

Université de Montréal

**Étude de l'impact de combinaisons d'acides gras
et de l'insuline sur la fonctionnalité
des cellules musculaires lisses vasculaires**

par

Corinne St-Denis

Sciences biomédicales, Institut de Cardiologie de Montréal

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Maître *es* Science (M. Sc.)
en Sciences Biomédicales
option générale

Juin 2012

© Corinne St-Denis, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude de l'impact de combinaisons d'acides gras et de l'insuline
sur la fonctionnalité des cellules musculaires lisses vasculaires

Présenté par :
Corinne St-Denis

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jonathan Ledoux, président-rapporteur
Dr. Jean-François Tanguay, directeur de recherche
Dre. Sylvie Marleau, membre du jury

Résumé

L'athérosclérose est étroitement liée au diabète de type 2. De fortes concentrations plasmatiques en acides gras libres (AGL) et en insuline sont des caractéristiques retrouvées chez les patients souffrant de ces deux pathologies. Les AGL, présents dans notre alimentation, font partie de l'environnement auquel les cellules sont exposées. Leurs effets dépendent de leur nature, les acides gras saturés (AGS) étant néfastes et les acides gras monoinsaturés (AGMI) plus protecteurs. Ils ont donc des effets variés sur les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) impliquées dans la pathogénèse de l'athérosclérose.

Ainsi, l'objectif principal de ce projet de maîtrise était d'évaluer l'impact de deux combinaisons d'AGL sur la viabilité des CMLV, en condition hyperinsulinémique ou non. Les deux combinaisons renfermaient les mêmes AGL mais en proportions différentes, l'une étant plus riche en AGS et l'autre en AGMI. Nos résultats ont montré que les combinaisons d'AGL ont un effet pro-apoptotique principalement dû aux AGS. L'acide oléique présent dans les combinaisons atténue cependant cet effet. Il diminue même plus fortement l'apoptose des CMLV lorsqu'associé à un AGS que lorsqu'utilisé seul. Cet impact est significatif uniquement dans certaines proportions de ces AGL et est plus efficace en présence d'insuline.

Ces résultats mettent en lumière la présence d'une compétition entre mécanismes anti- et pro-apoptotiques en fonction des proportions d'AGS versus AGMI et de l'insulinémie chez les CMLV. Ils soulignent également l'importance de la présence des AGMI dans les diètes riches en AGS et pourraient être utiles pour l'élaboration de nouvelles diètes adaptées aux patients athérosclérotiques et diabétiques.

Mots-clés : Acides gras libres, cellules musculaires lisses vasculaires, insuline, apoptose, viabilité cellulaire, athérosclérose, diabète de type 2.

Abstract

Atherosclerosis is closely linked to type 2 diabetes. High plasmatic concentrations of free fatty acids (FFA) and insulin are common features in patients suffering from both diseases. FFA, present in our diet, are part of the environment to which body cells are exposed. Their effects are dependent of their nature, being harmful for saturated fatty acids (SFA) and more protective for monounsaturated fatty acids (MUFA). They can have therefore various effects on vascular smooth muscle cells (VSMC) implicated throughout the development of atherosclerosis.

Thus, this study aimed to assess the impact of two FFA combinations on VSMC viability, whether or not in a hyperinsulinemic condition. Both combinations contained the same FFA but in different proportions, one being richer in SFA and the other in MUFA. Our results showed that FFA combinations have a pro-apoptotic impact, mainly due to SFA. However, the presence of oleic acid in the combinations attenuated this effect. Furthermore, oleic acid had the capacity to reduce more strongly VSMC apoptosis when combined with a SFA than when used alone, although only under specific FFA ratios. This impact is even more effective in presence of insulin.

These results highlight the presence of a competition between anti- and pro-apoptotic mechanisms dependent of FFA ratios (SFA vs. MUFA) and insulinemia to which are exposed VSMC. They also underline the importance of the presence of MUFA such as oleic acid in diets rich in SFA and could be useful for the development of new diets adapted to atherosclerotic and diabetic patients.

Keywords: Free fatty acids, vascular smooth muscle cells, insulin, apoptosis, cell viability, atherosclerosis, type 2 diabetes.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xii
Remerciements	xvi
1. Introduction	1
1.1 La fonction vasculaire	2
1.1.1 L'anatomie d'un vaisseau	2
1.1.2 Les principales fonctions de l'endothélium	4
1.1.2.1 Régulation du tonus vasculaire	4
1.1.2.2 Barrière sélective	4
1.1.2.3 Inflammation et hémostase	5
1.1.3 Les principales fonctions des cellules musculaires lisses vasculaires	6
1.1.3.1 La contractilité des CMLV	6
1.1.3.2 La modulation phénotypique	7
1.2 L'athérosclérose	8
1.2.1 Définition de la pathologie	8
1.2.1.1 Épidémiologie	9
1.2.1.2 Facteurs de risque impliqués	9
1.2.1.2.1 Facteurs non-modifiables	9
1.2.1.2.2 Facteurs modifiables	10
1.2.2 Les étapes de formation de la plaque d'athérosclérose	12
1.2.2.1 L'initiation : dysfonction et activation endothéliale	12
1.2.2.2 La progression : stries lipidiques, processus inflammatoire et formation du cap fibreux	14

1.2.2.3	Stade avancé : corps nécrotique et amincissement du cap fibreux	17
1.2.2.4	Rupture de la plaque et thrombose.....	17
1.3	Le diabète de type II.....	19
1.3.1	Définition de la pathologie.....	19
1.3.1.1	Épidémiologie	19
1.3.1.2	Facteur de risque important : l'obésité.....	20
1.3.2	Le développement du diabète de type II	21
1.3.2.1	L'inflammation chronique du tissu adipeux	21
1.3.2.2	La résistance à l'insuline.....	22
1.3.2.2.1	Le muscle et le foie	22
1.3.2.2.2	Le tissu adipeux.....	23
1.3.2.3	Le syndrome métabolique	24
1.3.3	Le diabète de type II : un facteur de risque des MCV et de l'accélération du processus d'athérosclérose	27
1.3.3.1	Impact sur la dysfonction endothéliale	27
1.3.3.2	Impact sur la dysfonction des CMLV	28
1.3.3.3	Impact sur la thrombose	30
1.4	Les acides gras	31
1.4.1	Caractéristiques des acides gras	31
1.4.1.1	Classes et structures	31
1.4.1.1.1	Acides gras saturés.....	31
1.4.1.1.2	Acides gras monoinsaturés.....	32
1.4.1.1.3	Acides gras polyinsaturés.....	33
1.4.1.1.4	Les acides gras essentiels : oméga-3 et oméga-6.....	34
1.4.1.1.5	Acides gras trans	35
1.4.1.2	Les acides gras dans les diètes alimentaires.....	35
1.4.1.2.1	La diète occidentale.....	35
1.4.1.2.2	La diète méditerranéenne	36
1.4.2	Métabolisme des acides gras.....	38

1.4.2.1 La digestion, l'absorption et le transport des acides gras.....	38
1.4.2.2 L'emmagasinage des acides gras dans le tissu adipeux	39
1.4.2.3 La relâche d'acides gras du tissu adipeux vers d'autres organes	40
1.4.2.4 La synthèse des acides gras de novo	40
1.4.2.5 Les transporteurs cellulaires des acides gras.....	43
1.4.2.5.1 FAT/CD36	43
1.4.2.5.2 FATP1 à FATP6	44
1.4.2.5.3 FABPpm.....	44
1.4.3 Fonctions des acides gras dans la cellule	45
1.4.3.1 Réserve et source d'énergie	45
1.4.3.2 Rôle structural	46
1.4.3.3 Signalisation cellulaire	46
1.4.4 L'impact des acides gras sur les cellules vasculaires : un lien avec l'athérosclérose	47
1.4.4.1 Impact sur les cellules endothéliales	48
1.4.4.2 Impact sur les cellules musculaires lisses vasculaires.....	49
1.4.4.2.1 Effets sur la prolifération et la migration des CMLV	49
1.4.4.2.2 Effets sur l'apoptose des CMLV	50
1.5 La problématique et le but du projet de recherche	51
2. Article scientifique	55
2.2 Key Fatty Acid Combinations Define Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Viability	56
2.2.1 Abstract	57
2.2.2 Keywords	57
2.2.3 Abbreviations	58
2.2.4 Introduction	58
2.2.5 Materials and Methods.....	61
2.2.5.1 Cell Isolation and Culture	61
2.2.5.2 Fatty Acid Preparation and VSMC Stimulations	61

2.2.5.3 Proliferation Assays by Manual Counts.....	62
2.2.5.4 Apoptosis Induction as Measured by Caspase-3 Assays	63
2.2.5.5 Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry	63
2.2.5.6 Statistical Analysis.....	64
2.2.6 Results.....	64
2.2.6.1 Fatty Acid Combinations Inhibit VSMC Proliferation.....	64
2.2.6.2 AD and VD FFA Combinations Both Cause the Induction of Apoptosis of VSMC	64
2.2.6.3 Saturated Fatty Acids Are the Main Inducers of Apoptosis in AD and VD Combinations	65
2.2.6.4 Saturated Fatty Acids Alone Induce Higher Caspase-3 Activity than when Combined in AD and VD.....	66
2.2.6.5 Oleate Attenuates the Impact of Saturated Fatty Acids on Apoptosis Level in a Dose Dependant Manner.....	66
2.2.6.6 The Combination of Oleate and SFA Has a Higher Reducing Effect than Oleate Alone on Apoptosis Level at AD Concentrations	67
2.2.7 Discussion	68
2.2.8 Acknowledgments.....	73
2.2.9 Conflict of Interest	73
2.2.10 References	74
2.2.11 Tables.....	79
2.2.12 Figure Legends.....	79
2.2.13 Figures.....	82
3. Résultats supplémentaires	89
3.1 Caractérisation du phénotype des CMLV en culture	90
3.2 L'effet des combinaisons d'AGL sur l'activité métabolique des CMLV	91
4. Discussion.....	93
4.1 La stabilité du phénotype des CMLV en culture	96
4.2 La préparation des combinaisons d'acides gras	98

4.2.1 Le choix des différents acides gras dans les combinaisons.....	98
4.2.2 Les modes de solubilisation des acides gras	99
4.2.2.1 Solubilisation dans l'éthanol.....	100
4.2.2.2 Formation de sels d'acides gras	101
4.2.2.3 Les acides gras complexés à l'albumine	101
4.3 L'impact des acides gras sur la viabilité des CMLV	104
4.3.1 Mécanismes potentiels d'induction de l'apoptose par les AGS.....	107
4.3.1.1 Synthèse de céramides	107
4.3.1.2 Impact sur les cardiolipines.....	108
4.3.1.3 Impact sur la perméabilité des mitochondries.....	109
4.3.1.4 Génération de ROS	110
4.3.1.5 Effets sur les transporteurs des AGL	111
4.3.2 Mécanisme protecteur potentiel de l'acide oléique.....	112
4.3.2.1 Emmagasiner des AG sous forme de vésicules de triglycérides	113
4.3.3 Compétition entre mécanismes anti- et pro-apoptotiques.....	114
4.3.3.1 Effets de l'hyperinsulinémie	116
4.3.4 Effets des autres AGMI et AGPI	118
4.4 La variation des résultats entre les travaux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	121
4.4.1 La présence d'hormones et de cytokines <i>in vivo</i>	122
4.4.1.1 Adiponectine et leptine	122
4.4.1.2 Cytokines pro-inflammatoires.....	123
4.4.2 La différence de ratios des AGL	124
5. Conclusion.....	126
6. Bibliographie	I

Liste des tableaux

Tableau I. Profil d'acides gras des diètes utilisées dans les précédents travaux.	53
Tableau II. Profil d'acides gras des combinaisons utilisées dans ce projet.	54

Liste des figures

Figure 1. Les différentes couches et types cellulaires d'un vaisseau sanguin. Vue transversale des trois couches d'un vaisseau. L'intima est constituée d'une couche de cellules endothéliales et la média de plusieurs couches de cellules musculaires lisses, selon la grosseur du vaisseau. L'adventice est composé de fibroblastes et de fibres de collagène. Chacune des couches est séparée par une lame élastique. Image adaptée de (1)..... 3

Figure 2. L'initiation de l'athérosclérose. L'une des étapes les plus précoces du développement de l'athérosclérose est l'oxydation des particules de LDL qui ont pénétré l'intima. Ces LDL oxydées (LDLox) sont pro-inflammatoires et activent l'endothélium. Ce dernier exprime alors à sa surface des molécules d'adhérence et des chimiokines qui permettront la migration des monocytes du plasma vers l'intima pour initier le processus inflammatoire et la formation des stries lipidiques. Image adaptée de (25). 13

Figure 3. La progression de l'athérosclérose. En parallèle et suivant la dysfonction et l'activation des cellules endothéliales, des stries lipidiques remplies de LDL oxydées, de macrophages et de cellules spumeuses se forment dans l'intima des vaisseaux. Les CMLV qui migrent, prolifèrent et synthétisent la matrice extracellulaire forment le cap fibreux et il en résulte ainsi une plaque stable. Cette plaque devient vulnérable lorsque le cap fibreux s'amincit après l'apoptose des CMLV et la dégradation de la matrice extracellulaire, augmentant ainsi les risques de rupture de la plaque et de thrombose. Image adaptée de (30). 16

Figure 4. L'inflammation du tissu adipeux engendre la résistance à l'insuline dans le muscle. Le TNF- α produit par les macrophages infiltrés dans le tissu adipeux enflammé favorise la lipolyse et diminue l'emmagasinement de triglycérides (TG) par les adipocytes. Le taux d'AGL plasmatique de même que l'emmagasinement ectopique de TG sont ainsi

augmentés. Les AGL deviennent le substrat énergétique principalement utilisé et altèrent la signalisation de l'insuline entraînant un phénomène de résistance. Image adaptée de (41). 23

Figure 5. Vision globale du syndrome métabolique. L'inflammation chronique du tissu adipeux chez les obèses crée une augmentation de la concentration plasmatique d'AGL, de même qu'une production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-6 et une modulation de la sécrétion d'adipokines, notamment la résistine et l'adiponectine. Cet état promeut le développement d'une résistance à l'insuline systémique, de même qu'une hyperglycémie et une hyperinsulinémie. Les concentrations élevées d'insuline et d'AGL amènent une dysfonction vasculaire, favorisant l'élévation de la pression sanguine artérielle et le développement de l'athérosclérose, conjointement avec une dyslipidémie provoquée par le foie dysfonctionnel. Un stade pro-thrombotique est également favorisé par la sécrétion de PAI-1 (*Plasminogen-Activator-Inhibitor-1*) par le tissu adipeux. Image adaptée de (47). 26

Figure 6. La structure chimique des acides gras. Les AG sont composés d'un groupement carboxyle et d'une chaîne aliphatique de longueur variable. Lorsque cette chaîne est saturée en atomes d'hydrogène, les AG ont une forme rectiligne. Lorsque la chaîne est insaturée, il y a présence d'une ou plusieurs doubles liaisons, entraînant une forme incurvée. Image adaptée de (61). 33

Figure 7. La pyramide de la diète méditerranéenne. Ce type de diète favorise une abondance de fruits et légumes, des produits céréaliers à base de grains entiers, du poisson et des fruits de mer au moins deux fois par semaine, des portions modérées de volaille et de produits laitiers, de même qu'une très faible quantité de viande rouge et de sucreries. Il y est également suggéré de consommer du vin avec modération, soit de un à deux verres par jour pour les hommes et un verre par jour pour les femmes. Image reproduite et adaptée avec la permission de (70), © 2009 Oldways Preservation & Exchange Trust, www.oldwayspt.org. 37

Figure 8. Le transport des AGL des voies exogène et endogène. Les AGL provenant de la voie exogène, c'est-à-dire des lipides alimentaires, sont transportés sous forme de TG vers le muscle squelettique et le tissu adipeux par des chylomicrons, puis ce qui reste, les chylomicrons *remnants*, vont vers le foie. Les AGL provenant de la voie endogène sont synthétisés dans le foie et sont transportés dans le sang vers le muscle et le tissu adipeux sous forme de TG par des VLDL. Ce qui reste, les IDL, retournent vers le foie pour la dégradation ou sont transformées en LDL. Ces LDL transportent le cholestérol vers les tissus périphériques. Image adaptée de (79). 42

Figure 9. Confirmation du phénotype des CMLV. Des cellules isolées d'aortes de souris et mises en culture ont été marquées à passage 4 avec α -SMA (vert) et SM-22 α (rouge), de même qu'avec un marqueur nucléaire (TOPRO-3, bleu), puis visualisées en microscopie confocale. Le marquage positif confirme le phénotype musculaire lisse des cellules. 90

