345-7783
Fax: (514) 345-4999
E-mail: [REDACTED]

ABSTRACT

Loads of reactive oxygen species that overburden antioxidant systems induce oxidative stress in the body. Circumstantial evidence suggests that oxidative stress plays a crucial role in the initiation and progression of atherosclerosis. Although endothelial dysfunction is one manifestation of the many changes induced in the arterial wall by oxidized LDL, little is known about the relationship between oxidative stress *per se*, cholesterol transport and endothelial cell integrity. The aim of the present work is to tackle this issue by treating human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with iron/ascorbate (100/1000 μ M) for periods of 4 and 8 hours and by subsequently evaluating the cholesterol flux, the gene expression status of cholesterol transporters, nuclear receptors and adhesion molecules, as well as the cellular adhesion of HUVEC and THP-1 macrophages. The incubation of HUVEC with iron/ascorbate resulted in marked lipid peroxidation as reflected by the discernible elevation of malondialdehyde (MDA) levels. MDA concentrations were reduced by pre-incubating HUVEC cells with the established antioxidant Trolox (0.5 mM). Our experiments could not reveal any modifications in the protein and gene expression of the transporters (ABCA1, SR-BI, LOX-1), the adhesion molecules (VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin) and the nuclear receptors (PPARs and LXRs) under the influence of iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. Interestingly, oxidative stress enhanced monocyte adhesion to endothelial cells in co-culture ($P < 0.05$), induced the gene expression of ICAM-1 ($P < 0.01$), E-selectin ($P < 0.02$) and MCP-1 ($P < 0.01$), whereas it downregulated eNOS mRNA ($P < 0.01$).

Overall, our data suggest that oxidative stress is more harmful in the presence of heterocellular communication between endothelial cells and macrophages since the induction of chemotactic factors and the down-regulation of eNOS may compromise the health of the endothelium and contribute to atherosclerosis development.

Keywords: Inflammation, atherosclerosis, reactive oxygen species, co-culture, endothelial cells, macrophages.

INTRODUCTION

Endothelial cells are crucial for the full integrity of the vessel wall. Marked alterations of their function predispose the vessel wall to vasoconstriction, leukocyte adherence, platelet activation, thrombosis, vascular inflammation and the pathogenesis of atherosclerosis. Various studies have emphasized the central involvement of low-density lipoprotein (LDL) oxidation in the endothelial dysfunction, which culminates in the formation of the atherome (27; 35). In fact, the incursion of oxidized LDL (oxLDL) in significant amounts in endothelial cells induces accelerated pro-inflammatory effects, including the initiation of the adhesion of leukocytes to the dysfunctional and injured endothelium, and the penetration of these cells into the vessel wall to generate foam cells (13; 14; 22). Mechanistic studies show that transcriptional activation of adhesion molecules, including P-selectin, E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) by nuclear factor- κ B (NF- κ B) plays a pivotal role in the process of cell-cell adhesion (4; 8; 17; 39; 46).

Vascular endothelial cells do not undergo the foam cell transformation and do not accumulate cholesterol in atherosclerotic plaques to the same extent as macrophages or smooth muscle cells. However, vascular endothelial cells express receptors for oxidized lipoproteins, and have the biochemical pathways for sterol synthesis and receptor-mediated endocytosis of lipoproteins. It has been postulated that endothelial cells maintain cholesterol homeostasis by down-

regulating cholesterol synthesis and low-density receptors, and by a cellular cholesterol efflux mechanism onto low-affinity but high-capacity high density lipoproteins (HDL) (15; 37).

If the remarkable capacity of oxLDL to contribute to vascular lesions has been the subject of intensive investigation, little attention has been devoted to the direct influence of oxidative stress per se on the endothelium integrity and metabolic behavior. However, the increase of reactive oxygen species (ROS) to high levels may react with cellular constituents to cause severe damage, disruption of function or degradation, as is the case for DNA, proteins and lipid structure (1; 10). Recently, we explored whether iron-catalyzed free radical-mediated lipid peroxidation provoked abnormalities in cholesterol trafficking in macrophages with an attention on the potential mechanisms (30). We were able to show that exposure of THP-1 macrophages to iron-ascorbate induced lipid peroxidation as assessed by the rise of malondialdehyde (MDA), decreased cholesterol efflux, diminished the gene and protein expression of ABCA1 among other unaffected receptors that regulate cholesterol homeostasis investigated, and down-regulated the expression of Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor (PPAR) α , PPAR γ , Liver X Receptor (LXR) α and LXR β . How endothelial cells respond to oxidative stress, as the unique causal factor, has poorly been examined. Does oxidative stress affect key cholesterol transporters such as scavenger receptor class B type I (SR-BI) and ATP-Binding Cassette Transporter A-1 (ABCA1)? Is it able to modify the transcription factors that trigger cholesterol uptake and exocytosis? What are the consequences of oxidative stress

on the co-culture of macrophages and endothelial cells? Experiments were performed to answer these important and intriguing questions. More precisely, the specific objectives of the present study were to determine the role of iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation in cholesterol influx and efflux in endothelial cells, gene and protein expression of SR-BI, ABCA1 and Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), mRNA status of PPAR α , PPAR β/δ and PPAR γ , as well as LXR α and LXR β , and finally the consequences on the interactions of vascular and inflammatory cells. Our hypothesis was that iron/ascorbate-induced lipid peroxidation may trigger significant disturbances in cholesterol flux and chemotaxis mediators when endothelial vascular cells communicate with macrophages.

METHODS

Cell Culture

HUVEC (Clonetics™ Human umbilical vascular endothelial cells, Cambrex) were cultured in EGM™ Bullet kit (CC-3124) containing 500 ml Endothelial Cell Basal Medium supplemented with 2 ml Bovine Brain extract, 0.5 ml hEGF (Endothelial Growth Factor), 0.5 ml hydrocortisone, 10 ml fetal calf serum and 0.5 ml GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin). The cell line was cultivated at 37°C, 95% humidity and 5% CO₂ and used between passages 4 and 12 (47).

THP-1 human monocytes (American Type Culture Collection (ATCC) TIB 202) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.05 mM 2-mercaptoethanol. The cell line was cultivated at 37°C, 95% humidity and 5% CO₂ and used between passages 4 and 12. Cells were differentiated into macrophages by the addition of 100 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma) for a 72-hour period (30).

Estimation of Lipid Peroxidation

HUVEC cells were incubated in the presence or absence of iron/ascorbate and the antioxidants Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,9-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid, Sigma) and butylated hydroxytoluene (BHT). The reaction was terminated by the addition of 0.2% BHT (2,6-di-t-butyl-p-cresol, Sigma) to measure MDA, as an index of lipid peroxidation. The amount of free MDA formed during the reaction was determined by HPLC as described previously (9). Briefly, proteins were first precipitated with a 10% sodium tungstate (Na₂WO₄) (Aldrich Chemical) solution,

and protein-free supernatant was then reacted with an isovolume of 0.5% thiobarbituric acid (Sigma) solution at 90°C for 60 min. After cooling to room temperature, chromogene was extracted with 1-butanol and dried over a stream of nitrogen at 37°C. The dry extract was then resuspended in a KH_2PO_4 /methanol (70:30, pH 7.0) mobile phase before MDA detection by HPLC.

MTT Assay

After the treatment of HUVEC with BHT (0.5 mM), the medium was aspirated from the cells and 200 μl of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution (0.5 mg MTT/ml PBS) was added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37°C, 95% humidity and 5% CO_2 to allow MTT oxidation by mitochondrial dehydrogenase in the viable cells. After 2 h the MTT solution was aspirated and DMSO (200 μl) was added to dissolve the resulting blue formazan crystals. The absorbance was measured at 535 nm. DMSO was used as blank (38).

Isolation and modification of lipoproteins

Human LDL ($1.019 < d < 1.063 \text{ g/ml}$), HDL₃ fraction ($1.125 < d < 1.210 \text{ g/ml}$) and lipoprotein-deficient serum (LPDS, $d > 1.125 \text{ g/ml}$) were prepared from plasma of healthy human subjects and isolated by differential ultracentrifugation as described previously (24-26). The lipoprotein fractions were dialyzed intensively against phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 150 mM NaCl and 0.3 mM ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA). In order to generate oxLDL, plasma LDL (3 mg apo B/ml) was extensively dialyzed against PBS (pH 7.4) containing 150 mM NaCl and 5 μM EDTA and then incubated with 10 μM

CuSO₄ for 18 h at 37°C. Its modification was verified by its mobility on agarose gel electrophoresis (Paragon, Beckman Instruments). All lipoprotein fractions were filtered through a 0.2 µM Millipore membrane and stored at 4°C.

Cholesterol oxLDL uptake

HUVEC cells were cultured in 6-well plates at $0,5 \times 10^6$ cells per well. After a 48-hour period for reaching confluence, cells were exposed for 4 hours to iron/ascorbate with or without the antioxidant substrates and then were incubated for 2 h at 37°C in 0.5 ml of supplemented EBM with 5% v/v LPDS containing [³H]-cholesteryl hexadecyl ether-oxLDL (12,5 µg/ml). To determine the non-specific binding, cells were incubated with labeled-oxLDL in the presence of a 50-fold excess of unlabeled oxLDL. The assays were essentially carried out as previously described (30; 45).

Cholesterol efflux

HUVEC cells were loaded with radiolabeled cholesterol by incubation for 24 hours in 0.5 ml of supplemented BME with 5% v/v LPDS and 2.64×10^6 dpm/ml [³H]-cholesteryl oleate albumin. After a 16-hour equilibration period of time without radioactivity, cells were washed with PBS and treated for 4 hours with or without iron/ascorbate and antioxidants. Cells were washed again and incubated with HDL₃ (50 µg/ml) for 24 hours. The media were centrifuged at 4000 g for 10 min to remove any suspended or dead cells. The cells were washed twice with PBS, resuspended in 1 ml of lysis buffer and homogenized by sonication on ice. The assays were performed as previously described (30; 45).

Western blot analysis

To determine the protein expression of SR-BI, ABCA1, LOX-1 and Phospho-P38, cells were homogenized and proteins (30 μ g) were denatured at 95°C for 5 min in SDS dithiothreitol and β -mercaptoethanol-containing sample buffer, separated on a 4-7.5% gradient SDS-PAGE, and electroblotted onto Hybond-C Extra nitrocellulose membranes (Amersham) in 25 mM Tris and 192 mM glycine. Membranes were blocked in Tris-buffered saline [20 mM Tris-HCl (pH 7.5) plus 137 mM sodium chloride (NaCl)] containing 0.1% Tween 20 and 5% nonfat dry milk for 60 min at room temperature. The blots were then incubated overnight at 4°C in blocking solution with the antibodies for SR-BI (Novus Biologicals) (1:1000), ABCA1 (Novus Biologicals) (1:1000), LOX-1 (Santa Cruz Biotechnology) (1:2000), Phospho-P38 (Cell Signaling Technology) (1:2000), and β -actin (Sigma-Aldrich) (1:5000). The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Blots were developed and the protein mass was quantified using a MultiImageTM Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA) and a Alphamager 1220 software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). Bands were analyzed using Scion Image software.

RT-PCR expression analysis

Levels of specific mRNAs were assessed by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) under quantitative conditions. Total cellular RNA from HUVEC was isolated using Trizol[®] Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The quantity and yield of the RNA were assessed by the

260:280-nm optical density ratio and by electrophoresis in 1.5% agarose gels and were viewed via ethidium bromide staining. Complementary DNA was synthesized in a total volume of 20 μ l, from RNA samples by mixing 2 μ g of total RNA, 2 μ l of reverse transcriptase buffer (10 X) supplemented with dNTPs (0.5 mM each), oligo (dT) primers (2.5 μ M), RNase inhibitor (10 units) and Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen). The first strand DNA synthesis was carried out at 37°C for 60 min. PCR amplification was performed in 50 μ l volume using 5 μ l PCR Buffer Hot Star (10 X), 10 μ l Q Solution (5 X), dNTPs (200 μ M), 0.4 μ M of each corresponding primer and 2.5 units of TAQ™ DNA Polymerase (Qiagen). The PCR amplifications were performed using a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) under the following profile: 28-35 cycles of amplification were used at 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 40 s. Amplicons were visualized on standard ethidium bromide stained 1.5% agarose gel and analyzed using Scion Image software (29).

THP-1 Cell Adhesion Assay

HUVEC were seeded in 6-well plates 48 hours before the experiment. Only confluent HUVEC monolayers were used, as confirmed by microscopic inspection. THP-1 cells were incubated in 6 ml supplemented RPMI 1640 medium containing 10 μ g/ml of the fluorescence dye 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM) (Molecular Probes, Eugene, Oregon) at 37°C for 20 minutes. Dye loading was stopped by addition of 44 ml RPMI 1640 with 5% FBS. Fluorescence-labeled cells were resuspended (10^6 /ml) in supplemented EBM media without FBS. Before addition of THP-1 cells, HUVEC were washed with

supplemented EBM media without FBS and then stimulated with TNF- α (100 U/ml) for 3 hours. A suspension of THP-1 cells containing or not iron/ascorbate and the antioxidant Trolox was added to HUVEC for an incubation of 20 minutes at 37°C. After, the THP-1 suspension was withdrawn and thoroughly washed with PBS. Cells were lysed with lysis buffer (pH 8) and fluorescence was measured by a Luminescence Spectrometer LS 50 (Perkin Elmer Instruments, Waltham MA) (excitation, 485 nm; emission, 535 nm). Adherent cells per well were calculated by comparing the determined fluorescence to a standard curve of THP-1 labeled with BCECF-AM (2; 49).

Statistical analysis

Data from the experiments were analyzed with SPSS Software 11.0 using ANOVA test. Reported values are expressed as means \pm SD. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

RESULTS

MDA generation in HUVEC after iron/ascorbate exposure

The effectiveness of iron/ascorbate in initiating lipid peroxidation was tested after incubation with HUVEC cells. At the end of a 4-h culture period, the degree of lipid peroxidation was determined by measuring MDA in cells. As illustrated in Figure 1A, iron/ascorbate promotes the production of peroxidation above control values. The formation of MDA was 27-fold higher ($P < 0.001$) in the presence than in the absence of iron/ascorbate. Neither iron nor ascorbate alone could induce marked lipid peroxidation (data not shown). The efficiency of powerful antioxidants in preventing or reducing lipid peroxidation induced by iron/ascorbate was also evaluated. Trolox significantly ($P < 0.002$) suppressed cellular peroxidation (3.5-fold) induced by iron/ascorbate at the concentration tested (Figure 1A), without any toxic effect as shown by the MTT test (data not shown). However, BHT, known as a powerful antioxidant either in ethanol or DMSO, was less efficient and even deleterious for the cell viability (results not shown). Thus, Trolox was chosen for the subsequent experiments. Since oxidative stress has been shown to lead to activation of phospho-p38 MAPK (21; 53), we determined phospho-p38 MAPK levels in HUVEC homogenates following the administration of iron/ascorbate. By Western blot, we could document a substantial elevation in lipid peroxidation (Figure 1B). We, therefore, selected this concentration of iron/ascorbate and Trolox for the subsequent studies since it does not represent a pharmacological dose. Importantly, cells were incubated with iron/ascorbate for limited periods of time (4

and 8 hours) since longer exposition to iron/ascorbate led to HUVEC morphologic changes and loss of cell adherence.

Cholesterol influx and efflux in HUVEC

We next investigated if cholesterol flux is influenced by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. HUVEC endothelial cells were exposed to iron/ascorbate with or without the antioxidant Trolox for 4 h and were incubated for 2 h with 25 mg of protein/ml oxLDL-[³H]-cholesteryl ether and cholesterol influx was then measured. As shown in Figure 2A, the incorporation of oxLDL-[³H]-cholesteryl ether remained unchanged either with iron/ascorbate or antioxidant. Similarly, cholesterol efflux to HDL₃ after loading cells with [³H]-cholesteryl oleate albumin and washing was not altered by iron/ascorbate (Figure 2B). We concluded that lipid peroxidation did not affect the influx and efflux processes.

Assessment of gene and protein expression of ABCA1, SR-BI and LOX-1 in HUVEC

We attempted to define the status of lipoprotein-cholesterol receptors in HUVEC cells following exposure to iron/ascorbate. To this end, ABCA1 was characterized as the rate limiting unidirectional cellular cholesterol exporter. Similarly, we evaluated mRNA and protein mass of SR-BI that may promote the bidirectional flux of free cholesterol between HUVEC cells and lipoproteins and/or the selective uptake of esterified cholesterol, and of LOX-1 implicated in oxidized lipid uptake. Gene expression of ABCA1 was diminished by iron/ascorbate, but only after a 8 hour-incubation period (Figure 3A) and Trolox was able to partially, but not significantly, prevent the iron/ascorbate-induced ABCA1 fall. On the other hand,

no significant modifications were noted in protein expression of ABCA1 (Figure 3B) following the incubation of HUVEC with iron/ascorbate. Similarly, no significant alterations were recorded in mRNA and protein mass of SR-BI or LOX-1 (data not shown).

Gene Expression of nuclear factors in HUVEC

We further tested PPARs and LXRs, which are nuclear receptors extensively involved in the control of lipid metabolism. The mRNA levels of PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ , LXR α , and LXR β were quantified by RT-PCR. Iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation was unable to induce changes in these nuclear factors in comparison to controls (Figure 4).

Gene Expression of adhesion molecules in HUVEC

Since atherosclerosis is characterized by adhesion and transendothelial migration of monocytes, we have analyzed the gene expression of adhesion molecules that strongly promote this process. Iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation did not affect the status of VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin (Figure 5).

Co-culture of endothelial cells and monocytes

Interactions between endothelial cells and monocytes in the vascular wall appear to be important in determining vascular function and remodeling (42; 44). Since cell-cell interaction is an essential component of atherosclerotic plaque development, it was valuable to find out how oxidative stress influences contact co-culture of endothelial cells with monocytes. Figure 6 showed that iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation augmented cell adhesion of THP-1 and HUVEC. Under these experimental conditions, there was an increase of ICAM-1, E-selectin and MCP-1

gene expression, whereas endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA was diminished and VCAM-1, P-selectin and LOX-1 remained unchanged (Figure 7).

DISCUSSION

Oxidative damage to LDL is known to accelerate the development of atherosclerosis through the formation of foam cells (40) and auto antibodies against oxLDL (11). However, the effect of oxidative stress per se on contributing factors in atherosclerosis is poorly documented. We have therefore evaluated the impact of iron/ascorbate on endothelial cells and consequently reported an appreciably raised concentration of MDA without any change in cholesterol influx/efflux and lipoprotein-cholesterol receptors (such as SR-BI, ABCA1 and LOX-1), as well as the gene expression of nuclear receptors (including PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ , LXR α , and LXR β) and the level of VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin mRNA. On the other hand, iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation enhanced cellular adhesion of HUVEC and THP-1 along with an increase in ICAM-1, E-selectin and MCP-1 gene expression, a decline in eNOS and invariable alteration in VCAM-1, P-selectin and LOX-1.

Both ABCA1 and SR-BI are known as apolipoprotein (apo) A-I- or high-density lipoprotein (HDL)-binding proteins. ABCA1 has been identified as the primary gatekeeper for eliminating tissue cholesterol, since it mediates the efflux of phospholipids and cholesterol onto apo A-I (3; 5; 23). Its activity is rate limiting for HDL biogenesis in the liver and helps to maintain the cholesterol homeostasis of macrophages in the vascular wall (48; 51). SR-BI is an HDL receptor that can mediate selective uptake of HDL cholesteryl esters by cells (20) but can also promote cellular free cholesterol efflux to HDL and the reorganization of a cholesterol oxidase-sensitive pool of cellular cholesterol (50). In addition, SR-BI contributes to the activation of endothelial nitric oxide synthase by HDLs (52).

Our data confirmed the presence of ABCA1 (15) and SR-BI (52) in endothelial cells, but could not demonstrate any modification of ABCA1 and SR-BI expression by oxidative stress. Accordingly, the influx and efflux of cholesterol was not changed by oxidative stress. Therefore, our results suggest that oxidative stress differently operates in endothelial cells than in macrophages in view of our recent studies showing that exposure of THP-1 macrophages to iron/ascorbate decreased cholesterol efflux and diminished the gene and protein expression of ABCA1 (30).

LOX-1 is the major oxLDL receptor found on endothelial cells (7; 43). LOX-1 mediates the internalization of oxLDL into cells and can induce endothelial cell dysfunction that is believed to constitute an early step in the development of atherosclerosis (19). The expression of LOX-1 enhances a variety of intracellular processes that lead to expression of adhesion molecules, to which inflammatory cells attach, and endothelial activation, which affects a variety of gene expression such as endothelial constitutive eNOS and MCP-1 (18; 32-34). However, in the present investigation, iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation did not regulate the expression of LOX-1 and did not affect the status of VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin. Furthermore, nuclear receptors represent a large super family of ligand-dependent transcription factors that regulate the expression of target genes to affect diverse lipid-metabolic processes. Upon activation by specific ligands, LXRs and PPARs form obligate heterodimers with the retinoid X receptor (RXR) and bind to LXR or PPAR response elements located in the promoter region of their target genes. PPARs and LXRs control the transcription of a number of

specific genes involved in central pathways in cholesterol metabolism, transport, and elimination (28; 31). For example, oxLDL inhibited apo A-I-mediated cholesterol efflux in endothelial cells and suppressed ABCA1 at the protein and mRNA levels in HUVECs by decreasing ABCA1 promoter activity via a ligand-dependent inhibition of LXR (55). Our observations could not reveal any modifications in the gene expression of these nuclear receptors by the presence of oxidative stress. Overall, the pro-inflammatory and pro-atherogenic effects of oxLDL are not observed with iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation.

In our studies, we used HUVEC as a model of endothelial cells given the ready availability, ease of preparation, and extensive literature on these cells. HUVEC have been employed to study a range of important pathophysiological processes, including immune-endothelial interactions, endothelial dysfunction related to atheroma formation and angiogenic sprouting, and capillary lumen formation (36). In particular, HUVEC have been crucial for the investigation of endothelial cell involvement in the diverse steps of atherosclerosis development. In fact, several reports have recently emphasized the direct impact of oxLDL on the endothelium (12), vasorelaxation factors (16), shear stress response (6), and inflammation effectors (41; 54). However, additional studies are necessary before extrapolating our findings to humans.

Much evidence supports a pivotal role for inflammation in all phases of atherosclerosis and the major cellular participants include immune cells. Monocytes and macrophages are critical cells present at all stages of atherogenesis and, when stimulated, can produce biologically active mediators

that have a profound influence on the progression of atherosclerosis. Our studies showed that oxidative stress promotes monocyte adhesion to endothelial cells and the direct cell-cell interaction resulted in high levels of the gene expression of ICAM-1, E-selectin and MCP-1, whereas eNOS mRNA was diminished. To our knowledge, this is the first report that documents the significant contribution of iron/ascorbate mediated lipid peroxidation as a potentially injurious stimulus for the endothelium without the involvement of oxLDL. Under our experimental conditions, the concomitant presence of oxidative stress and monocytes was necessary for the induction of chemotactic factors and the down-regulation of eNOS, which may compromise the health of the endothelium in vivo situation.

Overall, our studies show that, contrary to THP-1 macrophages, cholesterol metabolism and cellular inflammatory responses are not altered by oxidative stress in HUVEC. However, in the presence of monocytes, HUVEC respond to oxidative stress in a pro-inflammatory manner, suggesting that monocyte priming is necessary to HUVEC reaction.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Canadian Institutes of Health Research (MOP 49433) and Canadian Diabetes Association (OG-2-07-2422-EL). The authors thank Mrs Schohraya Spahis for her technical assistance.

REFERENCES

1. Ames BN, Shigenaga MK and Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7915-7922, 1993.
2. Bernardo J, Brennan L, Brink HF, Ortiz MF, Newburger PE and Simons ER. Chemotactic peptide-induced cytoplasmic pH changes in incubated human monocytes. *J Leukoc Biol* 53: 673-678, 1993.
3. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ and Schmitz G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 22: 347-351, 1999.
4. Botella LM, Puig-Kroger A, Almendro N, Sanchez-Elsner T, Munoz E, Corbi A and Bernabeu C. Identification of a functional NF-kappa B site in the platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter. *J Immunol* 164: 1372-1378, 2000.
5. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van DM, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Shbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J, Jr. and Hayden MR. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 22: 336-345, 1999.

6. Burns AR, Zheng Z, Soubra SH, Chen J and Rumbaut RE. Transendothelial flow inhibits neutrophil transmigration through a nitric oxide-dependent mechanism: Potential role for cleft shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007.
7. Chen M, Masaki T and Sawamura T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 95: 89-100, 2002.
8. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D and Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 9: 899-909, 1995.
9. Courtois F, Suc I, Garofalo C, Ledoux M, Seidman E and Levy E. Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G12-G19, 2000.
10. Dargel R. Lipid peroxidation--a common pathogenetic mechanism? *Exp Toxicol Pathol* 44: 169-181, 1992.
11. Faviou E, Vourli G, Nounopoulos C, Zachari A and onyssiou-Asteriou A. Circulating oxidized low density lipoprotein, autoantibodies against them and homocysteine serum levels in diagnosis and estimation of severity of coronary artery disease. *Free Radic Res* 39: 419-429, 2005.
12. Florian M and Magder S. Estrogen decreases TNF-alpha and oxidized LDL induced apoptosis in endothelial cells. *Steroids* 2007.

13. Frostegard J, Haegerstrand A, Gidlund M and Nilsson J. Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. *Atherosclerosis* 90: 119-126, 1991.
14. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1876-1890, 2001.
15. Hassan HH, Denis M, Krimbou L, Marcil M and Genest J. Cellular cholesterol homeostasis in vascular endothelial cells. *Can J Cardiol* 22 Suppl B: 35B-40B, 2006.
16. Jantzen F, Koneman S, Wolff B, Barth S, Staudt A, Kroemer HK, Dahm JB, Felix SB and Landsberger M. Isoprenoid depletion by statins antagonizes cytokine-induced down-regulation of endothelial nitric oxide expression and increases NO synthase activity in human umbilical vein endothelial cells. *J Physiol Pharmacol* 58: 503-514, 2007.
17. Kaur J, Woodman RC and Kubes P. P38 MAPK: critical molecule in thrombin-induced NF-kappa B-dependent leukocyte recruitment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1095-H1103, 2003.
18. Kita T. LOX-1, a possible clue to the missing link between hypertension and atherogenesis. *Circ Res* 84: 1113-1115, 1999.
19. Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, Moriwaki H, Kataoka H, Nishi E, Horiuchi H, Arai H and Yokode M. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 947: 199-205, 2001.

20. Krieger M. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem* 68: 523-558, 1999.
21. Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB and Colucci WS. H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol* 35: 615-621, 2003.
22. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T and Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 103: 1282-1288, 2001.
23. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM and Oram JF. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* 104: R25-R31, 1999.
24. Levy E, Rizwan Y, Thibault L, Lepage G, Brunet S, Bouthillier L and Seidman E. Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 71: 807-815, 2000.
25. Levy E, Thibault L, Garofalo C, Messier M, Lepage G, Ronco N and Roy CC. Combined (n-3 and n-6) essential fatty deficiency is a potent modulator of plasma lipids, lipoprotein composition, and lipolytic enzymes. *J Lipid Res* 31: 2009-2017, 1990.

26. Levy E, Thibault L, Roy CC, Letarte J, Lambert M and Seidman EG. Mechanisms of hypercholesterolaemia in glycogen storage disease type I: defective metabolism of low density lipoprotein in cultured skin fibroblasts. *Eur J Clin Invest* 20: 253-260, 1990.
27. Libby P, Ridker PM and Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135-1143, 2002.
28. Lu TT, Repa JJ and Mangelsdorf DJ. Orphan nuclear receptors as eLiXiRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J Biol Chem* 276: 37735-37738, 2001.
29. Marcil V, Delvin E, Garofalo C and Levy E. Butyrate impairs lipid transport by inhibiting microsomal triglyceride transfer protein in Caco-2 cells. *J Nutr* 133: 2180-2183, 2003.
30. Marcil V, Delvin E, Sane AT, Tremblay A and Levy E. Oxidative stress influences cholesterol efflux in THP-1 macrophages: role of ATP-binding cassette A1 and nuclear factors. *Cardiovasc Res* 72: 473-482, 2006.
31. Marx N, Duez H, Fruchart JC and Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res* 94: 1168-1178, 2004.
32. Mehta JL. The role of LOX-1, a novel lectin-like receptor for oxidized low density lipoprotein, in atherosclerosis. *Can J Cardiol* 20 Suppl B: 32B-36B, 2004.
33. Mehta JL, Hu B, Chen J and Li D. Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular

- superoxide radical generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 2203-2208, 2003.
34. Moriwaki H, Kume N, Kataoka H, Murase T, Nishi E, Sawamura T, Masaki T and Kita T. Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human and murine macrophages: upregulated expression by TNF-alpha. *FEBS Lett* 440: 29-32, 1998.
 35. Murohara T, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Ohta Y and Yasue H. LPC in oxidized LDL elicits vasocontraction and inhibits endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol* 267: H2441-H2449, 1994.
 36. Nakatsu MN, Sainson RC, Aoto JN, Taylor KL, Aitkenhead M, Perez-del-Pulgar S, Carpenter PM and Hughes CC. Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and Angiopoietin-1. *Microvasc Res* 66: 102-112, 2003.
 37. O'Connell BJ, Denis M and Genest J. Cellular physiology of cholesterol efflux in vascular endothelial cells. *Circulation* 110: 2881-2888, 2004.
 38. Otto M, Hansen SH, Dalgaard L, Dubois J and Badolo L. Development of an in vitro assay for the investigation of metabolism-induced drug hepatotoxicity. *Cell Biol Toxicol* 2007.
 39. Pan J and McEver RP. Regulation of the human P-selectin promoter by Bcl-3 and specific homodimeric members of the NF-kappa B/Rel family. *J Biol Chem* 270: 23077-23083, 1995.

40. Parthasarathy S, Quinn MT, Schwenke DC, Carew TE and Steinberg D. Oxidative modification of beta-very low density lipoprotein. Potential role in monocyte recruitment and foam cell formation. *Arteriosclerosis* 9: 398-404, 1989.
41. Rodriguez C, Alcludia JF, Martinez-Gonzalez J, Raposo B, Navarro MA and Badimon L. Lysyl oxidase (LOX) down-regulation by TNFalpha: A new mechanism underlying TNFalpha-induced endothelial dysfunction. *Atherosclerosis* 2007.
42. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809, 1993.
43. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T and Masaki T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386: 73-77, 1997.
44. Simionescu M and Simionescu N. Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration. *FASEB J* 7: 1359-1366, 1993.
45. Suc I, Brunet S, Mitchell G, Rivard GE and Levy E. Oxidative tyrosylation of high density lipoproteins impairs cholesterol efflux from mouse J774 macrophages: role of scavenger receptors, classes A and B. *J Cell Sci* 116: 89-99, 2003.
46. Takehana K, Konishi A, Oonuki A, Noguchi M, Fujita K, Iino Y and Kobayashi T. APC0576, a novel inhibitor of NF-kappaB-dependent gene activation, prevents pro-inflammatory cytokine-induced chemokine

- production in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 945-952, 2002.
47. Takei A, Huang Y and Lopes-Virella MF. Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein. Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL. *Atherosclerosis* 154: 79-86, 2001.
 48. Van EM, Pennings M, Hoekstra M, Out R and Van Berkel TJ. Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 16: 307-315, 2005.
 49. Weber C, Erl W, Pietsch A, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW and Weber PC. Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor-kappa B mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. *Arterioscler Thromb* 14: 1665-1673, 1994.
 50. Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, de IL-M, Phillips MC and Rothblat GH. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 712-719, 2003.
 51. Yokoyama S. Assembly of high density lipoprotein by the ABCA1/apolipoprotein pathway. *Curr Opin Lipidol* 16: 269-279, 2005.
 52. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH and Shaul PW. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 7: 853-857, 2001.

53. Zhang GX, Kimura S, Nishiyama A, Shokoji T, Rahman M, Yao L, Nagai Y, Fujisawa Y, Miyatake A and Abe Y. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. *Cardiovasc Res* 65: 230-238, 2005.
54. Zhou Z, Connell MC and MacEwan DJ. TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. *Cell Signal* 19: 1238-1248, 2007.
55. Zhu Y, Liao H, Xie X, Yuan Y, Lee TS, Wang N, Wang X, Shyy JY and Stemerman MB. Oxidized LDL downregulates ATP-binding cassette transporter-1 in human vascular endothelial cells via inhibiting liver X receptor (LXR). *Cardiovasc Res* 68: 425-432, 2005.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Lipid peroxidation and levels of phospho-p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) in HUVECs exposed to iron/ascorbate. HUVECs were incubated with 100 μM of Fe^{2+} and 1000 μM of ascorbate for 4 h at 37 °C. (A) Lipid peroxidation was monitored by measuring malondialdehyde (MDA) formation in cells. The effects of antioxidants Trolox on iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation were also tested. To this end, cells were incubated for 4 h with Trolox (0.5 mM) in addition to iron/ascorbate. Cells were then treated to determine MDA by HPLC. (B) Protein levels of phospho-p38 MAPK were determined by Western blotting. Values are means \pm SD for 4 different experiments.

*P < 0.002, **P < 0.001, ***P < 0.003, ****P < 0.02 vs controls.

FIGURE 2: Effect of iron/ascorbate on HUVEC cholesterol influx and efflux.

(A) After a 48-hour period allowing to reach confluence, cells were exposed for 4 hours to iron/ascorbate with or without the antioxidant substrates and were then incubated for 2 h at 37°C in 0.5 ml of supplemented EBM with 5% v/v LPDS containing [^3H]-cholesteryl hexadecyl ether-oxLDL (12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The cholesterol influx content was calculated

by assessing radioactivity in cell lysate. To determine the non-specific binding, cells and labeled-oxLDL were incubated in the presence of a 50-fold excess of unlabeled oxLDL. (B) Cells were incubated for 24 hours in 0.5 ml with BME supplemented with 5% v/v LPDS and 2.64×10^6 dpm/ml [^3H]-cholesteryl oleate albumin. After 16-hour equilibration period without radioactivity, cells were washed with PBS and treated for 4 hours with or without Fe^{2+} -ascorbate and antioxidants. Cells were washed again and incubated with HDL₃ (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hours

Values are means \pm SD for 5 or 6 separate experiments.

FIGURE 3: Influence of iron/ascorbate on gene and protein expression of ABCA1. HUVECs were exposed to iron/ascorbate and antioxidants for 4 h and 8 h at 37 °C. Thereafter, mRNA and protein levels of ABCA1 were determined by (A) RT-PCR and (B) Western blotting. Values are means \pm SD for 5 separate experiments.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.004$ vs controls.

FIGURE 4: Effect of iron/ascorbate on nuclear factors. Iron/ascorbate was administered to HUVECs in the presence or absence of Trolox. Following the period culture of 4 h and 8 h, mRNA levels of (A) PPAR α , (B) PPAR β/δ , (C) PPAR γ , (D) LXR α , and (E) LXR β were examined by RT-PCR as

described in Methods. Values are means \pm SD for 5 to 8 separate experiments.

FIGURE 5: Effect of iron/ascorbate on adhesion molecules. Iron/ascorbate was administered to HUVECs in the presence or absence of Trolox. Following the incubation period of 4 h and 8 h, mRNA levels of (A) VCAM-1, (B) ICAM-1 and (C) E-selectin were examined by RT-PCR as described in Methods. Values are means \pm SD for 3 or 4 separate experiments.

FIGURE 6: Effects of iron/ascorbate on endothelial cell and monocyte interactions. After dyeing THP-1 monocytes with BCECF-AM as mentioned in the Method section, the THP-1 cell suspension containing or not iron/ascorbate and the antioxidant Trolox was gently loaded on HUVEC for an incubation of for 20 minutes at 37°C. After washing, fluorescence was measured by a Luminescence Spectrometer LS 50 (Perkin Elmer Instruments, Waltham MA) (excitation, 485 nm; emission, 535 nm). The number of adherent cells per well was calculated by comparing the obtained fluorescence to a standard curve of THP-1 labeled with BCECF-AM. Values are means \pm SD for 4 separate experiments.

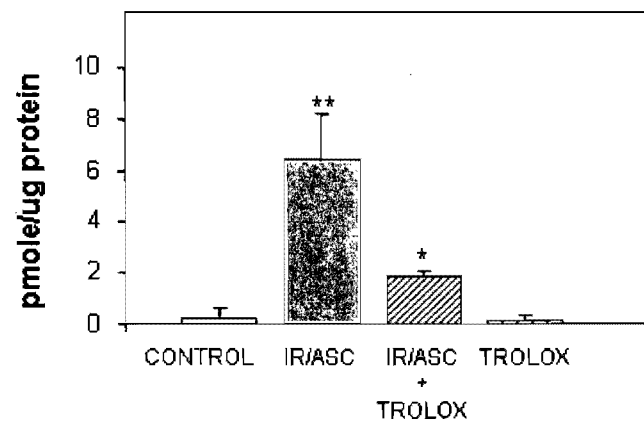
*P < 0.05 vs controls.

FIGURE 7: Effect of iron/ascorbate on endothelial adhesion molecules in the presence of THP-1 monocytes. A cell suspension of monocytes containing iron/ascorbate was added to HUVECs in the presence or absence of Trolox. Following the 20-minute incubation period culture with monocytes, the mRNA was isolated from the co-cultures and the levels of (A) VCAM-1, (B) ICAM-1, (C) E-selectin, (D) P-selectin, (E) LOX-1, (F) eNOS and (G) MCP-1 were examined by RT-PCR as described in Methods. Values are means \pm SD for 3 or 4 separate experiments.

* P < 0.01, ** P < 0.02 vs controls

Figure 1

A



B

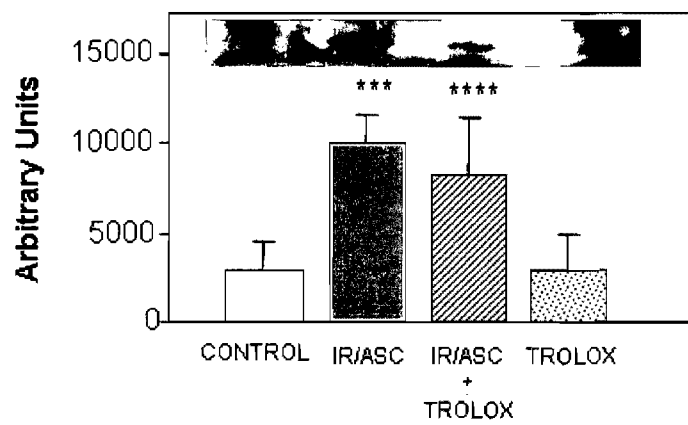


Figure 2

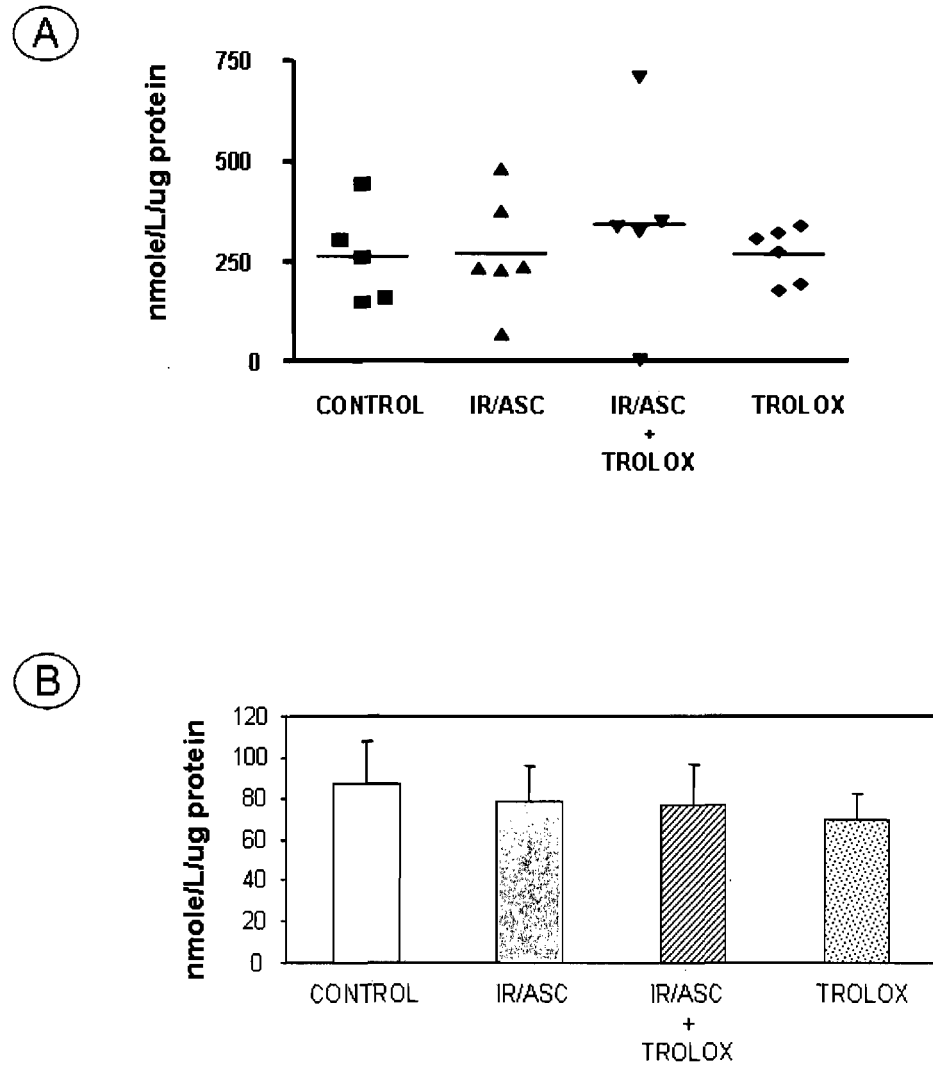


Figure 3

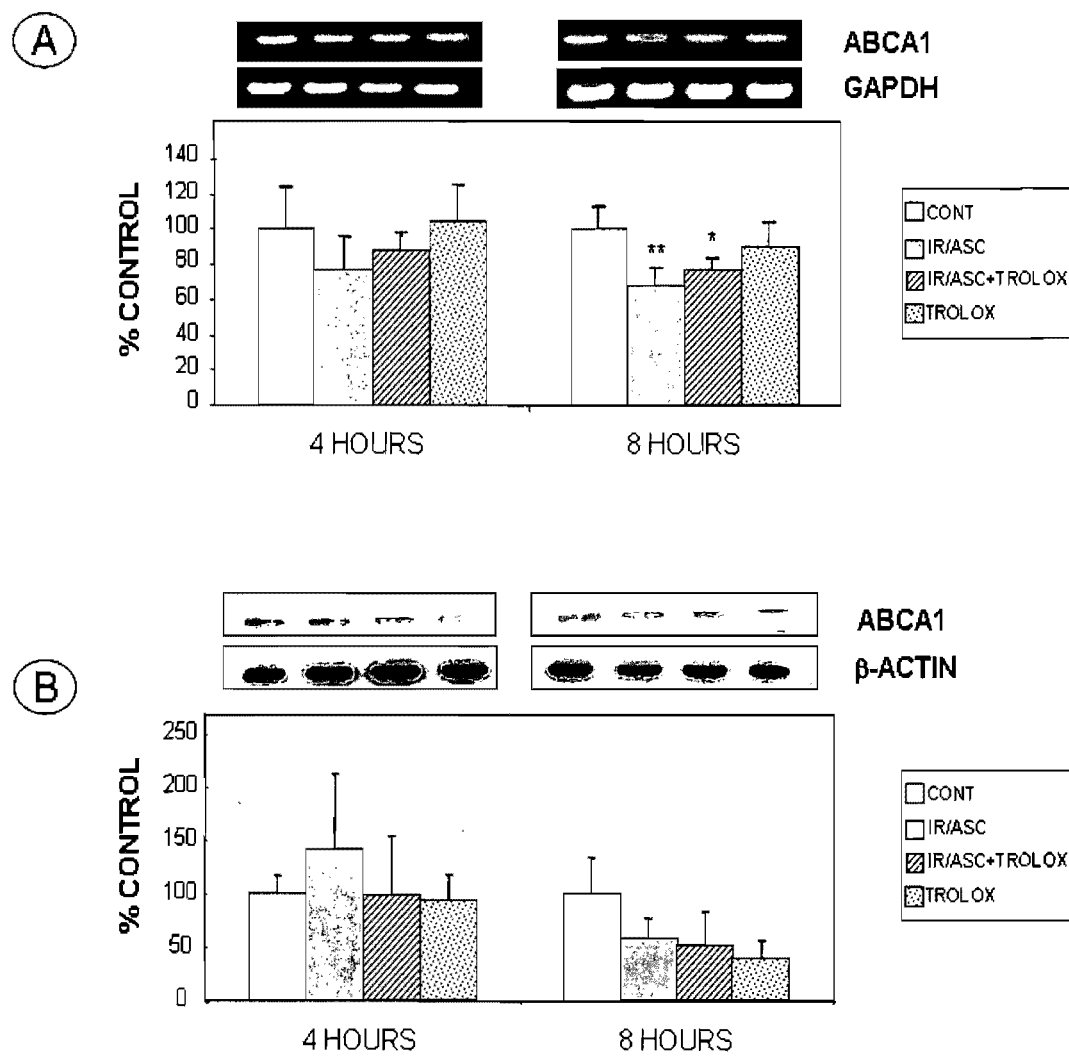


Figure 4

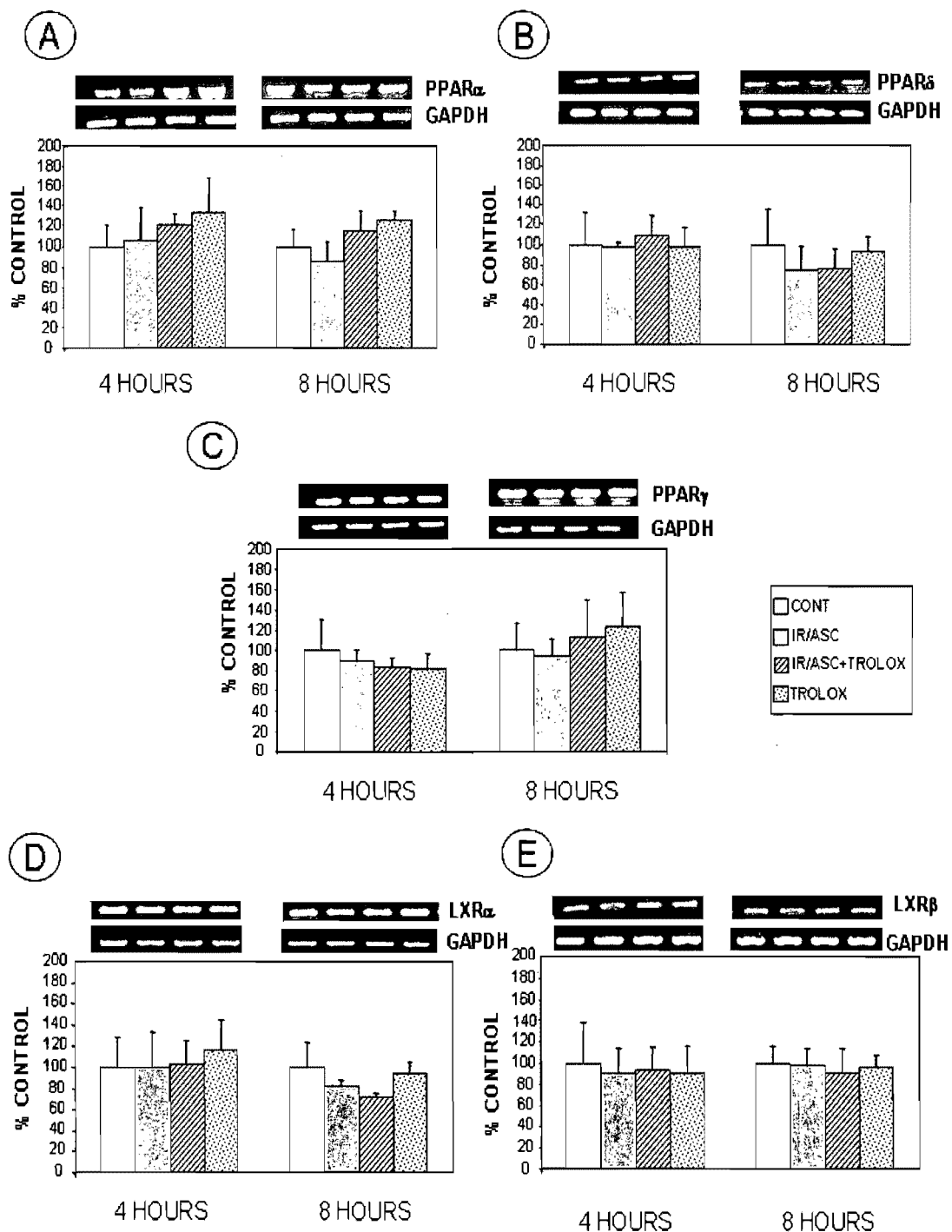


Figure 5

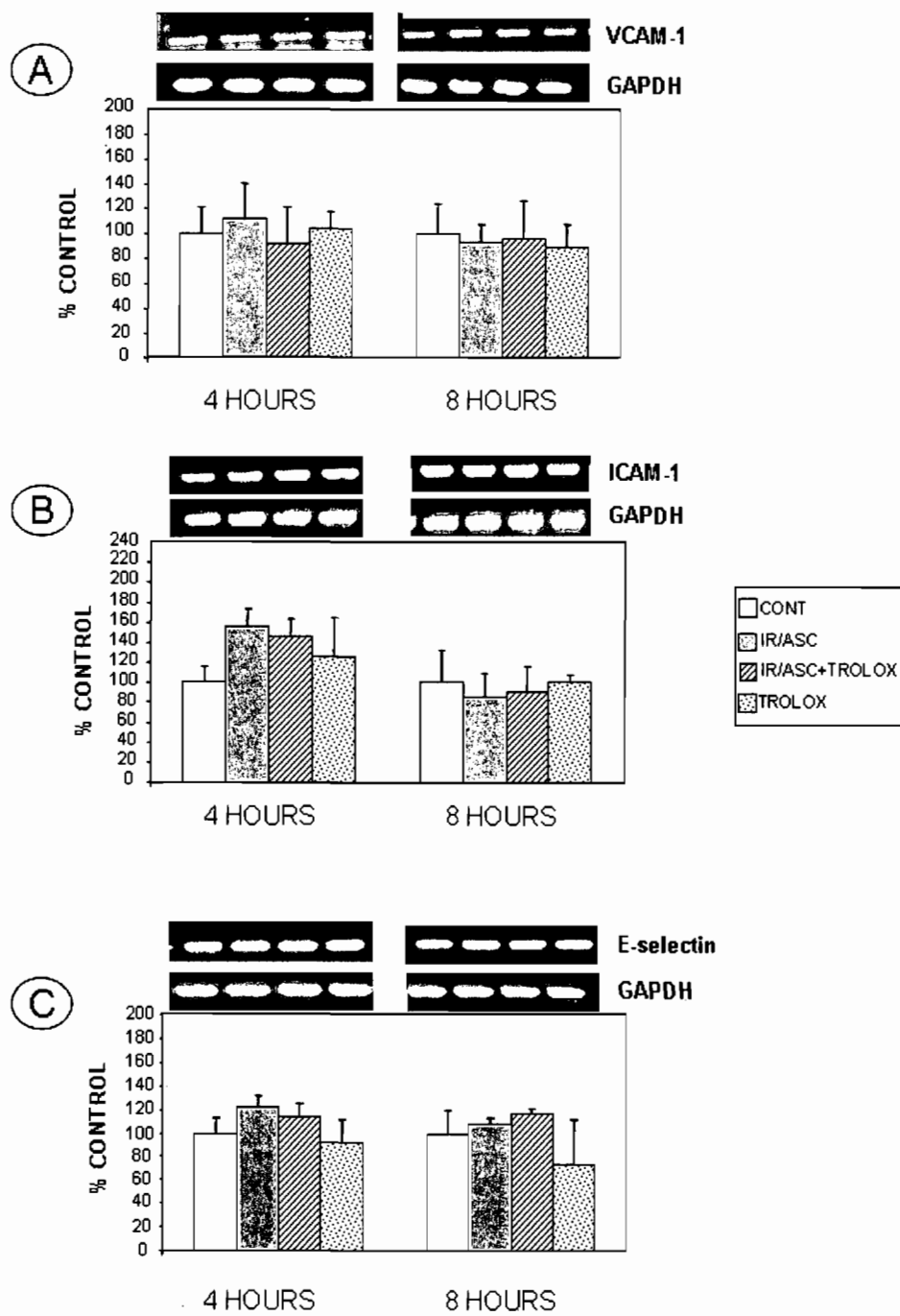


Figure 6

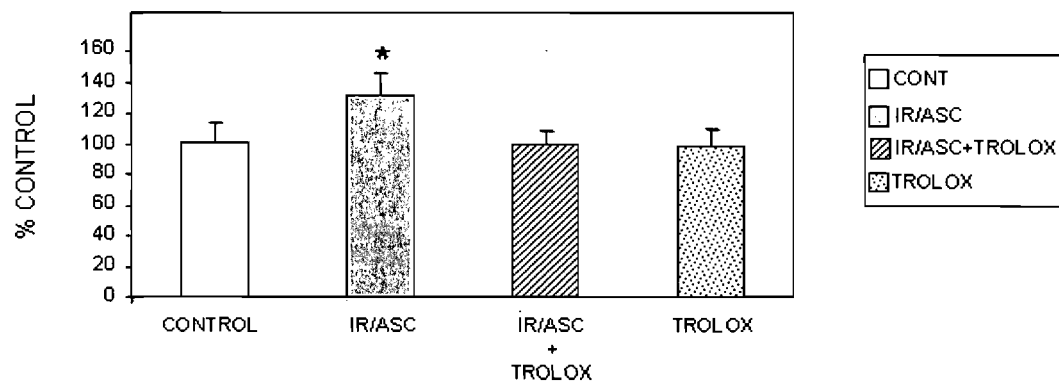
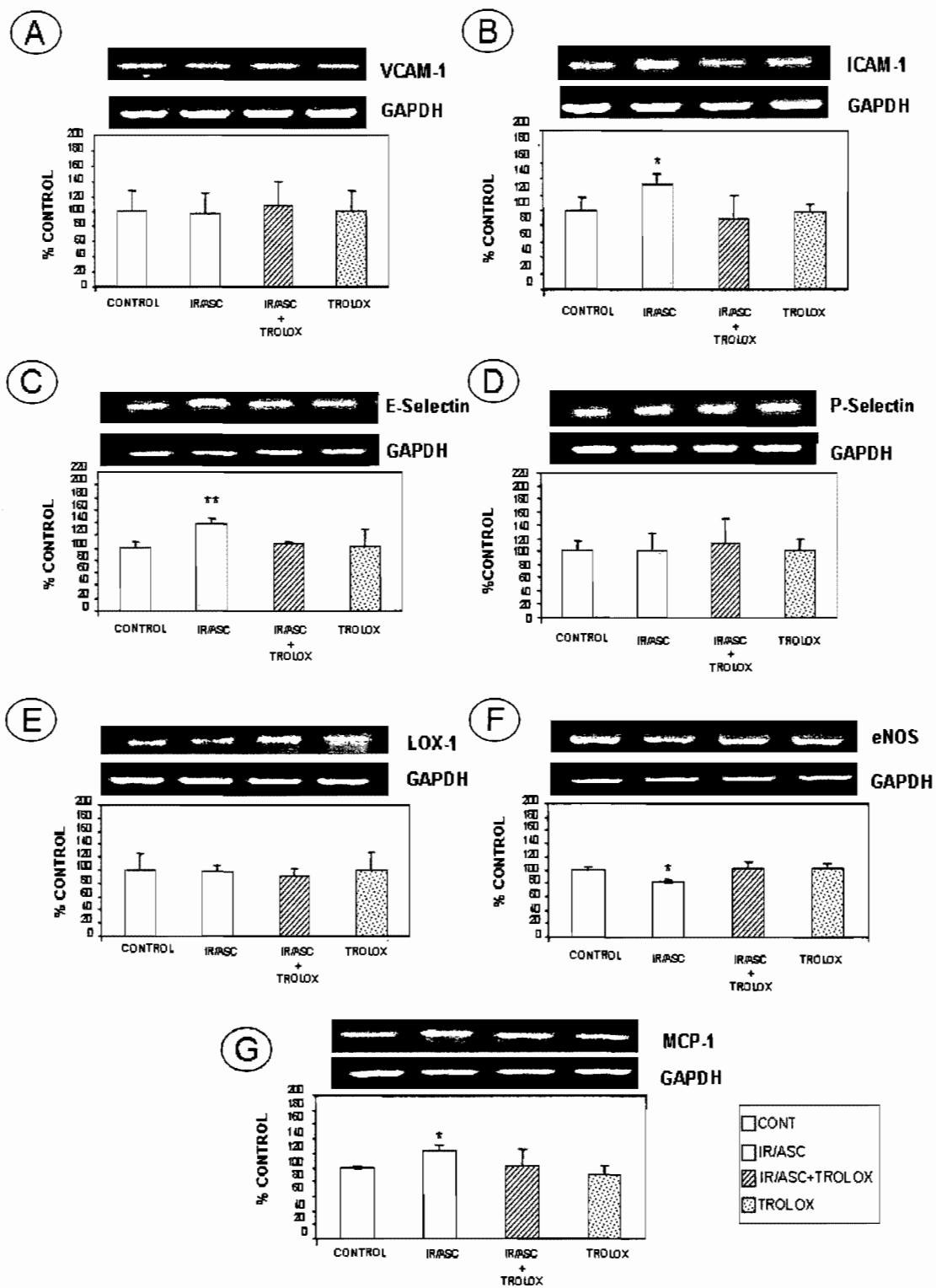


Figure 7



5. ARTICLE 3

Article soumis à Antioxidants & Redox Signaling, janvier 2008

Analysis of the effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage, antioxidant response and inflammation in THP-1 macrophages

Valérie Marcil,^{1,2} Edgard Delvin,^{1,3} Mounib Elchebly,^{1,3} Jean-Claude Lavoie,^{1,4} Ernest Seidman,⁵ and Emile Levy^{1,2 *}

⁽¹⁾Research Centre, CHU-Sainte-Justine, Departments of ⁽²⁾Nutrition, ⁽³⁾Biochemistry and ⁽⁴⁾Pediatrics, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada, H3T 1C5.

⁵Research Institute, McGill University, Campus MGH, C10.148.6, Montreal Quebec, Canada

Running Head: Antioxidant & inflammatory responses to lipid peroxidation

Address correspondence to:

Dr. Emile Levy
Centre de Recherche
CHU-Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine
Montréal, Québec, Canada H3T 1C5
Tel.: (514) 345-4626
Fax: (514) 345-4999
E-mail: [REDACTED]

ABSTRACT

Although, oxidative stress has over the past few decades been underscored for its importance to human health and diseases, limited information is available concerning its direct role on macrophages. This study aims to test the susceptibility of THP-1 macrophages to develop oxidative stress and to deploy antioxidant defense mechanisms that insure the balance between the pro- and anti-oxidant molecules. Iron-ascorbate promoted the production of lipid peroxidation as reflected by the formation of malondialdehyde and H₂O₂ along with reduced polyunsaturated fatty acid levels and elevated glutathione disulfide/total glutathione ratio, a reliable index of cellular redox status. In response of iron-ascorbate-induced lipid peroxidation, THP-1 macrophages developed an increase in cytoplasmic SOD activity due in part to the cytoplasmic SOD1. On the other hand, a decline was noted in mRNA and protein of extracellular SOD3, activity of GSH-peroxidase, GSH-transferase and ATOX-1 expression, along with unchanged transcript levels of γ -glutamylcysteine synthetase, glutathione synthetase and γ -glutamyltransferase. Additionally, iron-ascorbate-mediated oxidative stress degraded the inhibitory molecule I κ B that keeps NF- κ B inactive, which induced the production of cytokine TNF- α . In conclusions, macrophages activated under conditions of oxidative stress do not adequately deploy a powerful endogenous antioxidant response, a situation that can lead to an enhanced inflammatory response.

Key words: Antioxidant enzymes, NF- κ B, redox status, PUFA, TNF- α

INTRODUCTION

There is a great deal of evidence that oxygen-derived free radicals are important mediators of inflammation and tissue injury. Reactive oxygen species (ROS) play a vital role in most immune cells, as they are used as signaling molecules (16, 19, 47). However, their overproduction are known to play a crucial role in the pathogenesis of many cardiovascular diseases, including endothelial dysfunction, atherosclerosis, hypertension, diabetes, (23), which may involve DNA damage, oxidative modification of proteins and altered lipid structure (46). Normally, cells struggle to efficiently remove ROS in order to avoid deleterious effects. To this end, several enzymes scavenge the ROS accumulated in the cells. For example, the superoxide dismutase enzyme (SOD) acts as an endogenous cellular defense system that converts superoxide anions into oxygen and hydrogen peroxide, with the latter being further detoxified by catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx).

In early stages of atherosclerosis, oxidized lipoproteins are taken up by macrophages resulting in foam cell formation. This phenomenon activates macrophages that can further contribute to LDL modifications with the consequent acceleration of atherosclerosis development (42). Furthermore, macrophages react by producing ROS such as superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH) among others, in response to phagocytosis or stimulation by different agents (18), which contribute to the pathogenesis of diseases, including inflammation and atherosclerosis. Although oxidative stress has over the past few decades been underscored for its

importance to human health and diseases, limited information is available concerning its direct role on macrophages. Additionally, how the antioxidant reserves of macrophages respond to oxidative stress remains unclear. If the intracellular defense has gained widespread scientific acceptance, the ability of macrophages to deploy its protection assortment against destructive molecules has not been thoroughly investigated. It appears quite essential to define the antioxidant behavior of macrophages in order to grasp a clearer picture pertaining to the interruption of the vicious cycle induced by ROS. The transition metal iron is tightly sequestered in transport and storage of proteins and prosthetic groups, but its participation is significant in the generation of oxidative stress. Markedly elevated levels of iron have been detected in advanced atherosclerotic plaques and are compatible with iron-catalyzed oxidation reaction (34). Because the production of ROS in macrophages provides a redox environment in which transition metals can fully realize their pro-oxidant potential, we have exposed macrophages to iron-ascorbate (Fe/As), a widely used oxygen-radical generating system (8, 37). The ultimate purpose of our study was to test both the susceptibility of macrophages to develop oxidative stress and the responsiveness of defense mechanisms that insure the proper balance between the pro-oxidant and antioxidant molecules.

METHODS

Cell Culture

THP-1 human monocytes (American Type Culture Collection (ATCC) TIB 202) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.05 mM 2-mercaptoethanol. The cell line was cultivated at 37°C, 95% humidity and 5% CO₂ and used between passages 4 and 12. Cells (10×10⁶) were differentiated into macrophages by the addition of phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma) (100 ng/ml) for a 72-hour period.

Estimation of Lipid Peroxidation

THP-1 cells were incubated in the presence or absence of iron-ascorbate (100/1000 µM) or H₂O₂ (1000 µM) and the antioxidants: Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,9-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid, Sigma) (0.5 mM), butylated hydroxytoluene (2,6-di-*t*-butyl-*p*-cresol, BHT, Sigma) (0.5 mM), α-Tocopherol (Sigma) (0.5 mM) and NAC (N-Acetyl-L-cysteine, NAC, Sigma) (5 mM). Ethanol (ETOH) (1%) was used as a carrier control for the antioxidants. The reaction was terminated by the addition of 0.2% BHT to measure malondialdehyde (MDA), as an index of lipid peroxidation. The amount of free MDA formed during the reaction was determined by HPLC as described previously (14). Proteins were first precipitated with a 10% sodium Tung state (Na₂WO₄) solution (Aldrich Chemical), and protein-free supernatant was then reacted with an isovolume of 0.5% thiobarbituric acid solution (Sigma) at 90°C for 60 min. After cooling to room temperature, chromo gene was extracted with 1-

butanol and dried over a stream of nitrogen at 37°C. The dry extract was then resuspended in a KH_2PO_4 /methanol (70:30, pH 7.0) mobile phase before MDA detection by HPLC.

Fatty Acid Composition

Cells were incubated in the presence or absence of iron-ascorbate and antioxidants and then homogenised in PBS (Gibco) containing 0.005% (weight/volume) BHT. For trans-esterification, an internal standard consisting of 14.952 μg nonadecenoic acid (C19:1) was precisely weighed, dissolved in 2 ml of methanol-hexane 4:1 (v/v), and added to 100 μl of cell homogenate. Then acetyl chloride (200 μl) was slowly added. Each tube was tightly closed and subjected to methanolysis at 100°C for 1 hour. After tubes had been cooled, 5 ml of 6% K_2CO_3 solution was slowly added to stop the reaction and neutralize the mixture. The tubes were then shaken and centrifuged, and an aliquot of the hexane upper phase was injected into the chromatograph as previously described (35), using the Varian 8400 GC Autosampler system (Cole-Parmer, Ill., Vernon Hills). The fatty acids were identified by comparison with the expected retention times of known standards and were analyzed with Galaxie Chromatography Data System software (Varian Inc., Palo Alto, Calif.).

Measurement of Glutathione Content

Cellular glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) content were measured by capillary zone electrophoresis (51). Briefly, THP-1 samples were homogenized with 1% metaphosphoric acid and centrifuged for 3 minutes at 10,000 g. The supernatant was frozen at -80°C until glutathione determination.

GSH and GSSG from samples were separated by capillary electrophoresis (P/ACE MDQ from Beckman Coulter, Mississauga, Canada) in a 75- μ m inner diameter \times 50 cm silica capillary using a pH 8.4 buffer [75 mM boric acid + 25 mM bis-TRIS), 28°C, 18 kV]. Glutathione was detected at 200 nm and quantified by comparison to standard GSH and GSSG curves.

Determination of Superoxide Dismutase Activity

The activity of the antioxidant enzyme SOD was measured in cell homogenates after incubation with iron-ascorbate. The total SOD activity was computed with the SOD determination kit (Fluka, Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. Cytoplasmic and mitochondrial SOD activity was discriminated using the Superoxide Dismutase Assay Kit II (Calbiochem) according to the manufacturer's protocol.

Regulatory Antioxidant Enzyme Activity

The activity of the antioxidant enzymes CAT, GPx, glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) were measured in cell homogenates after incubation with iron-ascorbate and/or the antioxidants. Briefly, a substrate for each enzyme was added to the cell homogenates and rates of disappearance of the substrate were measured by spectrophotometry. The method for enzyme quantification was adapted from the protocol reported by Pippenger et al. (43). For CAT activity, aliquots of cell homogenates were mixed with H₂O₂ (10 mM) as a substrate, and absorbance was read at 240 nm for 3 min. For seleno-dependant GPx activity, cell homogenates were mixed with a PBS-based working solution (pH 7.0) containing 1 mM GSH, 0.6 U GR (Sigma), and 100 mM β -

Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt (NADPH, Sigma) with a small quantity of tert-butyl hydroperoxide (Sigma) (1.5%) to initiate the reaction. To obtain non seleno-dependant GPx activity, the reaction was rather initiated with cumene hydroperoxide (Sigma) (0.5 mM). For GST activity, cell homogenates were resuspended in a PBS buffer solution (pH 6.5) containing 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and 15 mM GSH to initiate the reaction. For GR activity, cell homogenates were added to a solution containing 1 mM GSSG, 0.1 mM NADPH, and 1% triton in PBS, pH 7.6). For each of the glutathione enzymes, absorbency rate was measured in a spectrometer at 340 nm for 3 min.