Figure 10. Effet des combinaisons d'AGL sur l'activité métabolique des CMLV. Les cellules ont été stimulées pendant 72 h soit avec la combinaison DV ou DA à 900 μ M, en présence (DV I, DA I et BSA I) ou non de 1 nM d'insuline. L'activité métabolique des cellules a été déterminée par essais MTS. Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM (pour *standard error of the mean* ou erreur type de la moyenne). Les différentes colonnes du graphique montrent l'absorbance à 490 nm du formazan produit par la réduction du MTS dans les cellules métaboliquement actives (trois expériences indépendantes en absence d'insuline et une expérience indépendante en présence d'insuline). *** $P < 0,001$ vs BSA. 92

Liste des abréviations

α -SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
ADP	Adénosine diphosphate
AG	Acide gras
AGL	Acide gras libre
AGMI	Acide gras monoinsaturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AGS	Acide gras saturé
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
Apaf-1	<i>Apoptosis protease activating factor 1</i>
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BSA	Albumine de sérum bovin
CA ²⁺	Calcium
CE	Cellules endothéliales
CL	Cardiolipine
CML	Cellules musculaires lisses
CMLV	Cellules musculaires lisses vasculaires
CO ₂	Dioxyde de carbone
DA	Diète animale; combinaison d'acides gras
DCFH-DA	Dichlorofluorescéine diacétate
DHA	Acide docosahexaénoïque
DPI	Diphénylène iodonium
DT2	Diabète de type 2
DV	Diète végétale; combinaison d'acides gras
ENOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
EPA	Acide éicopentaénoïque
ERK 1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>

FABPc	<i>Cytoplasmic fatty acid binding protein</i>
FABPpm	<i>Plasma membrane fatty acid binding protein</i>
FAT	<i>Fatty acid translocase</i>
FATP	<i>Fatty acid transport protein</i>
FID	Fédération Internationale du Diabète
GLUT4	<i>Glucose transporter type 4</i>
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IDL	<i>Intermediate density lipoprotein</i>
IFABP	<i>Intestinal fatty acid binding protein</i>
IFN- γ	Interféron gamma
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
INOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LDLox	Lipoprotéine de faible densité oxydée
LPL	Lipoprotéine lipase
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
MCV	Maladies cardiovasculaires
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i>
MPT	<i>Mitochondrial permeability transition</i>
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, <i>inner salt</i>
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaOH	Hydroxyde de sodium
NF κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>

NO	Monoxyde d'azote
O ₂	Oxygène
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
ONOO ⁻	Peroxynitrite
OSM	Organisation Mondiale de la Santé
PAI-1	<i>Plasminogen-activator inhibitor 1</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PGI ₂	Prostacycline
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLC	Phospholipase C
PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated receptors</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SERCA	<i>Sarco endoplasmic reticulum calcium ATPases</i>
SM22- α	Transgéline
SRA	<i>Scavenger receptor A</i>
TF	<i>Tissue factor</i>
TG	Triglycéride
TGF- β	<i>Tumor growth factor beta</i>
TLR-2	<i>Toll-like receptor 2</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
VWF	Facteur von Willebrand

« On se lasse de tout sauf de comprendre. »

[Virgile]

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Jean-François Tanguay de m'avoir permis de réaliser ma maîtrise au sein de son équipe. Au cours des trois dernières années, j'ai énormément appris autant sur le plan théorique que technique. J'en sais désormais davantage sur moi-même et je sors grandie de cette expérience également sur le plan personnel.

Merci au Dr Jonathan Ledoux et au Dre Sylvie Marleau d'avoir accepté de prendre de leur temps pour évaluer ce mémoire.

Merci au Dre Isabelle Cloutier d'avoir cru à mon potentiel d'étudiante aux études graduées et de m'avoir guidé tout au long de mon cheminement. Un grand merci pour tous les conseils, l'aide et le temps accordé en rapport à l'avancement de mon projet, mais aussi pour la rédaction de mon mémoire et de mon article scientifique.

Un merci particulier à Pascale Geoffroy, Julie Lebel, Sandra Gilligan et Marie-Élaine Clavet. Vous êtes une équipe dynamique et votre bonne humeur m'a accompagnée chaque jour au cours de mes trois années parmi vous. Merci également pour toute l'aide technique apportée pour la réalisation de mes expériences.

Je tiens également à remercier Émilie Cossette. Nous avons commencé la maîtrise au même moment et c'est en même temps que nous la terminons. Merci d'avoir été une amie exceptionnelle qui m'a écoutée, soutenue et aidée tout au long de ce parcours.

Un grand merci à Kim Tardif, Geneviève Morin, Vikie Lamontagne et Geneviève DonPierre. Vous êtes toutes des personnes extraordinaires. Vous m'avez conseillée, aidée et également supportée dans les moments plus difficiles. Merci pour toutes les conversations, les rires et les activités que nous avons partagés.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis pour tous vos encouragements et vos petites pensées. Sans vous, je ne serais pas rendue où je suis maintenant.

1. Introduction

1.1 La fonction vasculaire

1.1.1 L'anatomie d'un vaisseau

Chez les humains, de même que chez les autres vertébrés, les vaisseaux sanguins sont des structures faisant partie d'un système circulatoire clos. La fonction de ce système est d'assurer la circulation du sang afin de permettre les échanges gazeux et le transport des nutriments nécessaires au bon fonctionnement de chaque organe.

Les vaisseaux sanguins sont répertoriés en différentes catégories selon leur grosseur et leur fonction. Les artères transportent le sang du cœur vers les capillaires, micro-vaisseaux permettant les échanges entre les cellules et le sang, et les veines transportent le sang des capillaires vers le cœur. Les artères se ramifient en artérioles et les veines en veinules. Les vaisseaux sanguins sont constitués de trois couches, également appelées tuniques :

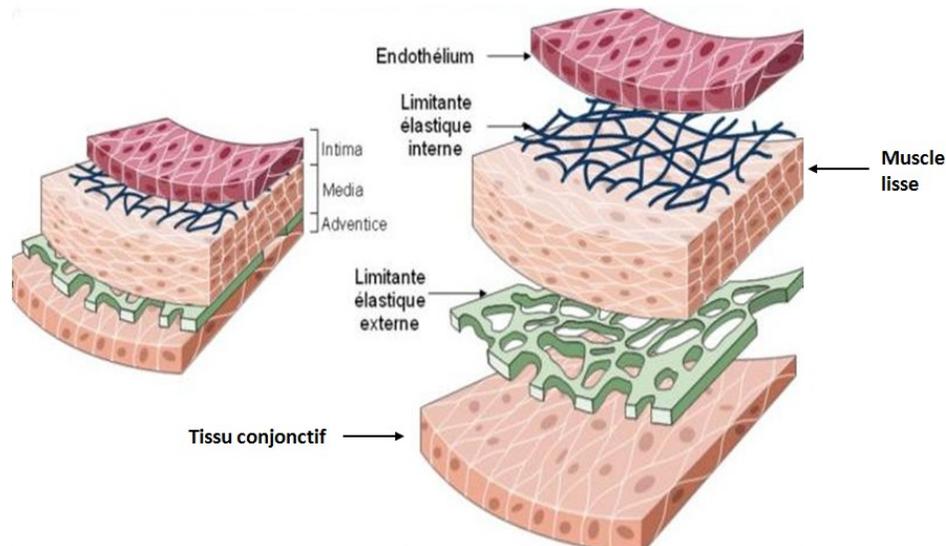


Figure 1. Les différentes couches et types cellulaires d'un vaisseau sanguin. Vue transversale des trois couches d'un vaisseau. L'intima est constituée d'une couche de cellules endothéliales et la média de plusieurs couches de cellules musculaires lisses, selon la grosseur du vaisseau. L'adventice est composé de fibroblastes et de fibres de collagène. Chacune des couches est séparée par une lame élastique. Image adaptée de (1).

L'intima, ou tunique interne, est la couche directement en contact avec le sang. Elle est formée d'une seule épaisseur de cellules endothéliales (CE) toutes imbriquées les unes aux autres et orientées dans le même sens que le flux sanguin. La média (tunique moyenne) se compose de plusieurs couches de cellules musculaires lisses (CML) orientées de façon concentrique. Le nombre de couches de CML varie en fonction de la grosseur des vaisseaux et de leur débit sanguin. Ainsi, les artères principales ont une média plus épaisse que les artérioles ou que les veines puisqu'elles doivent être plus résistantes et plus élastiques en raison du très fort débit sanguin. L'adventice (tunique externe) est constitué de tissu conjonctif renfermant des fibroblastes et des fibres de collagène. Chez les vaisseaux les plus importants ayant une paroi très épaisse, les deux dernières tuniques sont

elles-mêmes vascularisées (vasa vasorum) afin de pouvoir assurer l'apport en oxygène et en nutriments des cellules qu'elles contiennent. Chaque tunique est séparée par une lame élastique, composée d'élastine et de collagène. Chez les capillaires, la paroi vasculaire se limite à un endothélium (2, 3).

1.1.2 Les principales fonctions de l'endothélium

1.1.2.1 Régulation du tonus vasculaire

L'endothélium, lorsqu'il est sain et fonctionnel, joue plusieurs rôles d'importance majeure dans différentes fonctions physiologiques. Tout d'abord, il contribue à la régulation du tonus vasculaire en sécrétant différentes substances qui influenceront la contraction ou la relaxation des CML vasculaires (CMLV). Parmi les facteurs vasodilatateurs produits par les CE, le monoxyde d'azote (NO) est le plus important. Ce gaz hautement diffusible a une demi-vie de quelques secondes seulement. Il est produit par la NO synthase endothéliale (eNOS), une enzyme exprimée de façon constitutive dans les CE. En plus du NO, l'endothélium synthétise également la prostacycline (PGI₂), via la cyclooxygénase et la prostacycline synthase. Pour contrebalancer la vasodilatation, l'endothélium produit des substances vasoconstrictrices telles que l'endothéline-1, l'angiotensine II et la thromboxane A₂. Cette dernière est la contrepartie de la PGI₂ et est synthétisée elle aussi via la cyclooxygénase, suivie de la thromboxane synthase (4).

1.1.2.2 Barrière sélective

L'endothélium joue également le rôle de barrière sélective entre le sang et les tissus sous-jacents. Bien que certaines substances telles que l'oxygène (O₂) et le dioxyde de carbone (CO₂) puissent diffuser librement à travers cette barrière, le transport de la plupart des molécules est strictement régulé. Les fluides et les électrolytes vont utiliser un passage

intercellulaire, tandis que les macromolécules telles que les protéines seront transportées par transcytose, que ce soit via un récepteur ou via les cavéoles et vésicules. La perméabilité de l'endothélium varie selon la nature et les fonctions des vaisseaux sanguins. Par exemple, les artères et la barrière hémato-encéphalique ont une faible perméabilité due à une augmentation du nombre et de la complexité des jonctions serrées entre les CE (5).

1.1.2.3 Inflammation et hémostasie

Une autre fonction de l'endothélium est sa contribution essentielle dans les processus d'inflammation et d'hémostasie. Lors d'une infection, un état d'inflammation s'installe. Cet état induit l'expression des sélectines E et P à la surface des CE qui permettront le roulement des leucocytes sur ces dernières. Les CE expriment également des molécules d'adhérence telles qu'ICAM-1 (pour *Intercellular Adhesion Molecule-1*) et VCAM-1 (pour *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), auxquelles les leucocytes adhéreront fixement. Ils pourront par la suite migrer dans le tissu vers le site d'infection par diapédèse (6). D'un autre côté, l'endothélium possède des propriétés naturelles anti-thrombotiques. En effet, les molécules vasodilatatrices mentionnées plus haut, soit le NO et la PGI₂, sont également des inhibiteurs de l'adhésion plaquettaire (4). Ainsi, lorsqu'une lésion vasculaire survient et que l'endothélium est dénudé, ces inhibiteurs ne peuvent plus jouer leur rôle et le contenu pro-thrombotique de l'espace sous-endothélial est exposé, entraînant l'activation et l'agrégation plaquettaire. Toutes ces fonctions peuvent devenir pathologiques dans un état d'inflammation chronique et de dysfonction endothéliale, tel qu'il en sera discuté plus en détails dans la section 1.2.

1.1.3 Les principales fonctions des cellules musculaires lisses vasculaires

1.1.3.1 La contractilité des CMLV

Une des principales fonctions des CMLV est de contrôler le débit sanguin et la pression artérielle à travers l'organisme en se contractant ou se relaxant, permettant ainsi la constriction ou la dilatation des vaisseaux. Le mécanisme de contraction/relaxation des CMLV est dépendant de la concentration du calcium (Ca^{2+}) cytosolique. Une hausse du taux de Ca^{2+} intracellulaire entraînera une activation de la MLCK (pour *Myosin Light Chain Kinase*) qui induira à son tour la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, causant ainsi la contraction de la cellule. À l'inverse, une baisse du taux de Ca^{2+} mènera à la relaxation de la cellule en maintenant la MLCK inactive (7). Tel que mentionné dans la section 1.1.2, les CE sécrètent de nombreuses molécules qui régulent le tonus vasculaire. Ces molécules influencent indirectement les taux de Ca^{2+} cytosoliques en augmentant les taux d'AMPc ou de GMPc pour les vasodilatateurs ou en activant la phospholipase C (PLC) pour les vasoconstricteurs. Le NO, la substance vasodilatatrice la plus importante, cause une augmentation de la production de GMPc dans les CMLV via l'activation de la guanylate cyclase soluble. Cette augmentation entraîne l'activation de la protéine kinase G (PKG). Cette protéine a plusieurs cibles, dont le recaptage du Ca^{2+} cytosolique par le réticulum sarcoplasmique via les SERCA (pour *Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases*). La PGI_2 agit de la même façon, mais en causant une augmentation de la production d'AMPc via l'activation de l'adénylate cyclase et de la protéine kinase A (PKA) (8).

Le phénomène de contraction des CMLV est aussi impliqué dans la première étape de l'hémostase primaire. En effet, lors d'une blessure causant la rupture d'un vaisseau, un spasme vasculaire sera immédiatement produit grâce à la production de substances vasoconstrictrices telles que la thromboxane A2 et la sérotonine par les CE et les

plaquettes. Ceci permet de limiter temporairement les pertes sanguines et de favoriser la formation du clou hémostatique (9).

1.1.3.2 La modulation phénotypique

Les CMLV jouent également un rôle très important au niveau de la structure et du remodelage des vaisseaux sanguins de par leur très grande plasticité. Elles ont la capacité de passer, d'une façon réversible, d'un phénotype contractile à un phénotype prolifératif, dit synthétique, avec toute une gamme de phénotypes intermédiaires en fonction des situations physiologiques et pathologiques. C'est ce qui est appelé la modulation phénotypique. Cette modulation est influencée par différents facteurs biochimiques tels que certains facteurs de croissance, notamment le PDGF-B (pour *Platelet-Derived Growth Factor-B*) et le TGF- β (pour *Transforming Growth Factor-beta*). La modulation est également influencée par la composition et l'organisation de la matrice extracellulaire (MEC) et par des forces mécaniques telles que les forces de cisaillement et l'étirement. Les CMLV en stade contractile expriment plus de protéines en filaments responsables de la contraction des cellules, tandis que les CMLV en stade synthétique sécrètent une plus grande quantité de composants de la MEC et ont un taux de prolifération et de migration plus élevé. Bien que dans la paroi d'un vaisseau sain les CMLV en stade contractile soient plus nombreuses, les fonctions du stade synthétique deviennent particulièrement importantes lors du remodelage dû à une blessure vasculaire, à l'exercice ou encore lors d'une grossesse (10). Toutes les fonctions des CMLV énumérées ci-dessus sont également impliquées dans la pathogénèse de l'athérosclérose, tel qu'il le sera décrit dans la section 1.2.

1.2 L'athérosclérose

1.2.1 Définition de la pathologie

L'athérosclérose est un désordre inflammatoire chronique et complexe affectant la paroi des vaisseaux sanguins, principalement les artères de gros et moyen calibres telles que l'aorte et les artères coronaires et cérébrales. Cette pathologie se développe de façon progressive pouvant s'échelonner sur plusieurs décennies et implique plusieurs types cellulaires. Elle se caractérise par un épaissement des parois vasculaires et par une augmentation de la rigidité des vaisseaux.