Western Blot Analysis

To determine the protein expression of SOD1, SOD2, SOD3, I κ B and NF- κ B, cells were homogenized and proteins (30 μ g) were denatured at 95°C for 5 min in SDS dithiothreitol and β -mercaptoethanol-containing sample buffer, separated on a 4-7.5% gradient SDS/PAGE, and electroblotted onto Hybond-C Extra nitrocellulose membranes (Amersham) in 25 mM Tris and 192 mM glycine. Membranes were blocked in Tris-buffered saline [20 mM Tris-HCl (pH 7.5) plus 137 mM sodium chloride (NaCl)] containing 0.1% Tween 20 and 5% non fat dry milk for 60 min at room temperature. The blots were then incubated overnight at 4°C in blocking solution with the antibodies for SOD1 (Upstate) (1:1000), SOD2 (Upstate) (1:1000), SOD3 (Abcam) (1:1000), I κ B (Sigma-Aldrich) (1:000), NF- κ B (Sigma-Aldrich) (1:2000) and β -actin (Sigma-Aldrich) (1:5000). The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish

peroxidase-conjugated secondary antibodies. Blots were developed and the protein mass was quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and software.

RT-PCR Expression Analysis

Levels of specific mRNAs were assessed by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) under quantitative conditions. Total cellular RNA from macrophages was isolated using Trizol® Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The quantity and yield of the RNA were assessed by the 260:280-nm optical density ratio and by electrophoresis in 1.5% agarose gels and were viewed via ethidium bromide staining. Complimentary DNA was synthesized in a total volume of 20 µl, from RNA samples by mixing 2 µg of total RNA, 2 µl of reverse transcriptase buffer (10X) supplemented with dNTPs (0.5 mM each), oligo(dT) primers (2.5 µM), RNase inhibitor (10 units) and Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen). The first strand DNA synthesis was carried out at 37°C for 60 min. PCR amplification was performed in 50µl volume using 5 µl PCR Buffer (10X), 10 µl Q Solution (5X), dNTPs (200 µM), 0.4 µM of each corresponding primer and 2.5 units of TAQ™ DNA Polymerase (Qiagen). The PCR amplifications were performed using a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) under the following profile: 28 to 35 cycles of amplification were used at 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 40 s. Amplicons were visualized on standard ethidium bromide stained 1.5% agarose gel and analyzed using Scion Image software.

Measurement of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Cell Supernatants

To quantify amounts of supernatant TNF- α , cells were incubated with or without iron-ascorbate and the antioxidants Trolox and BHT. The supernatants were collected, centrifuged at 10,000 g, and then frozen at -80°C until dosage. TNF- α was measured using the Quantikine[®] Human TNF- α /TNFSF1A kit (R&D Systems) according to the manufacturer's protocol. Absorbance was measured at 450 nm using a Spectrophotometer microplate reader (Tecan, Switzerland), with a 540 nm correction wavelength. TNF- α content was calculated by referring to a standard TNF- α curve.

Measurement of Intra- and Extracellular H₂O₂

To quantify intra- and extracellular H₂O₂, cells were incubated with or without iron-ascorbate, homogenized in PBS and then frozen at -80°C. H₂O₂ was measured with the Fluoro H₂O₂[™] Detection kit (Cell Technology) according to the manufacturer's protocol. Fluorescence was measured using a Fluorescence plate reader (Molecular Devices) (excitation 570 nm; emission 600 nm). H₂O₂ content was calculated by referring to a standard H₂O₂ curve and expressed as μ M H₂O₂ normalized to cellular proteins.

Statistical Analysis

All values are expressed as means \pm SD. Data were analyzed by the one-way ANOVA and the two-tailed Student's *t*-test using a SPSS Software 11.0. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

RESULTS

MDA production following iron-ascorbate treatment

Experiments were first performed to examine the effectiveness of the iron-ascorbate (Fe/As) system in initiating lipid peroxidation in THP-1 macrophages. At the end of a 2-h culture period, the extent of lipid peroxidation was assessed by determining MDA in cells. Iron-ascorbate consistently promoted the production of peroxidation above baseline values (Figure 1A), and the formation of MDA increased with rising iron-ascorbate concentrations in a dose-dependent manner (data not shown). Subsequently, the pro-oxidant capacity of iron-ascorbate was compared to H₂O₂, one of the most powerful agents frequently used in many studies. When macrophages were incubated with H₂O₂ (1000 μM) or iron-ascorbate (100/1000 μM), the production of MDA was less prominent with the former (Figure 1A), providing direct evidence for the ability of the iron-ascorbate system to provoke profound lipid peroxidation. As expected, the control with the vehicle (ETOH) showed no difference compared to the controls without any addition. Finally, the efficiency of various antioxidants in preventing or reducing lipid peroxidation was evaluated (Figure 1B). Tocopherol, Trolox and BHT significantly restrained cellular peroxidation ($P < 0.0001$ vs Fe/As), whereas NAC did not display equivalent protection although the data exhibited statistical significance ($P < 0.0001$ vs Fe/As). Trolox and BHT were selected for subsequent experiments because of their capacity to maintain MDA near baseline values, even at higher iron-ascorbate concentrations (results not shown). Neither iron-ascorbate nor the antioxidants caused structural injuries or reduced cell viability

as assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) test or trypan blue exclusion (results not shown).

Impact of iron-ascorbate on fatty acid composition

Because peroxidation can lead to polyunsaturated fatty acid (PUFA) depletion as a result of an attack on membrane phospholipids, we determined fatty acid (FA) profiles under the influence of iron-ascorbate. THP-1 macrophages exposed to this pro-oxidant system exhibited marked alterations in long chain PUFA (Table 1). A significant decrease in eicosapentaenoate (20:5n-3), docosahexaenoate (22:6n-3), arachidonate (20:4n-6), and other n-3 and n-6 FA was recorded in THP-1 macrophages treated with iron-ascorbate (Table 1). The tabulation of the total FA belonging to individual families disclosed a decrease in n-3 and n-6 classes (Table 2). Furthermore, PUFA/saturated FA ratio was lower, whereas commonly used index for essential FA deficiency [(20:3n-9/20:4n-6)] was higher than that of control macrophages. However, the supply of Trolox or BHT attenuated the loss of PUFA resulting from iron-ascorbate exposure. Therefore, it is likely that unsaturated FA of macrophages incubated with iron-ascorbate were sensitive to peroxidation.

Modulation of Redox status by iron-ascorbate

The GSSG/total glutathione ratio is important in determining the redox status of proteins, e.g. the ratio of inter-convertible reduced/oxidized forms of molecules, thus influencing protein function and activity in cells (24). Efforts have, therefore, been exerted to assess the effects of iron-ascorbate on the GSSG/total glutathione ratio, which provides a reliable estimation of cellular redox status in cells and is,

thus, frequently measured as an indicator of oxidative stress. As illustrated in Figure 2, iron-ascorbate-induced lipid peroxidation increased the GSSG levels, expressed as % of total glutathione, whereas the presence of separate antioxidants, in particular α -tocopherol and BHT, lowered the ratio ($P < 0.05$ vs Fe/As) without normalizing it to the control values. Trolox and NAC did not alleviate iron-ascorbate effect.

Profile of antioxidant enzymes following iron-ascorbate exposure

Since cells have developed an enzymatic antioxidant pathway against free radicals and ROS, which are generated during oxidative metabolism, we first measured the SOD activity. As can be seen in Figure 3, the treatment of THP-1 macrophages with iron-ascorbate led to a significant rise in the total SOD activity ($P < 0.0001$). In order to identify the isozyme responsible for the increased SOD activity, we examined the catalytic activity of cytoplasmic SOD1 and mitochondrial SOD2. Only the activity of SOD1 was found elevated with the inclusion of iron-ascorbate in the culture medium (Figure 3). However, when we examined the gene and protein expression of SOD isozymes, the exposure of THP-1 macrophages to iron-ascorbate led to a decline in mRNA and protein mass of extracellular SOD3, whereas no changes were noted in SOD1 and SOD2 gene and protein expression (Figures 4 and 5).

Given that ATOX-1 is involved in mechanisms of oxidation protection and acts as a positive regulator of SOD3, we tested its gene expression (Figure 6). PCR analysis revealed a reduction of ATOX-1 mRNA levels following iron-ascorbate exposition.

The next series of experiments aimed at examining the activity of additional endogenous antioxidants. We first measured CAT activity, an important enzyme that catalyzes the conversion of H_2O_2 into H_2O and molecular oxygen. Neither iron-ascorbate nor the antioxidants have led to any change in its activity (Figure 7). As the antioxidant defenses of many cell types rely on GSH-related enzymes, we then assessed: (i) GPx that reduces hydroperoxides to the corresponding alcohols by means of GSH (Fig.8A); (ii) GR that catalyses the conversion of oxidized to reduced GSH (Fig.8B); and (iii) GST that catalyses GSH conjugation (Figure 8C). Iron-ascorbate slightly decreased the activity of seleno-dependant GPx (Figure 8A) and of GST (Figure 8C) In contrast, it remained without effect on GR (Figure 8B).

Glutathione is synthesized in two sequential ATP-dependent reactions catalyzed by γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) - the rate-limiting enzyme - and glutathione synthetase (GSS). We, therefore, examined the gene expression of these enzymes. No significant alterations were recorded in their mRNA levels in response to iron-ascorbate (Figures 9A and 9B). We finally turned to γ -Glutamyltransferase (γ -GT) that is the enzyme responsible for the extracellular catabolism of glutathione. Once again, its gene expression was not modified by iron-ascorbate treatment (Figure 9C).

Relationship between iron-ascorbate-mediated oxidative stress and inflammation

A wealth of data suggests that the NF- κ B signaling pathway plays a crucial role in the initiation, amplification and resolution of inflammation by controlling the

expression of multiple inflammatory mediators. We, therefore, hypothesized that iron-ascorbate-mediated oxidative stress may degrade the inhibitory molecule I κ B that kept inactive NF- κ B, thereby generating powerful cytokines such as TNF- α . Experiments with THP-1 macrophages showed that iron-ascorbate was able to trigger TNF- α by decreasing I κ B (Figure 10). Trolox was able to reduce TNF- α levels ($P < 0.05$ vs Fe/As) but, surprisingly, BHT did not prevent Fe/As effects on TNF- α , and even raised its levels when administrated alone ($P < 0.0001$ vs controls).

Cellular and extracellular H₂O₂ levels

Since our results showed that iron-ascorbate was able to induce the elevation of total and cytoplasmic SOD activity, without any change in CAT activity, we hypothesized that H₂O₂ might accumulate in THP-1 macrophages. We, therefore, measured H₂O₂ at the cellular and the extracellular level. Our results show that iron-ascorbate caused an increase in H₂O₂ concentrations in cell homogenates and in supernatants (Figure 11).

DISCUSSION

Macrophages play central roles as effectors in inflammatory reactions and cell-mediated immune responses. They are phagocytic cells that scavenge a large variety of compounds such as bacteria and apoptotic cells. One of the most immediate response of monocytes/macrophages to a variety of activating stimuli is the production of O_2^- in process called the "respiratory burst", contributing to the elimination of invading pathogens (18). In addition to its bactericidal action, physiological and controlled production of ROS (in the form of O_2^- , H_2O_2 , OH or lipid peroxy radical), is requisite for proper regulation of signal transduction pathways that ultimately control gene expression, post-translational protein modifications and receptor-mediated cell-signaling processes (3, 18). By contrast, sustained overproduction of ROS may result in inflammation and tissue injury. For example, excessive and uncontrolled ROS production can damage vascular cells, induce the formation of oxidized LDL (oxLDL), and may, as such, participate in the initiation and development of atherosclerosis (33). In these conditions, the antioxidant capacity of macrophages is very important not only to maintain vital function in host defense but also to tightly control the intracellular oxidative tone. Rapid progress in understanding the relationship between macrophages and oxidative stress has originated from the particular attention devoted to the chemical events responsible for oxidative modified form of LDL, which culminate in atherosclerosis (22). However, the ability of macrophages to handle exogenous oxidative stimuli and to deploy their antioxidant "arsenal" has little been investigated. More specifically, the effect of iron-ascorbate on the

susceptibility of macrophages to develop lipid peroxidation, trigger endogenous antioxidant response, alter redox status and generate inflammation needs to be characterized. Here we show that iron-ascorbate supplementation of macrophages led to (i) a marked lipid peroxidation; (ii) a depletion of n-3 and n-6 PUFA; (iii) an increase in the GSSG/total glutathione ratio, a reliable index of cellular redox status; (iv) a rise in total SOD activity probably consequent, in part, to enhanced SOD1 activity; (v) a decline in mRNA and protein mass of extracellular SOD3 along with a down-regulation of ATOX-1; (vi) a decrease in GPx and GST; (vii) an invariable activity of CAT and GR; (viii) an unchanged expression of γ -GCS, GSS and γ -GT; (ix) an enhanced TNF- α along with decreased I κ B protein expression; and (x) H₂O₂ accumulation at the cellular and extracellular levels.

Iron is a known catalyst for the oxidation of biological molecules, such as proteins, DNA, and lipids (49). It is proposed that the iron-catalyzed lipid oxidation (2) is induced by the formation of OH upon decomposition of H₂O₂ by ferrous ions, which subsequently react with polyunsaturated lipids to initiate chain reactions that lead to the formation of lipid hydroperoxides. The latter may undergo breakdown by Fe (II), leading to the formation of radicals and the propagation of the lipid oxidation process via the Fenton-like reaction. More and more investigations have been carried out on the combination of ascorbic acid and metals, including iron, in view of their involvement in the oxidation of unsaturated lipids *in vivo* (20, 21, 32, 41, 44, 50). Recently, we showed that iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation altered the composition and properties of the bilayer lipid environment, affected the functions of sterol regulatory enzymes

and integral membrane proteins of the endoplasmic reticulum, and disturbed cholesterol homeostasis (11). Several laboratories have also shown the ability of iron to initiate strong lipid peroxidation, whereas ascorbic acid can amplify iron-oxidative potential by promoting metal ion-induced lipid peroxidation (4, 9, 30). The data presented here clearly indicate that the iron-ascorbate system efficiently elicited marked lipid peroxidation in macrophages, probably via the oxidation of membrane PUFA, yielding a loss of cellular n-3 and n-6 FA. MDA levels and PUFA depletion could be abrogated by treating macrophages with antioxidants.

In the studies reported here, we sought to assess the effect of iron-ascorbate on the redox status known for its susceptibility to manifestations of oxidative stress. An important part of the defense against oxidative stress and free radicals in most organisms is the ubiquitous tripeptide glutathione (L-gamma-glutamyl-L-cysteinylglycine). It is the most abundant thiol-containing compound in the mammalian cell, with levels as high as 10 mM (31, 39, 40). Glutathione exists mainly in its reduced form (GSH) and only about 1-5% is in the oxidized form GSSG. The NADPH-requiring enzyme glutathione-disulfide reductase reduces GSSG back to GSH, and the GSSG/total glutathione ratio is often used as an indicator of the redox status of the cell (29, 45). Our data showed that the increased lipid peroxidation, reflected by the high levels of MDA and the low amounts of PUFA, were accompanied by a higher GSSG/total glutathione ratio in THP-1 macrophages.

Free radicals are controlled by various cellular defense mechanisms consisting of enzymatic proteins. The enzymatic antioxidant defenses include SOD, CAT and

GPx. SOD is the antioxidant enzyme that catalyses the dismutation of the highly reactive O_2^- and H_2O_2 . CAT and GPx play an important role in the detoxification of H_2O_2 . In particular, CAT reacts very efficiently with H_2O_2 to form water and molecular oxygen and with hydrogen donors with peroxidase activity, thus protecting cells against the H_2O_2 generated within them. GPx catalyses the reaction of hydroperoxides by using GSH, thereby protecting mammalian cells against oxidative damage. The findings reported here indicate that the total activity of SOD in macrophages increases in the presence of iron-ascorbate. However, CAT was unchanged and a slight fall was noted in GPx activity. Therefore, the imbalance in the coordinated expression/activity of antioxidant enzymes in macrophages can lead to the generation of oxidative stress: by promoting O_2^- dismutation, SOD could facilitate formation of H_2O_2 , another ROS capable of inducing cell injury at high concentrations.

Mammalian systems contain three SOD metallo-isozymes: copper- and zinc-containing SOD (Cu, Zn-SOD or SOD1), manganese containing SOD (Mn-SOD or SOD2) and extracellular-SOD (EC-SOD or SOD3). EC-SOD is a secretory, tetrameric glycoprotein, whereas Cu, Zn-SOD and Mn-SOD are intracellular enzymes predominantly found in the cytoplasm and mitochondria, respectively. Evidence was brought in our experiments, which indicate an up-regulation of SOD1 activity by iron-ascorbate-mediated oxidative stress. This gain of function was not accompanied with an enhancement of the gene and protein expression of SOD1, thus pointing to a post-translational regulation (1, 6, 10, 12, 13). In line with our results, Holvoet *et al.* (26) have reported that oxLDL can reduce oxidant

defense in THP-1 by inhibiting SOD1. Recent findings obtained in gene-targeted mouse have highlighted the functional importance of SOD1. Invalidation of SOD1 resulted in increased levels of vascular superoxide and peroxynitrite, elevated myogenic tone, augmented vasoconstrictor responses, impaired endothelium-dependent relaxation in large arteries and microvessels, amplified valvular permeability after ischemia and defects in vascular structure (7, 15, 48). The predominance of SOD1 in all cells is also insightful as to its pivotal function, and to provide an example, SOD1 activity in human and mouse aorta accounts for 50-80% of total SOD activity, whereas SOD2 contributes 2-12% and SOD3 the remainder (17). The decline in the gene and protein expression of SOD3 may be detrimental given its role in modulating the levels of extracellular O_2^- .

ATOX-1 is a cytosolic protein chaperone that delivers copper to SOD3 and is required for its activity (28). Using RT-PCR, we found a significant decrease in its gene expression. This is consistent with the findings that ATOX-1 functions not only as a copper chaperone for SOD3, but also as a positive regulator for its transcription (28).

We have investigated the possible H_2O_2 accumulation at the intracellular and extracellular levels as a consequence of iron-ascorbate administration to THP-1 macrophages. Our data showed increased amounts of H_2O_2 in cell homogenates and in supernatants. It has already been demonstrated that H_2O_2 can lead to a reduction of SOD3 protein and gene expression of SOD3 (25, 38). This H_2O_2 accumulation could be a mechanism by which iron-ascorbate can reduce SOD3 expression.

In macrophages, the inflammatory response is largely controlled through regulation of the transcription nuclear factor NF- κ B. NF- κ B exists primarily in the cytosol as a p50/p65 heterodimer complexed with its inhibitor protein I κ B. Activation of the I κ B kinase complex by numerous stimuli leads to the phosphorylation of I κ B, causing its dissociation from the NF- κ B heterodimer and subsequent degradation by the proteasome. Loss of I κ B reveals a nuclear localization sequence on the NF- κ B heterodimer that allows its rapid translocation to the nucleus and facilitates transcription of proinflammatory proteins (5, 36). Since NF- κ B is a redox-sensitive transcription factor that can be either activated or inhibited by oxidative stress, we tested the expression of I κ B in THP-1 macrophages exposed to iron-ascorbate. Apparently, this pro-oxidant system was capable of decreasing I κ B mRNA, which potentially facilitated the release of NF- κ B and its translocation to the nucleus where it could trigger the trans-activation of inflammatory genes such as TNF- α noted in our experiments. Noteworthy, one interesting finding of our experiments is that BHT alone induced an increase in TNF- α secretion. Based on available scientific literature, we expected that this antioxidant would lead to obvious anti-inflammatory effects as suggested by Hultén et al. (27). Interestingly, data from our laboratory have shown that BHT, in some circumstances, could promote inflammation (unpublished results).

The diagram in Figure 12 depicts the potential mechanisms for the modulation of antioxidant enzymes in macrophages exposed to iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation: (1) Oxidative stress activates macrophages by inducing the dissociation of NF- κ B from its inhibitor I κ B, which stimulates the NADPH

oxidase- O_2^- generating system and TNF- α production; (2) O_2^- production induces SOD1 activity without a concomitant rise in catalase and GPx activities, resulting in intra- and extracellular H_2O_2 accumulation at the intra- and extracellular levels; (3) in turn, H_2O_2 down-regulates SOD3 and ATOX-1 gene transcription, or directly affects its protein mass, reflecting a reduced protein expression.

In conclusion, the results of the present study highlight the inefficiency of THP-1 cell line to strongly respond to oxidative stress induced by iron-ascorbate. Additional experiments are needed to validate the data in primary cultures of human monocytes. Our findings may be relevant for the better understanding of the disease pathophysiology implicating macrophages and for the future developments of preventive strategies.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Canadian Institutes of Health Research (MOP 49433) and Canadian Diabetes Association (OG-2-07-2422-EL). The authors thank Mrs Schohraya Spahis for her technical assistance.

REFERENCES

1. Arnesano F, Banci L, Bertini I, Martinelli M, Furukawa Y, and O'Halloran TV. The unusually stable quaternary structure of human Cu,Zn-superoxide dismutase 1 is controlled by both metal occupancy and disulfide status. *J Biol Chem* 279: 47998-48003, 2004.
2. Aust SD and Svingen BA: The role of iron in enzymatic lipid peroxidation. *Free Radicals in Biology*. Edited by Pryor WA. New York, Academic Press, 1982, pp. 1-28
3. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 93: 1464-1476, 1999.
4. Bachowski GJ, Thomas JP, and Girotti AW. Ascorbate-enhanced lipid peroxidation in photooxidized cell membranes: cholesterol product analysis as a probe of reaction mechanism. *Lipids* 23: 580-586, 1988.
5. Baeuerle PA and Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141-179, 1994.
6. Banci L, Bertini I, Cantini F, D'Amelio N, and Gaggelli E. Human SOD1 before harboring the catalytic metal: solution structure of copper-depleted, disulfide-reduced form. *J Biol Chem* 281: 23333-23337, 2006.
7. Baumbach GL, Sigmund CD, and Faraci FM. Structure of cerebral arterioles in mice deficient in expression of the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 95: 822-829, 2004.
8. Bernotti S, Seidman E, Sinnott D, Brunet S, Dionne S, Delvin E, and Levy E. Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in

- Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G898-G906, 2003.
9. Brasitus TA, Davidson NO, and Schachter D. Variations in dietary triacylglycerol saturation alter the lipid composition and fluidity of rat intestinal plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 812: 460-472, 1985.
 10. Brown NM, Torres AS, Doan PE, and O'Halloran TV. Oxygen and the copper chaperone CCS regulate posttranslational activation of Cu,Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5518-5523, 2004.
 11. Brunet S, Thibault L, Lepage G, Seidman EG, Dube N, and Levy E. Modulation of endoplasmic reticulum-bound cholesterol regulatory enzymes by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 28: 46-54, 2000.
 12. Carroll MC, Outten CE, Proescher JB, Rosenfeld L, Watson WH, Whitson LJ, Hart PJ, Jensen LT, and Cizewski C, V. The effects of glutaredoxin and copper activation pathways on the disulfide and stability of Cu,Zn superoxide dismutase. *J Biol Chem* 281: 28648-28656, 2006.
 13. Caruano-Yzermans AL, Bartnikas TB, and Gitlin JD. Mechanisms of the copper-dependent turnover of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 281: 13581-13587, 2006.
 14. Courtois F, Suc I, Garofalo C, Ledoux M, Seidman E, and Levy E. Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G12-G19, 2000.

15. Didion SP, Ryan MJ, Didion LA, Fegan PE, Sigmund CD, and Faraci FM. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res* 91: 938-944, 2002.
16. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95, 2002.
17. Faraci FM and Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1367-1373, 2004.
18. Forman HJ and Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 166: S4-S8, 2002.
19. Forman HJ, Torres M, and Fukuto J. Redox signaling. *Mol Cell Biochem* 234-235: 49-62, 2002.
20. Fukuzawa K, Chida H, Tokumura A, and Tsukatani H. Antioxidative effect of alpha-tocopherol incorporation into lecithin liposomes on ascorbic acid-Fe²⁺-induced lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 206: 173-180, 1981.
21. Fukuzawa K, Seko T, Minami K, and Terao J. Dynamics of iron-ascorbate-induced lipid peroxidation in charged and uncharged phospholipid vesicles. *Lipids* 28: 497-503, 1993.
22. Garner B, van RD, Dean RT, and Jessup W. Direct copper reduction by macrophages. Its role in low density lipoprotein oxidation. *J Biol Chem* 272: 6927-6935, 1997.

23. Griendling KK and FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* 108: 2034-2040, 2003.
24. Han D, Hanawa N, Saberi B, and Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291: G1-G7, 2006.
25. Hink HU, Santanam N, Dikalov S, McCann L, Nguyen AD, Parthasarathy S, Harrison DG, and Fukai T. Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1402-1408, 2002.
26. Holvoet P, Davey PC, De KD, Doukoure M, Deridder E, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Beaufort E, Bishay K, Andrieux N, Benhabiles N, and Marguerie G. Oxidized low-density lipoprotein correlates positively with toll-like receptor 2 and interferon regulatory factor-1 and inversely with superoxide dismutase-1 expression: studies in hypercholesterolemic swine and THP-1 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1558-1565, 2006.
27. Hulten LM, Lindmark H, Schersten H, Wiklund O, Nilsson FN, and Riise GC. Butylated hydroxytoluene and N-acetylcysteine attenuates tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) secretion and TNF-alpha mRNA expression in alveolar macrophages from human lung transplant recipients in vitro. *Transplantation* 66: 364-369, 1998.

28. Jeney V, Itoh S, Wendt M, Gradek Q, Ushio-Fukai M, Harrison DG, and Fukai T. Role of antioxidant-1 in extracellular superoxide dismutase function and expression. *Circ Res* 96: 723-729, 2005.
29. Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol* 348: 93-112, 2002.
30. Jourd'Heuil D, Vaananen P, and Meddings JB. Lipid peroxidation of the brush-border membrane: membrane physical properties and glucose transport. *Am J Physiol* 264: G1009-G1015, 1993.
31. Kosower NS and Kosower EM. The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 54: 109-160, 1978.
32. Kubow S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radic Biol Med* 12: 63-81, 1992.
33. Kunsch C and Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 85: 753-766, 1999.
34. Lee FY, Lee TS, Pan CC, Huang AL, and Chau LY. Colocalization of iron and ceroid in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 138: 281-288, 1998.
35. Lepage G, Levy E, Ronco N, Smith L, Galeano N, and Roy CC. Direct transesterification of plasma fatty acids for the diagnosis of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. *J Lipid Res* 30: 1483-1490, 1989.
36. Liou HC and Baltimore D. Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol* 5: 477-487, 1993.

37. Marcil V, Delvin E, Sane AT, Tremblay A, and Levy E. Oxidative stress influences cholesterol efflux in THP-1 macrophages: role of ATP-binding cassette A1 and nuclear factors. *Cardiovasc Res* 72: 473-482, 2006.
38. Marklund SL. Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J* 220: 269-272, 1984.
39. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263: 17205-17208, 1988.
40. Meister A and Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-760, 1983.
41. Miller DM and Aust SD. Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 271: 113-119, 1989.
42. Oiknine J and Aviram M. Increased susceptibility to activation and increased uptake of low density lipoprotein by cholesterol-loaded macrophages. *Arterioscler Thromb* 12: 745-753, 1992.
43. Pippenger CE and Armstrong D: Regulatory antioxidant enzymes. *Free Radical and Antioxidant Protocols. Methods in Molecular Biology*. Edited by Clifton AD. NJ, Humana, 1998, pp. 299-313
44. Reilly CA and Aust SD: The critical role of free radicals. *Toxicology of the human environment*. Edited by Rhodes CJ. London, Taylor & Francis, 2000, pp. 155-190
45. Schafer FQ and Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30: 1191-1212, 2001.

46. Sen CK and Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 10: 709-720, 1996.
47. Thannickal VJ and Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1005-L1028, 2000.
48. Veerareddy S, Cooke CL, Baker PN, and Davidge ST. Gender differences in myogenic tone in superoxide dismutase knockout mouse: animal model of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H40-H45, 2004.
49. Welch KD, Davis TZ, Van Eden ME, and Aust SD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med* 32: 577-583, 2002.
50. Winterbourn CC. Comparison of superoxide with other reducing agents in the biological production of hydroxyl radicals. *Biochem J* 182: 625-628, 1979.
51. Yang Q, Krautmacher C, Schilling D, Pittelkow MR, and Naylor S. Simultaneous analysis of oxidized and reduced glutathione in cell extracts by capillary zone electrophoresis. *Biomed Chromatogr* 16: 224-228, 2002.

TABLE 1. Fatty Acid Composition in macrophages exposed to lipid peroxidation

Fatty Acid	CONT (n=3)	FE/ASC (n=3)	TROL (n=3) % Total	BHT (n=3)	FE/ASC + TROL (n=3)	FE/ASC + BHT (n=3)
14 :0	5.10 ± 0.29	5.37 ± 0.16	5.04 ± 0.13	5.07 ± 0.13	4.99 ± 0.43	5.03 ± 0.16
15 :0	0.71 ± 0.23	0.75 ± 0.01	0.72 ± 0.05	0.72 ± 0.02	0.69 ± 0.04	0.70 ± 0.02
16 :0	38.02 ± 0.87	39.33 ± 0.42	37.43 ± 0.28	37.96 ± 0.60	37.08 ± 1.36	37.28 ± 0.46
17 :0	0.70 ± 0.001	0.73 ± 0.02	0.71 ± 0.02	0.72 ± 0.03	0.68 ± 0.01	0.71 ± 0.02
18 :0	8.94 ± 0.40	9.22 ± 0.22	8.90 ± 0.08	8.94 ± 0.19	8.60 ± 0.70	9.15 ± 0.10
20 :0	0.58 ± 0.09	0.60 ± 0.03	0.50 ± 0.02	0.57 ± 0.07	0.52 ± 0.05	0.52 ± 0.02
22 :0	0.55 ± 0.09	0.57 ± 0.03	0.57 ± 0.03	0.56 ± 0.04	0.49 ± 0.11	0.55 ± 0.03
24 :0	0.67 ± 0.03	0.75 ± 0.02*	0.70 ± 0.03	0.66 ± 0.12	0.62 ± 0.19	0.73 ± 0.02*
18 :3n-3	0.078 ± 0.045	0.084 ± 0.077	0.11 ± 0.043	0.122 ± 0.037	0.099 ± 0.018	0.096 ± 0.013
20 :5n-3	0.23 ± 0.004	0.15 ± 0.009***	0.29 ± 0.01**	0.26 ± 0.006**	0.25 ± 0.06	0.28 ± 0.03
22 :5n-3	0.86 ± 0.02	0.80 ± 0.07	0.92 ± 0.01*	0.90 ± 0.11	0.82 ± 0.18	0.97 ± 0.05*
22 :6n-3	1.61 ± 0.05	1.19 ± 0.02***	1.79 ± 0.02**	1.72 ± 0.16	1.60 ± 0.35	1.89 ± 0.05***
18 :2n-6	2.42 ± 0.01	2.37 ± 0.09	2.49 ± 0.06	2.66 ± 0.32	2.41 ± 0.07	2.46 ± 0.03
18 :3n-6	0.086 ± 0.089	0.079 ± 0.022	0.277 ± 0.172	0.168 ± 0.135	0.098 ± 0.06	0.094 ± 0.08
20 :2n-6	0.02 ± 0.034	0	0	0	0.06 ± 0.11	0
20 :3n-6	1.21 ± 0.04	1.01 ± 0.002**	1.32 ± 0.004*	1.31 ± 0.06	1.20 ± 0.19	1.38 ± 0.03**
20 :4n-6	4.68 ± 0.29	2.72 ± 0.06***	5.81 ± 0.06*	5.14 ± 0.06	5.21 ± 0.61	5.57 ± 0.20*
22 :4n-6	0.48 ± 0.22	0.24 ± 0.02	0.75 ± 0.07	0.78 ± 0.15	0.57 ± 0.16	0.86 ± 0.07
16 :1n-7	3.88 ± 0.08	4.00 ± 0.04	3.88 ± 0.08	3.95 ± 0.08	3.84 ± 0.29	3.94 ± 0.06
18 :1n-7	6.14 ± 0.05	6.23 ± 0.14	6.09 ± 0.06	6.00 ± 0.06*	5.85 ± 0.51	6.14 ± 0.01
18 :1n-9	13.48 ± 0.50	13.51 ± 0.23	13.48 ± 0.34	13.32 ± 0.35	12.98 ± 0.75	13.478 ± 0.08
20 :1n-9	0.37 ± 0.05	0.41 ± 0.05	0.31 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.27 ± 0.06
20 :3n-9	0.40 ± 0.02	0.32 ± 0.007**	0.43 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.40 ± 0.05	0.43 ± 0.02
24 :1n-9	0.28 ± 0.03	0.23 ± 0.003	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.04	0.28 ± 0.07	0.32 ± 0.004

Results (X ± SD) are expressed as mol % of total fatty acids present.*P < 0.05 ** P < 0.01 ***P < 0.001

TABLE 2. Proportions of fatty acid families and indexes of essential fatty acid deficiency and desaturase in macrophages exposed to lipid peroxidation

Fatty Acid	CONT (n=3)	FE/ASC (n=3)	TROL (n=3)	BHT (n=3)	FE/ASC + TROL (n=3)	FE/ASC + BHT (n=3)
			%			
SFA (%)	56.25 ± 0.76	58.31 ± 0.223	54.65 ± 2.74	55.64 ± 0.57	55.64 ± 0.41	56.21 ± 0.65
MUFA (%)	28.56 ± 0.81	29.65 ± 0.35	27.05 ± 0.30	27.27 ± 0.35	26.00 ± 2.11	27.26 ± 0.19
PUFA (%)	12.15 ± 0.77	9.07 ± 0.31**	14.28 ± 0.09*	13.54 ± 0.42	12.80 ± 1.48	14.13 ± 0.37
PUFA : SFA	0.22 ± 0.02	0.16 ± 0.001**	0.26 ± 0.003*	0.24 ± 0.01	0.23 ± 0.020	0.25 ± 0.009*
Total n-3 (%)	2.84 ± 0.10	2.32 ± 0.02	3.19 ± 0.71	3.07 ± 0.30	2.84 ± 0.59	3.32 ± 0.11
Total n-6 (%)	8.91 ± 0.67	6.43 ± 0.033**	10.66 ± 0.10**	10.07 ± 0.15	9.56 ± 0.86	10.38 ± 0.24*
Total n-7 (%)	10.68 ± 0.07	10.88 ± 0.05	10.63 ± 0.08	10.63 ± 0.15	10.31 ± 0.86	10.74 ± 0.05
Total n-9 (%)	18.14 ± 0.85	19.00 ± 0.10	16.56 ± 0.22	16.87 ± 0.39	15.91 ± 1.44*	16.89 ± 0.24
DHA : AA	0.35 ± 0.01	0.44 ± 0.009*	0.30 ± 0.03	0.34 ± 0.002	0.31 ± 0.001	0.33 ± 0.03
16 :1n-7 /18 :2n-6	1.61 ±0.04	1.69 ± 0.07	1.56 ± 0.07	1.50 ± 0.17	1.59 ± 0.08	1.60 ± 0.04
20 :3n- 9/20 :4n-6	0.086 ± 0.003	0.117 ± 0.002**	0.075 ± 0.003**	0.078 ± 0.002*	0.078 ± 0.002*	0.078 ± 0.001**
18 :2n- 6/20 :4n-6	0.52 ± 0.03	0.87 ± 0.05**	0.43 ± 0.006	0.52 ± 0.07	0.47 ± 0.04	0.44 ± 0.01

X ± SD. SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids.

* P < 0.001 ** P < 0.0001

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1 Lipid peroxidation in THP-1 cells challenged with iron-ascorbate. THP-1 cells were incubated with iron-ascorbate for 2 h at 37 °C. Lipid peroxidation was monitored by measuring malondialdehyde (MDA) formation in cells. The pro-oxidant capacity of Fe/As (100/1000 µM) was compared to H₂O₂ (1000 µM) and the control with the vehicle (ETOH) alone (A). The effects of antioxidants [α -Tocopherol (TOCO), Trolox (TROL), BHT and NAC, all solubilized in ethanol (ETOH)] on iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation were also tested (B). To this end, cells were incubated for 2 h with the antioxidants in addition to iron-ascorbate. Cells were then treated to determine MDA by HPLC. Values are means \pm SD for 5 different experiments. ^aP < 0.0001 vs. controls; ^bP < 0.001 vs controls, ^cP < 0.0001 vs Fe/As.

FIGURE 2 Effect of iron-ascorbate on GSSG levels, expressed as % of total glutathione. Macrophages were treated for 2 h with/without Fe/As (100/1000 µM) and the antioxidants α -Tocopherol (TOCO), Trolox (TROL), BHT and NAC. Cellular reduced glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) content was measured by capillary zone

electrophoresis. Values are means \pm SD for 5 different experiments.

^aP < 0.05 vs. controls; ^bP < 0.05 vs Fe/As.

FIGURE 3

Influence of iron-ascorbate on superoxide dismutase activity. The activity of the antioxidant enzyme SOD was measured in cell homogenates after incubation with Fe/As. Separate techniques were employed to determine total SOD activity and to discriminate cytoplasmic and mitochondrial SOD activity. Values are means \pm SD for 5 separate experiments.

^aP < 0.0001 vs controls; ^bP < 0.01 vs controls.

FIGURE 4

Influence of iron-ascorbate on the gene expression of SOD1 (A), SOD2 (B) and SOD3 (C) in THP-1 macrophages. After a 2 hour-exposition of macrophages to Fe/As, mRNA levels were determined by RT-PCR. Values are means \pm SD for 4 separate experiments.

^aP < 0.001 vs controls. A representative blot is shown.

FIGURE 5

Influence of iron-ascorbate on the protein expression of SOD1 (A), SOD2 (B) and SOD3 (C) in THP-1 macrophages. After a 2 hour-exposition of macrophages to Fe/As, protein levels of SOD1, SOD2 and SOD3 were determined by Western blot. Values are means \pm SD for 6 separate experiments.

^aP < 0.015 vs controls. A representative blot is shown.

FIGURE 6

Influence of iron-ascorbate on the gene expression of ATOX-1 in THP-1 macrophages. After a 2 hour-exposition of macrophages to Fe/As, mRNA levels were determined by RT-PCR. Values are means \pm SD for 4 separate experiments.

^aP < 0.001 vs controls. A representative blot is shown.

FIGURE 7

Influence of peroxidation on catalase enzymatic activity in THP-1 macrophages. The activity of the antioxidant enzyme catalase was measured in cell homogenates after incubation with Fe/As and the antioxidants Trolox (TROL) and BHT. Cell homogenates were placed in a cup that received H₂O₂ (10 mM) as a substrate, and absorbance was read at 240 nm for 3 min. Values are means \pm SD for 8 separate experiments.

FIGURE 8

Influence of peroxidation on antioxidant enzyme activity in THP-1 macrophages. The activity of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx) was measured in cell homogenates after incubation with Fe/As and the antioxidants Trolox (TROL) and BHT (A). To obtain seleno-dependant GPx activity, the reaction was initiated with tert-butyl hydroperoxide (1.5%); and to obtain non seleno-dependant GPx activity, the reaction was initiated

with cumene hydroperoxide (0.5 mM). Absorbance rate was measured in a spectrometer at 340 nm for 3 min. Values are means \pm SD for 4 to 8 separate experiments.

^aP < 0.0001 vs controls.

For GR activity (B), cell homogenates were mixed with PBS buffer solution (pH 7.6) containing GSSG (1 mM), NADPH (0.1 mM) and triton (1%). Absorbance rate was measured in a spectrometer at 340 nm for 3 min. Values are means \pm SD for 4 separate experiments.

^aP < 0.0001 vs controls.

For GST activity (C), cell homogenates were resuspended in a PBS buffer solution (pH 6.5) containing 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (1 mM) and GSH (15 mM) was used to initiate the reaction. Absorbance rate was measured in a spectrometer at 340 nm for 3 min. Values are means \pm SD for 8 separate experiments.

^aP < 0.001 vs controls.

FIGURE 9

Influence of iron-ascorbate on the gene expression of γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) (A), glutathione synthetase (GSS) (B) and γ -Glutamyltransferase (γ -GT) (C) in THP-1 macrophages. After a 2 hour-exposition of macrophages to Fe/As, mRNA levels were determined by

RT-PCR. Values are means \pm SD for 4 separate experiments. A representative blot is shown.

FIGURE 10

Influence of iron-ascorbate on the protein expression of I κ B and NF- κ B, as well as on TNF- α supernatants levels in THP-1 macrophages. After a 2 hour-exposition of macrophages to Fe/As, protein levels of I κ B (A) and NF- κ B (B) were determined on cell homogenates by Western blot. Values are means \pm SD for 3 separate experiments. A representative blot is shown. Supernants TNF- α levels were measured following 2-hour incubation with or without Fe/As and the antioxidants trolox (TROL) and BHT (C). TNF- α was measured on the supernatants using the commercial Quantikine[®] Human TNF- α /TNFSF1A kit. Absorbance was measured at 450 nm, with a 540 nm correction wavelength. Values are means \pm SD for 4 separate experiments.

^aP < 0.001; ^bP < 0.003; ^cP < 0.0001 vs controls.

FIGURE 11

Influence of iron-ascorbate on intracellular and extracellular levels of H₂O₂ in THP-1 macrophages. After a 2 hour-exposition of macrophages to Fe/As, H₂O₂ was measured on cellular homogenates and supernatants with the commercial Fluoro H₂O₂[™] Detection kit and fluorescence was measured at 570 nm (excitation) and 600

nm (emission). Values are means \pm SD for 4 separate experiments.

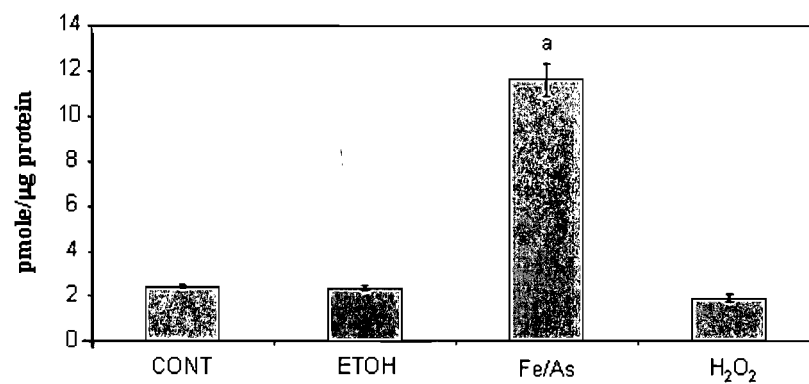
^aP < 0.001 vs controls.

FIGURE 12

Schematic view of potential mechanisms modulating antioxidant enzymes in macrophages exposed to iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation. (1) Oxidative stress activates macrophages by inducing the dissociation of NF- κ B from its inhibitor I κ B, which stimulates the NADPH oxidase- O₂⁻generating system and TNF- α production; (2) O₂⁻ production induces SOD1 activity without a concomitant rise in catalase and GPx activities, resulting in intra- and extracellular H₂O₂ accumulation at the intra- and extracellular levels; (3) In turn, H₂O₂ down-regulates SOD3 and ATOX-1 gene transcription, or directly affects its protein mass, reflecting a reduced protein expression.