Les conséquences de l'athérosclérose peuvent être très graves. Au cours du développement de la plaque d'athérome dans les artères coronaires, où la lumière des vaisseaux diminue peu à peu, il arrive que le débit sanguin ne puisse augmenter davantage pour combler l'apport en O₂ nécessaire aux besoins du cœur. Il s'agit alors d'épisodes transitoires d'ischémie du myocarde. Ces derniers s'accompagnent de douleurs à la poitrine, couramment nommées angines de poitrine, qui peuvent irradier vers la mâchoire et le bras du côté gauche. Ces angines apparaissent souvent lorsque les besoins en O₂ sont accrus, comme par exemple lors d'un exercice et sont habituellement de courte durée. Lorsqu'une artère est occlue complètement, l'ischémie prolongée entraîne la mort des tissus irrigués. L'occlusion peut être due au rétrécissement progressif de la lumière de l'artère, mais également à une embolie causée par un détachement d'un thrombus et entraînant ainsi une obstruction subite du vaisseau. Lorsque l'occlusion a lieu dans une artère coronaire, cela cause un infarctus aigu du myocarde et lorsqu'elle a lieu dans une artère cérébrale, cela cause un accident vasculaire cérébral (AVC). Les séquelles varient en importance selon l'étendue de la zone touchée. Elles peuvent même entraîner le décès de l'individu si elles sont très graves ou très étendues (11).

1.2.1.1 Épidémiologie

L'athérosclérose est responsable de la majorité des cas de maladies cardiovasculaires (MCV). Ces dernières constituent la principale cause de décès à travers le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 30 % du nombre total de morts en 2008 étaient imputés aux MCV, dont environ 24 % dus à des ischémies cardiaques ou cérébrales (12). Chez nous, 1,3 millions de canadiens ont déclaré souffrir d'une MCV ayant été diagnostiquée par un professionnel en 2007 et 16,9 % des hospitalisations en 2005-2006 ont été reliées à ces maladies selon l'Agence de la Santé Publique du Canada (13).

1.2.1.2 Facteurs de risque impliqués

Il existe de très nombreux facteurs pouvant augmenter les risques de développer de l'athérosclérose. Parmi les facteurs non-modifiables, notons l'âge, le sexe, l'ethnicité et l'hérédité. L'hypertension, les dyslipidémies, le tabagisme, l'obésité, la sédentarité et le diabète sont quant à eux considérés comme des facteurs modifiables.

1.2.1.2.1 Facteurs non-modifiables

L'âge et le sexe sont deux des facteurs de risque les plus importants. Il est bien connu que les cas d'athérosclérose augmentent avec l'âge des individus. Au Canada, le pourcentage de gens ayant déclaré une maladie du cœur en 2007 se situe à 1,3 % pour la tranche d'âge de 35-44 ans et monte graduellement pour atteindre 21,8 % pour les 75-84 ans (13). L'accélération du développement de l'athérosclérose peut s'expliquer par la sénescence des cellules vasculaires qui, comme toutes les cellules d'un organisme, perdent leur capacité à maintenir leurs fonctions avec le vieillissement. Ainsi avec l'âge, les vaisseaux sanguins deviennent plus rigides, le processus d'angiogénèse devient dysfonctionnel, la réponse inflammatoire est accrue et les propriétés anti-thrombotiques de l'endothélium diminuent (14). Il a par ailleurs été démontré que la production de NO et de PGI₂ diminue chez les CE sénescents (15, 16). D'un autre côté, l'incidence d'athérosclérose, et plus généralement de MCV, est beaucoup plus élevée chez les hommes

que chez les femmes pré-ménopausées pour une même tranche d'âge. L'écart entre les deux sexes tend cependant à diminuer avec le vieillissement, soit lorsque les femmes deviennent ménopausées. Cet effet a été fortement relié à l'arrêt de production d'œstrogène, un stéroïde reconnu pour son action cardioprotectrice (17).

Que ce soit sur une base génétique ou d'habitudes culturelles, l'origine ethnique est également reliée au risque de développer de l'athérosclérose. Aux États-Unis, les populations d'origine hispanique de même que les immigrants d'Asie du Sud ont une plus forte prévalence pour certains facteurs de risque modifiables, tels que le diabète et l'hyperlipidémie. Ils ont donc une prédisposition plus élevée aux maladies coronariennes que les caucasiens. Il a aussi été démontré dans une étude réalisée à Manhattan que l'incidence d'AVC était 2,4 fois plus élevée parmi la population noire et 1,6 fois plus élevée parmi la population hispanique lorsque comparée à la population blanche (18).

De la même façon, l'histoire familiale influence la prédisposition à l'athérosclérose. En effet, les personnes ayant des antécédents familiaux de MCV, surtout au premier degré, ont plus de risque d'en souffrir à leur tour. Plusieurs études de familles ou de jumeaux ont par ailleurs prouvé que l'héritabilité de l'athérosclérose était assez élevée, avec plus de 50 % de la maladie pouvant être expliqués par la génétique. Ceci peut être dû à une association avec des facteurs de risque à forte composante génétique, tels que l'hypercholestérolémie, une pression artérielle élevée et le diabète (19).

1.2.1.2.2 Facteurs modifiables

Dans cette catégorie se retrouvent des facteurs de risque qui peuvent être prévenus ou traités, que ce soit en changeant les habitudes de vie d'un individu ou à l'aide de médicaments. Certains de ces facteurs ont toutefois une forte composante génétique, comme c'est le cas pour l'hypertension artérielle et les dyslipidémies. L'hypertension est un des facteurs de risque les plus importants et touche un grand nombre de personnes à travers le monde. Selon l'OSM, environ 30 % de la population âgée de plus de 25 ans en Amérique du Nord avait une pression sanguine élevée en 2008 (20). Chez les patients

souffrant d'hypertension, l'angiotensine II, une molécule du système rénine-angiotensine au pouvoir vasoconstricteur, est élevée et favorise ainsi la contraction des CMLV. La production de radicaux libres est également augmentée chez ces patients, réduisant la synthèse et la biodisponibilité du vasodilatateur NO et augmentant l'inflammation (21).

D'un autre côté, les gens souffrant d'athérosclérose présentent aussi souvent des dyslipidémies. Le lien a été établi maintes fois entre le développement de plaques d'athérome et l'hypercholestérolémie incluant des taux sanguins de triglycérides, de LDL (pour *Low Density Lipoprotein*) et VLDL (pour *Very Low Density Lipoprotein*) élevés, ainsi que des taux de HDL (pour *High Density Lipoprotein*) réduits. Un taux élevé de LDL favorise l'internalisation de ces particules dans l'intima et leur oxydation subséquente. Ces LDL oxydées seront phagocytées par les macrophages qui deviendront par la suite des cellules spumeuses, initiant ainsi la formation de stries lipidiques au tout début du développement de l'athérosclérose (21). Il en sera discuté plus en détails dans la section 1.2.2. Les particules de HDL ont quant à elles un effet protecteur. Elles sont impliquées dans le transport inverse du cholestérol, c'est-à-dire de l'intima des vaisseaux sanguins où le cholestérol se retrouve en excès, vers le foie pour l'élimination dans la bile (19, 22). Puisque les taux de HDL sont réduits chez les patients athérosclérotiques, il y a perte de l'homéostasie du cholestérol qui peut ainsi s'accumuler librement dans l'espace sous-endothélial.

Le tabagisme est également fortement associé avec le développement de l'athérosclérose. Effectivement, les produits dérivés et inhalés du tabac facilitent l'agrégation plaquettaire, augmentent la viscosité du sang et endommagent l'endothélium (18). Le risque de subir une crise cardiaque est neuf fois plus élevé chez les fumeurs que chez les non-fumeurs. Ce risque diminue cependant de moitié 5 ans après l'arrêt de fumer et retombe au même niveau que celui du non-fumeur 10 ans après l'arrêt (13).

La sédentarité, une mauvaise alimentation et l'obésité qui en découle sont des facteurs de risque qui sont très présents chez les populations des pays industrialisés et qui apparaissent à un âge de plus en plus jeune. Le taux d'embonpoint chez les adolescents est

d'ailleurs très élevé. Il a été estimé aux États-Unis que la prévalence de l'obésité en 2020 sera de 30 à 37 % chez les hommes, comparée à 25 % présentement, et de 34 à 44 % chez les femmes, comparée à 32 % actuellement (23). Il est reconnu que le tissu adipeux est capable de sécréter de façon endocrine plusieurs molécules, appelées adipokines. Parmi celles-ci se trouvent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 (pour Interleukine-6) et le TNF- α (pour *Tumor Necrosis Factor*- alpha). Cette production, augmentée en même temps par l'hypertrophie du tissu adipeux et l'infiltration accrue de macrophages, contribue au développement d'un état d'inflammation systémique néfaste pour la fonction endothéliale des vaisseaux sanguins (24).

Le diabète de type 2 est pour sa part fortement associé à l'accélération du processus d'atteinte vasculaire dans l'athérosclérose, tel qu'il en sera discuté plus en détails à la section 1.3.

1.2.2 Les étapes de formation de la plaque d'athérosclérose

1.2.2.1 L'initiation : dysfonction et activation endothéliale

Au tout début de la pathologie, avant même d'observer l'épaississement des parois artérielles, l'accumulation de LDL dans l'espace sous-endothélial modifie la composition de l'intima. Cet évènement est à la fois une cause et une conséquence de la dysfonction de l'endothélium et mènera éventuellement vers un stade inflammatoire et vers la formation des stries lipidiques :

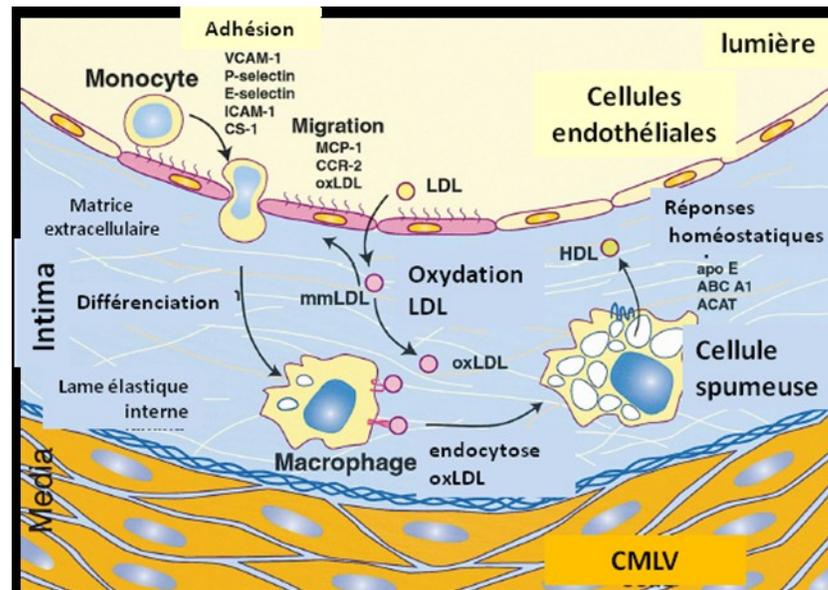


Figure 2. L'initiation de l'athérosclérose. L'une des étapes les plus précoces du développement de l'athérosclérose est l'oxydation des particules de LDL qui ont pénétré l'intima. Ces LDL oxydées (LDLox) sont pro-inflammatoires et activent l'endothélium. Ce dernier exprime alors à sa surface des molécules d'adhérence et des chimiokines qui permettront la migration des monocytes du plasma vers l'intima pour initier le processus inflammatoire et la formation des stries lipidiques. Image adaptée de (25).

En effet, une dysfonction endothéliale se caractérise par une diminution de la biodisponibilité de NO, une altération des fonctions anti-thrombotiques, une augmentation de l'expression de molécules d'adhérence permettant le recrutement des leucocytes et une augmentation de la perméabilité qui diminue les capacités de barrière sélective. Cette dernière caractéristique facilitera la diffusion des particules de LDL à travers les jonctions des CE vers l'intima. Les LDL non modifiées ne sont pas en tant que tel des particules pro-inflammatoires et ne sont pas reconnues par les macrophages. Elles sont cependant retenues dans l'intima par leur interaction avec les protéines de la MEC contenues dans l'espace sous-endothélial. En effet, certains acides aminés basiques de l'apolipoprotéine-B100, une protéine formant les LDL, interagissent avec les charges négatives des groupements

glycosaminoglycans (GAG) des protéoglycanes de la MEC (26). Les LDL retenues dans l'intima sont susceptibles à l'oxydation sous l'action des ROS (pour *Reactive Oxygen Species*) et d'enzymes produites par les CE, les CMLV ou les macrophages, telles que les lipoxygénases, les NADPH oxydases et la iNOS (pour *inducible Nitric Oxid Synthase*) lorsqu'elles ont pénétré l'espace sous-endothélial.

Ces LDL oxydées (LDLox) sont hautement athérogéniques et ont de ce fait la capacité d'activer l'endothélium. Ce dernier se mettra alors à exprimer à sa surface des molécules d'adhérence telles que les sélectines E et P, ICAM-1 et VCAM-1. Il produira également des chimiokines telles que MCP-1 (pour *Monocyte Chemotactic Protein-1*), également appelée CCL2, et des facteurs de croissance tels que M-CSF (pour *Macrophage Colony-Stimulating Factor*) afin de promouvoir le recrutement des monocytes circulant dans le sang, leur migration dans l'intima et leur différenciation en macrophages (19, 22, 27, 28).

1.2.2.2 La progression : stries lipidiques, processus inflammatoire et formation du cap fibreux

Les macrophages nouvellement différenciés phagocytent les LDLox grâce à leurs récepteurs éboueurs CD36 et SRA (pour *Scavenger Receptor A*). Ils se transforment ensuite en cellules spumeuses par accumulation de cholestérol et s'amoncellent, initiant ainsi la formation des stries lipidiques. Les lymphocytes T sont également recrutés aux sites de lésion et sécrètent des cytokines, telles que l'IFN- γ (pour interféron-gamma), qui stimuleront les macrophages à produire plusieurs molécules pro-inflammatoires, telles qu'IL-1, IL-6 et TNF- α . Ces cytokines promeuvent à leur tour plus de recrutement de monocytes et plus d'oxydation de LDL. Un état d'inflammation chronique est donc créé.

Les macrophages sécrètent aussi des facteurs de croissance comme le PDGF, stimulant ainsi la migration et la prolifération des CMLV dans l'espace sous-endothélial. Les CMLV présentes dans l'intima synthétisent une MEC composée de collagène, fibrine

et protéoglycanes, formant ainsi le cap fibreux. On parle d'une plaque stable en présence de stries lipidiques entourées d'une couche épaisse de cap fibreux. Cette plaque occlue partiellement les artères et peut provoquer des angines de poitrine. Elle peut rester stable durant plusieurs années, cependant des événements entraînant l'amincissement du cap fibreux et l'augmentation de son contenu pro-thrombotique la rendront vulnérable à un stade avancé de la pathologie (voir la figure 3 pour un schéma de cette progression) (19, 22, 25, 29).

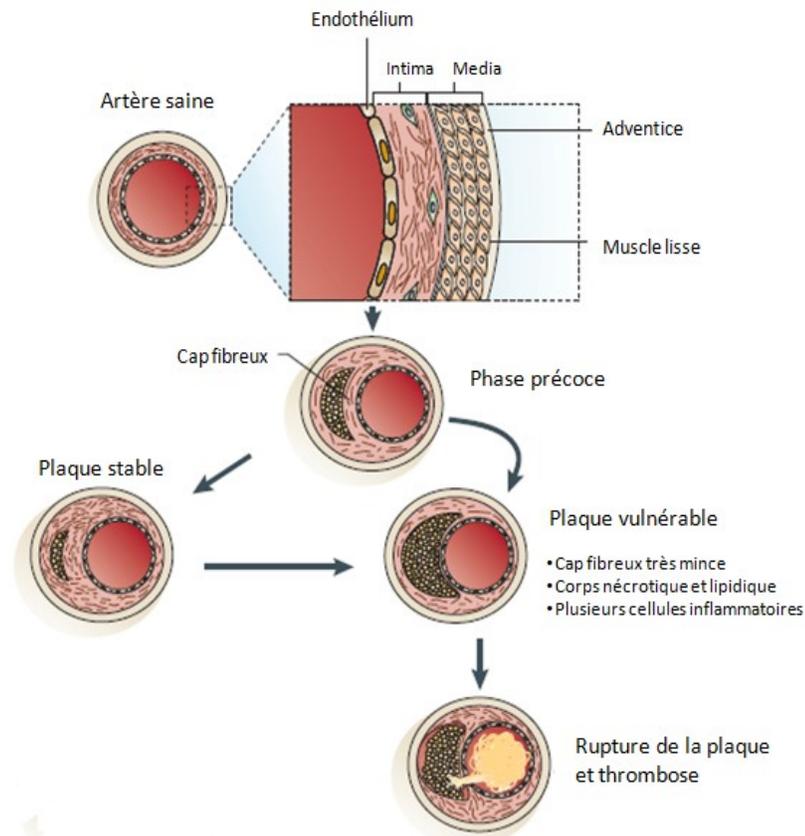


Figure 3. La progression de l'athérosclérose. En parallèle et suivant la dysfonction et l'activation des cellules endothéliales, des stries lipidiques remplies de LDL oxydées, de macrophages et de cellules spumeuses se forment dans l'intima des vaisseaux. Les CMLV qui migrent, prolifèrent et synthétisent la matrice extracellulaire forment le cap fibreux et il en résulte ainsi une plaque stable. Cette plaque devient vulnérable lorsque le cap fibreux s'amincit après l'apoptose des CMLV et la dégradation de la matrice extracellulaire, augmentant ainsi les risques de rupture de la plaque et de thrombose. Image adaptée de (30).