Figure 1

A



B

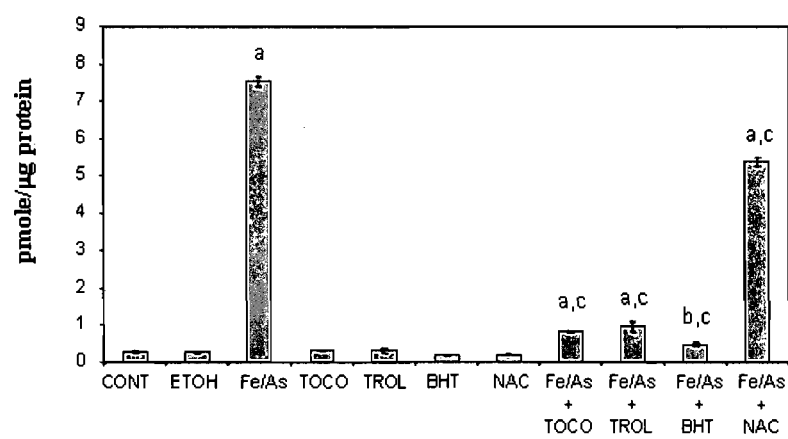


Figure 2

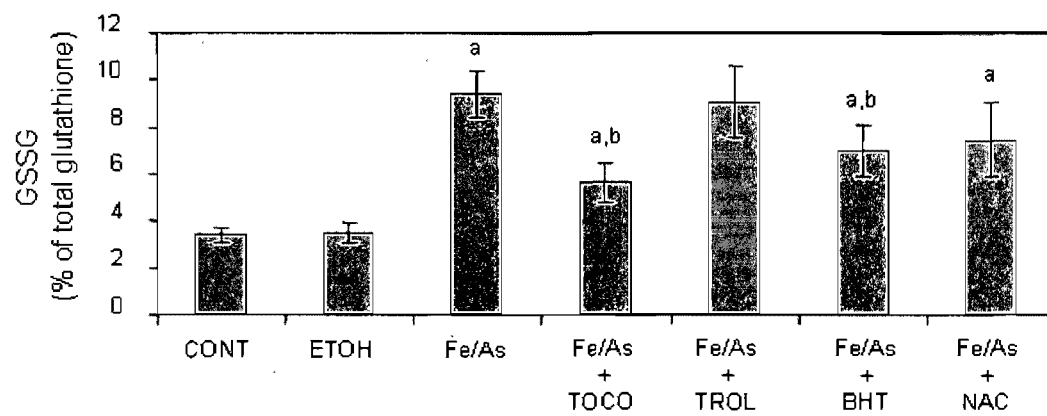


Figure 3

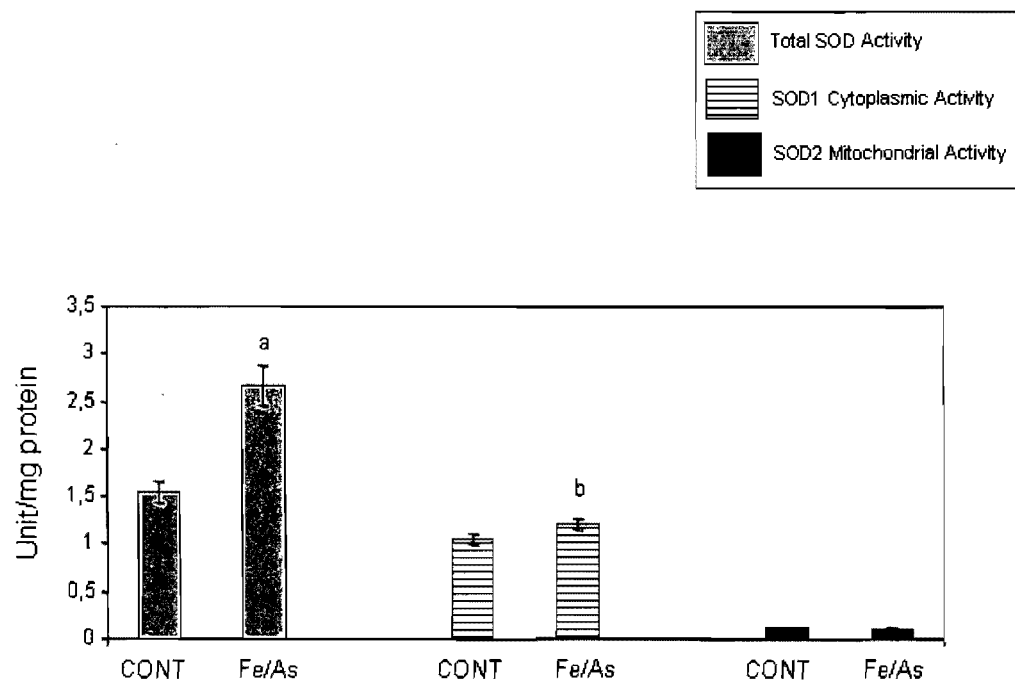


Figure 4

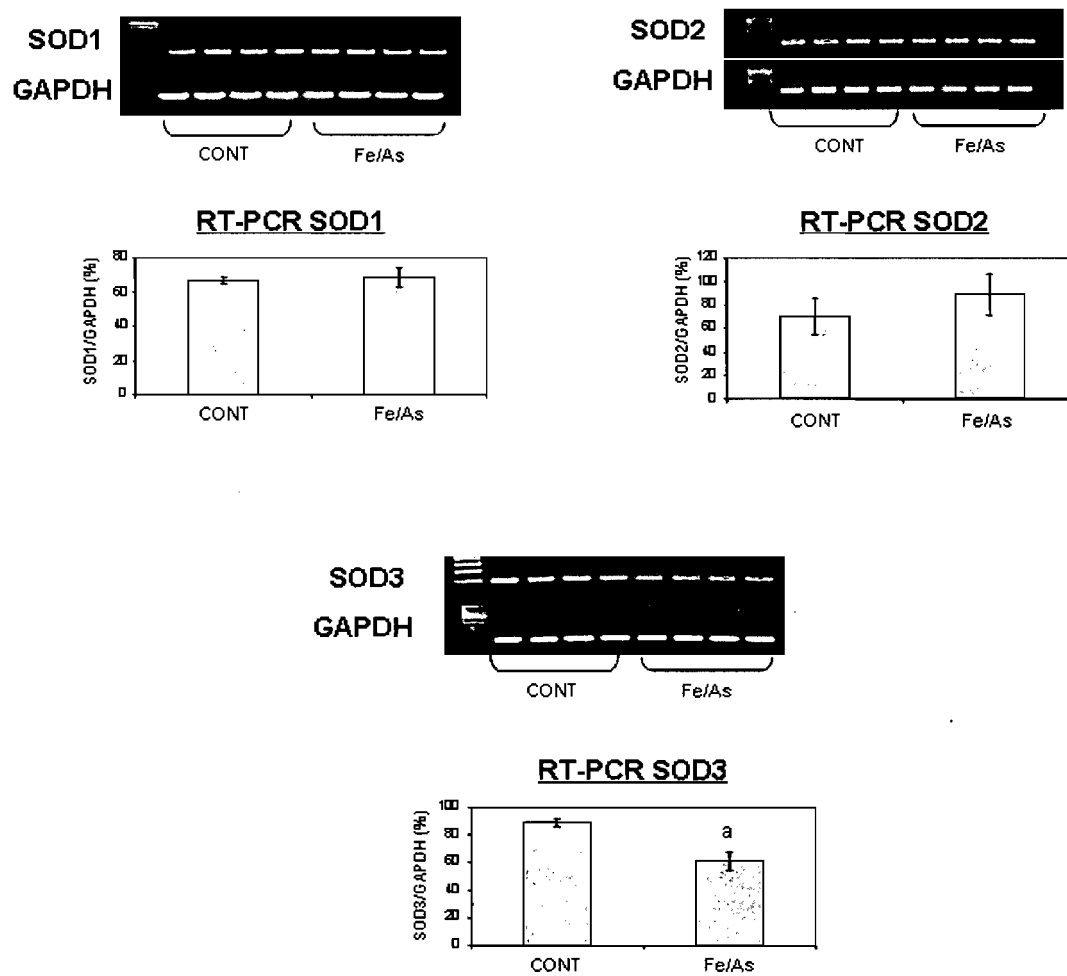


Figure 5

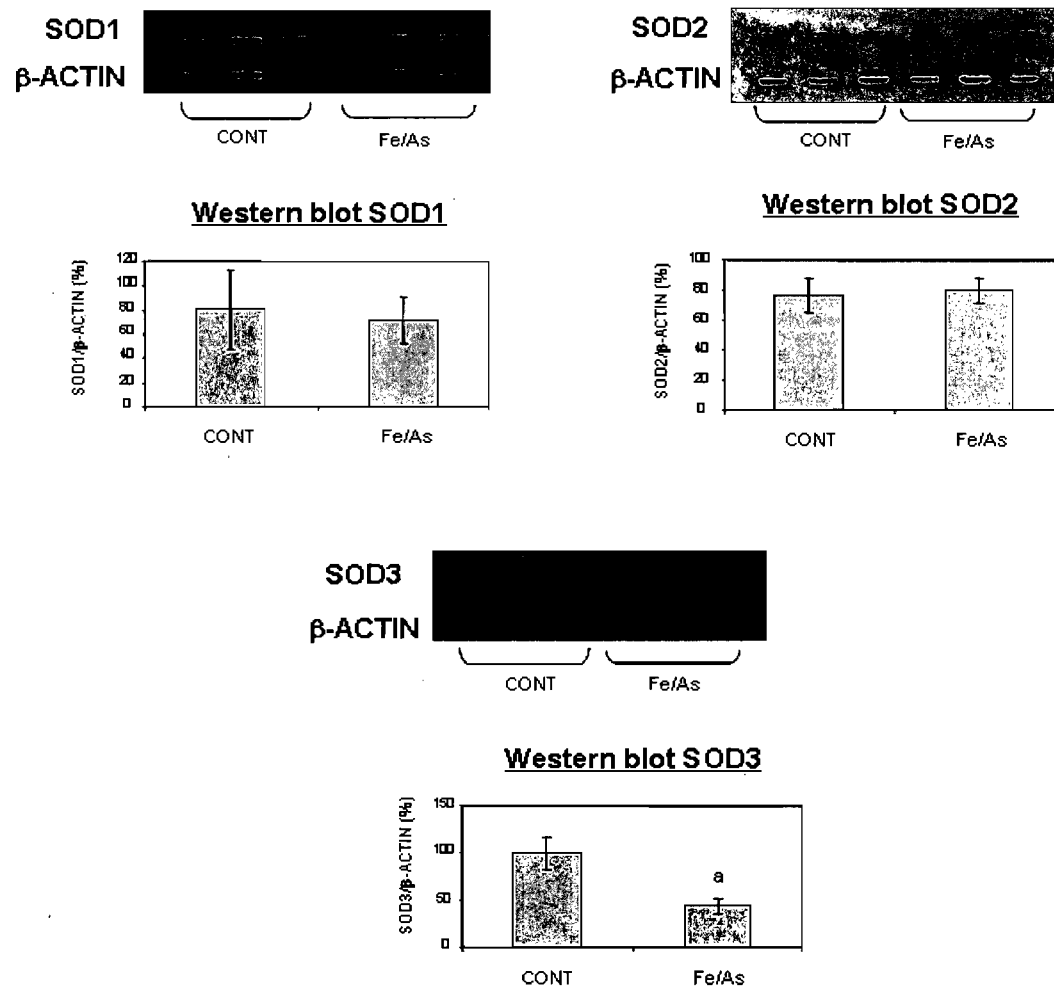


Figure 6

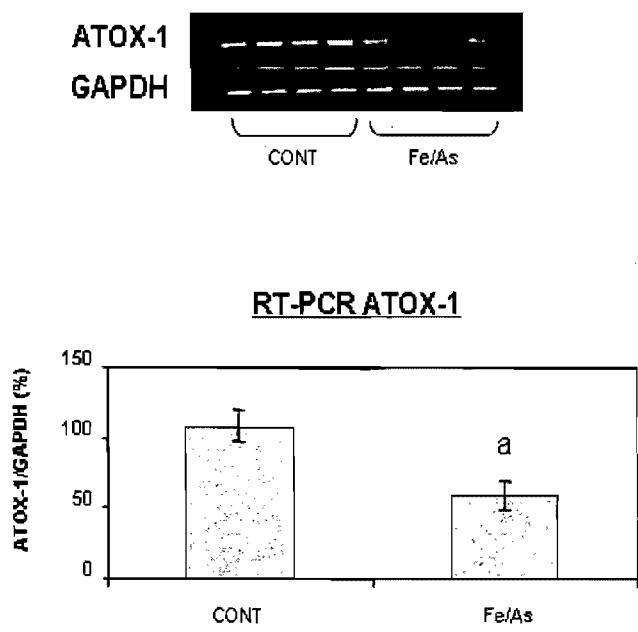


Figure 7

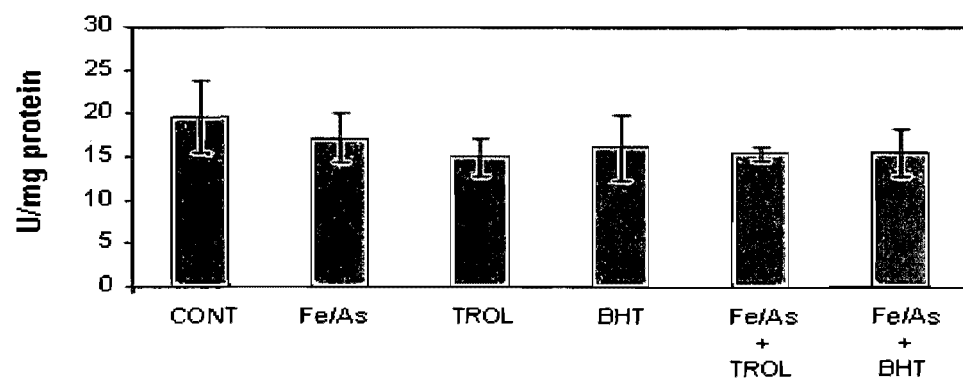


Figure 8

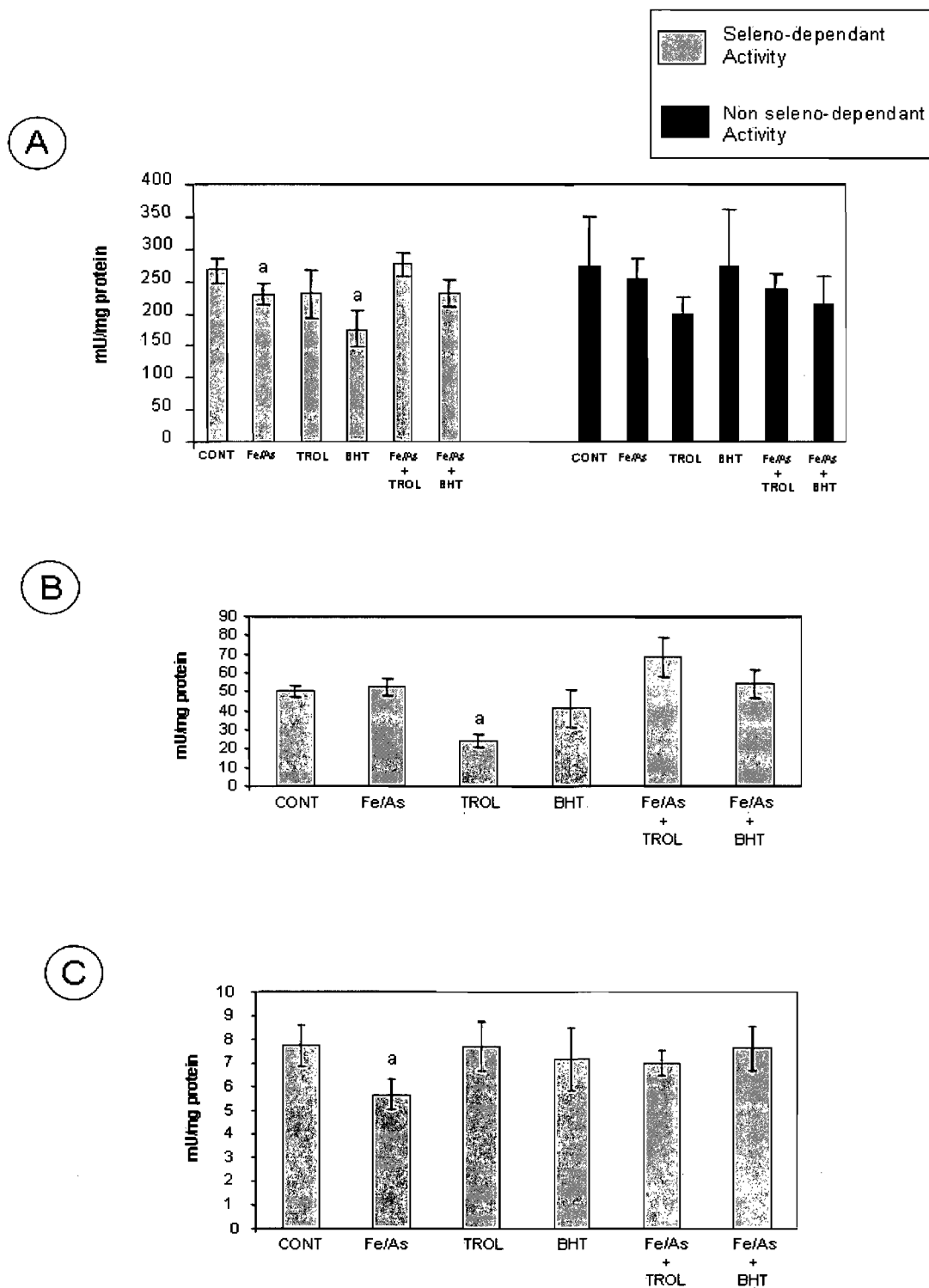


Figure 9

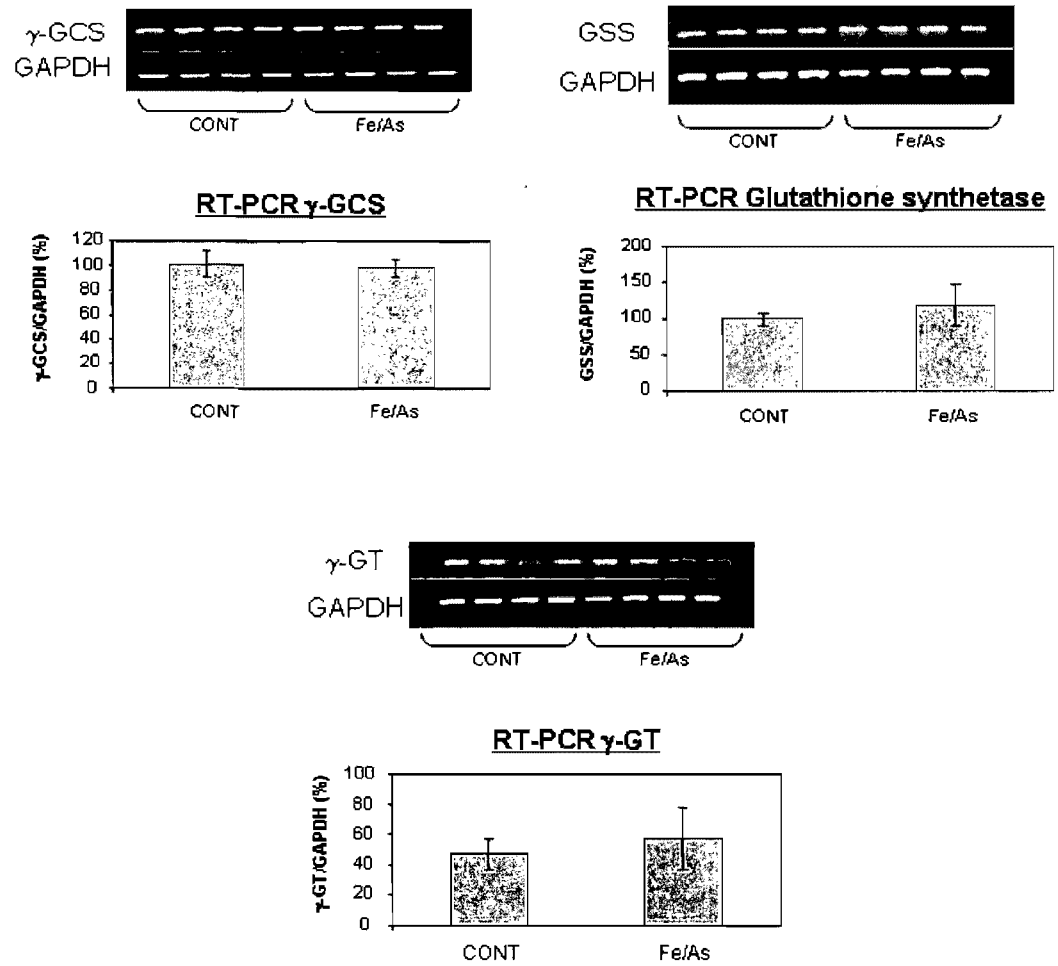


Figure 10

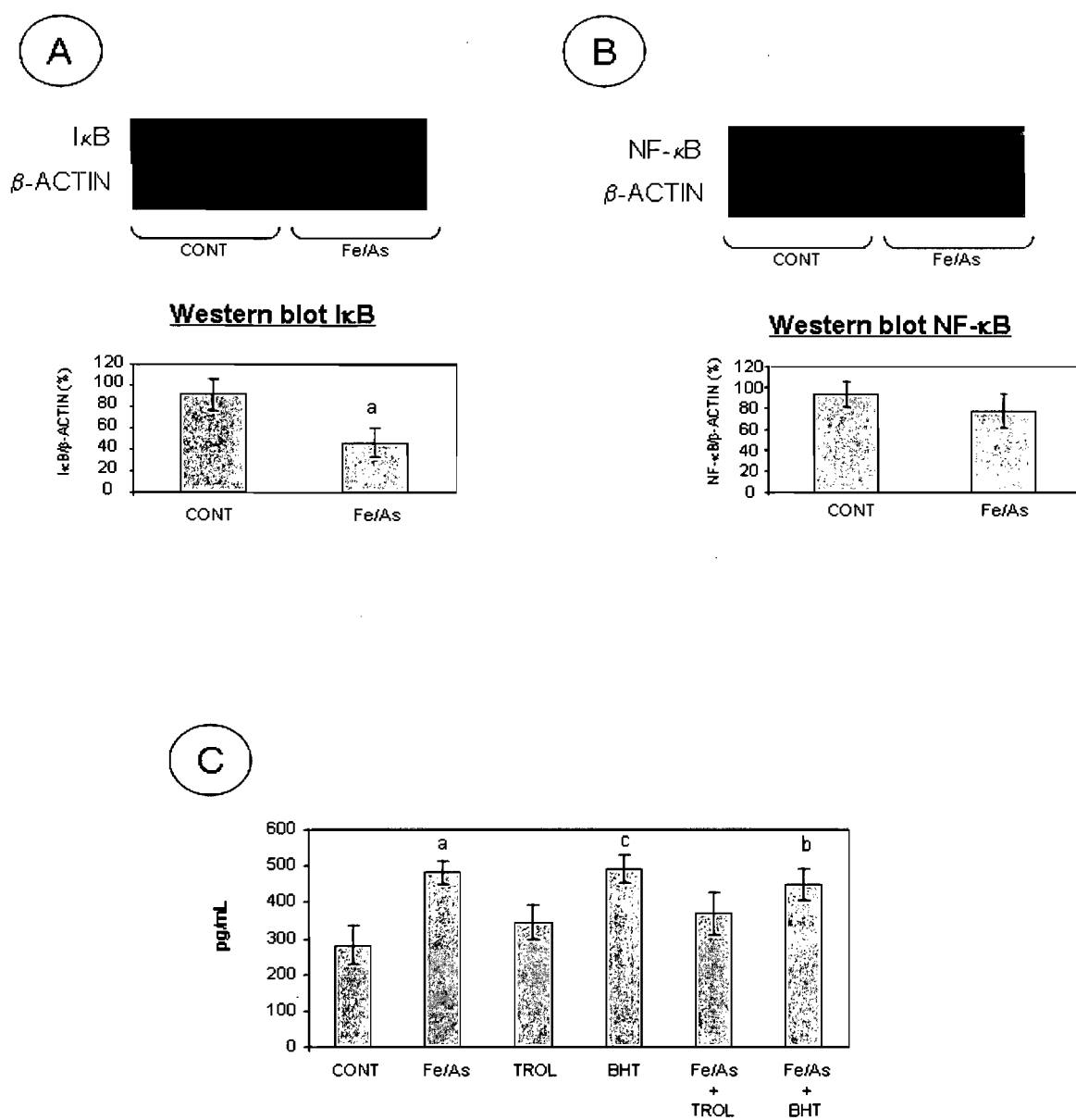


Figure 11

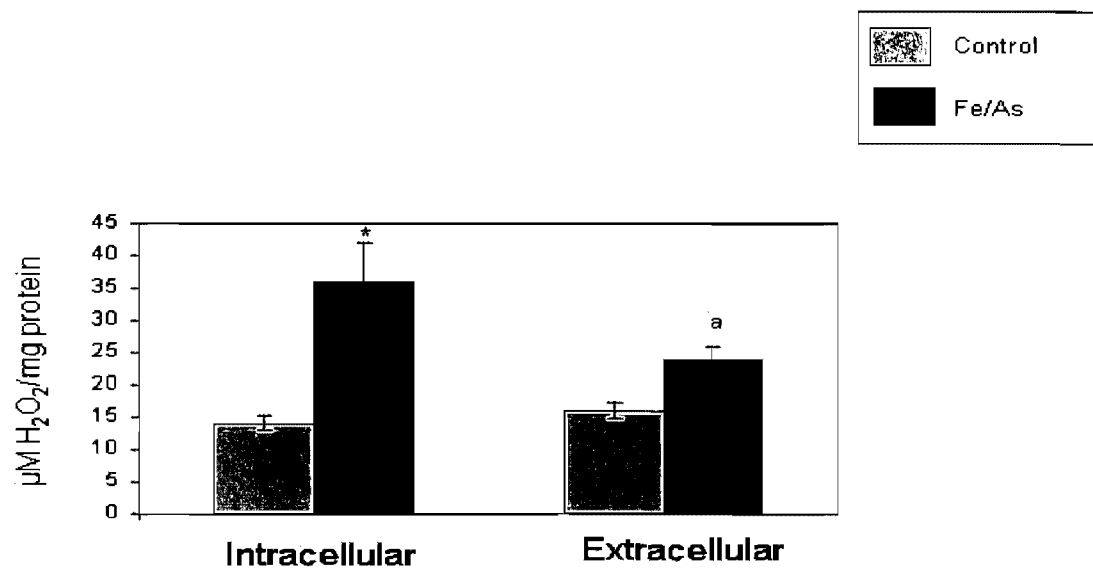
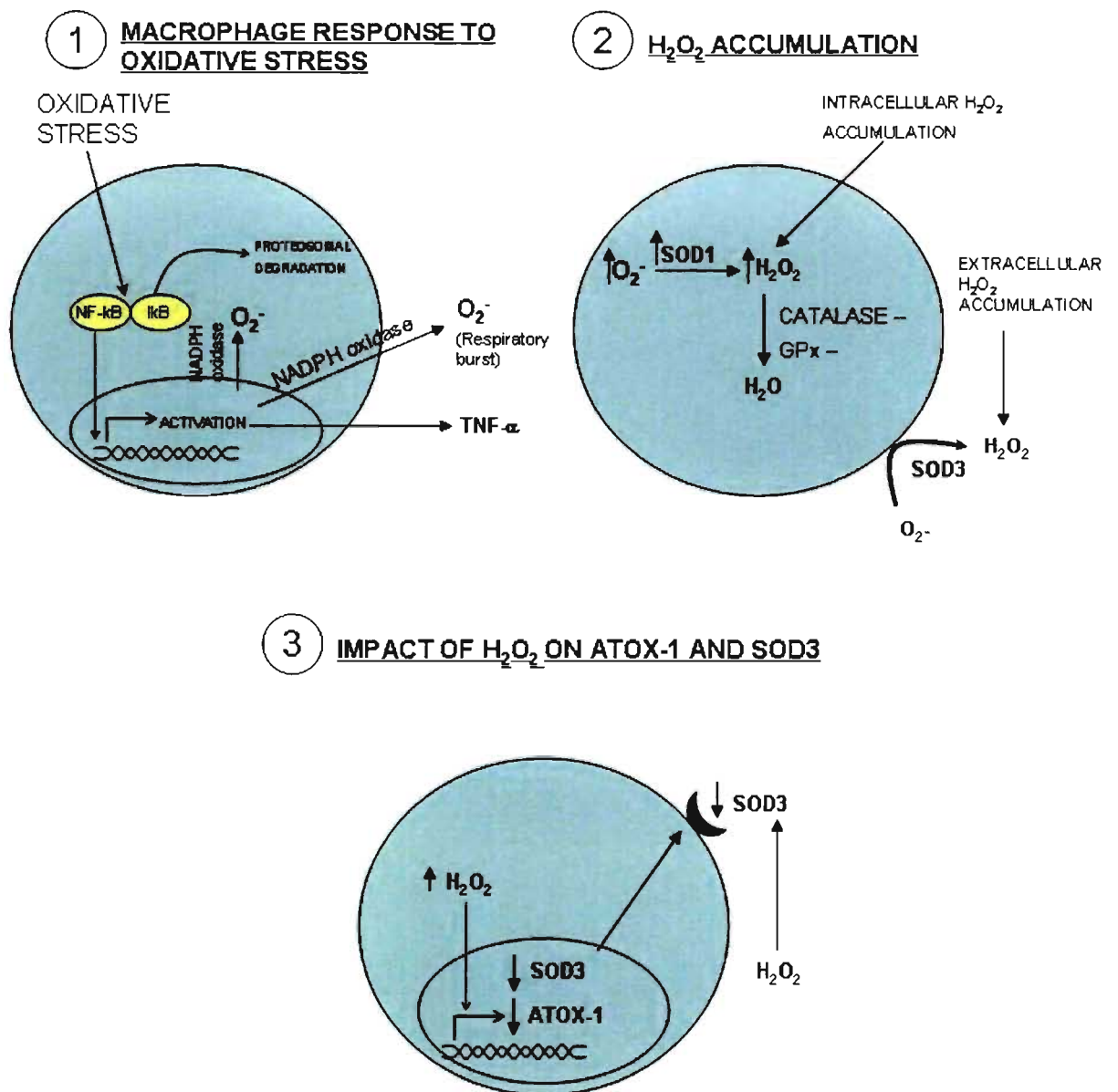


Figure 12



6. DISCUSSION GÉNÉRALE

Les connaissances sur le développement de l'athérosclérose ont beaucoup évolué depuis les dernières années. L'examen approfondi des différentes étapes s'y rapportant nous a amené à mieux saisir les processus pathophysiologiques déclencheurs comme le diabète, la résistance à l'insuline, l'hypercholestérolémie, l'hypertension et l'hyperhomocystéinémie. De plus, la combinaison d'inflammation, d'accumulation lipidique et de stress oxydatif pèse lourdement dans l'initiation de l'athérosclérose. Nous avons jugé pertinent de porter une attention particulière à ces trois composantes d'intérêt.

Jusqu'à présent, l'implication du stress oxydatif dans le développement de l'athérosclérose a été étudiée surtout en relation avec l'oxydation des LDL et l'ensemble des données expérimentales supporte un rôle important des oxLDL dans la pathogenèse de l'athérosclérose. Nous pouvons citer les évidences suivantes comme exemples : (1) les LDL ayant subi des modifications oxydatives sont présentes dans les lésions athéromateuses [513-516] ; (2) l'inhibition de l'oxydation des LDL par différents antioxydants peut ralentir la progression de la maladie [517-519] ; (3) la susceptibilité des LDL à l'oxydation est corrélée à la sévérité de la maladie coronarienne [520] ; et (4) les oxLDL ont la capacité de transformer les macrophages en cellules spumeuses [116]. Par contre, l'impact direct du stress oxydatif, indépendamment de l'implication des oxLDL, comme facteur causal du développement de l'athérosclérose, a été pauvrement examiné.

Pourtant, les dérivés réactifs de l'oxygène générés au niveau de la paroi vasculaire constituent un facteur causal important de la dysfonction endothéliale, étape primaire de l'athérogenèse [128]. Les lipides oxydés de la paroi vasculaire stimulent l'expression des molécules d'adhésion, le recrutement des cellules mononucléées par l'endothélium, les réponses inflammatoires et la formation des cellules spumeuses [5]. Si plusieurs études animales ont dévoilé les bénéfices des antioxydants sur le développement de l'athérosclérose [521-524], les études d'interventions humaines ne sont pas globalement parvenues aux mêmes conclusions [449-451]. Toutefois, l'utilisation d'antioxydants assez puissants à des doses optimales semble apporter des effets cardiovasculaires bénéfiques chez l'humain [525], ce qui permet de considérer avec positivisme de futures interventions pharmacologiques antioxydantes.

D'un autre côté, tous les facteurs de risque de l'athérosclérose sont associés à une élévation du niveau global de stress oxydatif, tel que démontré par l'augmentation de certains marqueurs sériques et urinaires [526-528]. Des études randomisées ont aussi révélé que la consommation d'une diète riche en fruits et en légumes, réduite en graisses totales, en lipides saturés et en cholestérol permet d'abaisser les niveaux de stress oxydatif de l'organisme, en réduisant l'oxydation des lipides *in vivo*, et améliore la capacité antioxydante [529].

Dans cette optique, nos travaux ont principalement évalué l'impact du stress oxydatif sur certaines étapes précoces du développement de l'athérosclérose. Nous avons étudié si l'état général de peroxydation de certaines cellules de la paroi vasculaire, spécifiquement les monocytes/macrophages et les cellules endothéliales vasculaires, peut influencer leur propension à développer l'athérosclérose. Nous avons initialement émis l'hypothèse que les cellules qui se trouvent dans un milieu présentant un niveau de stress oxydatif élevé sont plus disposées à subir les changements physiologiques et mécanistiques caractéristiques de l'athérosclérose, et ce plus spécialement au niveau des processus de transport de cholestérol.

Dans nos travaux, le système utilisé pour engendrer un stress oxydatif, sans l'implication des oxLDL, est constitué du fer et de l'ascorbate qui sont ajoutés aux milieux de culture de nos modèles cellulaires. Les radicaux hydroxyles et ascorbyles ainsi formés attaquent les lipides membranaires, ce qui initie la peroxydation lipidique et un stress oxydatif. D'autres agents générateurs de radicaux libres auraient pu être utilisés, avec possiblement des impacts différents sur l'issue des résultats. Nous avons toutefois choisi le modèle de fer-ascorbate, car les macrophages THP-1 se sont avérés difficiles à peroxyder. En effet, ni le peroxyde d'hydrogène ou le générateur de radicaux libres «2,2'-azobis-2-méthyl-propanimidamide dihydrochloride» (AAPH) n'ont permis d'élever les niveaux de MDA dans ces cellules, contrairement au fer-ascorbate qui y est efficacement parvenu. Par la suite, pour nos études sur les HUVEC, nous avons désiré poursuivre avec le même inducteur de peroxydation.

Dans la première partie de notre travail, nous avons exploré si la peroxydation lipidique induite par le fer-ascorbate provoque des dérangements dans le transport du cholestérol au niveau des macrophages THP-1. Nous avons démontré que l'exposition des THP-1 au fer-ascorbate : (1) induit une peroxydation lipidique ; (2) diminue l'efflux de cholestérol sans en affecter son influx ; (3) abaisse l'expression génique et protéique de l'ABCA1 sans affecter les autres récepteurs de l'homéostasie du cholestérol à l'étude; et (4) réduit l'expression de PPAR α , PPAR γ , LXR α et LXR β . Le traitement avec les antioxydants Trolox et BHT a permis de prévenir les effets nocifs du fer-ascorbate.

Dans les macrophages THP-1, le complexe fer-ascorbate s'est avéré très efficace pour induire une peroxydation lipidique, tel que démontré par l'élévation des niveaux de MDA, une mesure bien établie de peroxydation lipidique [476]. Ceci est appuyé par l'effet inhibiteur des antioxydants Trolox et BHT sur les quantités de MDA.

L'intégrité du mouvement du cholestérol dans les THP-1 s'est avérée compromise sous l'effet pro-oxydant du fer-ascorbate, ce qui suggère que l'oxydation des LDL est un processus important, mais non obligatoire, pour la formation de cellules spumeuses. Fait intéressant dans nos expériences, seule la voie de l'efflux a été dérangée par la peroxydation lipidique. Tel que mentionné précédemment, la formation des cellules spumeuses à partir des macrophages constitue un événement critique de l'initiation du processus d'athérosclérose. La modulation par le stress oxydatif de l'expression de gènes impliqués dans les

voies d'import et d'export de cholestérol peut avoir un grand impact dans la formation des cellules spumeuses et le développement des lésions. Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec les observations cliniques montrant que l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines peut réduire l'athérosclérose, indépendamment de l'abaissement des niveaux de cholestérol [530,531].

Par la suite, nous avons investigué la régulation génique et protéique des récepteurs qui participent au transport de cholestérol. La CD36 est un récepteur éboueur majeur qui internalise les LDL modifiées [202,532]. Nos résultats montrent que seule l'expression protéique de la CD36 est modifiée par le stress oxydatif dans les macrophages THP-1. Il a déjà été démontré que les oxLDL peuvent stimuler la CD36 via le facteur de transcription PPAR γ [202,532], menant potentiellement à la formation de cellules spumeuses, la mort cellulaire et le relâchement de lipides et des MMPs. Toutefois, dans nos expériences, l'expression génique de PPAR γ a été réduite par le fer-ascorbate alors qu'aucun changement dans l'ARNm de la CD36 n'a été décelé.

D'une manière similaire, le complexe fer-ascorbate n'a pas causé de changements dans l'expression génique et protéique de SR-BI, récepteur qui permet les échanges bidirectionnels de cholestérol à travers la membrane plasmique et l'entrée des esters de cholestérol [205]. Il semble que l'expression de SR-BI dans les macrophages soit modulée par la charge en cholestérol [533], ainsi que par les voies de PPAR α , PPAR γ et LXR α [206,310]. Par contre, sa régulation, qui est inversement corrélée à l'expression de l'ABCA1 [534,535], n'est pas encore complètement comprise. Sous nos conditions expérimentales, le

stress oxydatif n'a induit aucun changement significatif de SR-BI, même si les voies de PPAR et de LXR ont été altérées.

En contraste, le stress oxydatif a réduit l'expression génique et protéique de l'ABCA1, ce qui peut expliquer la diminution de l'efflux de cholestérol. L'expression génique de l'ABCA1 peut être régulée de manière transcriptionnelle ; plusieurs études ont démontré que les PPARs induisent l'expression de l'ABCA1 dans les macrophages à travers une cascade transcriptionnelle, via l'activation des récepteurs nucléaires LXRs [229,234,275,536,537]. De ce fait, nous avons déterminé si la diminution d'ABCA1 et de l'efflux de cholestérol par le stress oxydatif était dépendante de l'inactivation des PPARs et/ou des LXRs. Nos résultats démontrent clairement que le fer-ascorbate inhibe la transcription de PPAR α , PPAR γ , LXR α et LXR β .

En résumé, selon nos résultats, en réponse au stress oxydatif, le cholestérol s'accumule dans les macrophages THP-1 en conséquence d'une réduction de son efflux cellulaire. Le diagramme ci-dessous dépeint les mécanismes possibles de ce bris d'homéostasie : le stress oxydatif limite l'efflux de cholestérol à travers une cascade moléculaire impliquant l'inhibition de l'expression génique de PPAR α et PPAR γ , entraînant le déclin de la transcription de LXR α et LXR β , ou via une baisse directe de ces derniers. Ceci entraîne la diminution de l'expression de l'ABCA1 et de sa transcription protéique, ce qui abaisse la sortie du cholestérol. La peroxydation lipidique catalysée par le fer-ascorbate semble donc jouer un rôle important dans la régulation de l'efflux de cholestérol des macrophages THP-1.

Figure 33. Réduction de l'efflux de cholestérol par le stress oxydatif dans les macrophages THP-1

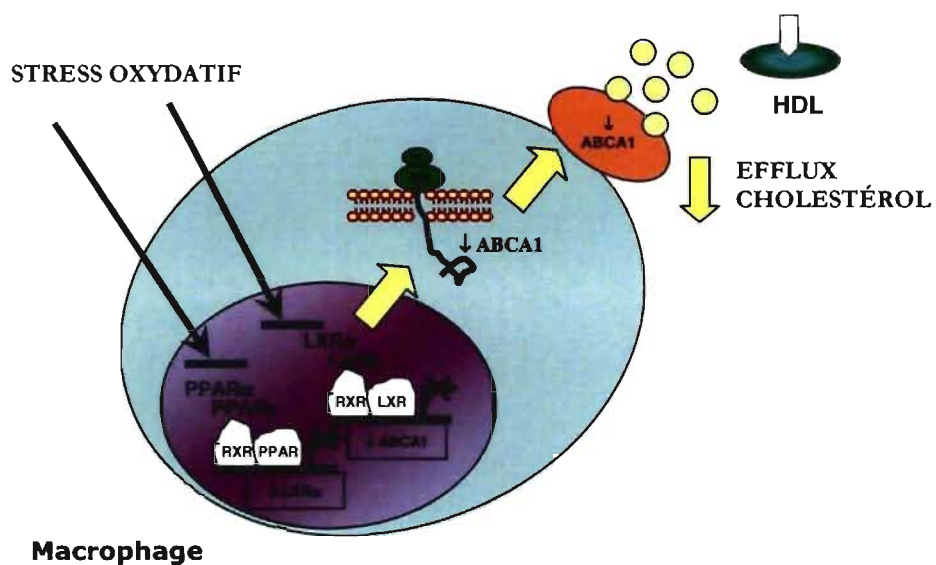


Figure 33 : Dans les cellules THP-1, le stress oxydatif pourrait abaisser l'efflux de cholestérol en inhibant l'expression génique de PPAR α et PPAR γ , entraînant ainsi le déclin de l'ARNm de LXR α et LXR β , ou pourrait agir directement sur les LXRs. Ceci pourrait diminuer la transcription génique de l'ABCA1, puis conséquemment sa masse protéique, réduisant l'efflux de cholestérol.

Dans le deuxième volet de notre étude, nous avons évalué l'impact du fer-ascorbate sur les mécanismes de transport de cholestérol et d'inflammation des cellules endothéliales vasculaires. Nous croyons que l'étude de la régulation du transport de cholestérol dans les cellules endothéliales vasculaire soit pertinente, car malgré le fait que ces cellules ne subissent pas de transformation spumeuse et n'accumulent pas le cholestérol de manière comparable aux macrophages, elles expriment des récepteurs pour les lipoprotéines oxydées et sont pourvues des voies métaboliques pour la synthèse des stérols. Plusieurs données suggèrent aussi que les cellules endothéliales maintiennent l'homéostasie du cholestérol par régulation négative de la synthèse de cholestérol et des récepteurs des lipoprotéines de basse densité, ainsi que par un mécanisme d'efflux de cholestérol cellulaire dépendant des lipoprotéines de haute densité [214,247,249,258].

Globalement, nos résultats ont rapporté une augmentation appréciable des niveaux de MDA, sans changement dans les processus d'influx ou d'efflux de cholestérol et des récepteurs aux lipoprotéines (comme l'ABCA1, le SR-BI et le LOX-1), ni dans l'expression génique des récepteurs nucléaires (incluant PPAR α , PPAR δ , PPAR γ , LXR α et LXR β) ou dans les niveaux d'ARNm des molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, E-sélectine et P-sélectine). D'un autre côté, la peroxydation lipidique induite par le fer-ascorbate en présence de monocytes a augmenté leur adhésion aux cellules HUVEC, en parallèle avec l'augmentation de l'expression génique de la ICAM-1, la E-sélectine et la MCP-1 et avec la réduction de la eNOS.

Nos données expérimentales permettent de confirmer la présence d'ABCA1 [214] et de SR-BI [538] dans les cellules endothéliales, mais ne démontrent aucune modification de leur expression par le stress oxydatif induit par le fer-ascorbate. De la même manière, les processus d'influx et d'efflux de cholestérol n'ont pas été changés par le stress oxydatif. Nos résultats suggèrent donc que le stress oxydatif opère de manière différente dans les cellules endothéliales que dans les macrophages, étant donné la constatation que dans les macrophages THP-1, le fer-ascorbate empêche l'efflux de cholestérol en réduisant l'expression génique et protéique de l'ABCA1.

Le LOX-1 est présent sur les cellules endothéliales et consiste en un récepteur majeur des oxLDL [215,539]. Il permet l'internalisation des oxLDL dans les cellules et peut induire la dysfonction des cellules endothéliales [540]. L'expression de LOX-1 stimule une variété de processus intracellulaires qui mènent à l'expression des molécules d'adhésion, auxquelles s'attachent les cellules inflammatoires, et à l'activation endothéliale en affectant une variété de gènes comme la eNOS et la MCP-1 [127,540-543]. Par contre, dans nos conditions expérimentales, la peroxydation lipidique induite par le fer-ascorbate n'a pas permis de changer l'expression de LOX-1 et n'a pas affecté le statut de la VCAM-1, la ICAM-1 et de la E-sélectine. De plus, d'une manière générale, les PPARs et les LXRs contrôlent la transcription de plusieurs gènes spécifiques impliqués dans les voies centrales du métabolisme du cholestérol, de son transport et de son élimination [544,545]. Par exemple, les oxLDL inhibent l'efflux de cholestérol des cellules endothéliales vers l'apo A-I et suppriment les

niveaux protéiques et d'ARNm de l'ABCA1 dans les HUVEC en diminuant l'activité du promoteur de l'ABCA1 via une inhibition dépendante des ligands des LXRs [249]. Nos observations n'ont pas révélé de modifications dans l'expression génique de ces récepteurs nucléaires par le stress oxydatif. Dans l'ensemble, les effets pro-inflammatoires et pro-athérogènes des oxLDL n'ont pas été observés par la peroxydation lipidique.

Plusieurs évidences supportent le rôle important de l'inflammation dans toutes les phases du développement de l'athérosclérose. Les monocytes et les macrophages sont impliqués de manière critique à tous les stades de l'athérogenèse et, lorsque stimulés, ils peuvent produire des médiateurs biologiquement actifs qui ont une profonde influence sur la progression de l'athérosclérose. Nos résultats démontrent que le stress oxydatif amplifie l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et que cette interaction cellulaire stimule l'expression génique de la ICAM-1, la E-sélectine et la MCP-1, mais réprime l'expression de la eNOS. À notre connaissance, ceci constitue le premier rapport qui documente la contribution significative de la peroxydation induite par le fer-ascorbate comme un stimulus potentiellement nocif pour l'endothélium, sans contribution des oxLDL. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, la présence concomitante de stress oxydatif et des monocytes s'est avérée nécessaire pour induire les facteurs chimiotactiques et pour abaisser la eNOS, ce qui pourrait avoir des impacts nocifs sur la santé de l'endothélium dans une situation *in vivo*.

Des auteurs ont démontré qu'une source exogène d'anions superoxydes, les principaux dérivés réactifs de l'oxygène formés par les monocytes et les macrophages, stimule de manière directe et rapide l'expression de la P-sélectine et de la ICAM-1 à la surface des HUVEC et diminue l'expression protéique et génique de la eNOS [546]. Selon ces données et l'analyse de nos résultats, il nous semble possible que, en absence des oxLDL, la présence des monocytes/macrophages, ou de leurs principaux agents radicalaires, les anions superoxydes, soit nécessaire pour provoquer la réactivité endothéliale.

Figure 34. Stress oxydatif et cellules endothéliales vasculaires

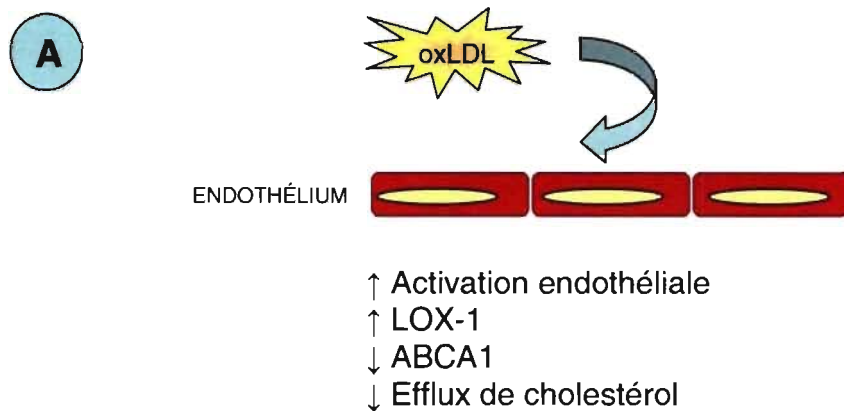


Figure 34 A : L'exposition des cellules endothéliales vasculaires aux oxLDL entraîne la dysfonction endothéliale. Entre autres, les oxLDL stimulent l'activation endothéliale et l'expression de LOX-1, mais ils inhibent l'ABCA1 et l'efflux de cholestérol [249].

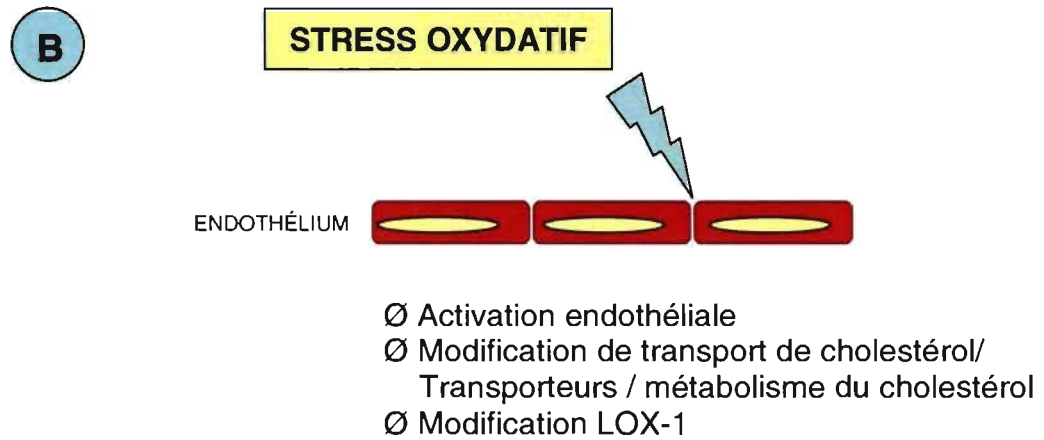


Figure 34 B : Dans notre étude, le stress oxydatif induit par le fer-ascorbate n'a pas modifié les caractéristiques spécifiques à la dysfonction endothéliale.

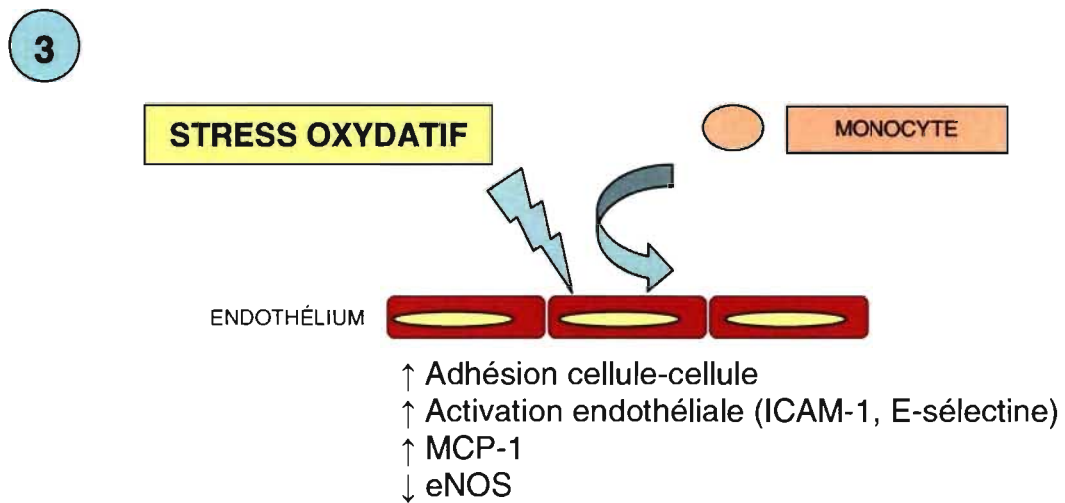


Figure 34 C : Dans nos conditions expérimentales et en présence des monocytes, le stress oxydatif a augmenté l'interaction cellulaire, a amplifié l'expression des molécules inflammatoires ICAM-1, E-sélectine et MCP-1 et a réduit l'expression de la NO synthase endothéliale.

Dans le troisième volet de notre étude, nous avons investigué l'influence du stress oxydatif sur les réponses antioxydantes et inflammatoires des macrophages THP-1. Les macrophages jouent des rôles cruciaux comme effecteurs cellulaires des réactions inflammatoires et des réponses immunitaires. Ces cellules phagocytaires captent une large variété de composés et produisent des dérivés réactifs de l'oxygène dans un processus appelé « respiratory burst » qui contribue à éliminer les pathogènes envahissants [547]. En plus de leur action bactéricide, la production contrôlée et physiologique de ROS est requise pour une régulation convenable des voies contrôlant l'expression génique, les modifications post-traductionnelles des protéines et la signalisation cellulaire [547,548]. Toutefois, la surproduction soutenue de ROS peut entraîner l'inflammation et le dommage tissulaire. Par exemple, la génération excessive et non contrôlée de ROS peut endommager les cellules vasculaires, induire la formation de oxLDL et initier le processus d'athérosclérose [418]. Dans ces conditions, la capacité antioxydante des macrophages s'avère très importante, non seulement pour maintenir les fonctions vitales dans la défense envers l'hôte, mais aussi pour contrôler de façon précise l'équilibre rédox intracellulaire.

L'étude de la relation entre les macrophages et le stress oxydatif a, jusqu'à ce jour, particulièrement porté sur les événements chimiques responsables de l'oxydation des LDL et sur leur importance dans l'athérosclérose [549]. Par contre, la capacité des macrophages de composer avec des stimuli oxydatifs exogènes et de déployer leur arsenal de défenses antioxydantes n'a été que très peu investiguée. Ainsi, d'une manière spécifique, nous avons évalué l'effet du

fer-ascorbate sur la susceptibilité des macrophages à la peroxydation lipidique, sur la réponse de leurs antioxydants endogènes, sur leur statut rédox et sur la génération de l'inflammation. Dans cette étude, nous démontrons que l'incubation des macrophages THP-1 en présence de fer-ascorbate induit (1) une peroxydation lipidique marquée ; (2) une déplétion en acides gras polyinsaturés ; (3) une augmentation du ratio GSSG/GSH total ; (4) une élévation de l'activité SOD totale ; (5) une diminution de l'ARNm et de la masse protéique de la SOD3 extracellulaire et de l'ATOX-1 ; (6) une diminution des activités GSH-péroxydase et GSH-transférase ; (7) des activités catalase et GSH réductase inchangées ; (8) une expression inchangée de la γ -glutamyltransférase, de la γ -glutamylcystéine synthétase et de la glutathion synthétase ; (9) une élévation de TNF- α en accord avec la diminution de l'expression protéique de I κ B ; et (10) une accumulation de H₂O₂ au niveau intra- et extracellulaire.

Il a déjà été démontré que la peroxydation lipidique induite par le fer-ascorbate altère la composition et les propriétés des environnements lipidiques, affecte les fonctions des enzymes régulatrices des stérols et l'intégrité membranaire des protéines du RE, en plus de déranger l'homéostasie du cholestérol [550,551]. Les données présentées dans notre étude indiquent clairement que le système fer-ascorbate entraîne une peroxydation marquée dans les macrophages, probablement par l'oxydation des AGPI membranaires, menant à la perte des acides gras n-3 et n-6. Les niveaux de MDA et la déplétion en acides gras ont pu être réduits par le traitement des macrophages avec les antioxydants.

Nous avons aussi étudié les effets du fer sur le statut rédox cellulaire, connu pour être très susceptible au stress oxydatif soutenu. Plusieurs mécanismes importants impliqués dans la défense antioxydante impliquent le tripeptide glutathion. Le glutathion est le composé thiolé le plus abondant dans les cellules des mammifères, avec des niveaux aussi élevés que 10 mM [552-554]. Le glutathion existe principalement dans sa forme réduite (GSH) et seulement de 1 à 5% est dans sa forme oxydée pour former le glutathion disulfide (GSSG). L'enzyme glutathion-disulfide réductase dépendante du NADPH réduit le GSSG en GSH, et le ratio GSSG/GSH total est souvent utilisé comme un indicateur du statut rédox cellulaire [555,556]. Nos résultats démontrent que l'augmentation de la peroxydation lipidique par le fer-ascorbate est parallèle à l'élévation des niveaux de MDA et que les altérations des acides gras polyinsaturés sont accompagnées d'une hausse du ratio GSSG/GSH total dans les macrophages.

Le glutathion est synthétisé en deux étapes séquentielles dépendantes de l'ATP, catalysées par les enzymes γ -glutamylcystéine synthétase (γ -GCS), l'enzyme limitante, et glutathion synthétase (GSS). Aucun changement significatif de l'expression génique de ces enzymes en réponse au fer-ascorbate n'a été observé. En conséquent, nous avons testé la modulation de l'expression de la γ -glutamyltransférase (γ -GT), l'enzyme responsable du catabolisme extracellulaire du glutathion et, encore une fois, la peroxydation lipidique n'a pas modifié son expression.