1.2.2.3 Stade avancé : corps nécrotique et amincissement du cap fibreux

L'inflammation continue causée par les macrophages et les lymphocytes T contribue au développement de lésions plus complexes et instables dans un stade plus avancé de l'athérosclérose. L'IFN- γ et le TGF- β produits par les lymphocytes T inhibent la prolifération des CMLV. Les macrophages produisent quant à eux des métalloprotéinases de types collagénase et gélatinase qui dégradent la MEC et favorisent la desquamation de l'endothélium. Ils stimulent également l'expression de Fas à la surface des CMLV. Le ligand du récepteur Fas (Fas ligand) est exprimé par les lymphocytes T et lorsque qu'il est lié au récepteur, induit l'apoptose des CMLV (29). Étant moins nombreuses, les CMLV sécrètent moins de MEC. Il a de plus été démontré que l'apoptose des CMLV peut amener à la production de thrombine et à la calcification vasculaire, deux composantes importantes dans le processus d'atteinte vasculaire (31). Ainsi, à ce stade-ci s'observe une plus grande proportion de cellules inflammatoires, un gros noyau lipidique et nécrotique et une plus faible proportion de CMLV et de MEC (voir figure 3). Tous ces éléments font en sorte que le cap fibreux s'amincit, rendant la plaque vulnérable à une rupture.

1.2.2.4 Rupture de la plaque et thrombose

Lorsque la plaque se rompt, le contenu pro-thrombotique de l'espace sous-endothélial est exposé aux plaquettes qui circulent dans le sang. Le facteur von Willebrand (vWF) sécrété par les CE qui se trouvent au site de rupture permet l'adhésion des plaquettes. La liaison de ses dernières avec le collagène de la MEC entraîne leur activation et puis leur agrégation grâce à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ située à la surface des plaquettes ayant été activées. L'activation par le collagène entraîne également la sécrétion d'ADP et de thromboxane A₂, deux agonistes agissant de façon autocrine comme activateurs des plaquettes. La thrombine, générée par la cascade de coagulation, agit aussi à titre d'agoniste de l'activation plaquettaire. Ces molécules permettent la croissance du thrombus. La fibrine

produite à partir du fibrinogène grâce à la thrombine veille à stabiliser le clou plaquettaire. Le thrombus ainsi formé ne se désagrège pas facilement puisque l'équilibre entre la fibrinolyse et la thrombose est débalancé par un endothélium dysfonctionnel. Le thrombus peut donc occlure complètement un vaisseau à l'endroit où il s'est formé et causer une ischémie allant jusqu'à la nécrose, ou se détacher et entraîner une embolie distale (32).

1.3 Le diabète de type II

1.3.1 Définition de la pathologie

Tout comme l'athérosclérose, le diabète de type 2 (DT2) est une maladie chronique très complexe se développant de façon progressive. C'est un désordre d'origine métabolique impliquant plusieurs organes et ayant comme conséquence initiale de créer un déséquilibre de l'homéostasie du glucose, dû à une incapacité de produire ou d'utiliser correctement l'insuline. Le DT2 est caractérisé par une résistance à l'insuline au niveau du foie, des muscles et du tissu adipeux, par une hyperinsulinémie et une hyperglycémie, de même que par une intolérance au glucose. Une destruction des cellules- β pancréatiques responsables de la production de l'insuline est également observée à un stade plus avancé. Cette maladie est source de préoccupation croissante à l'échelle mondiale puisqu'un nombre de plus en plus élevé de gens en sont atteints et qu'elle est un facteur de risque connu de l'accélération du processus d'athérosclérose. En plus d'augmenter les cas d'infarctus du myocarde et d'AVC, le DT2 peut causer d'autres complications macrovasculaires, souvent dans les membres inférieurs, amenant une claudication et une ischémie chronique avec possible gangrène et éventuellement amputation. Le DT2 est également la source de complications microvasculaires non moins graves telles que l'insuffisance rénale, la rétinopathie avec possibilité de cécité et la neuropathie périphérique (33).

1.3.1.1 Épidémiologie

Le DT2 était auparavant surtout observé dans les pays industrialisés d'Europe et d'Amérique du Nord, mais il touche maintenant aussi les pays en voie de développement et les pays pauvres. L'OSM considère même cette maladie comme une épidémie. Dans la 4^e édition du *Diabetes Atlas* publiée par la Fédération Internationale du Diabète (FID) (34), le

nombre de personnes atteintes de DT2 en 2010 a été évalué à 284,8 millions, soit une prévalence mondiale de 6,4 %. Les régions les plus touchées sont l'Amérique du Nord et les Caraïbes (37, 4 millions). Statistique Canada a pour sa part évalué qu'environ 1,8 millions de canadiens souffraient de DT2 en 2010 (35). À titre de prévision, la FID estime qu'en 2030 le nombre de personnes atteintes de cette maladie passera à 438,7 millions (prévalence mondiale de 7,7 %), correspondant à une augmentation de 54 % du nombre de cas lorsque comparé au nombre évalué en 2010.

1.3.1.2 Facteur de risque important : l'obésité

Un des facteurs de risque les plus importants concernant le développement du DT2 est l'obésité. En 1997, l'OSM a déclaré l'obésité comme étant une maladie. Elle définit cette pathologie comme « *une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé* ». Lorsque l'indice de masse corporelle (IMC) d'une personne est égal ou supérieur à 25, il y a surpoids et lorsque l'IMC est égal ou supérieur à 30, la personne est considérée obèse. En 2008, l'OSM a stipulé au niveau mondial que 35 % des adultes âgés de 20 ans et plus avaient un surplus de poids, regroupés principalement en Amérique du Nord et en Océanie. L'OSM a également évalué globalement que 12 % des adultes âgés de 20 ans et plus étaient obèses (36, 37).

L'obésité se produit lorsque l'apport calorique provenant de l'alimentation est excessif comparativement aux dépenses d'énergie d'un individu. Cet apport excessif provient surtout de diètes riches en lipides et d'un manque d'activité physique. Il en résulte une expansion du tissu adipeux par une augmentation de la taille des adipocytes gorgés de lipides (hypertrophie) et par une prolifération croissante lorsque les adipocytes existants deviennent saturés (hyperplasie). Il existe principalement deux types d'obésité selon la localisation du surplus de graisse. Le type androïde est caractérisé par un surplus principalement localisé au niveau du tronc et de l'abdomen, alors que le surplus au niveau des hanches et des cuisses est appelé le type gynécoïde. Ce type est principalement observé

chez les femmes et est composé essentiellement de tissu adipeux sous-cutané. Le type androïde est observé surtout chez les hommes, mais également chez les femmes post-ménopausées. Il est une source de préoccupation plus importante, car il est principalement constitué de tissu adipeux viscéral. Il est connu qu'un état d'inflammation chronique peut s'installer dans ce type de tissu adipeux chez les obèses ou les personnes en surcharge pondérale et ainsi promouvoir le développement du DT2 (38, 39).

1.3.2 Le développement du diabète de type II

1.3.2.1 L'inflammation chronique du tissu adipeux

L'inflammation du tissu adipeux engendrée par une surcharge en lipides des adipocytes est un événement initiateur menant à un stade de résistance à l'insuline systémique et éventuellement au développement du DT2. Lorsque les adipocytes sont hypertrophiés, ils ont tendance à mourir plus facilement par nécrose. Cela pourrait être une cause du recrutement dans le tissu adipeux de macrophages venus phagocyter les débris d'adipocytes nécrotiques. Il est également reconnu que le tissu adipeux chez les obèses sécrète un taux plus élevé de MCP-1 (CCL2), favorisant également le recrutement des macrophages (40). Le pourcentage de macrophages dans le tissu adipeux de sujets sains est d'environ 5-10 %, alors que chez les sujets obèses, il peut atteindre 50 %. Ainsi, les macrophages activés qui s'accumulent dans le tissu adipeux hypertrophié sont responsables de la production d'une grande quantité de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6. Ces cytokines pro-inflammatoires favorisent la dysfonction des adipocytes, entraînant une diminution de leur capacité à synthétiser et emmagasiner les triglycérides, de même qu'une augmentation de la lipolyse causant une élévation de la concentration d'acides gras libres (AGL) circulant dans le sang (41).

1.3.2.2 La résistance à l'insuline

1.3.2.2.1 Le muscle et le foie

Le haut taux d'AGL plasmatique engendré par l'inflammation du tissu adipeux a des conséquences néfastes au niveau d'autres organes tels le muscle et le foie. Au niveau du muscle, la balance de substrat énergétique utilisé sera modifiée (voir figure 4). En effet, les cellules musculaires utiliseront préférentiellement les acides gras plutôt que le glucose, augmentant ainsi la β -oxydation. Il est également connu que les AGL inhibent la signalisation de l'insuline à son récepteur, empêchant ainsi la translocation de GLUT4 (pour *Glucose Transporter Type 4*) à la surface des cellules. Ces éléments augmentent la résistance à l'insuline et créent une hyperglycémie (41).

Au niveau du foie, l'insuline a comme fonction d'inhiber la gluconéogénèse. Puisque la voie de signalisation de l'insuline est altérée par les fortes doses en AGL, non seulement le foie devient résistant à l'insuline, mais il produit aussi une forte concentration de glucose, contribuant à l'hyperglycémie (42).

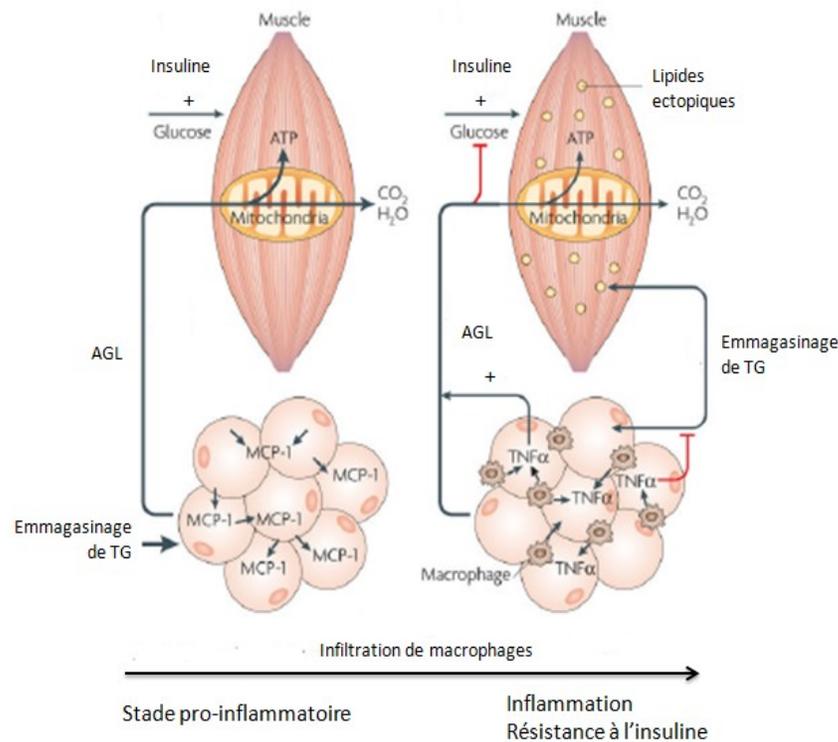


Figure 4. L'inflammation du tissu adipeux engendre la résistance à l'insuline dans le muscle. Le TNF- α produit par les macrophages infiltrés dans le tissu adipeux enflammé favorise la lipolyse et diminue l'emmagasinage de triglycérides (TG) par les adipocytes. Le taux d'AGL plasmatique de même que l'emmagasinage ectopique de TG sont ainsi augmentés. Les AGL deviennent le substrat énergétique principalement utilisé et altèrent la signalisation de l'insuline entraînant un phénomène de résistance. Image adaptée de (41).

1.3.2.2.2 Le tissu adipeux

Tel que décrit ci-haut dans la section 1.3.2.1, le taux de TNF- α est augmenté lors de l'inflammation chronique du tissu adipeux. Il est connu que cette cytokine affecte la sensibilité des adipocytes à l'insuline. En effet, le TNF- α induit la phosphorylation de résidus sérine de l'IRS-1 (pour *Insulin Receptor Substrate-1*), réduisant de ce fait la signalisation sous-jacente lorsque l'insuline se lie à son récepteur (43). L'hormone ne peut

alors plus jouer correctement son rôle anabolique consistant à promouvoir la lipogenèse et inhiber la lipolyse (44). Le tissu adipeux devient donc insensible à la présence d'insuline et est dit résistant. Puisque la lipolyse et ainsi le taux d'AGL plasmatique sont augmentés sous cette condition, la résistance à l'insuline du tissu adipeux contribue également au développement de la résistance à l'insuline du muscle et du foie.

Cet état de résistance à l'insuline dans plusieurs organes devient donc un état systémique. Le glucose n'est ainsi plus utilisé efficacement par les cellules et demeure en circulation libre dans le sang, entraînant le développement d'une hyperglycémie. Une intolérance au glucose s'installe alors dans le muscle et le foie devant cette hyperglycémie persistante, créant un stade dit pré-diabétique. Déjà à ce stade, les individus sont plus susceptibles de développer des complications cardiovasculaires. Avec le temps et si aucune prévention n'est faite, l'hyperglycémie devient plus élevée. Pour compenser, les cellules- β du pancréas sécréteront une plus grande quantité d'insuline, amenant ainsi une hyperinsulinémie. Ce sont ces conditions combinées qui mèneront graduellement à l'établissement du stade diabétique (45).

1.3.2.3 Le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique, également appelé syndrome X, est un regroupement de plusieurs caractéristiques pathologiques affectant le métabolisme (voir la figure 5 pour une image détaillée). Dans l'*IDF (International Diabetes Federation) consensus worldwide definition of the metabolic syndrome* publié en 2006, la FID définit le syndrome métabolique selon les paramètres suivants : tout d'abord, il est essentiel qu'une obésité centrale soit présente. Cette obésité doit être accompagnée d'au moins deux des quatre facteurs prédéfinis. Il s'agit d'un taux de triglycérides élevé ($\geq 1,7$ mM), un taux de HDL réduit ($< 1,03$ mM chez les hommes et $< 1,29$ mM chez les femmes), une pression sanguine artérielle élevée (systolique ≥ 130 mm Hg et diastolique ≥ 85 mm Hg) ou une glycémie à jeun $\geq 5,6$ mM. Il a de plus été estimé dans ce rapport qu'environ 20-25 % de la population

adulte mondiale est atteinte de ce syndrome. C'est une affection qui a de graves conséquences puisque les individus en souffrant ont trois fois plus de risque de subir un infarctus du myocarde ou un AVC. Plus frappant encore, le syndrome métabolique est fortement associé au DT2 puisque les personnes atteintes ont cinq fois plus de risque de devenir diabétiques que les personnes non atteintes (46).

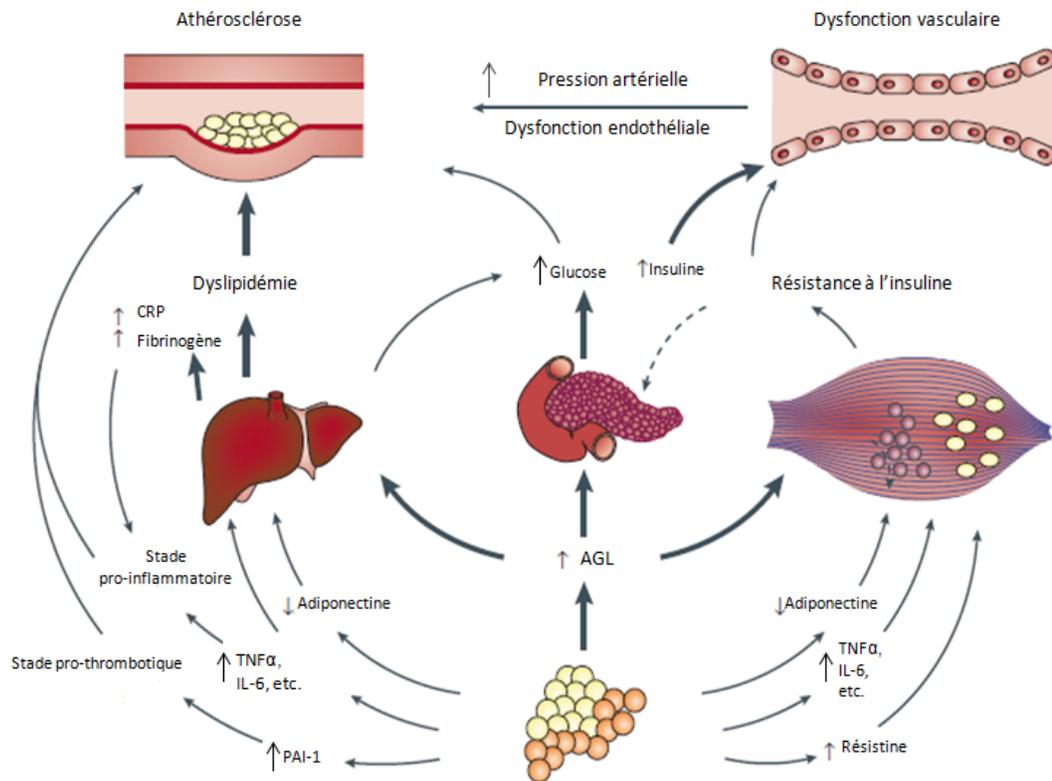


Figure 5. Vision globale du syndrome métabolique. L'inflammation chronique du tissu adipeux chez les obèses crée une augmentation de la concentration plasmatique d'AGL, de même qu'une production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-6 et une modulation de la sécrétion d'adipokines, notamment la résistine et l'adiponectine. Cet état promeut le développement d'une résistance à l'insuline systémique, de même qu'une hyperglycémie et une hyperinsulinémie. Les concentrations élevées d'insuline et d'AGL amènent une dysfonction vasculaire, favorisant l'élévation de la pression sanguine artérielle et le développement de l'athérosclérose, conjointement avec une dyslipidémie provoquée par le foie dysfonctionnel. Un stade pro-thrombotique est également favorisé par la sécrétion de PAI-1 (*Plasminogen-Activator-Inhibitor-1*) par le tissu adipeux. Image adaptée de (47).

1.3.3 Le diabète de type II : un facteur de risque des MCV et de l'accélération du processus d'athérosclérose

Il a été démontré maintes fois que le DT2 est un facteur de risque très important des MCV. Au Canada, le rapport du système national de surveillance du diabète publié en 2009 stipule qu'au cours d'une hospitalisation, les adultes atteints de diabète présentaient trois fois plus souvent une cardiopathie ischémique, incluant les crises cardiaques, ou un AVC que les adultes non-diabétiques (48). Aux États-Unis, dans le *National Diabetes Fact Sheet* publié en 2011, il est évalué que les diabétiques ont une incidence de MCV de 2 à 4 fois plus élevée que les individus non atteints (49). La cause principale de cette augmentation est l'impact qu'a le DT2 sur l'accélération de la pathogénèse de l'athérosclérose. En effet, le DT2 est associé à des altérations vasculaires en favorisant la dysfonction des CE et des CMLV et en augmentant l'activation plaquettaire et la coagulation lors de la formation d'un thrombus suite à une rupture de la plaque d'athérome.

1.3.3.1 Impact sur la dysfonction endothéliale

Tel que décrit dans la section 1.2.2 sur les étapes de formation de la plaque d'athérome, la dysfonction de l'endothélium est l'étape initiatrice cruciale pour mener au développement de l'athérosclérose. Le DT2 ou la résistance à l'insuline vont contribuer à l'établissement de cette dysfonction par différents mécanismes. L'une des altérations vasculaires les plus importantes du DT2 est la diminution de la production et de la biodisponibilité du NO, un puissant vasodilatateur. En effet, l'insuline agit principalement via deux voies de signalisation, soit celle de la PI3K (pour phosphatidylinositol 3 kinase) et celle des MAPK (pour *Mitogen-Activated Protein Kinases*). En temps normal, l'insuline a pour fonction de stimuler la production de NO via l'activation d'eNOS par la voie de la PI3K. Or, les individus diabétiques étant résistants à l'insuline, la fonctionnalité de cette

voie est altérée et avec elle, la production de NO est diminuée. La biodisponibilité du NO restant est elle aussi affectée par l'augmentation du stress oxydatif causée par l'hyperlipidémie et l'hyperglycémie diabétiques. Ainsi, il y a une surproduction d'anions superoxydes (O_2^-) via la chaîne de transport d'électrons mitochondriale et via le découplage d'eNOS qui est observée chez les sujets atteints de DT2. L' O_2^- a la capacité de lier très facilement le NO et de former alors du peroxynitrite ($ONOO^-$), une molécule toxique et sans pouvoir vasodilatateur. La production de PGI_2 , autre puissant vasodilatateur, est également compromise par l'inhibition de l'activité de la prostacycline synthase due à l'hyperglycémie et à la présence d'une forte quantité d' $ONOO^-$ qui augmente la nitration de l'enzyme. Il est à noter également que les hauts taux de glucose sanguin peuvent entraîner la glycosylation non-enzymatique de différentes protéines, altérant de ce fait leur conformation, leur activité enzymatique, leur capacité de dégradation et pouvant aussi interférer avec la reconnaissance de ligands par leur récepteur (50, 51).

Tel que mentionné ci-haut, l'insuline agit via deux voies de signalisation. Alors que la voie de la PI3K est altérée en condition de résistance à l'insuline, la voie des MAPK n'est pas affectée. L'hyperinsulinémie observée sous cette condition pathologique favorisera donc cette voie qui mène à l'augmentation de la production d'endothéline-1, une molécule vasoconstrictrice, et à l'augmentation de l'expression à la surface des CE de molécules d'adhérence telles que VCAM-1 et la sélectine-E. La sécrétion dans le sang de TNF- α et d'IL-6 causée par l'inflammation du tissu adipeux des individus diabétiques active les CE et crée donc également l'augmentation de l'expression des molécules d'adhérence endothéliales (50, 52).

1.3.3.2 Impact sur la dysfonction des CMLV

La dysfonction endothéliale favorisée par le DT2 a bien entendu des répercussions sur les fonctions des CMLV. En effet, la diminution de production de NO et de PGI_2 , de même que l'augmentation de la sécrétion d'endothéline-1 décrites dans la section

précédente ont un impact sur la contractilité du muscle lisse. En permettant l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire, ces phénomènes atténuent ainsi la relaxation des cellules et favorisent leur contraction.

Tel que décrit plus haut, l'insuline agit via deux voies de signalisation : celle de la PI3K et celle des MAPK. En condition normale, c'est la voie de la PI3K qui est favorisée dans les CMLV. Cette voie de signalisation régule le transport du glucose et est associée à un phénotype contractile chez les CMLV. Elle a aussi comme conséquences d'antagoniser les effets du PDGF, donc de diminuer la prolifération, et d'augmenter la synthèse et la sécrétion de métalloprotéinases. En condition de résistance à l'insuline et/ou de DT2, la voie de la PI3K est altérée, alors que la voie des MAPK est sur-stimulée par l'hyperinsulinémie observée dans ces conditions. Cette voie favorise une augmentation de la migration et de la prolifération des CMLV dans l'intima (52). La prolifération des cellules est également induite par le stress oxydatif accru en stade diabétique, puisqu'il incite une dédifférenciation des CMLV du phénotype contractile vers le phénotype prolifératif (51). L'hyperglycémie observée contribue à augmenter le stress oxydatif via la protéine kinase C (PKC) en activant la NADPH oxydase, qui produira à son tour de l'O_2^- (53). Il a également été démontré que les hauts taux de glucose sanguin augmentent l'expression protéique du récepteur du PDGF, stimulant de ce fait la prolifération des CMLV (54).

L'hyperglycémie a d'autres rôles délétères sur les fonctions des CMLV. Effectivement, des études ont observé que de fortes concentrations de glucose pouvaient causer la mort des CMLV par nécrose en stimulant la production de peroxyde d'hydrogène (55). De plus, l'activation de la PKC, mentionnée plus haut, entraîne aussi l'activation de NF- κ B (pour *nuclear factor-kappa B*), promouvant l'expression de gènes pro-inflammatoires dans les CMLV (56).

1.3.3.3 Impact sur la thrombose

Les plaquettes des sujets diabétiques adhèrent à l'endothélium et s'agrègent plus facilement que celles des sujets sains. La principale cause est la diminution de production de NO et de PGI₂ observée dans le DT2. En effet, ces deux molécules ont des propriétés anti-thrombotiques naturelles, car elles inhibent l'activité des plaquettes. De son côté, le tissu adipeux enflammé des obèses atteints de diabète sécrète du PAI-1, affectant ainsi la fibrinolyse. La résistance à l'insuline du foie engendrée par les concentrations d'AGL et de cytokines pro-inflammatoires élevées contribue pour sa part à l'hypercoagulation en altérant la synthèse hépatique de fibrinogène, des facteurs de coagulation VII et VIII et du TF (pour *Tissue Factor*) (57).

Il est à noter que certains des effets du DT2 sur l'accélération du processus d'athérosclérose décrits dans la section 1.3.3 sont également favorisés par une concentration d'AGL plasmatique élevée en condition de résistance à l'insuline et/ou diabétique. Il en sera discuté plus en détails dans la section suivante.

1.4 Les acides gras

1.4.1 Caractéristiques des acides gras

1.4.1.1 Classes et structures

Les acides gras (AG) font partie de la grande catégorie des lipides avec les triglycérides, les sphingolipides, les glycérophospholipides, les stérols, les prényls et les saccharolipides. Les AG sont plus souvent retrouvés comme composants de base des autres classes de lipides énumérées précédemment, puisqu'il est en fait rare de les retrouver à l'état libre. Ils sont donc les constituants essentiels de plusieurs biomolécules et structures, telles que certaines vitamines, certaines hormones, les graisses, les huiles et les membranes plasmiques. Lorsqu'ils ne sont complexés à aucun autre composant, ils sont appelés AG libres (AGL). Les AG sont composés d'un groupement carboxyle (-COOH) à leur tête, ce qui leur donne leur propriété acide, et d'une chaîne aliphatique (voir figure 6). Les AG les plus abondants chez les mammifères sont ceux ayant des chaînes de 16 et 18 carbones, plus particulièrement les acides palmitiques (C16 :0), stéariques (C18 :0), oléiques (C18 :1) et linoléiques (C18 :2). Les AG sont des molécules hydrophobes et plus leur chaîne aliphatique est longue, plus leur solubilité dans l'eau va en diminuant (58).

1.4.1.1.1 Acides gras saturés

Un AG saturé (AGS) est un AG ne possédant pas de double liaison entre deux atomes de carbone dans sa chaîne aliphatique. Il est saturé en molécules d'hydrogène. L'absence de double liaison fait en sorte qu'il a une chaîne rectiligne (figure 6). Les gras comportant une forte proportion d'AGS sont sous forme solide à température pièce et même à la température corporelle, puisque le point de fusion des AGS à plus de 14 carbones est plus grand que 50°C (58). Les AGS sont surtout présents dans les produits laitiers, la viande rouge et certaines huiles végétales telles que l'huile de noix de coco et

l'huile de palme. Ils sont généralement associés à une mauvaise alimentation et à un impact néfaste sur la santé cardiovasculaire (59).

1.4.1.1.2 Acides gras monoinsaturés

Les AG insaturés en molécules d'hydrogène comportent une ou plusieurs doubles liaisons dans leur chaîne aliphatique. Lorsqu'ils ne possèdent qu'un double lien, ce sont des AG monoinsaturés (AGMI). La présence de ce double lien est habituellement de conformation *cis*, ce qui confère une forme incurvée à la chaîne (voir figure 6). Cela a pour conséquence de diminuer les interactions de van der Waals et donc de diminuer le point de fusion de ces AG. Cette propriété est importante concernant la fluidité des membranes plasmiques (voir section 1.4.3.2). Il est à noter que plus le nombre de liaisons insaturées augmente, plus le point de fusion des AGMI diminue. Les AGMI qui se trouvent dans l'alimentation sont sous forme liquide à température pièce, puisque leur point de fusion se situe au-dessous de 13,4°C (58). Ils sont présents principalement dans des huiles végétales telles que les huiles de canola, d'arachide, de carthame et d'olive. Les huiles d'olive et de carthame sont celles contenant les plus hauts pourcentages en AGMI, avec 75 et 77% des AG totaux respectivement. Les AGMI sont généralement associés à une alimentation saine et à un effet cardioprotecteur (60).

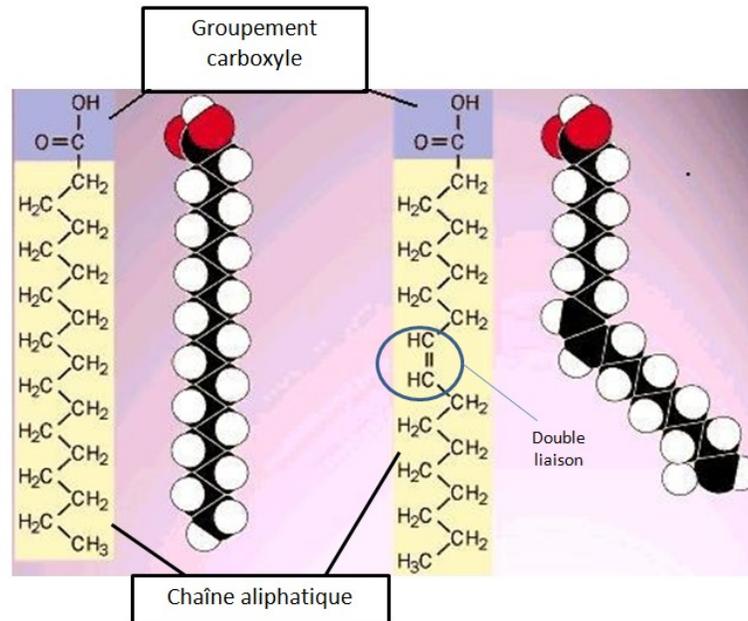


Figure 6. La structure chimique des acides gras. Les AG sont composés d'un groupement carboxyle et d'une chaîne aliphatique de longueur variable. Lorsque cette chaîne est saturée en atomes d'hydrogène, les AG ont une forme rectiligne. Lorsque la chaîne est insaturée, il y a présence d'une ou plusieurs doubles liaisons, entraînant une forme incurvée. Image adaptée de (61).

1.4.1.1.3 Acides gras polyinsaturés

Les AG insaturés ayant plus d'une double liaison sont appelés AG polyinsaturés (AGPI). Ils ont une forme encore plus courbée que les AGMI, pouvant même être totalement repliés sur eux-mêmes, comme c'est le cas de l'acide arachidonique qui a quatre doubles liens. Ce dernier a une fonction métabolique très importante puisqu'il est le précurseur des écosanoïdes, tel qu'il en sera discuté dans la section 1.4.3.3. Les AGPI sont retrouvés principalement dans certaines huiles végétales comme les huiles de graines de lin, de tournesol et de soja sous forme d'acides linoléique (C18 :2) et α -linoléiques (C18 :3) et dans les poissons et fruits de mer sous forme d'EPA (pour acide icosapentaénoïque, C20 :5) et de DHA (pour acide docosahexaénoïque, C22 :6) (60).

1.4.1.1.4 Les acides gras essentiels : oméga-3 et oméga-6

Les AG oméga-3 et oméga-6 sont des sous-groupes de la classe des AGPI. Ils sont nommés ainsi pour faire référence au numéro de l'atome de carbone où se trouve la première double liaison à partir de l'extrémité oméga (ω) de l'AG, c'est-à-dire l'extrémité ne comportant pas le groupement carboxyle. Ce sont des AG dits essentiels puisqu'ils ne peuvent être synthétisés par les mammifères. Ils doivent donc être obligatoirement présents dans la diète (62).

Cette catégorie renferme les acides linoléiques et arachidoniques, qui sont les omégas-6, et les acides α -linoléiques, EPA et DHA, qui sont les omégas-3. Les acides linoléiques peuvent cependant être convertis en acides arachidoniques et les acides α -linoléiques peuvent être convertis en EPA et DHA chez les mammifères. Donc, à strictement parler, seuls les acides linoléiques et α -linoléiques sont vraiment essentiels. Parmi les huiles végétales, l'huile de tournesol est la plus grande source d'acide linoléique ω -6 (71% des AG totaux) et l'huile de graines de lin est la plus grande source d'acide α -linoléique ω -3 (57% des AG totaux). L'acide arachidonique est retrouvé uniquement dans les aliments d'origine animale, tandis que l'EPA et le DHA sont très présents dans le saumon et les huîtres (62).

Les AG oméga-3 sont connus pour avoir un impact bénéfique sur la santé cardiovasculaire, entre autres en diminuant les taux de triglycérides et de VLDL sanguins, tandis que les AG oméga-6 sont connus pour avoir un rôle pro-inflammatoire puisqu'ils sont les précurseurs des prostaglandines et des leucotriènes. L'EPA et le DHA sont quant à eux très concentrés dans le cerveau et sont essentiels à son développement et à son bon fonctionnement. Il est reconnu que ces AG diminuent le développement de la maladie d'Alzheimer et atténuent les symptômes de troubles bipolaires. Ainsi, il est important de retrouver un ratio ω -3/ ω -6 élevé dans l'alimentation (62).