Figure 35. Synthèse et métabolisme du glutathion

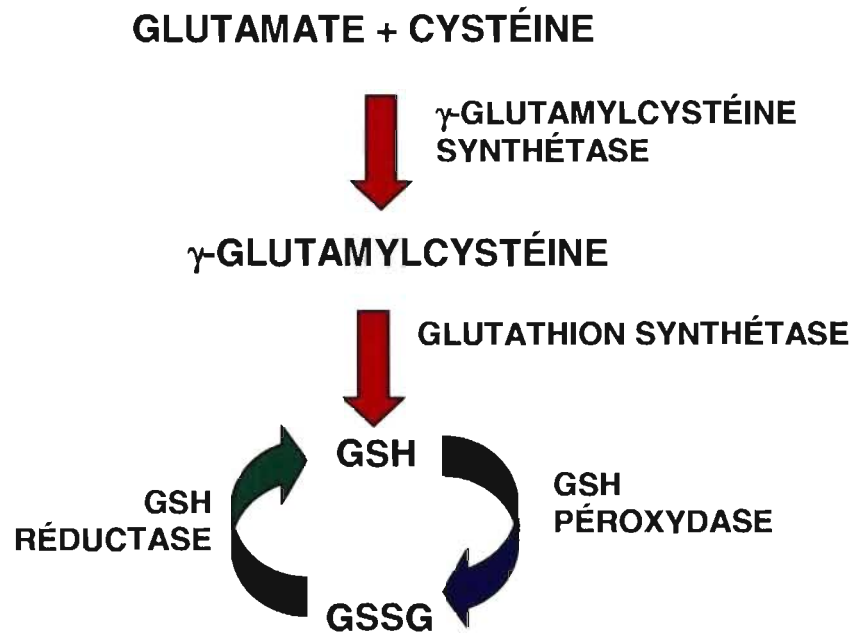


Figure 35 : Le glutathion est synthétisé en deux étapes séquentielles dépendantes de l'ATP, catalysées par les enzymes γ -GCS et GSS. L'enzyme GSH peroxydase oxyde le GSH en GSSG et la GSH réductase réduit le GSSG en GSH.

La production de radicaux libres est contrôlée par différents mécanismes de défense consistant en des protéines enzymatiques. Les protections antioxydantes enzymatiques incluent les SOD, la catalase et les GPx. Les SOD sont des enzymes qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde (O_2^-), hautement réactif, en O_2 et en H_2O_2 . La CAT et les GPx jouent pour leur part un rôle important dans la détoxification du H_2O_2 . En particulier, la catalase réagit de

manière très efficace avec le H_2O_2 pour former de l'eau et de l'oxygène moléculaire, protégeant ainsi les cellules contre l'accumulation de H_2O_2 . Les GPx catalysent la réaction des hydroperoxydes en utilisant le GSH, défendant aussi les cellules contre les dommages oxydatifs. Les données de notre étude indiquent que l'activité SOD totale des macrophages augmente en présence de fer-ascorbate. Par contre, la catalase est restée inchangée et une faible diminution de l'activité GPx a été notée. Ainsi, le débalancement dans la coordination de l'expression et de l'activité des enzymes antioxydantes dans les macrophages pourrait mener à la génération de stress oxydatif. En effet, en stimulant la dismutation de O_2^- , l'activité SOD peut faciliter la formation de H_2O_2 , un dérivé réactif de l'oxygène capable d'induire le dommage cellulaire à de hautes concentrations ($>100 \mu M$) [557].

Chez les mammifères, on compte trois métallo-isozymes de SOD : la cuivre-zinc SOD (Cu, Zn-SOD ou SOD1), la manganèse SOD (Mn-SOD ou SOD2) et la cuivre-zinc SOD extracellulaire (ec-SOD ou SOD3). La SOD3, une glycoprotéine tétramérique, consiste en une enzyme sécrétoire, alors que la SOD1 et la SOD2 sont des enzymes intracellulaires retrouvées de manière prédominante respectivement dans le cytoplasme et la mitochondrie [558]. Nos expériences indiquent que le stress oxydatif induit par le fer-ascorbate augmente l'activité de la SOD1. Ce gain de fonction n'a pas accompagné une élévation de son expression protéique et génique, ce qui suggère une régulation post-traductionnelle de l'enzyme [559-563]. D'une manière similaire, l'équipe de Holvoet [564] a rapporté que les oxLDL peuvent réduire les défenses oxydantes

dans les cellules THP-1 en inhibant la SOD1. Des données récentes obtenues chez les souris transgéniques ont souligné l'importance fonctionnelle de la SOD1. En effet, l'invalidation de la SOD1 entraîne l'augmentation des niveaux vasculaires de superoxydes et de peroxy-nitrites, une élévation des processus myogéniques et des réponses vasoconstrictrices, un défaut dans la relaxation dépendante de l'endothélium dans les artères et les micro-vaisseaux, une amplification de la perméabilité vasculaire post-ischémie et des anomalies de la structure vasculaire [565-568]. La prédominance de SOD1 dans les cellules est aussi un signe de son importance fonctionnelle. Par exemple, l'activité de la SOD1 dans les aortes humaines et de souris compte pour 50 à 80 % de l'activité totale de la SOD, alors que la SOD2 contribue pour 2 à 12% de l'activité et que la SOD3 compte pour le reste [569]. Toutefois, la diminution de l'expression génique et la masse protéique de cette dernière pourrait avoir des conséquences nocives, étant donné le rôle de la SOD3 dans la régulation des niveaux extracellulaires d'anions superoxydes [558].

L'ATOX-1 consiste en une protéine chaperone cytosolique qui délivre le cuivre à la SOD3 et qui est requise pour son activité [570]. Nous avons observé une diminution significative de l'expression génique d'ATOX-1, ce qui est consistant avec les données révélant que cette protéine n'agit pas seulement en livrant le cuivre à la SOD3, mais aussi comme un régulateur positif de sa transcription [570].

Nous avons aussi investigué l'accumulation possible de H₂O₂ aux niveaux intracellulaire et extracellulaire, après une incubation des THP-1 avec le fer-

ascorbate. Nos données indiquent une élévation des niveaux de H_2O_2 dans les homogénats cellulaires et dans le surnageant. Il a déjà été démontré que le peroxyde d'hydrogène peut abaisser l'expression protéique de la SOD3, ainsi que l'expression génique de la SOD3 et de l'ATOX-1. Cette accumulation de H_2O_2 pourrait donc être une pièce du mécanisme par lequel le fer-ascorbate influence la SOD3 [571,572].

Dans les macrophages, les réponses inflammatoires sont étroitement contrôlées à travers une régulation impliquant le NF- κ B. À l'état de base, le NF- κ B se trouve au niveau cytosolique sous la forme d'un hétérodimère p50/p65 complexé avec son inhibiteur, le I κ B. L'activation d'un complexe I κ B kinase par différents stimuli mène à la phosphorylation de I κ B, causant sa dissociation de NF- κ B et sa dégradation successive dans le protéasome. La perte de I κ B permet une translocation rapide de NF- κ B au noyau, ce qui facilite la transcription de protéines pro-inflammatoires [573,574]. Étant donné que le NF- κ B est un facteur de transcription sensible au stress oxydatif, nous avons testé l'expression protéique de I κ B dans les macrophages THP-1 exposés au fer-ascorbate. Selon nos résultats, ce système pro-oxydant est capable de diminuer l'expression protéique de I κ B, ce qui peut potentiellement relâcher le NF- κ B et faciliter sa translocation au noyau, entraînant l'activation des gènes pro-inflammatoires comme le TNF- α , tel que nous l'avons noté dans nos expériences.

De ces travaux, nous concluons que lorsque les macrophages THP-1 sont soumis à un stress oxydatif, il s'ensuit une peroxydation lipidique, une perturbation de la composition en acides gras polyinsaturés et une réponse

inflammatoire. Dans nos conditions expérimentales, la réponse des enzymes antioxydantes ne s'est pas avérée efficace, ce qui a mené à une perturbation du statut rédox et à l'accumulation intracellulaire et extracellulaire du peroxyde d'hydrogène, qui peut lui-même exercer des effets nocifs. Cette attaque oxydative a donc dérégulé certains processus de défense des macrophages THP-1, qui n'ont pas été en mesure de se détoxifier de manière convenable.

Figure 36. Réponse des macrophages au stress oxydatif

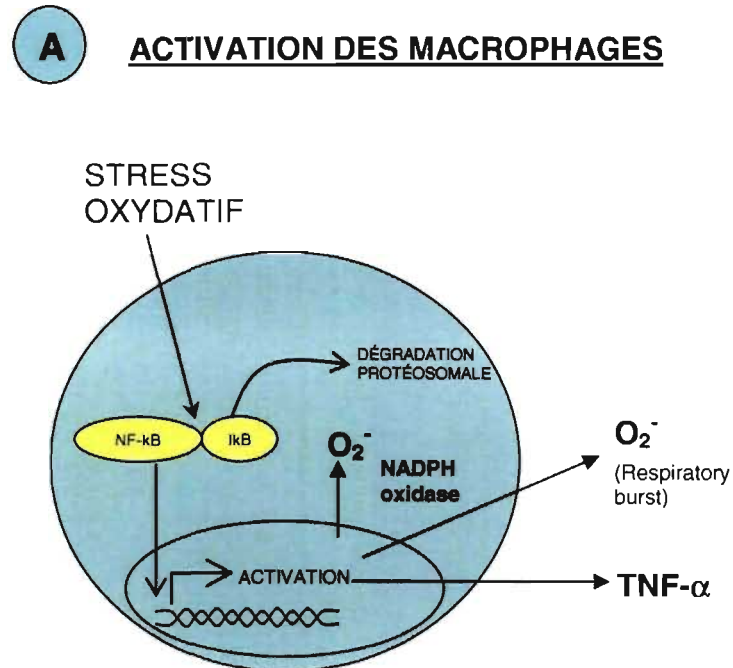


Figure 36 A : Nous proposons que dans les macrophages THP-1, le stress oxydatif entraîne la dissociation de NF- κ B de son inhibiteur, puis sa translocation au noyau. Ceci active les macrophages et mène à la synthèse d'anions superoxydes et de facteurs inflammatoires comme le TNF- α .

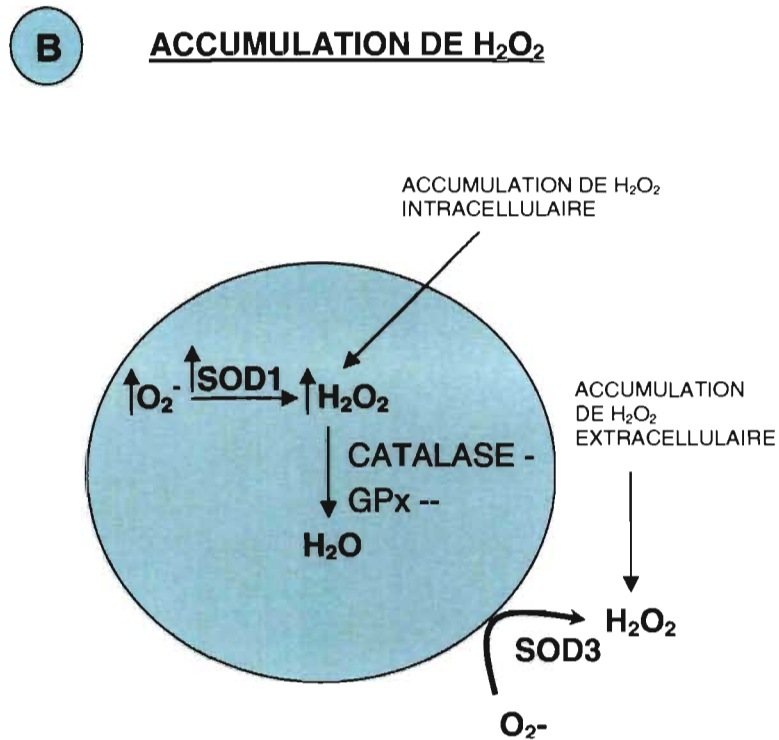


Figure 36 B : Dans nos conditions expérimentales, l'activité SOD totale et SOD1 est amplifiée en réponse au stress oxydatif, probablement en raison de la surproduction d'anions superoxydes. Par contre, les enzymes catalase et glutathion peroxydase ne démontrent pas d'augmentation parallèle, ce qui cause une accumulation de peroxyde d'hydrogène au niveau intracellulaire et extracellulaire.

C IMPACT DE H_2O_2 ET $TNF-\alpha$ SUR ATOX1 ET SOD3

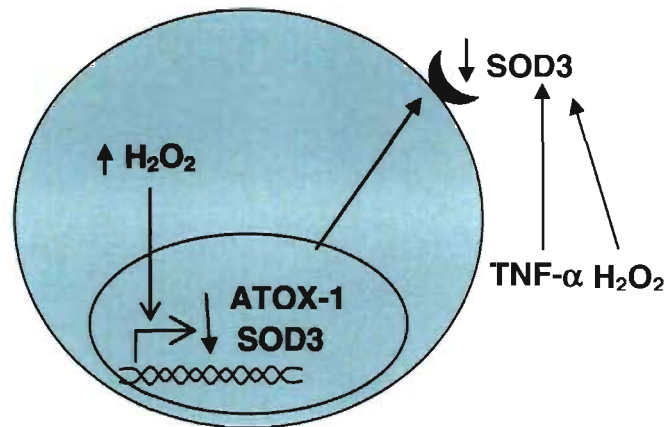


Figure 36 C : L'accumulation de peroxyde d'hydrogène peut entraîner une réduction de la transcription génique et de l'expression protéique de la SOD3, tout comme le $TNF-\alpha$ qui peut exercer un effet négatif sur la protéine. Il a aussi été démontré que le peroxyde d'hydrogène a la capacité d'abaisser l'expression d'ATOX-1, qui peut à son tour empêcher l'expression de la SOD3.

En conclusion, nos études ont permis de préciser l'impact du stress oxydatif sur les étapes précoces de l'athérogenèse, en plus de souligner l'implication capitale des macrophages dans ce processus. Lorsque les macrophages se trouvent dans un milieu pro-oxydatif, ils deviennent prédisposés à se développer en cellules spumeuses, par l'inhibition, entre autres, de la sortie de cholestérol cellulaire. Le stress oxydatif peut aussi stimuler la dysfonction des cellules endothéliales vasculaires, mais seulement lorsque ces dernières sont mises en présence de monocytes, soit à l'instar de la situation pathophysiologique normale. Enfin, l'importance des monocytes/macrophages dans ces étapes pourrait être due à leur incapacité à se défendre adéquatement contre un stress oxydatif, devenant toxiques pour eux-mêmes et pour les cellules environnantes.

Ainsi, nos résultats appuient l'hypothèse inflammatoire qui implique de manière prédominante les monocytes/macrophages dans le développement de l'athérosclérose. Selon nos travaux, les interventions préventives et thérapeutiques des maladies cardiovasculaires devraient cibler plus spécifiquement les monocytes/macrophages et leurs interactions avec l'endothélium, plutôt que de viser simplement la dysfonction endothéliale.

7. RÉFÉRENCES

- [1] Levy E, Roy CC. Developmental aspects of intestinal lipoprotein synthesis and secretion. In: Lebenthal E, editor. Human Gastrointestinal Development. New York: Raven Press, 1989. p. 491-502.

- [2] Levy E. Digestion and absorption of carbohydrates, fat and proteins. In: Rathaike RN, editor. Small Bowel Disorders. USA: 2000. p. 162-82.

- [3] Freeland-Graves JH, Peckham GC. Lipids. In: Foundation of Food Preparation. Prentice-Hall, 1996. p. 49-61.

- [4] Phan CT, Tso P. Intestinal lipid absorption and transport. Front Biosci 2001;6:D299-D319.

- [5] Ros E. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. Atherosclerosis 2000;151(2):357-79.

- [6] Luc G, Lecerf J, Bard J-M, Hachulla E, Fruchart J-C, Devulder B. Cholestérol et athérosclérose. Édition Masson ed. 1991.

- [7] Marcil V, Peretti N, Delvin E, Levy E. [Digestive and absorptive processes of lipids]. *Gastroenterol Clin Biol* 2004;28(12):1257-66.
- [8] Istvan ES, Deisenhofer J. The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529(1-3):9-18.
- [9] Erlanson-Albertsson C. Pancreatic colipase. Structural and physiological aspects. *Biochim Biophys Acta* 1992;1125(1):1-7.
- [10] Tso P. Intestinal lipid absorption. In: Johnson LR, editor. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press, 1994. p. 1867-907.
- [11] Donovan JM, Jackson AA. Accurate separation of biliary lipid aggregates requires the correct intermixed micellar/intervesicular bile salt concentration. *Hepatology* 1998;27(3):641-8.
- [12] Davidson NO, Magun AM. Intestinal lipid absorption. In: Johnson LR, editor. *Textbook of Gastroenterology*. Philadelphia: Edition T. Yamada, 1995. p. 428-55.

- [13] Hamilton JA, Kamp F. How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* 1999;48(12):2255-69.
- [14] Schaffer JE. Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282(2):E239-E246.
- [15] Veerkamp JH, van Kuppevelt TH, Maatman RG, Prinsen CF. Structural and functional aspects of cytosolic fatty acid-binding proteins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1993;49(6):887-906.
- [16] Alpers DH, Bass NM, Engle MJ, DeSchryver-Kecskemeti K. Intestinal fatty acid binding protein may favor differential apical fatty acid binding in the intestine. *Biochim Biophys Acta* 2000;1483(3):352-62.
- [17] Dawson PA, Rudel LL. Intestinal cholesterol absorption. *Curr Opin Lipidol* 1999;10(4):315-20.
- [18] Eehalt R, Fullekrug J, Pohl J, Ring A, Herrmann T, Stremmel W. Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Mol Cell Biochem* 2006;284(1-2):135-40.

- [19] Glatz JF, van der Vusse GJ. Cellular fatty acid-binding proteins: current concepts and future directions. *Mol Cell Biochem* 1990;98(1-2):237-51.
- [20] Stahl A, Hirsch DJ, Gimeno RE, Punreddy S, Ge P, Watson N, Patel S, Kotler M, Raimondi A, Tartaglia LA, Lodish HF. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol Cell* 1999;4(3):299-308.
- [21] Howles PN, Carter CP, Hui DY. Dietary free and esterified cholesterol absorption in cholesterol esterase (bile salt-stimulated lipase) gene-targeted mice. *J Biol Chem* 1996;271(12):7196-202.
- [22] Levy E, Menard D, Suc I, Delvin E, Marcil V, Brissette L, Thibault L, Bendayan M. Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 2):327-37.
- [23] Hauser H, Dyer JH, Nandy A, Vega MA, Werder M, Bieliauskaite E, Weber FE, Compassi S, Gemperli A, Boffelli D, Wehrli E, Schulthess G, Phillips MC. Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine. *Biochemistry* 1998;37(51):17843-50.

- [24] Peretti N, Delvin E, Sinnett D, Marcil V, Garofalo C, Levy E.
Asymmetrical regulation of scavenger receptor class B type I by
apical and basolateral stimuli using Caco-2 cells. *J Cell Biochem*
2007;100(2):421-33.
- [25] Bietrix F, Yan D, Nauze M, Rolland C, Bertrand-Michel J, Comera C,
Schaak S, Barbaras R, Groen AK, Perret B, Terce F, Collet X.
Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal
SR-BI. *J Biol Chem* 2006;281(11):7214-9.
- [26] Levy E, Spahis S, Sinnett D, Peretti N, Maupas-Schwalm F, Delvin E,
Lambert M, Lavoie MA. Intestinal cholesterol transport proteins:
an update and beyond. *Curr Opin Lipidol* 2007;18(3):310-8.
- [27] Nauli AM, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB, Lee
D, Jandacek RJ, Abumrad NA, Tso P. CD36 is important for
chylomicron formation and secretion and may mediate
cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology*
2006;131(4):1197-207.
- [28] Sfeir Z, Ibrahimi A, Amri E, Grimaldi P, Abumrad N. Regulation of
FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a
role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins
Leukot Essent Fatty Acids* 1997;57(1):17-21.

- [29] Davis HR, Veltri EP. Zetia: inhibition of Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) to reduce intestinal cholesterol absorption and treat hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb* 2007;14(3):99-108.
- [30] Mikhailidis DP, Sibbring GC, Ballantyne CM, Davies GM, Catapano AL. Meta-analysis of the cholesterol-lowering effect of ezetimibe added to ongoing statin therapy. *Curr Med Res Opin* 2007;23(8):2009-26.
- [31] Davies JP, Scott C, Oishi K, Liapis A, Ioannou YA. Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 2005;280(13):12710-20.
- [32] Corsico B, Cistola DP, Frieden C, Storch J. The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(21):12174-8.
- [33] Thomson AB, Keelan M, Thiesen A, Clandinin MT, Ropeleski M, Wild GE. Small bowel review: normal physiology part 1. *Dig Dis Sci* 2001;46(12):2567-87.

- [34] Besnard P, Niot I, Poirier H, Clement L, Bernard A. New insights into the fatty acid-binding protein (FABP) family in the small intestine. *Mol Cell Biochem* 2002;239(1-2):139-47.
- [35] Montoudis A, Delvin E, Menard D, Beaulieu JF, Jean D, Tremblay E, Bendayan M, Levy E. Intestinal-fatty acid binding protein and lipid transport in human intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339(1):248-54.
- [36] Murphy EJ. Sterol carrier protein-2 expression increases NBD-stearate uptake and cytoplasmic diffusion in L cells. *Am J Physiol* 1998;275(2 Pt 1):G237-G243.
- [37] Schroeder F, Atshaves BP, McIntosh AL, Gallegos AM, Storey SM, Parr RD, Jefferson JR, Ball JM, Kier AB. Sterol carrier protein-2: new roles in regulating lipid rafts and signaling. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771(6):700-18.
- [38] Knudsen J, Jensen MV, Hansen JK, Faergeman NJ, Neergaard TB, Gaigg B. Role of acylCoA binding protein in acylCoA transport, metabolism and cell signaling. *Mol Cell Biochem* 1999;192(1-2):95-103.

- [39] Veerkamp JH. Fatty acid transport and fatty acid-binding proteins. *Proc Nutr Soc* 1995;54(1):23-37.
- [40] Buhman KK, Smith SJ, Stone SJ, Repa JJ, Wong JS, Knapp FF, Jr., Burri BJ, Hamilton RL, Abumrad NA, Farese RV, Jr. DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis. *J Biol Chem* 2002;277(28):25474-9.
- [41] Cao J, Lockwood J, Burn P, Shi Y. Cloning and functional characterization of a mouse intestinal acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase, MGAT2. *J Biol Chem* 2003;278(16):13860-6.
- [42] Lee DP, Deonaraine AS, Kienetz M, Zhu Q, Skrzypczak M, Chan M, Choy PC. A novel pathway for lipid biosynthesis: the direct acylation of glycerol. *J Lipid Res* 2001;42(12):1979-86.
- [43] Cao J, Burn P, Shi Y. Properties of the mouse intestinal acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase, MGAT2. *J Biol Chem* 2003;278(28):25657-63.
- [44] Coleman RA, Lewin TM, Muoio DM. Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. *Annu Rev Nutr* 2000;20:77-103.

- [45] Meegalla RL, Billheimer JT, Cheng D. Concerted elevation of acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298(3):317-23.
- [46] Millar JS, Stone SJ, Tietge UJ, Tow B, Billheimer JT, Wong JS, Hamilton RL, Farese RV, Jr., Rader DJ. Short-term overexpression of DGAT1 or DGAT2 increases hepatic triglyceride but not VLDL triglyceride or apoB production. *J Lipid Res* 2006;47(10):2297-305.
- [47] Yen CL, Farese RV, Jr. MGAT2, a monoacylglycerol acyltransferase expressed in the small intestine. *J Biol Chem* 2003;278(20):18532-7.
- [48] Cao J, Hawkins E, Brozinick J, Liu X, Zhang H, Burn P, Shi Y. A predominant role of acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase-2 in dietary fat absorption implicated by tissue distribution, subcellular localization, and up-regulation by high fat diet. *J Biol Chem* 2004;279(18):18878-86.
- [49] Cheng D, Nelson TC, Chen J, Walker SG, Wardwell-Swanson J, Meegalla R, Taub R, Billheimer JT, Ramaker M, Feder JN.

Identification of acyl coenzyme A:monoacylglycerol acyltransferase 3, an intestinal specific enzyme implicated in dietary fat absorption. *J Biol Chem* 2003;278(16):13611-4.

- [50] Buhman KF, Accad M, Farese RV. Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529(1-3):142-54.
- [51] Davidson NO, Shelness GS. APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu Rev Nutr* 2000;20:169-93.
- [52] Anderson RA, Joyce C, Davis M, Reagan JW, Clark M, Shelness GS, Rudel LL. Identification of a form of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase specific to liver and intestine in nonhuman primates. *J Biol Chem* 1998;273(41):26747-54.
- [53] Parini P, Davis M, Lada AT, Erickson SK, Wright TL, Gustafsson U, Sahlin S, Einarsson C, Eriksson M, Angelin B, Tomoda H, Omura S, Willingham MC, Rudel LL. ACAT2 is localized to hepatocytes and is the major cholesterol-esterifying enzyme in human liver. *Circulation* 2004;110(14):2017-23.
- [54] Tanaka A. Postprandial hyperlipidemia and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2004;11(6):322-9.

- [55] Berriot-Varoqueaux N, Aggerbeck LP, Samson-Bouma M, Wetterau JR. The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu Rev Nutr* 2000;20:663-97.
- [56] Hussain MM, Kancha RK, Zhou Z, Luchoomun J, Zu H, Bakillah A. Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochim Biophys Acta* 1996;1300(3):151-70.
- [57] Black DD. Development and Physiological Regulation of Intestinal Lipid Absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293(3):G519-G524.
- [58] Gordon DA, Jamil H, Gregg RE, Olofsson SO, Boren J. Inhibition of the microsomal triglyceride transfer protein blocks the first step of apolipoprotein B lipoprotein assembly but not the addition of bulk core lipids in the second step. *J Biol Chem* 1996;271(51):33047-53.
- [59] Siddiqi SA, Gorelick FS, Mahan JT, Mansbach CM. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 2):415-27.

- [60] Hussain MM, Fatma S, Pan X, Iqbal J. Intestinal lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol* 2005;16(3):281-5.
- [61] Levy E, Mehran M, Seidman E. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J* 1995;9(8):626-35.
- [62] Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998;27(3):503-19.
- [63] Ory DS. Chylomicrons and lipoprotein lipase at the endothelial surface: bound and GAG-ged? *Cell Metab* 2007;5(4):229-31.
- [64] Mead JR, Ramji DP. The pivotal role of lipoprotein lipase in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2002;55(2):261-9.
- [65] Dullaart RP, Dallinga-Thie GM, Wolffenbuttel BH, van Tol A. CETP inhibition in cardiovascular risk management: a critical appraisal. *Eur J Clin Invest* 2007;37(2):90-8.
- [66] Murayama T, Yokode M, Horiuchi H, Yoshida H, Sano H, Kita T. Overexpression of low density lipoprotein receptor eliminates apolipoprotein B100-containing lipoproteins from circulation and markedly prevents early atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2000;153(2):295-302.

- [67] Kang S, Davis RA. Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529(1-3):223-30.
- [68] Morral N, Edenberg HJ, Witting SR, Altomonte J, Chu T, Brown M. Effects of glucose metabolism on the regulation of genes of fatty acid synthesis and triglyceride secretion in the liver. *J Lipid Res* 2007;48(7):1499-510.
- [69] Olofsson SO, Asp L, Boren J. The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1999;10(4):341-6.
- [70] Wang H, Gilham D, Lehner R. Proteomic and lipid characterization of apolipoprotein B-free luminal lipid droplets from mouse liver microsomes: Implications for very-low density lipoprotein assembly. *J Biol Chem* 2007.
- [71] Bradbury P, Mann CJ, Kochl S, Anderson TA, Chester SA, Hancock JM, Ritchie PJ, Amey J, Harrison GB, Levitt DG, Banaszak LJ, Scott J, Shoulders CC. A common binding site on the microsomal triglyceride transfer protein for apolipoprotein B and protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 1999;274(5):3159-64.

- [72] Hussain MM, Bakillah A, Nayak N, Shelness GS. Amino acids 430-570 in apolipoprotein B are critical for its binding to microsomal triglyceride transfer protein. *J Biol Chem* 1998;273(40):25612-5.
- [73] Beucler I, Turpin G. [Metabolism of atherogenic lipoproteins]. *Ann Med Interne (Paris)* 2001;152(3):158-61.
- [74] Medh JD, Fry GL, Bowen SL, Ruben S, Wong H, Chappell DA. Lipoprotein lipase- and hepatic triglyceride lipase- promoted very low density lipoprotein degradation proceeds via an apolipoprotein E-dependent mechanism. *J Lipid Res* 2000;41(11):1858-71.
- [75] Vakkilainen J, Jauhiainen M, Ylitalo K, Nuotio IO, Viikari JS, Ehnholm C, Taskinen MR. LDL particle size in familial combined hyperlipidemia: effects of serum lipids, lipoprotein-modifying enzymes, and lipid transfer proteins. *J Lipid Res* 2002;43(4):598-603.
- [76] Zambon A, Bertocco S, Vitturi N, Polentarutti V, Vianello D, Crepaldi G. Relevance of hepatic lipase to the metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 5):1070-4.

- [77] Sato R, Takano T. Regulation of intracellular cholesterol metabolism. *Cell Struct Funct* 1995;20(6):421-7.
- [78] Yoshida M. Potential role of statins in inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2003;10(3):140-4.
- [79] Dietschy JM. Dietary fatty acids and the regulation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentrations. *J Nutr* 1998;128(2 Suppl):444S-8S.
- [80] Packard CJ. Triacylglycerol-rich lipoproteins and the generation of small, dense low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 5):1066-9.
- [81] Colvin PL, Parks JS. Metabolism of high density lipoprotein subfractions. *Curr Opin Lipidol* 1999;10(4):309-14.
- [82] Wang M, Briggs MR. HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance. *Chem Rev* 2004;104(1):119-37.
- [83] Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M, Nguyen D, Dhanasekaran P, Saito H, Rothblat GH, Lund-Katz S, Phillips MC. Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid

efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 2007;282(34):25123-30.

- [84] Kolovou GD, Mikhailidis DP, Anagnostopoulou KK, Daskalopoulou SS, Cokkinos DV. Tangier disease four decades of research: a reflection of the importance of HDL. *Curr Med Chem* 2006;13(7):771-82.
- [85] Stein O, Stein Y. Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2005;178(2):217-30.
- [86] Mineo C, Shaul PW. HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel mechanism of HDL action. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13(6):226-31.
- [87] Han J, Hajjar DP, Zhou X, Gotto AM, Jr., Nicholson AC. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated gene expression. A new mechanism of action for high density lipoprotein. *J Biol Chem* 2002;277(26):23582-6.
- [88] Yokoyama S. Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529(1-3):231-44.

- [89] Baumberger C, Ulevitch RJ, Dayer JM. Modulation of endotoxic activity of lipopolysaccharide by high-density lipoprotein. *Pathobiology* 1991;59(6):378-83.
- [90] Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(11):1987-94.
- [91] Singh IM, Shishehbor MH, Ansell BJ. High-density lipoprotein as a therapeutic target: a systematic review. *JAMA* 2007;298(7):786-98.
- [92] Mackness MI, Mackness B, Durrington PN. Paraonase and coronary heart disease. *Atheroscler Suppl* 2002;3(4):49-55.
- [93] Rosenblat M, Vaya J, Shih D, Aviram M. Paraonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 2005;179(1):69-77.
- [94] Negre-Salvayre A, Dousset N, Ferretti G, Bacchetti T, Curatola G, Salvayre R. Antioxidant and cytoprotective properties of high-

density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic Biol Med* 2006;41(7):1031-40.

- [95] Le Fardeau croissant des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux au Canada. 2003. Canada, Fondation des Maladies du Cœur du Canada.
Ref Type: Pamphlet
- [96] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407(6801):233-41.
- [97] O'Connell BJ, Genest J, Jr. High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation* 2001;104(16):1978-83.
- [98] Trepels T, Zeiher AM, Fichtlscherer S. The endothelium and inflammation. *Endothelium* 2006;13(6):423-9.
- [99] Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol* 2007;49(25):2379-93.

- [100] Chisolm GM, III, Hazen SL, Fox PL, Cathcart MK. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms. *J Biol Chem* 1999;274(37):25959-62.
- [101] Desjardins F, Balligand JL. Nitric oxide-dependent endothelial function and cardiovascular disease. *Acta Clin Belg* 2006;61(6):326-34.
- [102] Wu G, Meininger CJ. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annu Rev Nutr* 2002;22:61-86.
- [103] Fetalvero KM, Martin KA, Hwa J. Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007;82(1-4):109-18.
- [104] Salinas G, Rangasetty UC, Uretsky BF, Birnbaum Y. The cyclooxygenase 2 (COX-2) story: it's time to explain, not inflame. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2007;12(2):98-111.
- [105] Ghesquiere SA, Hofker MH, de Winther MP. The role of phospholipases in lipid modification and atherosclerosis. *Cardiovasc Toxicol* 2005;5(2):161-82.
- [106] Akimoto S, Mitsumata M, Sasaguri T, Yoshida Y. Laminar shear stress inhibits vascular endothelial cell proliferation by inducing

cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1). *Circ Res* 2000;86(2):185-90.

- [107] Resnick N, Yahav H, Schubert S, Wolfovitz E, Shay A. Signalling pathways in vascular endothelium activated by shear stress: relevance to atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000;11(2):167-77.
- [108] Gonzalez MA, Selwyn AP. Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *Am J Med* 2003;115 Suppl 8A:99S-106S.
- [109] Zeng X, Chen J, Miller YI, Javaherian K, Moulton KS. Endostatin binds biglycan and LDL and interferes with LDL retention to the subendothelial matrix during atherosclerosis. *J Lipid Res* 2005;46(9):1849-59.
- [110] Hurt-Camejo E, Camejo G, Rosengren B, Lopez F, Ahlstrom C, Fager G, Bondjers G. Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1992;12(5):569-83.

- [111] Hurt E, Bondjers G, Camejo G. Interaction of LDL with human arterial proteoglycans stimulates its uptake by human monocyte-derived macrophages. *J Lipid Res* 1990;31(3):443-54.
- [112] Boren J, Olin K, Lee I, Chait A, Wight TN, Innerarity TL. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest* 1998;101(12):2658-64.
- [113] Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, Boren J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002;417(6890):750-4.
- [114] O'Brien KD, Olin KL, Alpers CE, Chiu W, Ferguson M, Hudkins K, Wight TN, Chait A. Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques: colocalization of biglycan with apolipoproteins. *Circulation* 1998;98(6):519-27.
- [115] Pillarisetti S, Paka L, Obunike JC, Berglund L, Goldberg IJ. Subendothelial retention of lipoprotein (a). Evidence that

reduced heparan sulfate promotes lipoprotein binding to subendothelial matrix. *J Clin Invest* 1997;100(4):867-74.

- [116] Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 2000;28(12):1815-26.
- [117] Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991;88(6):1785-92.
- [118] Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001;29(Pt 2):358-62.
- [119] Verges B. New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2005;31(5):429-39.
- [120] Lyons TJ, Jenkins AJ. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Curr Opin Lipidol* 1997;8(3):174-80.
- [121] Steinbrecher UP, Witztum JL. Glucosylation of low-density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism. *Diabetes* 1984;33(2):130-4.

- [122] Bowie A, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH. Glycosylated low density lipoprotein is more sensitive to oxidation: implications for the diabetic patient? *Atherosclerosis* 1993;102(1):63-7.
- [123] Hunt JV, Smith CC, Wolff SP. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 1990;39(11):1420-4.
- [124] Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D. Endothelial cell-derived chemotactic activity for mouse peritoneal macrophages and the effects of modified forms of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(17):5949-53.
- [125] Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke* 2006;37(7):1923-32.
- [126] Vainio S, Ikonen E. Macrophage cholesterol transport: a critical player in foam cell formation. *Ann Med* 2003;35(3):146-55.
- [127] Mehta JL. The role of LOX-1, a novel lectin-like receptor for oxidized low density lipoprotein, in atherosclerosis. *Can J Cardiol* 2004;20 Suppl B:32B-6B.

- [128] Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84(4):1381-478.
- [129] Kriegelstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 2001;14(6 Pt 2):44S-54S.
- [130] Sperandio M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J* 2006;273(19):4377-89.
- [131] Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995;9(10):899-909.
- [132] Blann AD, Nadar SK, Lip GY. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2003;24(24):2166-79.
- [133] Freedman JE, Sauter R, Battinelli EM, Ault K, Knowles C, Huang PL, Loscalzo J. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res* 1999;84(12):1416-21.
- [134] Xia L, Sperandio M, Yago T, McDaniel JM, Cummings RD, Pearson-White S, Ley K, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1-

deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J Clin Invest* 2002;109(7):939-50.

- [135] Yang J, Hirata T, Croce K, Merrill-Skoloff G, Tchernychev B, Williams E, Flaumenhaft R, Furie BC, Furie B. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med* 1999;190(12):1769-82.
- [136] Smith ML, Olson TS, Ley K. C. *J Exp Med* 2004;200(7):935-9.
- [137] Katayama Y, Hidalgo A, Chang J, Peired A, Frenette PS. CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *J Exp Med* 2005;201(8):1183-9.
- [138] Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP, Ley K. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med* 2003;197(10):1355-63.
- [139] Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;170(2):191-203.

- [140] Cook-Mills JM. VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species. *Mol Immunol* 2002;39(9):499-508.
- [141] Hughes PE, Pfaff M. Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol* 1998;8(9):359-64.
- [142] Lopez-Rodriguez C, Chen HM, Tenen DG, Corbi AL. Identification of Sp1-binding sites in the CD11c (p150,95 alpha) and CD11a (LFA-1 alpha) integrin subunit promoters and their involvement in the tissue-specific expression of CD11c. *Eur J Immunol* 1995;25(12):3496-503.
- [143] Lefer AM. Role of the beta2-integrins and immunoglobulin superfamily members in myocardial ischemia-reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1999;68(5):1920-3.
- [144] Lynam E, Sklar LA, Taylor AD, Neelamegham S, Edwards BS, Smith CW, Simon SI. Beta2-integrins mediate stable adhesion in collisional interactions between neutrophils and ICAM-1-expressing cells. *J Leukoc Biol* 1998;64(5):622-30.
- [145] Rose DM, Grabovsky V, Alon R, Ginsberg MH. The affinity of integrin alpha(4)beta(1) governs lymphocyte migration. *J Immunol* 2001;167(5):2824-30.

- [146] Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, Jr., Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 1997;96(12):4219-25.
- [147] Malik I, Danesh J, Whincup P, Bhatia V, Papacosta O, Walker M, Lennon L, Thomson A, Haskard D. Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Lancet* 2001;358(9286):971-6.
- [148] Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998;351(9096):88-92.
- [149] Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, Meyer J. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104(12):1336-42.
- [150] Ghaisas NK, Shahi CN, Foley B, Goggins M, Crean P, Kelly A, Kelleher D, Walsh M. Elevated levels of circulating soluble

adhesion molecules in peripheral blood of patients with unstable angina. *Am J Cardiol* 1997;80(5):617-9.

[151] Ikeda H, Nakayama H, Oda T, Kuwano K, Muraishi A, Sugi K, Koga Y, Toshima H. Soluble form of P-selectin in patients with acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis* 1994;5(6):515-8.

[152] Ikeda H, Takajo Y, Ichiki K, Ueno T, Maki S, Noda T, Sugi K, Imaizumi T. Increased soluble form of P-selectin in patients with unstable angina. *Circulation* 1995;92(7):1693-6.

[153] Miwa K, Igawa A, Inoue H. Soluble E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 levels in systemic and coronary circulation in patients with variant angina. *Cardiovasc Res* 1997;36(1):37-44.

[154] Mizia-Stec K, Zahorska-Markiewicz B, Mandecki T, Janowska J, Szulc A, Jastrzebska-Maj E. Serum levels of selected adhesion molecules in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2002;83(2):143-50.

[155] Mulvihill NT, Foley JB, Murphy RT, Pate G, Crean PA, Walsh M. Enhanced endothelial activation in diabetic patients with unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *Diabet Med* 2001;18(12):979-83.

- [156] Parker C, III, Vita JA, Freedman JE. Soluble adhesion molecules and unstable coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2001;156(2):417-24.
- [157] Shyu KG, Chang H, Lin CC, Kuan P. Circulating intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with acute coronary syndrome. *Chest* 1996;109(6):1627-30.
- [158] Rohde LE, Lee RT, Rivero J, Jamacochian M, Arroyo LH, Briggs W, Rifai N, Libby P, Creager MA, Ridker PM. Circulating cell adhesion molecules are correlated with ultrasound-based assessment of carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(11):1765-70.
- [159] Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251(4995):788-91.
- [160] O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD, . Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 1993;92(2):945-51.

- [161] Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(12):1876-90.
- [162] Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* 2004;95(9):858-66.
- [163] Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;394(6696):894-7.
- [164] Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* 1999;103(6):773-8.
- [165] Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 1998;2(2):275-81.
- [166] Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, Milos PM. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(6):1518-25.

- [167] Martinovic I, Abegunewardene N, Seul M, Vosseler M, Horstick G, Buerke M, Darius H, Lindemann S. Elevated monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in patients at risk for coronary artery disease. *Circ J* 2005;69(12):1484-9.
- [168] Chitu V, Stanley ER. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol* 2006;18(1):39-48.
- [169] Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(18):8264-8.
- [170] de Winther MP, van Dijk KW, Havekes LM, Hofker MH. Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(2):290-7.
- [171] Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(12):4533-7.

- [172] Weissberg P. Mechanisms modifying atherosclerotic disease - from lipids to vascular biology. *Atherosclerosis* 1999;147 Suppl 1:S3-10.
- [173] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
- [174] Chandrasekar B, Mummidi S, Mahimainathan L, Patel DN, Bailey SR, Imam SZ, Greene WC, Valente AJ. Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF-kappaB- and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin. *J Biol Chem* 2006;281(22):15099-109.
- [175] Gronholdt ML, Ager-Pedersen S, Falk E. Coronary atherosclerosis: determinants of plaque rupture. *Eur Heart J* 1998;19 Suppl C:C24-C29.
- [176] Sedding DG, Braun-Dullaeus RC. Caveolin-1: dual role for proliferation of vascular smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc Med* 2006;16(2):50-5.
- [177] Farzaneh-Far A, Rudd J, Weissberg PL. Inflammatory mechanisms. *Br Med Bull* 2001;59:55-68.

- [178] Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res* 2000;45(3):736-46.
- [179] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(10):2054-61.
- [180] Wasserman EJ, Shipley NM. Atherothrombosis in acute coronary syndromes: mechanisms, markers, and mediators of vulnerability. *Mt Sinai J Med* 2006;73(1):431-9.
- [181] Marz W, Koenig W. HMG-CoA reductase inhibition: anti-inflammatory effects beyond lipid lowering? *J Cardiovasc Risk* 2003;10(3):169-79.
- [182] Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1977;46:897-930.
- [183] Terpstra V, van Amersfoort ES, van Velzen AG, Kuiper J, van Berkel TJ. Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(8):1860-72.

- [184] Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T, . A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997;386(6622):292-6.
- [185] Sakaguchi H, Takeya M, Suzuki H, Hakamata H, Kodama T, Horiuchi S, Gordon S, van der Laan LJ, Kraal G, Ishibashi S, Kitamura N, Takahashi K. Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest* 1998;78(4):423-34.
- [186] Geng Y, Kodama T, Hansson GK. Differential expression of scavenger receptor isoforms during monocyte-macrophage differentiation and foam cell formation. *Arterioscler Thromb* 1994;14(5):798-806.
- [187] Geng YJ, Hansson GK. Interferon-gamma inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 1992;89(4):1322-30.
- [188] Hsu HY, Nicholson AC, Hajjar DP. Inhibition of macrophage scavenger receptor activity by tumor necrosis factor-alpha is

transcriptionally and post-transcriptionally regulated. *J Biol Chem* 1996;271(13):7767-73.

- [189] Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391(6662):79-82.
- [190] de Villiers WJ, Fraser IP, Hughes DA, Doyle AG, Gordon S. Macrophage-colony-stimulating factor selectively enhances macrophage scavenger receptor expression and function. *J Exp Med* 1994;180(2):705-9.
- [191] Guidez F, Li AC, Horvai A, Welch JS, Glass CK. Differential utilization of Ras signaling pathways by macrophage colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF receptors during macrophage differentiation. *Mol Cell Biol* 1998;18(7):3851-61.
- [192] Aviram M. Platelet secretory products enhance LDL receptor activity and inhibit scavenger receptor activity in human monocyte derived macrophages. *Metabolism* 1989;38(5):425-30.
- [193] Bottalico LA, Wager RE, Agellon LB, Assoian RK, Tabas I. Transforming growth factor-beta 1 inhibits scavenger receptor

activity in THP-1 human macrophages. *J Biol Chem* 1991;266(34):22866-71.

- [194] Nishimura N, Harada-Shiba M, Tajima S, Sugano R, Yamamura T, Qiang QZ, Yamamoto A. Acquisition of secretion of transforming growth factor-beta 1 leads to autonomous suppression of scavenger receptor activity in a monocyte-macrophage cell line, THP-1. *J Biol Chem* 1998;273(3):1562-7.
- [195] Vallve JC, Uliaque K, Girona J, Cabre A, Ribalta J, Heras M, Masana L. Unsaturated fatty acids and their oxidation products stimulate CD36 gene expression in human macrophages. *Atherosclerosis* 2002;164(1):45-56.
- [196] Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 1994;126(1):111-26.
- [197] Abumrad NA, el Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced

during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* 1993;268(24):17665-8.

- [198] Ibrahimi A, Bonen A, Blinn WD, Hajri T, Li X, Zhong K, Cameron R, Abumrad NA. Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *J Biol Chem* 1999;274(38):26761-6.
- [199] Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 2000;105(8):1049-56.
- [200] Miyaoka K, Kuwasako T, Hirano K, Nozaki S, Yamashita S, Matsuzawa Y. CD36 deficiency associated with insulin resistance. *Lancet* 2001;357(9257):686-7.
- [201] Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Al Majali KM, Trembling PM, Mann CJ, Shoulders CC, Graf D, St Lezin E, Kurtz TW, Kren V, Pravenec M, Ibrahimi A, Abumrad NA, Stanton LW, Scott J. Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty

acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* 1999;21(1):76-83.

- [202] Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 1998;93(2):229-40.
- [203] Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2001;108(6):785-91.
- [204] Ruiz-Velasco N, Dominguez A, Vega MA. Statins upregulate CD36 expression in human monocytes, an effect strengthened when combined with PPAR-gamma ligands Putative contribution of Rho GTPases in statin-induced CD36 expression. *Biochem Pharmacol* 2004;67(2):303-13.
- [205] Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 1997;272(34):20982-5.
- [206] Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B.

CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 2000;101(20):2411-7.

- [207] Nakagawa-Toyama Y, Hirano K, Tsujii K, Nishida M, Miyagawa J, Sakai N, Yamashita S. Human scavenger receptor class B type I is expressed with cell-specific fashion in both initial and terminal site of reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2005;183(1):75-83.
- [208] Jessup W, Gelissen IC, Gaus K, Kritharides L. Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages. *Curr Opin Lipidol* 2006;17(3):247-57.
- [209] Webb NR, Connell PM, Graf GA, Smart EJ, de Villiers WJ, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *J Biol Chem* 1998;273(24):15241-8.
- [210] Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM* 2005;98(12):845-56.

- [211] Zhang W, Yancey PG, Su YR, Babaev VR, Zhang Y, Fazio S, Linton MF. Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2003;108(18):2258-63.
- [212] Covey SD, Krieger M, Wang W, Penman M, Trigatti BL. Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(9):1589-94.
- [213] Huang ZH, Gu D, Lange Y, Mazzone T. Expression of scavenger receptor BI facilitates sterol movement between the plasma membrane and the endoplasmic reticulum in macrophages. *Biochemistry* 2003;42(13):3949-55.
- [214] Hassan HH, Denis M, Krimbou L, Marcil M, Genest J. Cellular cholesterol homeostasis in vascular endothelial cells. *Can J Cardiol* 2006;22 Suppl B:35B-40B.
- [215] Chen M, Masaki T, Sawamura T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 2002;95(1):89-100.

- [216] Sakurai K, Sawamura T. Stress and vascular responses: endothelial dysfunction via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: close relationships with oxidative stress. *J Pharmacol Sci* 2003;91(3):182-6.
- [217] Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Tosetti ML, Campagnola M, Rigoni A, Pastorino AM, Lo C, V, Sawamura T. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2000;275(17):12633-8.
- [218] Li DY, Chen HJ, Mehta JL. Statins inhibit oxidized-LDL-mediated LOX-1 expression, uptake of oxidized-LDL and reduction in PKB phosphorylation. *Cardiovasc Res* 2001;52(1):130-5.
- [219] Li D, Mehta JL. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 2000;101(25):2889-95.
- [220] Li D, Chen H, Romeo F, Sawamura T, Saldeen T, Mehta JL. Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion

molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302(2):601-5.

- [221] Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292(1):C82-C97.
- [222] Honjo M, Nakamura K, Yamashiro K, Kiryu J, Tanihara H, McEvoy LM, Honda Y, Butcher EC, Masaki T, Sawamura T. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(3):1274-9.
- [223] Schmitz G, Langmann T. Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim Biophys Acta* 2005;1735(1):1-19.
- [224] Attie AD. ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis. *Trends Biochem Sci* 2007;32(4):172-9.
- [225] Oram JF, Vaughan AM. ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 2000;11(3):253-60.

- [226] Francis GA, Knopp RH, Oram JF. Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J Clin Invest* 1995;96(1):78-87.
- [227] Klucken J, Buchler C, Orso E, Kaminski WE, Porsch-Ozcurumez M, Liebisch G, Kapinsky M, Diederich W, Drobnik W, Dean M, Allikmets R, Schmitz G. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(2):817-22.
- [228] Oram JF, Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J Lipid Res* 1996;37(12):2473-91.
- [229] Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000;289(5484):1524-9.
- [230] Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2006;116(4):1052-62.

- [231] Neufeld EB, Demosky SJ, Jr., Stonik JA, Combs C, Remaley AT, Duverger N, Santamarina-Fojo S, Brewer HB, Jr. The ABCA1 transporter functions on the basolateral surface of hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297(4):974-9.
- [232] Haghpassand M, Bourassa PA, Francone OL, Aiello RJ. Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J Clin Invest* 2001;108(9):1315-20.
- [233] Van Eck M, Singaraja RR, Ye D, Hildebrand RB, James ER, Hayden MR, van Berkel TJ. Macrophage ATP-binding cassette transporter A1 overexpression inhibits atherosclerotic lesion progression in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(4):929-34.
- [234] Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart JC, Clavey V, Staels B. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 2001;7(1):53-8.

- [235] Panousis CG, Zuckerman SH. Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(6):1565-71.
- [236] Kiss RS, Maric J, Marcel YL. Lipid efflux in human and mouse macrophagic cells: evidence for differential regulation of phospholipid and cholesterol efflux. *J Lipid Res* 2005;46(9):1877-87.
- [237] Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem* 2000;275(42):33053-8.
- [238] Fitzgerald ML, Morris AL, Rhee JS, Andersson LP, Mendez AJ, Freeman MW. Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 2002;277(36):33178-87.
- [239] Chen W, Wang N, Tall AR. A PEST deletion mutant of ABCA1 shows impaired internalization and defective cholesterol efflux from late endosomes. *J Biol Chem* 2005;280(32):29277-81.

- [240] Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257(1):29-33.
- [241] Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, Wade DP. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem* 2000;275(44):34508-11.
- [242] Le Goff W, Zheng P, Brubaker G, Smith JD. Identification of the cAMP-responsive enhancer of the murine ABCA1 gene: requirement for CREB1 and STAT3/4 elements. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(3):527-33.
- [243] See RH, Caday-Malcolm RA, Singaraja RR, Zhou S, Silverston A, Huber MT, Moran J, James ER, Janoo R, Savill JM, Rigot V, Zhang LH, Wang M, Chimini G, Wellington CL, Tafuri SR, Hayden MR. Protein kinase A site-specific phosphorylation regulates ATP-binding cassette A1 (ABCA1)-mediated phospholipid efflux. *J Biol Chem* 2002;277(44):41835-42.

- [244] Tang CK, Yi GH, Yang JH, Liu LS, Wang Z, Ruan CG, Yang YZ. Oxidized LDL upregulated ATP binding cassette transporter-1 in THP-1 macrophages. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25(5):581-6.
- [245] Wang N, Chen W, Linsel-Nitschke P, Martinez LO, Agerholm-Larsen B, Silver DL, Tall AR. A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. *J Clin Invest* 2003;111(1):99-107.
- [246] Wang Y, Oram JF. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *J Biol Chem* 2002;277(7):5692-7.
- [247] Liao H, Langmann T, Schmitz G, Zhu Y. Native LDL upregulation of ATP-binding cassette transporter-1 in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(1):127-32.
- [248] Zeng L, Liao H, Liu Y, Lee TS, Zhu M, Wang X, Stemerman MB, Zhu Y, Shyy JY. Sterol-responsive element-binding protein (SREBP) 2 down-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in vascular endothelial cells: a novel role of SREBP in regulating cholesterol metabolism. *J Biol Chem* 2004;279(47):48801-7.

- [249] Zhu Y, Liao H, Xie X, Yuan Y, Lee TS, Wang N, Wang X, Shyy JY, Stemerman MB. Oxidized LDL downregulates ATP-binding cassette transporter-1 in human vascular endothelial cells via inhibiting liver X receptor (LXR). *Cardiovasc Res* 2005;68(3):425-32.
- [250] Cavelier C, Rohrer L, von Eckardstein A. ATP-Binding cassette transporter A1 modulates apolipoprotein A-I transcytosis through aortic endothelial cells. *Circ Res* 2006;99(10):1060-6.
- [251] Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldan A, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* 2005;1(2):121-31.
- [252] Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(26):9774-9.
- [253] Nakamura K, Kennedy MA, Baldan A, Bojanic DD, Lyons K, Edwards PA. Expression and regulation of multiple murine ATP-binding cassette transporter G1 mRNAs/isoforms that stimulate cellular

cholesterol efflux to high density lipoprotein. *J Biol Chem* 2004;279(44):45980-9.

- [254] Vaughan AM, Oram JF. ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J Biol Chem* 2005;280(34):30150-7.
- [255] Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, Cartland S, Packianathan M, Kritharides L, Jessup W. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(3):534-40.
- [256] Venkateswaran A, Repa JJ, Lobaccaro JM, Bronson A, Mangelsdorf DJ, Edwards PA. Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J Biol Chem* 2000;275(19):14700-7.
- [257] Cserepes J, Szentpetery Z, Seres L, Ozvegy-Laczka C, Langmann T, Schmitz G, Glavinas H, Klein I, Homolya L, Varadi A, Sarkadi B, Elkind NB. Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320(3):860-7.

- [258] O'Connell BJ, Denis M, Genest J. Cellular physiology of cholesterol efflux in vascular endothelial cells. *Circulation* 2004;110(18):2881-8.
- [259] Lin CY, Duan H, Mazzone T. Apolipoprotein E-dependent cholesterol efflux from macrophages: kinetic study and divergent mechanisms for endogenous versus exogenous apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1999;40(9):1618-27.
- [260] Yancey PG, Yu H, Linton MF, Fazio S. A pathway-dependent on apoE, ApoAI, and ABCA1 determines formation of buoyant high-density lipoprotein by macrophage foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(5):1123-31.
- [261] Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 2000;49(10):497-505.
- [262] Plutzky J. The vascular biology of atherosclerosis. *Am J Med* 2003;115 Suppl 8A:55S-61S.

- [263] Plutzky J. The potential role of peroxisome proliferator-activated receptors on inflammation in type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003;92(4A):34J-41J.
- [264] Puddu P, Puddu GM, Muscari A. Peroxisome proliferator-activated receptors: are they involved in atherosclerosis progression? *Int J Cardiol* 2003;90(2-3):133-40.
- [265] Bocher V, Pineda-Torra I, Fruchart JC, Staels B. PPARs: transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 2002;967:7-18.
- [266] Martens FM, Visseren FL, Lemay J, de Koning EJ, Rabelink TJ. Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. *Drugs* 2002;62(10):1463-80.
- [267] Glass CK. Potential roles of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in macrophage biology and atherosclerosis. *J Endocrinol* 2001;169(3):461-4.
- [268] Lefebvre AM, Peinado-Onsurbe J, Leitersdorf I, Briggs MR, Paterniti JR, Fruchart JC, Fievet C, Auwerx J, Staels B. Regulation of lipoprotein metabolism by thiazolidinediones occurs through a

distinct but complementary mechanism relative to fibrates.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17(9):1756-64.

[269] Oliver WR, Jr., Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznaidman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliewer SA, Hansen BC, Willson TM. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98(9):5306-11.

[270] Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R, Evans RM. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99(1):303-8.

[271] Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). Mol Cell Biol 2000;20(14):5119-28.

[272] Wang YX, Lee CH, Tjep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. Cell 2003;113(2):159-70.

- [273] Castrillo A, Tontonoz P. Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:455-80.
- [274] Hsueh WA, Law RE. PPARgamma and atherosclerosis: effects on cell growth and movement. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(12):1891-5.
- [275] Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 2001;7(1):48-52.
- [276] Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, Andersson LP, Altshuler D, Milstone DS, Mortensen RM, Spiegelman BM, Freeman MW. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med* 2001;7(1):41-7.
- [277] Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 1996;15(19):5336-48.

- [278] Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation: from basic science to clinical applications. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27 Suppl 3:S41-S45.
- [279] Marx N, Mackman N, Schonbeck U, Yilmaz N, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPARalpha activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes. *Circulation* 2001;103(2):213-9.
- [280] Neve BP, Corseaux D, Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Duriez P, Staels B, Jude B. PPARalpha agonists inhibit tissue factor expression in human monocytes and macrophages. *Circulation* 2001;103(2):207-12.
- [281] Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 1998;393(6687):790-3.
- [282] Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* 2001;169(3):453-9.

- [283] Hsueh WA, Law R. The central role of fat and effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on progression of insulin resistance and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2003;92(4A):3J-9J.
- [284] Collins AR, Meehan WP, Kintscher U, Jackson S, Wakino S, Noh G, Palinski W, Hsueh WA, Law RE. Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(3):365-71.
- [285] Shinohara E, Kihara S, Ouchi N, Funahashi T, Nakamura T, Yamashita S, Kameda-Takemura K, Matsuzawa Y. Troglitazone suppresses intimal formation following balloon injury in insulin-resistant Zucker fatty rats. *Atherosclerosis* 1998;136(2):275-9.
- [286] Chen CC, Wang HJ, Shih HC, Sheen LY, Chang CT, Chen RH, Wang TY. Comparison of the metabolic effects of metformin and troglitazone on fructose-induced insulin resistance in male Sprague-Dawley rats. *J Formos Med Assoc* 2001;100(3):176-80.
- [287] Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands

inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2000;106(4):523-31.

[288] Minamikawa J, Tanaka S, Yamauchi M, Inoue D, Koshiyama H. Potent inhibitory effect of troglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(5):1818-20.

[289] Ogihara T, Rakugi H, Ikegami H, Mikami H, Masuo K. Enhancement of insulin sensitivity by troglitazone lowers blood pressure in diabetic hypertensives. *Am J Hypertens* 1995;8(3):316-20.

[290] Fujishima S, Ohya Y, Nakamura Y, Onaka U, Abe I, Fujishima M. Troglitazone, an insulin sensitizer, increases forearm blood flow in humans. *Am J Hypertens* 1998;11(9):1134-7.

[291] Walker AB, Chattington PD, Buckingham RE, Williams G. The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL-49653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats. *Diabetes* 1999;48(7):1448-53.

[292] Bagi Z, Koller A, Kaley G. PPARgamma activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286(2):H742-H748.

- [293] Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM.
PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation
and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998;93(2):241-52.
- [294] Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors in endothelial cell
biology. *Curr Opin Lipidol* 2001;12(5):511-8.
- [295] Chen Z, Ishibashi S, Perrey S, Osuga J, Gotoda T, Kitamine T, Tamura
Y, Okazaki H, Yahagi N, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K,
Harada K, Shimano H, Nagai R, Yamada N. Troglitazone
inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice:
pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. *Arterioscler
Thromb Vasc Biol* 2001;21(3):372-7.
- [296] Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB,
Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz
P. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is
involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*
2001;7(1):161-71.
- [297] Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Pimprale S,
Lee YH, Ricote M, Glass CK, Brewer HB, Jr., Gonzalez FJ.
Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated
receptor gamma gene in mice results in lowered expression of

ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol* 2002;22(8):2607-19.

- [298] Argmann CA, Sawyez CG, McNeil CJ, Hegele RA, Huff MW. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor results in net depletion of cellular cholesteryl esters in macrophages exposed to oxidized lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(3):475-82.
- [299] Jackson SM, Parhami F, Xi XP, Berliner JA, Hsueh WA, Law RE, Demer LL. Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(9):2094-104.
- [300] Wang N, Verna L, Chen NG, Chen J, Li H, Forman BM, Stemerman MB. Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2002;277(37):34176-81.
- [301] Hsueh WA, Jackson S, Law RE. Control of vascular cell proliferation and migration by PPAR-gamma: a new approach to the

macrovascular complications of diabetes. *Diabetes Care* 2001;24(2):392-7.

- [302] Law RE, Meehan WP, Xi XP, Graf K, Wuthrich DA, Coats W, Faxon D, Hsueh WA. Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J Clin Invest* 1996;98(8):1897-905.
- [303] Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1999;274(13):9116-21.
- [304] Kintscher U, Goetze S, Wakino S, Kim S, Nagpal S, Chandraratna RA, Graf K, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor ligands inhibit monocyte chemotactic protein-1-directed migration of monocytes. *Eur J Pharmacol* 2000;401(3):259-70.
- [305] Fonseca VA, Reynolds T, Hemphill D, Randolph C, Wall J, Valiquet TR, Graveline J, Fink LM. Effect of troglitazone on fibrinolysis and activated coagulation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 1998;12(4):181-6.

- [306] Vosper H, Patel L, Graham TL, Khoudoli GA, Hill A, Macphee CH, Pinto I, Smith SA, Suckling KE, Wolf CR, Palmer CN. The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. *J Biol Chem* 2001;276(47):44258-65.
- [307] Zhang J, Fu M, Zhu X, Xiao Y, Mou Y, Zheng H, Akinbami MA, Wang Q, Chen YE. Peroxisome proliferator-activated receptor delta is up-regulated during vascular lesion formation and promotes post-confluent cell proliferation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2002;277(13):11505-12.
- [308] Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Transcriptional regulation of macrophage cholesterol trafficking by PPARalpha and LXR. *Biochem Soc Trans* 2006;34(Pt 6):1128-31.
- [309] Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(2):507-12.
- [310] Malerod L, Juvet LK, Hanssen-Bauer A, Eskild W, Berg T. Oxysterol-activated LXRalpha/RXR induces hSR-BI-promoter activity in

hepatoma cells and preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299(5):916-23.

- [311] Crestani M, De Fabiani E, Caruso D, Mitro N, Gilardi F, Vigil Chacon AB, Patelli R, Godio C, Galli G. LXR (liver X receptor) and HNF-4 (hepatocyte nuclear factor-4): key regulators in reverse cholesterol transport. *Biochem Soc Trans* 2004;32(Pt 1):92-6.
- [312] Shiffman D, Mikita T, Tai JT, Wade DP, Porter JG, Seilhamer JJ, Somogyi R, Liang S, Lawn RM. Large scale gene expression analysis of cholesterol-loaded macrophages. *J Biol Chem* 2000;275(48):37324-32.
- [313] Millatt LJ, Bocher V, Fruchart JC, Staels B. Liver X receptors and the control of cholesterol homeostasis: potential therapeutic targets for the treatment of atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2003;1631(2):107-18.
- [314] Babiker A, Andersson O, Lund E, Xiu RJ, Deeb S, Reshef A, Leitersdorf E, Diczfalusy U, Bjorkhem I. Elimination of cholesterol in macrophages and endothelial cells by the sterol 27-hydroxylase mechanism. Comparison with high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *J Biol Chem* 1997;272(42):26253-61.

- [315] Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD, Sparrow CP, Lund EG. 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem* 2001;276(42):38378-87.
- [316] Valledor AF, Ricote M. Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem Pharmacol* 2004;67(2):201-12.
- [317] Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 2003;9(2):213-9.
- [318] Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, DeBose-Boyd RA, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(11):6027-32.
- [319] Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Nakakuki M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Takahashi A, Sone H, Osuga JJ, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by

inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem* 2002;277(3):1705-11.

- [320] Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* 2003;108(12):1527-32.
- [321] Tesfamariam B, Brown ML, Deykin D, Cohen RA. Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J Clin Invest* 1990;85(3):929-32.
- [322] Bohlen HG, Lash JM. Topical hyperglycemia rapidly suppresses EDRF-mediated vasodilation of normal rat arterioles. *Am J Physiol* 1993;265(1 Pt 2):H219-H225.
- [323] Pieper GM, Meier DA, Hager SR. Endothelial dysfunction in a model of hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Am J Physiol* 1995;269(3 Pt 2):H845-H850.
- [324] Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Baron AD. Decreased effect of insulin to stimulate skeletal muscle blood flow in obese man. A novel mechanism for insulin resistance. *J Clin Invest* 1990;85(6):1844-52.

- [325] Mather KJ, Verma S, Anderson TJ. Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(5):1344-50.
- [326] Watanabe Y, Sunayama S, Shimada K, Sawano M, Hoshi S, Iwama Y, Mokuno H, Daida H, Yamaguchi H. Troglitazone improves endothelial dysfunction in patients with insulin resistance. *J Atheroscler Thromb* 2000;7(3):159-63.
- [327] Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, Natarajan R. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes* 2003;52(5):1256-64.
- [328] Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000;49(11):1939-45.
- [329] Hattori Y, Hattori S, Sato N, Kasai K. High-glucose-induced nuclear factor kappaB activation in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2000;46(1):188-97.

- [330] Fukumoto H, Naito Z, Asano G, Aramaki T. Immunohistochemical and morphometric evaluations of coronary atherosclerotic plaques associated with myocardial infarction and diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb* 1998;5(1):29-35.
- [331] Hussain MJ, Peakman M, Gallati H, Lo SS, Hawa M, Viberti GC, Watkins PJ, Leslie RD, Vergani D. Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia* 1996;39(1):60-9.
- [332] Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, Harrison DG, Tsao PS. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res* 2001;88(12):1291-8.
- [333] Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001;24(8):1476-85.
- [334] Li Y, Woo V, Bose R. Platelet hyperactivity and abnormal Ca²⁺ homeostasis in diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280(4):H1480-H1489.
- [335] Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 1996;20(5):707-27.

- [336] Natella F, Ghiselli A, Guidi A, Ursini F, Scaccini C. Red wine mitigates the postprandial increase of LDL susceptibility to oxidation. *Free Radic Biol Med* 2001;30(9):1036-44.
- [337] Ursini F, Sevanian A. Postprandial oxidative stress. *Biol Chem* 2002;383(3-4):599-605.
- [338] Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Bloomfield HE, Robins SJ, Schaefer EJ. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(10):2185-91.
- [339] Doi H, Kugiyama K, Oka H, Sugiyama S, Ogata N, Koide SI, Nakamura SI, Yasue H. Remnant lipoproteins induce proatherothrombogenic molecules in endothelial cells through a redox-sensitive mechanism. *Circulation* 2000;102(6):670-6.
- [340] Burdge GC, Calder PC. Plasma cytokine response during the postprandial period: a potential causal process in vascular disease? *Br J Nutr* 2005;93(1):3-9.
- [341] Das UN. Folic acid says NO to vascular diseases. *Nutrition* 2003;19(7-8):686-92.

- [342] McGill HC, Jr., McMahan CA. Determinants of atherosclerosis in the young. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Am J Cardiol* 1998;82(10B):30T-6T.
- [343] Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, III, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med* 1998;338(23):1650-6.
- [344] Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D'Armiento FP, Palinski W. Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet* 1999;354(9186):1234-41.
- [345] Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997;100(11):2680-90.

- [346] Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005;16(10):577-86.
- [347] Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(2):274-8.
- [348] Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999;283(5407):1482-8.
- [349] Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003;552(Pt 2):335-44.
- [350] Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, Yakes FM, Van Houten B, Ballinger CA, Freeman BA, Runge MS. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res* 2000;86(9):960-6.
- [351] Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000;86(5):494-501.