1.4.1.1.5 Acides gras trans

Mis à part de faibles quantités dans le lait de vache, il y a peu d'AG insaturés avec une conformation *trans* présents dans la nature. En effet, la plupart des AG *trans* proviennent de la transformation industrielle des aliments, c'est-à-dire d'un processus appelé hydrogénation des gras. Ce procédé est utilisé entre autre pour rendre la margarine solide, qui autrement serait liquide en raison de sa forte proportion en AG insaturés. L'hydrogénation cause la saturation des AG insaturés, mais certains AG vont avoir leur conformation *cis* changée pour une conformation *trans* au lieu de devenir saturés. Ce changement fait en sorte que les AG *trans* ont une forme rectiligne tout à fait semblable à celle des AGS. Leur impact sur la santé cardiovasculaire est d'ailleurs tout aussi négatif que ceux-ci, puisque les AG *trans* augmentent les taux sanguins de LDL et diminuent ceux de HDL (63).

1.4.1.2 Les acides gras dans les diètes alimentaires

Les AG sont une composante essentielle de notre alimentation. Ils y sont principalement retrouvés sous forme de triglycérides, c'est-à-dire des lipides neutres constitués de trois chaînes d'AG reliées à un groupement glycérol (58). Il existe une très grande variété de diètes alimentaires à travers le monde, différentes selon les groupes ethniques ou les régions. Chacune possède des proportions distinctes des différentes classes d'AG. Le but de ce mémoire n'étant pas de discuter de nutrition, seulement deux diètes seront décrites brièvement, soit celles les plus fréquemment mentionnées dans la société nord-américaine.

1.4.1.2.1 La diète occidentale

La diète occidentale, également appelée diète américaine standard, est le mode d'alimentation le plus populaire dans les pays industrialisés, particulièrement en Amérique du Nord, d'où elle tire son origine. C'est une diète caractérisée par des apports élevés en sel, en lipides et en sucres raffinés, une forte consommation de viandes rouges et une faible

teneur en fibres, fruits et légumes. Les aliments qui sont consommés dans cette diète ont une plus forte proportion en AGS qu'en AGMI, de même que des quantités élevées d'AG *trans* et de cholestérol. Il y a également très peu d'AGPI oméga-3, car le poisson et les fruits de mer de même que les grains entiers tels que les graines de lin y sont quasiment exclus. Habituellement, les personnes ayant ce profil alimentaire sont moins actives et ont un pourcentage de tabagisme plus élevé. Ce type de diète est associé à un risque accru de développer de l'obésité et des MCV (64-66).

Dans le but de diminuer ces effets néfastes, le Canada encourage sa population à adopter des habitudes alimentaires plus saines et a pour se faire développé le Guide alimentaire canadien. Ce dernier préconise de consommer une grande quantité de fruits et légumes, de manger la moitié des consommations quotidiennes de produits céréaliers sous forme de grains entiers, de choisir des produits laitiers faibles en lipides, de choisir des viandes maigres et de manger au moins deux portions de poisson par semaine. Il suggère également d'éviter de consommer des produits riches en calories, en sucres, en sel ou en lipides, surtout les AG *trans*. Il propose aussi de consommer une petite quantité d'AGMI quotidiennement, retrouvés dans les huiles de cuisson, la margarine, la mayonnaise et les vinaigrettes (67).

1.4.1.2.2 La diète méditerranéenne

Tout comme son nom l'indique, la diète méditerranéenne est originaire des pourtours de la mer Méditerranée. Elle s'inspire plus particulièrement des traditions culinaires retrouvées en Grèce et dans le sud de l'Italie dans les années 1960. Elle tire sa popularité suite à une étude initiée dans les années 1950 et publiée en 1986 par Ancel Keys et al, appelée *Seven Countries Study*, dans laquelle il a été démontré que la population de Crète avait une longue espérance de vie et une faible incidence de maladie coronarienne malgré une diète riche en gras (68). Cette diète est riche en AGMI et en AGPI oméga-3 (69). Ses principales caractéristiques sont une nourriture d'origine végétale abondante (fruits, légumes, légumineuses, céréales de grains entiers, noix), un apport modéré à élevé en poissons, un apport faible à modéré en volaille, une faible consommation de viande

rouge, une consommation de vin modérée et l'huile d'olive comme source principale de lipides (voir figure 7) (68, 69).

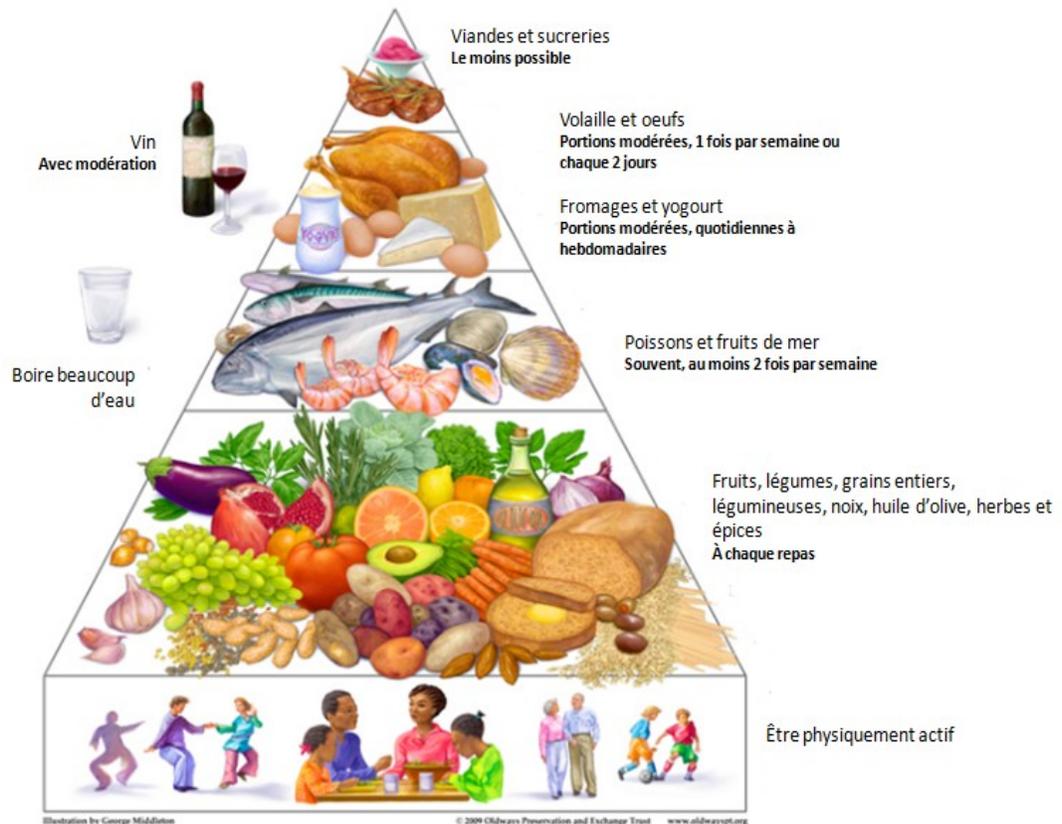


Figure 7. La pyramide de la diète méditerranéenne. Ce type de diète favorise une abondance de fruits et légumes, des produits céréaliers à base de grains entiers, du poisson et des fruits de mer au moins deux fois par semaine, des portions modérées de volaille et de produits laitiers, de même qu'une très faible quantité de viande rouge et de sucreries. Il y est également suggéré de consommer du vin avec modération, soit de un à deux verres par jour pour les hommes et un verre par jour pour les femmes. Image reproduite et adaptée avec la permission de (70), © 2009 Oldways Preservation & Exchange Trust, www.oldwayspt.org.

Il a été prouvé dans plus d'une étude que la diète de type méditerranéenne a un effet bénéfique sur la santé cardiovasculaire des individus qui la suivent. En effet, une étude d'une grande renommée publiée en 1999, la *Lyon Diet Heart Study*, a évalué que des patients ayant déjà subi un infarctus du myocarde et ayant été mis sur une diète méditerranéenne étaient moins susceptibles d'avoir un deuxième infarctus et d'en mourir que ceux ayant été mis sur une diète prudente post-infarctus (71). Par ailleurs, dans une étude italienne sur 180 patients atteints du syndrome métabolique et suivis pendant deux ans, il a été démontré que le groupe suivant la diète méditerranéenne avait des taux sanguins de CRP (pour protéine C réactive), IL-6, IL-7 et IL-18 réduits comparativement au groupe suivant une diète contrôle. Leur résistance à l'insuline était également diminuée et leur fonction endothéliale améliorée (72). La teneur élevée en AGMI et en AGPI oméga-3 pourrait avoir un rôle à jouer dans ces effets positifs observés.

1.4.2 Métabolisme des acides gras

1.4.2.1 La digestion, l'absorption et le transport des acides gras

Tel que mentionné précédemment, les AG provenant de l'alimentation sont principalement sous forme de triglycérides (TG). La digestion des TG est initiée dans l'estomac par la lipase gastrique, bien que cela ne compte pour seulement 10 à 30 % de la digestion totale. La majorité de la digestion a lieu dans l'intestin grêle grâce à la lipase pancréatique. Cette enzyme est cependant hydrophile alors que les TG sont de nature hydrophobe, rendant ainsi le processus difficile. La digestion a donc lieu aux interfaces lipides/eau. Les acides biliaires produits par le foie et déversés dans l'intestin grêle via la vésicule biliaire ont pour rôle d'émulsifier les lipides, augmentant ainsi, en combinaison avec les mouvements péristaltiques intestinaux, la proportion d'interfaces lipides/eau. La lipase pancréatique est active seulement à la jonction de ces interfaces et peut alors cliver les TG en 2 chaînes d'AG et en monoglycéride. La phospholipase pancréatique A2 se

charge quant à elle de la digestion des phospholipides. Une fois que les lipides sont clivés, ils ont tendance à former des micelles qui seront absorbées par les entérocytes, c'est-à-dire par les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale. Les acides biliaires contribuent aussi au processus d'absorption en servant de « navettes » aux micelles de la lumière de l'intestin vers la surface des entérocytes. La pénétration des AG et autres types de lipides dans le cytoplasme des cellules est facilitée par des transporteurs tels que le CD36, la IFABP (pour *Intestinal Fatty Acid Binding Protein*) et plus particulièrement, par la FATP-4 (pour *Fatty Acid Transport Protein 4*).

Une fois à l'intérieur des entérocytes, les AG sont reconvertis en TG à l'aide de différentes enzymes de type acyltransférase. Ces TG sont par la suite intégrés dans des chylomicrons et libérés dans la lymphe intestinale, c'est-à-dire la chyle. Les chylomicrons sont une classe de lipoprotéines très denses qui se forment au niveau de la muqueuse intestinale. Une fois dans le système lymphatique, les chylomicrons gorgés de TG sont déversés dans la circulation sanguine vers le tissu adipeux, où les TG sont emmagasinés, ou vers le muscle squelettique si les besoins énergétiques le nécessitent. Ce qui reste, sous forme de chylomicrons *remnants*, est acheminé vers le foie où a lieu la synthèse d'AG endogènes (73-75). La figure 8 illustre bien le transport des AG à travers l'organisme.

1.4.2.2 L'emmagasinage des acides gras dans le tissu adipeux

La principale fonction du tissu adipeux étant d'emmagasiner les AG pour former une réserve en source d'énergie, la plupart des chylomicrons transportant les TG vont y être acheminés. Dans les capillaires du tissu adipeux, les TG sont hydrolysés en AGL par la lipoprotéine lipase (LPL) synthétisée par les CE. La LPL est activée en présence des ApoC-II (pour apolipoprotéines C-II) situées à la surface des chylomicrons (76). Les AGL sont par la suite intégrés dans les adipocytes via les transporteurs d'AG tels que le CD36. Avant d'être convertis en TG, les AGL sont d'abord transformés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthase, puis par la suite en diglycérides et finalement en TG par des acyltransférases (75).

Ce processus est appelé lipogenèse. Enfin, les TG sont entreposés dans l'unique vésicule lipidique des adipocytes, occupant la presque totalité de l'espace cytoplasmique, dans l'attente d'être utilisés.

1.4.2.3 La relâche d'acides gras du tissu adipeux vers d'autres organes

L'équilibre entre le dépôt et la relâche d'AG dans le tissu adipeux est un processus très bien régulé de façon hormonale et en fonction de l'état nutritionnel (77). La conversion des TG en AGL et leur relâche dans la circulation sanguine, appelée lipolyse, s'effectue lorsque les demandes énergétiques du corps augmentent et/ou qu'il y a une carence en substrat principal, soit le glucose. L'hydrolyse des TG en AGL est produite par les lipases hormono-dépendantes des adipocytes. L'insuline a un impact négatif sur la lipolyse, car elle inhibe ces types de lipases (75). Parallèlement, l'état de jeûne diminue la quantité de glucose disponible pour les besoins énergétiques. Cette diminution entraîne une réduction de la sécrétion d'insuline par le pancréas et donc la levée de l'inhibition des lipases hormono-dépendantes. Les AGL sont transportés dans le sang par l'albumine vers les tissus en besoin d'énergie (73), principalement les muscles squelettiques et le muscle cardiaque, où ils seront oxydés pour produire de l'adénosine triphosphate (ATP).

1.4.2.4 La synthèse des acides gras de novo

En plus de provenir de l'alimentation, les AG peuvent également être synthétisés *de novo* et être convertis en TG par les hépatocytes dans le foie. Les AG sont synthétisés à partir du glucose et plus précisément d'un produit dérivé de la glycolyse, c'est-à-dire l'acétyl-CoA. Pour ce faire, dans la glycolyse, cette molécule découlant du pyruvate est transformée en citrate dans la mitochondrie par le cycle de Krebs. Le citrate est alors retransformé en acétyl-CoA lorsqu'il sort des mitochondries vers le cytoplasme, où a lieu la synthèse d'AG. De l'acétyl-CoA découle le malonyl-CoA. À partir de ces deux molécules, les AG seront synthétisés en sept étapes enzymatiques grâce au complexe de l'acide gras

synthétase. L'acide palmitique est l'AG principalement produit par ce complexe enzymatique. Les AG plus longs ou insaturés sont produits à partir de l'acide palmitique par des enzymes de types élongase et désaturase. Ces AG peuvent par la suite être convertis en TG (78). Ces derniers sont transportés dans le sang par les VLDL vers les tissus périphériques, principalement vers le tissu adipeux pour servir de réserve énergétique et vers le muscle squelettique pour la production d'ATP (voir figure 8). Tout comme les chylomicrons, les TG des VLDL sont hydrolysés en AGL par la LPL à la surface des CE dans les capillaires. Les VLDL restants, maintenant pauvres en TG, sont appelés IDL (pour *Intermediate Density Lipoprotein*). De 40 à 60 % des IDL retournent vers le foie pour y être dégradés et le reste est transformé en LDL via la lipase hépatique. Les LDL sont riches en cholestérol et distribuent ce dernier vers les différents tissus (79).

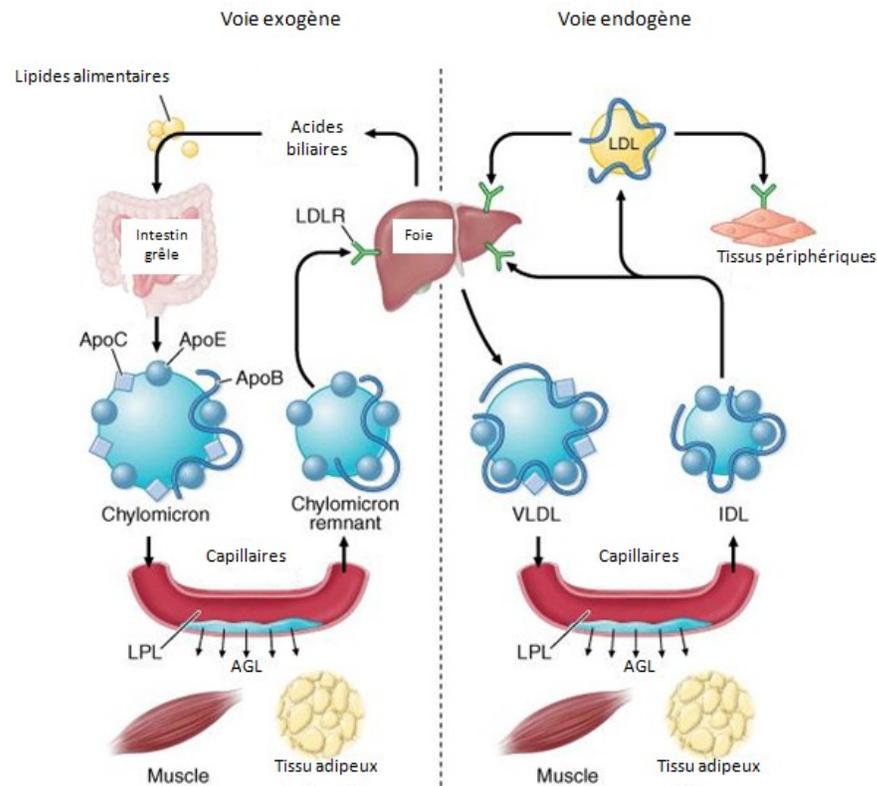


Figure 8. Le transport des AGL des voies exogène et endogène. Les AGL provenant de la voie exogène, c'est-à-dire des lipides alimentaires, sont transportés sous forme de TG vers le muscle squelettique et le tissu adipeux par des chylomicrons, puis ce qui reste, les chylomicrons *remnants*, vont vers le foie. Les AGL provenant de la voie endogène sont synthétisés dans le foie et sont transportés dans le sang vers le muscle et le tissu adipeux sous forme de TG par des VLDL. Ce qui reste, les IDL, retournent vers le foie pour la dégradation ou sont transformées en LDL. Ces LDL transportent le cholestérol vers les tissus périphériques. Image adaptée de (79).