- [352] Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HH, Busse R, Brandes RP. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2004;279(44):45935-41.
- [353] Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285(2):R277-R297.
- [354] Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002;33(6):774-97.
- [355] Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006;58(1):87-114.
- [356] Sakuma S, Fujimoto Y, Sakamoto Y, Uchiyama T, Yoshioka K, Nishida H, Fujita T. Peroxynitrite induces the conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in rabbit liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;230(2):476-9.
- [357] Friedl HP, Till GO, Ryan US, Ward PA. Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. *FASEB J* 1989;3(13):2512-8.

- [358] Linder N, Rapola J, Raivio KO. Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab Invest* 1999;79(8):967-74.
- [359] Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, Brecht M, Gamez G, Tatge H, Reepschlager N, Hornig B, Drexler H, Harrison DG. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* 2003;107(10):1383-9.
- [360] Guthikonda S, Sinkey C, Barenz T, Haynes WG. Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers. *Circulation* 2003;107(3):416-21.
- [361] Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, III, Quyyumi AA, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* 1997;30(1 Pt 1):57-63.
- [362] Farquharson CA, Butler R, Hill A, Belch JJ, Struthers AD. Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Circulation* 2002;106(2):221-6.

- [363] Sohn HY, Krotz F, Gloe T, Keller M, Theisen K, Klauss V, Pohl U.
Differential regulation of xanthine and NAD(P)H oxidase by hypoxia in human umbilical vein endothelial cells. Role of nitric oxide and adenosine. *Cardiovasc Res* 2003;58(3):638-46.
- [364] Fukushima T, Adachi T, Hirano K. The heparin-binding site of human xanthine oxidase. *Biol Pharm Bull* 1995;18(1):156-8.
- [365] Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, Freeman BA. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem* 1999;274(8):4985-94.
- [366] Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 2002;106(24):3073-8.
- [367] Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, Luscher T, Rabelink T. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1997;99(1):41-6.

- [368] Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003;111(8):1201-9.
- [369] Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006;113(13):1708-14.
- [370] Plantin-Carrenard E, Bernard M, Derappe C, Bringuier A, Vadrot N, Feldmann G, Foglietti MJ, Aubery M, Braut-Boucher F. Differential responses of proliferative and non-proliferative leukemia cells to oxidative stress. *Free Radic Res* 2005;39(1):1-13.
- [371] Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 1988;240(4852):640-2.
- [372] Avraham KB, Schickler M, Sapoznikov D, Yarom R, Groner Y. Down's syndrome: abnormal neuromuscular junction in tongue of transgenic mice with elevated levels of human Cu/Zn-superoxide dismutase. *Cell* 1988;54(6):823-9.

- [373] Yarom R, Sapoznikov D, Havivi Y, Avraham KB, Schickler M, Groner Y. Premature aging changes in neuromuscular junctions of transgenic mice with an extra human CuZnSOD gene: a model for tongue pathology in Down's syndrome. *J Neurol Sci* 1988;88(1-3):41-53.
- [374] de Haan JB, Newman JD, Kola I. Cu/Zn superoxide dismutase mRNA and enzyme activity, and susceptibility to lipid peroxidation, increases with aging in murine brains. *Brain Res Mol Brain Res* 1992;13(3):179-87.
- [375] de Haan JB, Cristiano F, Iannello R, Bladier C, Kelner MJ, Kola I. Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum Mol Genet* 1996;5(2):283-92.
- [376] Leopold JA, Zhang YY, Scribner AW, Stanton RC, Loscalzo J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression decreases endothelial cell oxidant stress and increases bioavailable nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(3):411-7.

- [377] Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(16):6377-81.
- [378] Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(24):9748-52.
- [379] Sharma MK, Buettner GR. Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: an ESR study. *Free Radic Biol Med* 1993;14(6):649-53.
- [380] Frei B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am J Clin Nutr* 1991;54(6 Suppl):1113S-8S.
- [381] Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* 1990;264:155-63.
- [382] Bisby RH, Parker AW. Reactions of the alpha-tocopheroxyl radical in micellar solutions studied by nanosecond laser flash photolysis. *FEBS Lett* 1991;290(1-2):205-8.

- [383] Witting PK, Westerlund C, Stocker R. A rapid and simple screening test for potential inhibitors of tocopherol-mediated peroxidation of LDL lipids. *J Lipid Res* 1996;37(4):853-67.
- [384] Kagan VE, Serbinova EA, Packer L. Recycling and antioxidant activity of tocopherol homologs of differing hydrocarbon chain lengths in liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1990;282(2):221-5.
- [385] May JM, Qu ZC, Mendiratta S. Protection and recycling of alpha-tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. *Arch Biochem Biophys* 1998;349(2):281-9.
- [386] Vita JA, Keaney JF, Jr., Raby KE, Morrow JD, Freedman JE, Lynch S, Koulouris SN, Hankin BR, Frei B. Low plasma ascorbic acid independently predicts the presence of an unstable coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 1998;31(5):980-6.
- [387] May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 1998;273(36):23039-45.
- [388] Jackson TS, Xu A, Vita JA, Keaney JF, Jr. Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ Res* 1998;83(9):916-22.

- [389] Huang A, Vita JA, Venema RC, Keaney JF, Jr. Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 2000;275(23):17399-406.
- [390] Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 1999;13(9):1007-24.
- [391] Squadrito GL, Cueto R, Splenser AE, Valavanidis A, Zhang H, Uppu RM, Pryor WA. Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biochem Biophys* 2000;376(2):333-7.
- [392] Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J* 1986;235(3):747-54.
- [393] Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1994;269(24):16712-9.
- [394] Dennery PA, McDonagh AF, Spitz DR, Rodgers PA, Stevenson DK. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in

neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radic Biol Med* 1995;19(4):395-404.

- [395] Kohlmeier L, Hastings SB. Epidemiologic evidence of a role of carotenoids in cardiovascular disease prevention. *Am J Clin Nutr* 1995;62(6 Suppl):1370S-6S.
- [396] Sesso HD, Buring JE, Norkus EP, Gaziano JM. Plasma lycopene, other carotenoids, and retinol and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Clin Nutr* 2004;79(1):47-53.
- [397] Christen S, Woodall AA, Shigenaga MK, Southwell-Keely PT, Duncan MW, Ames BN. gamma-tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO(X) and complements alpha-tocopherol: physiological implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(7):3217-22.
- [398] Cooney RV, Franke AA, Harwood PJ, Hatch-Pigott V, Custer LJ, Mordan LJ. Gamma-tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(5):1771-5.

- [399] Jiang Q, Ames BN. Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *FASEB J* 2003;17(8):816-22.
- [400] Hensley K, Benaksas EJ, Bolli R, Comp P, Grammas P, Hamdheydari L, Mou S, Pye QN, Stoddard MF, Wallis G, Williamson KS, West M, Wechter WJ, Floyd RA. New perspectives on vitamin E: gamma-tocopherol and carboxyethylhydrochroman metabolites in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 2004;36(1):1-15.
- [401] Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr* 2001;20(6):591-8.
- [402] Forsmark-Andree P, Dallner G, Ernster L. Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles. *Free Radic Biol Med* 1995;19(6):749-57.
- [403] Stocker R, Bowry VW, Frei B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(5):1646-50.

- [404] Ingold KU, Bowry VW, Stocker R, Walling C. Autoxidation of lipids and antioxidation by alpha-tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids: unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(1):45-9.
- [405] Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. Oxidative stress, inflammation, and diabetic vasculopathies: the role of alpha tocopherol therapy. *Free Radic Res* 2002;36(12):1331-6.
- [406] Papaharalambus CA, Griendling KK. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17(2):48-54.
- [407] Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2000;28(12):1685-96.
- [408] Lehr HA, Becker M, Marklund SL, Hubner C, Arfors KE, Kohlschutter A, Messmer K. Superoxide-dependent stimulation of leukocyte adhesion by oxidatively modified LDL in vivo. *Arterioscler Thromb* 1992;12(7):824-9.

- [409] Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Statins and oxidative stress during atherogenesis. *J Cardiovasc Risk* 2003;10(3):181-9.
- [410] Cai H. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ Res* 2005;96(8):818-22.
- [411] Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(24):9265-9.
- [412] Nakamura K, Hori T, Sato N, Sugie K, Kawakami T, Yodoi J. Redox regulation of a src family protein tyrosine kinase p56lck in T cells. *Oncogene* 1993;8(11):3133-9.
- [413] Denu JM, Tanner KG. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 1998;37(16):5633-42.
- [414] Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1998;273(25):15366-72.

- [415] Lincoln TM, Komalavilas P, Cornwell TL. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension* 1994;23(6 Pt 2):1141-7.
- [416] Moro MA, Darley-Usmar VM, Lizasoain I, Su Y, Knowles RG, Radomski MW, Moncada S. The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite. *Br J Pharmacol* 1995;116(3):1999-2004.
- [417] Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996;97(7):1715-22.
- [418] Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999;85(8):753-66.
- [419] Cominacini L, Garbin U, Fratta PA, Paulon T, Davoli A, Campagnola M, Marchi E, Pastorino AM, Gaviraghi G, Lo C, V. Lacidipine inhibits the activation of the transcription factor NF-kappaB and the expression of adhesion molecules induced by pro-oxidant signals on endothelial cells. *J Hypertens* 1997;15(12 Pt 2):1633-40.

- [420] Maziere C, Auclair M, Djavaheri-Mergny M, Packer L, Maziere JC. Oxidized low density lipoprotein induces activation of the transcription factor NF kappa B in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells. *Biochem Mol Biol Int* 1996;39(6):1201-7.
- [421] Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta* 1991;1072(1):63-80.
- [422] Hayakawa M, Miyashita H, Sakamoto I, Kitagawa M, Tanaka H, Yasuda H, Karin M, Kikugawa K. Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF-kappaB activation. *EMBO J* 2003;22(13):3356-66.
- [423] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362(6423):801-9.
- [424] Pajonk F, Riess K, Sommer A, McBride WH. N-acetyl-L-cysteine inhibits 26S proteasome function: implications for effects on NF-kappaB activation. *Free Radic Biol Med* 2002;32(6):536-43.
- [425] Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of

intracellular peroxide production. *J Biol Chem*

1999;274(4):2234-42.

- [426] Parola M, Robino G, Marra F, Pinzani M, Bellomo G, Leonarduzzi G, Chiarugi P, Camandola S, Poli G, Waeg G, Gentilini P, Dianzani MU. HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 1998;102(11):1942-50.
- [427] Rao GN, Glasgow WC, Eling TE, Runge MS. Role of hydroperoxyeicosatetraenoic acids in oxidative stress-induced activating protein 1 (AP-1) activity. *J Biol Chem* 1996;271(44):27760-4.
- [428] Ruef J, Rao GN, Li F, Bode C, Patterson C, Bhatnagar A, Runge MS. Induction of rat aortic smooth muscle cell growth by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Circulation* 1998;97(11):1071-8.
- [429] Ohlsson BG, Englund MC, Karlsson AL, Knutsen E, Erixon C, Skribeck H, Liu Y, Bondjers G, Wiklund O. Oxidized low density lipoprotein inhibits lipopolysaccharide-induced binding of nuclear factor-kappaB to DNA and the subsequent expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in macrophages. *J Clin Invest* 1996;98(1):78-89.

- [430] Teupser D, Thiery J, Seidel D. Alpha-tocopherol down-regulates scavenger receptor activity in macrophages. *Atherosclerosis* 1999;144(1):109-15.
- [431] Lin JH, Zhu Y, Liao HL, Kobari Y, Groszek L, Stemerman MB. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 by low-density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1996;127(2):185-94.
- [432] Maziere C, Djavaheri-Mergny M, Frey-Fressart V, Delattre J, Maziere JC. Copper and cell-oxidized low-density lipoprotein induces activator protein 1 in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1997;409(3):351-6.
- [433] Shono T, Ono M, Izumi H, Jimi SI, Matsushima K, Okamoto T, Kohno K, Kuwano M. Involvement of the transcription factor NF-kappaB in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. *Mol Cell Biol* 1996;16(8):4231-9.
- [434] Ares MP, Kallin B, Eriksson P, Nilsson J. Oxidized LDL induces transcription factor activator protein-1 but inhibits activation of nuclear factor-kappa B in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(10):1584-90.

- [435] Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* 1992;70(3):593-9.
- [436] Napoli C, de NF, Palinski W. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J Cell Biochem* 2001;82(4):674-82.
- [437] Roebuck KA, Rahman A, Lakshminarayanan V, Janakidevi K, Malik AB. H₂O₂ and tumor necrosis factor- α activate intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene transcription through distinct cis-regulatory elements within the ICAM-1 promoter. *J Biol Chem* 1995;270(32):18966-74.
- [438] Wung BS, Cheng JJ, Hsieh HJ, Shyy YJ, Wang DL. Cyclic strain-induced monocyte chemotactic protein-1 gene expression in endothelial cells involves reactive oxygen species activation of activator protein 1. *Circ Res* 1997;81(1):1-7.
- [439] Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutzky J. PPAR α activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 1999;99(24):3125-31.

- [440] Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2000;129(5):823-34.
- [441] Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998;391(6662):82-6.
- [442] Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(13):7614-9.
- [443] Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem* 1998;273(49):32833-41.
- [444] Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 1991;53(1 Suppl):326S-34S.

- [445] Riemersma RA, Wood DA, Macintyre CC, Elton RA, Gey KF, Oliver MF. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C, and E and carotene. *Lancet* 1991;337(8732):1-5.
- [446] Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 1993;328(20):1444-9.
- [447] Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993;328(20):1450-6.
- [448] Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996;334(18):1156-62.
- [449] The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1994;330(15):1029-35.

- [450] de GG. Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. Collaborative Group of the Primary Prevention Project. *Lancet* 2001;357(9250):89-95.
- [451] Salonen JT, Nyyssonen K, Salonen R, Lakka HM, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Voutilainen S, Lakka TA, Rissanen T, Leskinen L, Tuomainen TP, Valkonen VP, Ristonmaa U, Poulsen HE. Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *J Intern Med* 2000;248(5):377-86.
- [452] Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Mahrer PR, Sevanian A, Liu CR, Liu CH, Hwang J, Selzer RH, Azen SP. Alpha-tocopherol supplementation in healthy individuals reduces low-density lipoprotein oxidation but not atherosclerosis: the Vitamin E Atherosclerosis Prevention Study (VEAPS). *Circulation* 2002;106(12):1453-9.
- [453] Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996;347(9004):781-6.

- [454] Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafter U, Iaina A, Knecht A, Weissgarten Y, Brunner D, Fainaru M, Green MS. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2000;356(9237):1213-8.
- [455] Rapola JM, Virtamo J, Ripatti S, Huttunen JK, Albanes D, Taylor PR, Heinonen OP. Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet* 1997;349(9067):1715-20.
- [456] Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* 1999;354(9177):447-55.
- [457] Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000;342(3):145-53.

- [458] Lonn E, Yusuf S, Dzavik V, Doris C, Yi Q, Smith S, Moore-Cox A, Bosch J, Riley W, Teo K. Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis: the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E (SECURE). *Circulation* 2001;103(7):919-25.
- [459] Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2003;361(9374):2017-23.
- [460] Waters DD, Alderman EL, Hsia J, Howard BV, Cobb FR, Rogers WJ, Ouyang P, Thompson P, Tardif JC, Higginson L, Bittner V, Steffes M, Gordon DJ, Proschan M, Younes N, Verter JI. Effects of hormone replacement therapy and antioxidant vitamin supplements on coronary atherosclerosis in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288(19):2432-40.
- [461] MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002;360(9326):7-22.

- [462] Weinberg RB, VanderWerken BS, Anderson RA, Stegner JE, Thomas MJ. Pro-oxidant effect of vitamin E in cigarette smokers consuming a high polyunsaturated fat diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(6):1029-33.
- [463] Serebruany V, Malinin A, Scott R. The in vitro effects of a novel vascular protectant, AGI-1067, on platelet aggregation and major receptor expression in subjects with multiple risk factors for vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2006;11(3):191-6.
- [464] Tardif JC, Gregoire J, L'Allier PL, Ibrahim R, Anderson TJ, Reeves F, Title LM, Schampaert E, Lemay M, Lesperance J, Scott R, Guertin MC, Brennan ML, Hazen SL, Bertrand OF. Effects of the antioxidant succinobucol (AGI-1067) on human atherosclerosis in a randomized clinical trial. *Atherosclerosis* 2007.
- [465] Welch KD, Davis TZ, Van Eden ME, Aust SD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med* 2002;32(7):577-83.
- [466] Wish JB. Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1 Suppl 1:S4-S8.

- [467] Beaumont C. [Molecular mechanisms of iron homeostasis]. *Med Sci (Paris)* 2004;20(1):68-72.
- [468] Ganz T, Nemeth E. Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290(2):G199-G203.
- [469] Biemond P, van Eijk HG, Swaak AJ, Koster JF. Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Possible mechanism in inflammation diseases. *J Clin Invest* 1984;73(6):1576-9.
- [470] Halliwell B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 1993;23 Suppl 1:118-26.
- [471] Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994;52(8 Pt 1):253-65.
- [472] Gutteridge JM. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett* 1986;201(2):291-5.

- [473] Nichols GM, Bacon BR. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis and clinical features of a common disease. *Am J Gastroenterol* 1989;84(8):851-62.
- [474] Sullivan JL. Heterozygous hemochromatosis as a risk factor for premature myocardial infarction. *Med Hypotheses* 1990;31(1):1-5.
- [475] Bacon BR, Britton RS. The pathology of hepatic iron overload: a free radical--mediated process? *Hepatology* 1990;11(1):127-37.
- [476] Courtois F, Suc I, Garofalo C, Ledoux M, Seidman E, Levy E. Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279(1):G12-G19.
- [477] Brasitus TA, Davidson NO, Schachter D. Variations in dietary triacylglycerol saturation alter the lipid composition and fluidity of rat intestinal plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1985;812(2):460-72.
- [478] Bachowski GJ, Thomas JP, Girotti AW. Ascorbate-enhanced lipid peroxidation in photooxidized cell membranes: cholesterol

product analysis as a probe of reaction mechanism. *Lipids* 1988;23(6):580-6.

- [479] Jour'd'Heuil D, Vaananen P, Meddings JB. Lipid peroxidation of the brush-border membrane: membrane physical properties and glucose transport. *Am J Physiol* 1993;264(6 Pt 1):G1009-G1015.
- [480] Fukuzawa K, Chida H, Tokumura A, Tsukatani H. Antioxidative effect of alpha-tocopherol incorporation into lecithin liposomes on ascorbic acid-Fe²⁺-induced lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1981;206(1):173-80.
- [481] Miller DM, Aust SD. Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1989;271(1):113-9.
- [482] Winterbourn CC. Comparison of superoxide with other reducing agents in the biological production of hydroxyl radicals. *Biochem J* 1979;182(2):625-8.
- [483] Lunec J. Free radicals: their involvement in disease processes. *Ann Clin Biochem* 1990;27 (Pt 3):173-82.

- [484] Kubow S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radic Biol Med* 1992;12(1):63-81.
- [485] Rellstab P, Schaffner A. Endotoxin suppresses the generation of O₂- and H₂O₂ by "resting" and lymphokine-activated human blood-derived macrophages. *J Immunol* 1989;142(8):2813-20.
- [486] Sung HJ, Yee A, Eskin SG, McIntire LV. Cyclic strain and motion control produce opposite oxidative responses in two human endothelial cell types. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293(1):C87-C94.
- [487] Yan EB, Unthank JK, Castillo-Melendez M, Miller SL, Langford SJ, Walker DW. Novel method for in vivo hydroxyl radical measurement by microdialysis in fetal sheep brain in utero. *J Appl Physiol* 2005;98(6):2304-10.
- [488] Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL, Davies KJ. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291(3):R491-R511.

- [489] Koyama K, Takatsuki K, Inoue M. Determination of superoxide and ascorbyl radicals in the circulation of animals under oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 1994;309(2):323-8.
- [490] Galleano M, Aimò L, Puntarulo S. Ascorbyl radical/ascorbate ratio in plasma from iron overloaded rats as oxidative stress indicator. *Toxicol Lett* 2002;133(2-3):193-201.
- [491] Kallner A, Hartmann D, Hornig D. Steady-state turnover and body pool of ascorbic acid in man. *Am J Clin Nutr* 1979;32(3):530-9.
- [492] Burgess JW, Kiss RS, Zheng H, Zachariah S, Marcel YL. Trypsin-sensitive and lipid-containing sites of the macrophage extracellular matrix bind apolipoprotein A-I and participate in ABCA1-dependent cholesterol efflux. *J Biol Chem* 2002;277(35):31318-26.
- [493] Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 1991;47(1):22-31.
- [494] Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF, Garvey WT. The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation

in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*
2002;165(2):259-69.

- [495] Llaverias G, Jove M, Vazquez-Carrera M, Sanchez RM, Diaz C, Hernandez G, Laguna JC, Alegret M. Avasimibe and atorvastatin synergistically reduce cholesteryl ester content in THP-1 macrophages. *Eur J Pharmacol* 2002;451(1):11-7.
- [496] Llaverias G, Lacasa D, Vinals M, Vazquez-Carrera M, Sanchez RM, Laguna JC, Alegret M. Reduction of intracellular cholesterol accumulation in THP-1 macrophages by a combination of rosiglitazone and atorvastatin. *Biochem Pharmacol* 2004;68(1):155-63.
- [497] Llaverias G, Noe V, Penuelas S, Vazquez-Carrera M, Sanchez RM, Laguna JC, Ciudad CJ, Alegret M. Atorvastatin reduces CD68, FABP4, and HBP expression in oxLDL-treated human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318(1):265-74.
- [498] Rubic T, Lorenz RL. Downregulated CD36 and oxLDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as anti-atherosclerotic mechanisms of interleukin-10. *Cardiovasc Res* 2006;69(2):527-35.

- [499] Llaverias G, Lacasa D, Vazquez-Carrera M, Sanchez RM, Laguna JC, Alegret M. Cholesterol regulation of genes involved in sterol trafficking in human THP-1 macrophages. *Mol Cell Biochem* 2005;273(1-2):185-91.
- [500] Wang X, Liao D, Bharadwaj U, Li M, Yao Q, Chen C. C-Reactive Protein Inhibits Cholesterol Efflux From Human Macrophage-Derived Foam Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007.
- [501] Vikstedt R, Metso J, Hakala J, Olkkonen VM, Ehnholm C, Jauhiainen M. Cholesterol efflux from macrophage foam cells is enhanced by active phospholipid transfer protein through generation of two types of acceptor particles. *Biochemistry* 2007;46(42):11979-86.
- [502] Hoang A, Murphy AJ, Coughlan MT, Thomas MC, Forbes JM, O'Brien R, Cooper ME, Chin-Dusting JP, Sviridov D. Advanced glycation of apolipoprotein A-I impairs its anti-atherogenic properties. *Diabetologia* 2007;50(8):1770-9.
- [503] Yvan-Charvet L, Matsuura F, Wang N, Bamberger MJ, Nguyen T, Rinninger F, Jiang XC, Shear CL, Tall AR. Inhibition of cholesteryl ester transfer protein by torcetrapib modestly

increases macrophage cholesterol efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(5):1132-8.

- [504] Norata GD, Ongari M, Uboldi P, Pellegatta F, Catapano AL. Liver X receptor and retinoic X receptor agonists modulate the expression of genes involved in lipid metabolism in human endothelial cells. *Int J Mol Med* 2005;16(4):717-22.
- [505] Bellido C, Lopez-Miranda J, Perez-Martinez P, Paz E, Marin C, Gomez P, Moreno JA, Moreno R, Perez-Jimenez F. The Mediterranean and CHO diets decrease VCAM-1 and E-selectin expression induced by modified low-density lipoprotein in HUVECs. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16(8):524-30.
- [506] Karabina SA, Brocheriou I, Le NG, Agrapart M, Durand H, Gelb M, Lambeau G, Ninio E. Atherogenic properties of LDL particles modified by human group X secreted phospholipase A2 on human endothelial cell function. *FASEB J* 2006;20(14):2547-9.
- [507] Jeong YJ, Choi YJ, Kwon HM, Kang SW, Park HS, Lee M, Kang YH. Differential inhibition of oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells treated with different flavonoids. *Br J Nutr* 2005;93(5):581-91.

- [508] Cathcart MK, McNally AK, Morel DW, Chisolm GM, III. Superoxide anion participation in human monocyte-mediated oxidation of low-density lipoprotein and conversion of low-density lipoprotein to a cytotoxin. *J Immunol* 1989;142(6):1963-9.
- [509] Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;74(6):1141-8.
- [510] Hehner SP, Breikreutz R, Shubinsky G, Unsoeld H, Schulze-Osthoff K, Schmitz ML, Droge W. Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *J Immunol* 2000;165(8):4319-28.
- [511] Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82(1):47-95.
- [512] Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003;91(3A):7A-11A.
- [513] Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum

- JL. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(4):1372-6.
- [514] Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989;84(4):1086-95.
- [515] Haberland ME, Fong D, Cheng L. Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Science* 1988;241(4862):215-8.
- [516] Rosenfeld ME, Palinski W, Yla-Herttuala S, Butler S, Witztum JL. Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. *Arteriosclerosis* 1990;10(3):336-49.
- [517] Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998;141(1):1-15.
- [518] Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997;272(34):20963-6.

- [519] Sasahara M, Raines EW, Chait A, Carew TE, Steinberg D, Wahl PW, Ross R. Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probucol. I. Is the extent of atherosclerosis related to resistance of LDL to oxidation? *J Clin Invest* 1994;94(1):155-64.
- [520] Regnstrom J, Nilsson J, Tornvall P, Landou C, Hamsten A. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* 1992;339(8803):1183-6.
- [521] Kritchevsky D, Kim HK, Tepper SA. Influence of 4,4'-(isopropylidenedithio)bis(2,6-di-t-butylphenol) (DH-581) on experimental atherosclerosis in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971;136(4):1216-21.
- [522] Kita T, Nagano Y, Yokode M, Ishii K, Kume N, Ooshima A, Yoshida H, Kawai C. Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(16):5928-31.
- [523] Tawara K, Ishihara M, Ogawa H, Tomikawa M. Effect of probucol, pantethine and their combinations on serum lipoprotein

metabolism and on the incidence of atheromatous lesions in the rabbit. *Jpn J Pharmacol* 1986;41(2):211-22.

[524] Wissler RW, Vesselinovitch D. Combined effects of cholestyramine and probucol on regression of atherosclerosis in rhesus monkey aortas. *Appl Pathol* 1983;1(2):89-96.

[525] Serebruany VL, Malinin A, Eisert C, Ong S. AGI-1067, a novel vascular protectant, anti-inflammatory drug and mild antiplatelet agent for treatment of atherosclerosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007;5(4):635-41.

[526] Helmersson J, Larsson A, Vessby B, Basu S. Active smoking and a history of smoking are associated with enhanced prostaglandin F(2alpha), interleukin-6 and F2-isoprostane formation in elderly men. *Atherosclerosis* 2005;181(1):201-7.

[527] Flores L, Rodela S, Abian J, Claria J, Esmatjes E. F2 isoprostane is already increased at the onset of type 1 diabetes mellitus: effect of glycemic control. *Metabolism* 2004;53(9):1118-20.

[528] Jonasson T, Ohlin AK, Gottsater A, Hultberg B, Ohlin H. Plasma homocysteine and markers for oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease--a prospective

randomized study of vitamin supplementation. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(6):628-34.

- [529] Miller ER, III, Appel LJ, Risby TH. Effect of dietary patterns on measures of lipid peroxidation: results from a randomized clinical trial. *Circulation* 1998;98(22):2390-5.
- [530] Kugiyama K, Motoyama T, Doi H, Kawano H, Hirai N, Soejima H, Miyao Y, Takazoe K, Moriyama Y, Mizuno Y, Tsunoda R, Ogawa H, Sakamoto T, Sugiyama S, Yasue H. Improvement of endothelial vasomotor dysfunction by treatment with alpha-tocopherol in patients with high remnant lipoproteins levels. *J Am Coll Cardiol* 1999;33(6):1512-8.
- [531] Yoshida H, Ishikawa T, Ayaori M, Shige H, Ito T, Suzukawa M, Nakamura H. Beneficial effect of gemfibrozil on the chemical composition and oxidative susceptibility of low density lipoprotein: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Atherosclerosis* 1998;139(1):179-87.
- [532] Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, Staels B. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(5):717-26.

- [533] Fluiter K, van der Westhuijzen DR, van Berkel TJ. In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J Biol Chem* 1998;273(14):8434-8.
- [534] Chen W, Silver DL, Smith JD, Tall AR. Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1- mediated cholesterol efflux in macrophages. *J Biol Chem* 2000;275(40):30794-800.
- [535] Yancey PG, Kawashiri MA, Moore R, Glick JM, Williams DL, Connelly MA, Rader DJ, Rothblat GH. In vivo modulation of HDL phospholipid has opposing effects on SR-BI- and ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res* 2004;45(2):337-46.
- [536] Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 2000;275(36):28240-5.
- [537] Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, Mak PA, Wilpitz DC, Edwards PA, Tontonoz P. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(22):12097-102.

- [538] Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 2001;7(7):853-7.
- [539] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 1997;386(6620):73-7.
- [540] Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, Moriwaki H, Kataoka H, Nishi E, Horiuchi H, Arai H, Yokode M. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;947:199-205.
- [541] Kita T. LOX-1, a possible clue to the missing link between hypertension and atherogenesis. *Circ Res* 1999;84(9):1113-5.
- [542] Mehta JL, Hu B, Chen J, Li D. Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(12):2203-8.

- [543] Moriwaki H, Kume N, Kataoka H, Murase T, Nishi E, Sawamura T, Masaki T, Kita T. Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human and murine macrophages: upregulated expression by TNF-alpha. *FEBS Lett* 1998;440(1-2):29-32.
- [544] Lu TT, Repa JJ, Mangelsdorf DJ. Orphan nuclear receptors as eLiXiRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J Biol Chem* 2001;276(41):37735-8.
- [545] Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res* 2004;94(9):1168-78.
- [546] Jacobi J, Kristal B, Chezar J, Shaul SM, Sela S. Exogenous superoxide mediates pro-oxidative, proinflammatory, and procoagulatory changes in primary endothelial cell cultures. *Free Radic Biol Med* 2005;39(9):1238-48.
- [547] Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(12 Pt 2):S4-S8.
- [548] Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999;93(5):1464-76.

- [549] Hersberger M, von Eckardstein A. Low high-density lipoprotein cholesterol: physiological background, clinical importance and drug treatment. *Drugs* 2003;63(18):1907-45.
- [550] Brunet S, Thibault L, Delvin E, Yotov W, Bendayan M, Levy E. Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* 1999;29(6):1809-17.
- [551] Brunet S, Thibault L, Lepage G, Seidman EG, Dube N, Levy E. Modulation of endoplasmic reticulum-bound cholesterol regulatory enzymes by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 2000;28(1):46-54.
- [552] Kosower NS, Kosower EM. The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 1978;54:109-60.
- [553] Meister A. Transport and metabolism of glutathione and gamma-glutamyl amino acids. *Biochem Soc Trans* 1983;11(6):793-4.
- [554] Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 1988;263(33):17205-8.

- [555] Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001;30(11):1191-212.
- [556] Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol* 2002;348:93-112.
- [557] Liochev SI, Fridovich I. The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free Radic Biol Med* 2007;42(10):1465-9.
- [558] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002;33(3):337-49.
- [559] Carroll MC, Outten CE, Proescher JB, Rosenfeld L, Watson WH, Whitson LJ, Hart PJ, Jensen LT, Cizewski C, V. The effects of glutaredoxin and copper activation pathways on the disulfide and stability of Cu,Zn superoxide dismutase. *J Biol Chem* 2006;281(39):28648-56.
- [560] Banci L, Bertini I, Cantini F, D'Amelio N, Gaggelli E. Human SOD1 before harboring the catalytic metal: solution structure of

copper-depleted, disulfide-reduced form. *J Biol Chem* 2006;281(4):2333-7.

- [561] Caruano-Yzermans AL, Bartnikas TB, Gitlin JD. Mechanisms of the copper-dependent turnover of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 2006;281(19):13581-7.
- [562] Brown NM, Torres AS, Doan PE, O'Halloran TV. Oxygen and the copper chaperone CCS regulate posttranslational activation of Cu,Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(15):5518-23.
- [563] Arnesano F, Banci L, Bertini I, Martinelli M, Furukawa Y, O'Halloran TV. The unusually stable quaternary structure of human Cu,Zn-superoxide dismutase 1 is controlled by both metal occupancy and disulfide status. *J Biol Chem* 2004;279(46):47998-8003.
- [564] Holvoet P, Davey PC, De KD, Doukoure M, Deridder E, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Beaufort E, Bishay K, Andrieux N, Benhabiles N, Marguerie G. Oxidized low-density lipoprotein correlates positively with toll-like receptor 2 and interferon regulatory factor-1 and inversely with superoxide dismutase-1 expression: studies in hypercholesterolemic swine and THP-1 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(7):1558-65.

- [565] Didion SP, Ryan MJ, Didion LA, Fegan PE, Sigmund CD, Faraci FM. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res* 2002;91(10):938-44.
- [566] Veerareddy S, Cooke CL, Baker PN, Davidge ST. Gender differences in myogenic tone in superoxide dismutase knockout mouse: animal model of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(1):H40-H45.
- [567] Cooke CL, Davidge ST. Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. *Cardiovasc Res* 2003;60(3):635-42.
- [568] Kondo T, Reaume AG, Huang TT, Carlson E, Murakami K, Chen SF, Hoffman EK, Scott RW, Epstein CJ, Chan PH. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 1997;17(11):4180-9.
- [569] Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(8):1367-73.

- [570] Jeney V, Itoh S, Wendt M, Gradek Q, Ushio-Fukai M, Harrison DG, Fukai T. Role of antioxidant-1 in extracellular superoxide dismutase function and expression. *Circ Res* 2005;96(7):723-9.
- [571] Hink HU, Santanam N, Dikalov S, McCann L, Nguyen AD, Parthasarathy S, Harrison DG, Fukai T. Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(9):1402-8.
- [572] Marklund S. Interactions between hydroxymethylhydroperoxide and catalase. *Biochim Biophys Acta* 1972;289(2):269-75.
- [573] Liou HC, Baltimore D. Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5(3):477-87.
- [574] Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141-79.