1.4.2.5 Les transporteurs cellulaires des acides gras

Les AG sont des molécules impliquées dans différentes fonctions cellulaires mais peuvent, à trop forte concentration, s'avérer toxique. Il est donc essentiel que le mécanisme d'entrée des AG de la circulation sanguine vers les cellules soit très bien contrôlé. Les AG étant hydrophobes, la membrane plasmique des cellules n'est pas un obstacle pour eux et ils peuvent diffuser passivement à travers elle. Le transport des AG du milieu extracellulaire vers le cytoplasme s'effectue globalement en sept étapes. Tout d'abord, ils doivent se dissocier de l'albumine qui les transportait dans le sang. Ensuite ils diffusent vers la membrane plasmique et s'insèrent dans la couche externe de phospholipides. Il se produit alors un *flip-flop* vers la couche interne de phospholipides, c'est-à-dire que le groupement carboxyle polaire des AG s'oriente vers le cytoplasme. Puis les AG se dissocient de la membrane plasmique et diffusent dans le cytoplasme, où ils se lient à FABPc (pour *cytoplasmic Fatty Acid Binding Protein*). Ils peuvent par la suite être utilisés ou emmagasinés, selon les besoins. Cette diffusion passive n'est cependant pas très rapide. Le rôle des transporteurs est donc de faciliter la diffusion des AG vers l'intérieur des cellules, en plus de le réguler. En effet, l'expression des transporteurs et leur translocation vers la membrane plasmique sont elles-mêmes contrôlées de façon hormonale et selon les différentes demandes métaboliques, que ce soit en situations physiologiques ou pathologiques. L'insuline est l'hormone principale responsable d'augmenter la translocation des transporteurs, principalement le CD36, vers la membrane plasmique. Un état de jeûne amène également cette augmentation (80).

1.4.2.5.1 FAT/CD36

Le CD36, également appelé FAT (pour *Fatty Acid Translocase*), est une protéine multifonctionnelle appartenant à la famille des récepteurs éboueurs de classe B. Il est colocalisé avec la cavéoline-1 dans les cavéoles et est exprimé par une grande variété de types cellulaires, notamment les CE de la microvasculature, les CMLV, les adipocytes, les cellules des muscles cardiaque et squelettique, les plaquettes et les monocytes/macrophages. En plus d'exercer la fonction de transporteur des AG vers le

cytoplasme, cette protéine a de multiples autres rôles. La clairance des cellules apoptotiques durant le développement ou dans l'homéostasie de certains systèmes ou suite à une infection se trouve parmi ces autres fonctions. S'y retrouve également un rôle dans l'immunité innée puisque le CD36 est un corécepteur du TLR-2 (pour *Toll-Like Receptor 2*). Le CD36 a également une fonction pro-athérogénique connue. En effet, cette protéine permet aux macrophages situés dans l'intima des artères d'endocyter les molécules de LDLox, favorisant ainsi la formation de cellules spumeuses. La fonction de transporteur d'AG du CD36 est impliquée dans la pathophysiologie de la résistance à l'insuline. Effectivement, en condition d'hyperinsulinémie, il y a une surexpression du CD36 à la surface des cellules, augmentant ainsi les concentrations intracellulaires d'AG et contribuant de ce fait à la lipotoxicité observée dans cette pathologie (80-83).

1.4.2.5.2 FATP1 à FATP6

Les FATP1 à 6 (pour *Fatty Acid Transport Protein*) sont des transporteurs d'AG transmembranaires. Chacun des membres de ce groupe de protéines correspond à une isoforme. L'expression des FATP dans les tissus est différente pour chaque isoforme. À titre d'exemples, FATP1 est exprimée dans le tissu adipeux, le cœur, le muscle, le cerveau, les reins, la peau et les poumons, tandis que FATP4 est en plus exprimée dans l'intestin, mais pas dans le tissu adipeux. FATP5 pour sa part semble présente seulement dans le foie (80). Une étude a par ailleurs démontré que les différentes isoformes de la FATP ont une efficacité de transport spécifique en fonction du type d'AG. Ainsi, l'acide palmitique est transporté plus efficacement par la FATP6, tandis que l'acide oléique est transporté plus efficacement par la FATP4 (84).

1.4.2.5.3 FABPpm

La FABPpm (pour *plasma membrane Fatty Acid Binding Protein*) est un transporteur localisé, comme son nom l'indique, à la surface de la membrane plasmique, du côté extracellulaire. Il a été démontré que la FABPpm est exprimée par plusieurs tissus dont le foie, le cœur, le muscle squelettique, le tissu adipeux et l'intestin grêle (80). De plus, il

semblerait que la FABPpm participe au transport des AG en coopération avec le CD36 (85).

1.4.3 Fonctions des acides gras dans la cellule

1.4.3.1 Réserve et source d'énergie

La principale fonction des AG est d'être un substrat énergétique pouvant être emmagasiné dans le tissu adipeux pour constituer une réserve. La plupart du temps, cette réserve ne sera utilisée que lorsque la demande métabolique est intense, comme par exemple lors d'un exercice physique ou en période de jeûne, soit lorsque l'organisme aura utilisé tout le glucose disponible comme source d'énergie primaire. Il existe cependant des tissus utilisant les AG comme source principale d'énergie, comme c'est le cas pour le muscle cardiaque.

Les AG pénétrant dans le cytoplasme d'une cellule sont dirigés vers la mitochondrie, où aura lieu leur oxydation, appelée β -oxydation, afin de produire de l'ATP. Avant de pénétrer à l'intérieur des mitochondries, les AG doivent être transformés en acyl-CoA dans l'espace intermembranaire. L'acyl-CoA représente la forme activée des AG. L'acyl de cette molécule réagit par la suite avec la carnitine et peut traverser la membrane interne mitochondriale via un transporteur d'acylcarnitine. Une fois à l'intérieur de la mitochondrie, un autre groupement CoA est ajouté à l'acyl. Il s'ensuit alors quatre réactions enzymatiques amenant à la transformation de chaque atome de carbone de l'acyl-CoA en acétyl-CoA. Cette molécule peut à son tour entrer dans le cycle de Krebs. Les électrons libérés pendant l'oxydation de l'acyl-CoA en acétyl-CoA et puis durant l'oxydation de l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs sont dirigés vers la chaîne respiratoire pour produire de l'ATP. L'oxydation d'AG insaturés fait intervenir des enzymes de type isomérase, afin de convertir les doubles liaisons *cis* en doubles liaisons *trans*, qui sont des substrats reconnus

par les enzymes de la β -oxydation. À quantités égales, l'oxydation des AG peut fournir jusqu'à 6 fois plus d'ATP que l'oxydation du glucose (86, 87).

1.4.3.2 Rôle structural

Les AG jouent également un rôle de structure pour les cellules. Ils sont les composants de base de différents lipides formant les membranes plasmiques et les membranes des organelles à l'intérieur des cellules tels que les mitochondries, le noyau, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Les membranes sont composées d'une bicouche lipidique. Chaque feuillet a un corps hydrophobe orienté vers le centre de la bicouche et des groupements polaires orientés vers le milieu aqueux, que ce soit extra ou intracellulaire. Les membranes contiennent trois différents types de lipides, dont deux constitués d'AG comme corps hydrophobe. Les glycérophospholipides sont le type le plus abondant. Ils se composent de deux chaînes d'AG, pouvant varier en longueur et en degré d'insaturation, liés à un glycérol phosphate et à un groupement polaire. Les deuxième et troisième types de lipides formant les membranes des cellules sont les sphingolipides et le cholestérol. Ce dernier n'implique pas d'AG dans sa structure (88).

Les bicouches lipidiques des membranes cellulaires sont des éléments fluides. Leur degré de fluidité varie en fonction des classes d'AG qui composent leur corps hydrophobe. Les AG insaturés augmentent la fluidité, car leurs courbures diminuent la stabilité des interactions avec les autres AG de la bicouche. Les AGS étant rectilignes, ils ont des interactions plus stables avec les autres AG, rendant ainsi les membranes plus rigides. Le cholestérol pour sa part tend à diminuer la fluidité des membranes (88).

1.4.3.3 Signalisation cellulaire

Les lipides servent de précurseurs pour différents messagers intra ou extracellulaires. Parmi les AG, l'acide arachidonique, un AGPI oméga-6, est bien connu

dans le domaine de la biologie vasculaire. En effet, il est le précurseur des écosanoïdes, petites molécules ayant une très courte demi-vie qui exercent leurs effets de façon locale uniquement. Il existe deux principales catégories d'écosanoïdes : les prostanoïdes et les leucotriènes. Bien que toutes les cellules puissent produire des écosanoïdes, les voies de synthèse empruntées dépendent de la nature du tissu.

Les cyclooxygénases 1 et 2 initient la synthèse des prostanoïdes, qui regroupent les prostaglandines, la thromboxane et la prostacycline. Ces deux dernières molécules ont des rôles opposés très importants dans la fonction vasculaire, c'est-à-dire la vasoconstriction et l'activation plaquettaire pour la thromboxane et la vasodilatation et l'inhibition de l'adhésion plaquettaire pour la prostacycline. La voie de la lipoxygénase-5 synthétise quant à elle les différents leucotriènes, principalement dans les cellules du système immunitaire. Ces molécules sont impliquées dans les mécanismes inflammatoires de plusieurs maladies telles que l'arthrite, l'asthme, l'obésité et les allergies (89, 90).

1.4.4 L'impact des acides gras sur les cellules vasculaires : un lien avec l'athérosclérose

L'athérosclérose, très souvent associée à des concentrations plasmatiques d'AGL élevées, est souvent reliée à la présence d'obésité, de résistance à l'insuline et/ou de DT2 chez un individu. Ces concentrations élevées amènent une quantité d'AG plus grande que la normale à l'intérieur des cellules vasculaires. Étant donné que ce type de cellules n'a pas une capacité élevée à entreposer les AGL sous forme neutre de TG, une lipotoxicité est rapidement observée, causant une modification des fonctions cellulaires. Cependant, l'impact sur les cellules vasculaires varie en fonction des classes d'AG. Les AGS et les AGPI oméga-6, très abondants dans la diète occidentale, sont plutôt associés à un impact négatif, tandis que les AGMI et les AGPI oméga-3 sont plutôt associés à un effet protecteur.

1.4.4.1 Impact sur les cellules endothéliales

Étant directement en contact avec la lumière des vaisseaux sanguins, les CE sont fortement influencées par la concentration d'AGL plasmatique. De plus, les AGL doivent nécessairement passer par les CE avant de pouvoir atteindre les tissus. Comme il a déjà été mentionné, l'une des altérations les plus importantes en cas de résistance à l'insuline et/ou de DT2 dans les CE est la diminution de la production de NO via la diminution de l'activation d'eNOS. Or, il a été démontré que les forts taux d'AGL circulants observés dans ces conditions ont un rôle à jouer dans cette altération. En effet, l'acide palmitique, un AGS, a un effet inhibiteur sur la voie de signalisation PI3K de l'insuline, entraînant une diminution de la phosphorylation d'eNOS et ainsi une baisse de son activation (91). Ceci cause une diminution de la relâche de NO et contribue à activer les CE, une des étapes primordiales dans l'initiation de l'athérosclérose. Un endothélium activé est associé à l'expression accrue de molécules d'adhérence et de cytokines pro-inflammatoires. Plusieurs études ont prouvé que les AGL modulent l'état d'activation des CE. Les AGS, tels que l'acide stéarique, de même que les AGPI oméga-6, tels que l'acide linoléique, augmentent l'inflammation en stimulant l'expression d'ICAM-1, l'activation de NF- κ B et la production d'IL-6 et d'IL-8 (92-94). Au contraire, l'acide oléique, un AGMI, diminue l'inflammation en réduisant l'expression de VCAM-1, ICAM-1 et de la sélectine-E, de même que l'activation de NF- κ B (95). Il peut même contrecarrer les effets pro-inflammatoires de l'acide stéarique (94). Les AGPI oméga-3 ont eux aussi un effet protecteur contre l'activation des CE, puisqu'ils inhibent également l'expression de molécules pro-inflammatoires telles que VCAM-1, ICAM-1, la sélectine-E, IL-6, IL-8 et NF- κ B (96).

L'apoptose des CE fait aussi partie de la pathogénèse de l'athérosclérose à un stade avancé et contribue au dysfonctionnement de l'endothélium. Il est connu que l'acide oléique a un effet inhibiteur sur l'induction de l'apoptose des CE, tandis que l'acide stéarique la promeut. À fortes concentrations, il a également été démontré que les AGPI, plus précisément les acides linoléiques, linoléiques et arachidoniques pouvaient aussi induire l'apoptose (94, 97).

1.4.4.2 Impact sur les cellules musculaires lisses vasculaires

La fonctionnalité des CMLV est également affectée par l'afflux anormalement élevé d'AGL chez les individus souffrants de résistance à l'insuline et/ou de DT2 conjointement avec l'athérosclérose. Il sera discuté ci-dessous des effets des AGL plus particulièrement sur la prolifération, la migration et l'apoptose des CMLV, qui sont des fonctions d'importance primordiale quand au développement et à la stabilité des plaques d'athérome. En effet, la prolifération et la migration des CMLV contribuent en début de pathologie, tel que mentionné à la section 1.2.2, à la formation d'une plaque stable avec un cap fibreux épais, tandis que l'apoptose des CMLV entraîne une diminution de l'épaisseur du cap fibreux et de ce fait, l'instabilité de la plaque.

1.4.4.2.1 Effets sur la prolifération et la migration des CMLV

L'acide oléique est un AGMI très connu pour ses actions pro-proliférative et pro-migratrice sur les CMLV (98-100). Différentes voies ont été proposées comme mécanisme d'action, notamment la voie de ERK1/2 (pour *Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2*, de la voie des MAPK) (100), la voie de PI3K (99), ou l'augmentation de l'effet mitogénique du PDGF-BB (98). L'acide oléique ne semble donc pas avoir un rôle protecteur dans les phases précoces de l'athérosclérose puisqu'il contribue à la formation d'un cap fibreux. Cependant, ses propriétés mitogéniques pourraient être bénéfiques dans les phases tardives de la pathologie, en favorisant la prolifération plutôt que l'apoptose des CMLV, empêchant de ce fait la déstabilisation de la plaque. D'autre part, il a été démontré qu'une faible concentration (5-10 μ M) d'acide arachidonique (AGPI oméga-6) peut induire la migration des CMLV en activant la voie des MAPK (101). L'EPA et le DHA (AGPI oméga-3) inhibent quant à eux cette migration (102, 103). Un rôle préventif dans le développement de la plaque peut ainsi être attribué aux AGPI oméga-3.

1.4.4.2.2 Effets sur l'apoptose des CMLV

L'acide palmitique est connu pour ses effets pro-apoptotiques sur les CMLV (104, 105). Divers mécanismes d'induction de l'apoptose par les AGS ont été étudiés. En effet, l'accumulation de céramides, des métabolites toxiques des AGS, a été proposée. L'apoptose pourrait aussi être due à la diminution de la synthèse des cardiolipines, des lipides présents dans la membrane interne des mitochondries responsables d'empêcher la relâche du cytochrome c dans le cytoplasme et donc l'activation de la cascade de caspases qui s'ensuit. L'acide oléique pour sa part inhibe l'induction de l'apoptose causée par l'acide palmitique (105), potentiellement en favorisant l'entreposage des AGS sous forme de vésicules de TG ou en rétablissant la synthèse de cardiolipines. L'acide arachidonique, mais uniquement à fortes concentrations (50 μ M), cause l'apoptose des cellules possiblement suite à son oxydation (106).

Les études des effets des AGL sur l'apoptose des CMLV ne sont pas si nombreuses, mais plusieurs autres études réalisées sur différents types cellulaires corroborent les observations faites sur les CMLV. C'est le cas notamment pour les cardiomyocytes (107, 108), les cellules- β pancréatiques (109, 110), les hépatocytes (111), les cellules du muscle squelettique (112) et également pour les CE (94, 97).

1.5 La problématique et le but du projet de recherche

Grâce aux fruits de plusieurs recherches, il est maintenant bien connu que les personnes atteintes de DT2 ont des taux plasmatiques d'insuline et d'AGL plus élevés que la normale. Ces caractéristiques se retrouvent également souvent chez les individus atteints d'athérosclérose, puisque ces deux pathologies sont étroitement liées. En effet, le DT2 est associé à une accélération du processus d'atteinte vasculaire lors de la formation de la plaque d'athérome. Parmi les cellules vasculaires, qui sont résistantes à l'insuline sous ces conditions, une partie de ce phénomène est due à l'altération des voies de signalisation de l'insuline. Cependant, une forte proportion des altérations vasculaires est due aux quantités élevées d'AGL qui se retrouvent à l'intérieur des cellules, causant une lipotoxicité. Plusieurs études ont démontré que les AGL, selon leur classe, modifient certaines fonctions des CMLV, notamment celles reliées à la viabilité des cellules, c'est-à-dire la prolifération et l'apoptose. Ces deux fonctions ont un impact crucial tout au long du développement et de la progression de l'athérosclérose. Les AGS et les AGPI oméga-6, abondants dans la diète occidentale, induisent l'apoptose des CMLV, favorisant ainsi l'instabilité de la plaque d'athérome et augmentant les risques de rupture. Les AGMI, retrouvés en forte proportion dans la diète méditerranéenne, renversent les effets pro-apoptotiques des AGS.

Bien qu'il existe un très grand nombre de travaux évaluant l'impact des AGL sur les fonctions vasculaires selon leur nature, la plupart d'entre eux n'évalue les effets que d'un ou deux AGL à la fois. Or, les AGL provenant de l'alimentation sont présents en plus grandes variétés et sous diverses proportions selon les types de diète. L'impact des AGL lorsque combinés en groupes complexes ayant différents ratios n'est cependant pas très bien connu et des études s'avèrent nécessaires pour éclaircir le sujet.

Lors de travaux réalisés précédemment dans notre laboratoire, nous avons étudié les effets de surnageants d'adipocytes riches en AGL sur la fonctionnalité des CMLV. Ces surnageants provenaient de souris mâles nourries avec l'une ou l'autre de deux diètes, soit celle riche en gras d'origine animale (DA) ou l'autre riche en gras d'origine végétale (DV).

La DA contenait une plus forte proportion en AGS que la DV, tandis que cette dernière renfermait une plus forte proportion en AGMI que la DA pour une même quantité en lipides (voir le tableau I ci-dessous). Les résultats de ces recherches ont démontré que les CMLV stimulées avec les surnageants d'adipocytes provenant de souris nourries avec la DA avaient un taux plus élevé d'apoptose que celles stimulées avec des surnageants provenant de souris nourries avec la DV. De plus, cet écart entre les deux conditions était beaucoup plus élevé lorsque les CMLV étaient mises en présence de surnageants provenant d'adipocytes ayant eux-mêmes été stimulés avec une forte dose d'insuline. Ces résultats nous ont donc permis de prouver que les altérations induites sur les CMLV sont influencées par la composition des AGL présents dans la diète et par un état hyperinsulinémique.

Mon projet de recherche découle de ces travaux. Il avait comme objectif principal d'analyser les effets directs de deux combinaisons d'AGL, dont les compositions dérivent de celles retrouvées dans les diètes précédemment utilisées, sur la prolifération et l'apoptose des CMLV de souris, en présence ou non d'une forte dose d'insuline. Les deux combinaisons étudiées dans ce projet comportaient les mêmes AGL, mais dans des proportions différentes et pour une concentration totale de 900 μ M (voir le tableau II ci-dessous). Suite aux différents résultats obtenus lors de la précédente étude, nous avons émis *l'hypothèse qu'en condition hyperinsulinémique, la combinaison d'AGL plus riche en AGS, représentant la DA, induirait plus fortement l'apoptose des CMLV lorsque comparée à la combinaison d'AGL plus riche en AGMI, qui elle, représente la DV*. Les résultats de ce projet vont permettre de mieux comprendre l'impact de différentes combinaisons d'AGL, variant selon les diètes, sur les atteintes vasculaires induites chez les patients athérosclérotiques souffrant également de DT2.

Tableau I. Profil d'acides gras des diètes utilisées dans les précédents travaux.

Acides gras	DA (%)	DV (%)
C14 : 0 acide myristique	0,86	0,19
C14 : 1 acide myristoléique	0,47	0
C16 : 0 acide palmitique	23	13
C16 : 1 acide palmitoléique	3,7	0,19
C18 : 0 acide stéarique	13	10
C18 : 1 acide oléique	42	63
C18 : 2 acide linoléique	14	13
C18 : 3 acide linoléique	1,7	0,74
C20 : 0 acide arachidique	0	0,26
C20 : 4 acide arachidonique	1,7	0
AGS totaux	37	24
AGMI totaux	46	63
AGPI totaux	17	14

Tableau II. Profil d'acides gras des combinaisons utilisées dans ce projet.

Acides gras	DA (%)	DA ($\mu\text{M}/900\mu\text{M}$)	DV (%)	DV ($\mu\text{M}/900\mu\text{M}$)
C16 : 0 acide palmitique	27	244	15	135
C16 : 1 acide palmitoléique	4,3	39	0,2	1,8
C18 : 0 acide stéarique	15	139	12	106
C18 : 1 acide oléique	49	443	72	650
C18 : 3 acide linoléique	2	18	0,9	8,1
C20 : 4 acide arachidonique	1,9	17,1	0	0
AGS totaux	43	383	27	241
AGMI totaux	53	482	72	652
AGPI totaux	4	35,1	1	8,1

2. Article scientifique

2.2 Key Fatty Acid Combinations Define Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Viability

Corinne St-Denis^{1,2}, Isabelle Cloutier¹ and Jean-François Tanguay^{1,2}

¹ Research Center, Montreal Heart Institute; ² Faculty of Medicine, Université de Montréal, 2900 Blvd. Édouard-Montpetit, Montréal (Qc), H3T 1J4, Canada.

Contribution of the authors:

Corinne St-Denis: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing.

Isabelle Cloutier: conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing and review.

Jean-François Tanguay: conception and design, final approval of manuscript.

Corresponding author:

Dr. Jean-François Tanguay

Tel.: X

Address: 5000 Bélanger Street, Montréal (Qc), H1T 1C8, Canada.

Email address: X

2.2.1 Abstract

High plasmatic concentrations of free fatty acids (FFA) and insulin are common features in atherosclerotic patients with type 2 diabetes. FFA, according to their nature, can have various effects on vascular smooth muscle cells (VSMC). These cells play important roles throughout atherosclerosis pathogenesis, from plaque development to plaque instability. Thus, this study aims to assess the impact of two FFA combinations and insulin on murine VSMC viability. The two combinations contain the same FFA but at different ratios, one being richer in saturated fatty acids (SFA) and the other having a higher content in monounsaturated fatty acids (MUFA). Both combinations inhibited VSMC proliferation due to their pro-apoptotic potential, with SFA being the major inducers of apoptosis. However, the presence of oleic acid attenuated this impact in a dose-dependent manner. Surprisingly, oleic acid had the capacity to reduce apoptosis rates more strongly when combined to SFA than when used alone in VSMC treatments. This effect was significant only for specific proportions of these FFA and was even more effective in presence of insulin. These results highlight the presence of a competition between pro-apoptotic and anti-apoptotic mechanisms in VSMC that is dependent on FFA ratios (saturated vs. monounsaturated) and on insulinemia. They also underline the importance of the presence of MUFA such as oleic acid in diets containing high proportions of SFA.

2.2.2 Keywords

Free fatty acids - vascular smooth muscle cells - insulin - apoptosis - cell viability - atherosclerosis - type 2 diabetes

2.2.3 Abbreviations

ALA	Linolenic acid
ARA	Arachidonic acid
BSA	Bovine serum albumin
EGF	Epithelial growth factor
FFA	Free fatty acid
FGF	Fibroblast growth factor
MUFA	Monounsaturated fatty acid
OLA	Oleic acid
PAL	Palmitoleic acid
PAM	Palmitic acid
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
RFU	Relative fluorescence unit
ROS	Reactive oxygen species
SFA	Saturated fatty acid
STA	Stearic acid
T2D	Type 2 diabetes
TAG	Triacylglycerol
VSMC	Vascular smooth muscle cells

2.2.4 Introduction

For the past few decades, cardiovascular diseases (CVD) have been the major cause of mortality worldwide. Data from the World Health Organization have reported in 2008 that 30 % of all deaths in the world were due to CVD, with 24 % of them related to cardiac or cerebral ischemia [1]. In most cases, atherosclerosis is the pathology behind cardiovascular complications. Atherosclerosis is a complex systemic disorder with a progressive development involving various cell types [2]. Among them, vascular smooth

muscle cells (VSMC) play important roles throughout the progression of the pathology. Indeed, VSMC migration and proliferation from the media toward the intima of the vessel wall contribute to the development of a stable plaque. They also synthesize extracellular matrix proteins, part of building blocks of a thick fibrous cap. In advanced lesions, VSMC apoptosis favors plaque instability by thinning the fibrous cap, increasing thereby risks of plaque rupture and thrombosis [3,4].

Among risk factors of cardiovascular diseases, type 2 diabetes (T2D) has become a widespread concern. The American Centers for Disease Control and Prevention have approximated in the *2011 National Diabetes Fact Sheet* that 25.8 million people, 8.3 % of the population in USA, were affected by diabetes in 2010 [5]. A major cardiovascular complication of T2D is an accelerated process of atherosclerosis pathogenesis, associated with metabolic syndrome and insulin resistance [6]. Hyperinsulinemia and a high level of plasmatic free fatty acids (FFA) are well known characteristics of these conditions. While hyperinsulinemia affects the proliferation, migration and contractility of VSMC [7,8,9], it is recognized that FFA at high concentration, and according to their nature, can play various roles on VSMC functions.

Saturated fatty acids (SFA) are present in high proportion in the Western diet, associated with increased risk of developing cardiovascular diseases [10,11]. Many studies have demonstrated that SFA have a negative impact on different cell types, principally by inducing apoptosis. Indeed, it has been reported that SFA such as palmitic or stearic acids cause higher level of apoptosis in VSMC [12,13], but also in endothelial cells [14,15], hepatocytes [16], β -cells [17,18] and cardiomyocytes [19,20]. On the other hand, monounsaturated fatty acids (MUFA), which are more abundant in the Mediterranean diet, are recognized for their protective impact against cardiovascular diseases [21,22,23]. MUFA such as palmitoleic or oleic acids can reduce the impact of SFA on apoptosis [13,15,16]. It has also been demonstrated in different studies that oleic acid promotes VSMC proliferation and migration [24,25,26]. Thus, oleic acid seems to have an important protective role in late stages of atherosclerosis, by preventing plaque thinning.

Most of these studies were performed with individual FFA or with a combination of two, but rarely with complex mixes, although dietary fatty acids are composed of a group of FFA rather than being limited to one or two of them. Therefore, the role of FFA on VSMC apoptosis when they are combined in groups of various proportions is still unclear. In one of our previous studies, we found that VSMC apoptosis level was higher when cells were treated with adipocyte supernatants isolated from male mice fed with a high fat diet from animal origin richer in SFA (named AD, for animal diet) than when treated with adipocyte supernatants from male mice fed with a high fat diet from vegetal origin richer in MUFA (named VD, for vegetal diet) [27]. This level was further increased when adipocytes were stimulated with a high dose of insulin (unpublished data). With these results in mind, we hypothesized that in a hyperinsulinemic state, a FFA combination with a higher content in SFA (also named AD) would induce higher VSMC apoptosis than a FFA combination richer in MUFA (also named VD).

Thus, this work aims to assess the impact of these two FFA combinations, derived from both diets, on the proliferation and apoptosis of VSMC in presence, or not, of a high insulin dose. The two combinations tested contain the same FFA but in different proportions. Our results show that the FFA combinations have a pro-apoptotic impact on VSMC, principally due to SFA. The presence of oleic acid in these combinations reduces VSMC apoptosis rates induced by SFA, even more than when oleic acid was alone. Such an effect was modulated by the FFA ratios and the presence or not of a high insulin dose. In the presence of a competition between pro- and anti-apoptotic mechanisms, these results suggest that the relative concentration of each FFA in a combination (SFA vs. MUFA) is as important as their total concentrations to determine their impact on VSMC functions.

2.2.5 Materials and Methods

2.2.5.1 Cell Isolation and Culture

VSMC were isolated from aortas of 10 weeks old male mice C57BL/6 (Charles River, Montreal, Canada) using a method modified from Ray et al. [28]. Briefly, mice were euthanized by a ketamine/xylazine mix and full length aortas, from aortic arch to kidneys, were extracted. Freshly isolated aortas were dissected into 2-3 mm pieces and digested with type II collagenase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 5h at 37°C, 5 % CO₂. The digested aortas were then washed twice by centrifugation for 5 minutes at 300 x g to remove all traces of collagenase. The obtained VSMC were put in culture to be amplified in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose (Invitrogen), 1 % penicillin-streptomycin (Invitrogen), 10 % fetal bovine serum (FBS) (PAA, Pasching, Austria), 0,5 ng/ml EGF and 2 ng/ml FGF-basic (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), at 37°C, 5 % CO₂. The smooth muscle cell phenotype was confirmed by a positive staining for alpha smooth muscle actin (rabbit monoclonal antibody, ab32575, 1:400) and for SM-22 α (rabbit polyclonal antibody, ab14106, 1:100) (Abcam, Cambridge, MA, USA), both specific markers of smooth muscle cells. Positive stains were visualized by immunofluorescence with a confocal microscope (LSM510) and analysed with Zeiss LSM Image Browser System (Zeiss, Toronto, Canada). Cells at passage 4 or 5 were used throughout this study. All animal procedures in this protocol (#2010-59-1) were approved by the Animal Ethics Committee of the Montreal Heart Institute.

2.2.5.2 Fatty Acid Preparation and VSMC Stimulations

Palmitic [C16:0, PAM], palmitoleic [C16:1n-7, PAL], stearic [C18:0, STA], oleic [C18:1n-9, OLA], linolenic [C18:3n-3, ALA] and arachidonic [C20:4n-6, ARA] acids

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were dissolved at 50 mM in 80°C water containing a 10 % excess of NaOH 1N (55 mM). After dissolution, each free fatty acid (FFA) was immediately added to a 20 % fatty acid-free bovine serum albumin (FA-free BSA) (PAA) solution that has been pre-heated at 45°C to obtain 10 mM FFA stock solutions with a molar ratio of 3.3:1 FFA/BSA. The FFA-BSA complexes were stirred at 45°C until complete dissolution, filter sterilized and stored in aliquots at -20°C until usage. For VSMC stimulations, cells were treated whether with a combination of FFA at a final concentration of 900 µM or with individual FFA at the concentration found in each combination. The two combinations used contained the same mix of fatty acids but at different ratios and were derived from diets with fat of animal origin (AD, D12492, Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) and vegetal origin (VD, D06061202, Research Diets) used in our previous studies [27]. The concentrations of each FFA present in both combinations are shown in Table 1. For the control condition, cells were treated with a BSA solution without FFA. The VSMC stimulations were done for 24 or 72 h, depending on the measured parameter, in the presence or not of 1 nM insulin (Sigma) in 1 % FBS DMEM medium.

2.2.5.3 Proliferation Assays by Manual Counts

The effects of fatty acid combinations and insulin on proliferation were evaluated by manual cell counts. VSMC were plated into 24-well culture plates at a seeding density of 1×10^4 cells/well and let grow for 24 h. After an overnight starvation in a 0.1 % FBS DMEM medium and a 72 h of stimulation with the fatty acid combinations, with or without insulin, cells in each well were trypsinized and re-suspended in 100 µl of 20 % FBS DMEM medium for cell count. Live and dead cells were counted by Trypan blue stain (Invitrogen) exclusion with a haemocytometer under a phase-contrast microscope.

2.2.5.4 Apoptosis Induction as Measured by Caspase-3 Assays

To determine the level of apoptotic VSMC, cells were seeded in a black 96-well plate with clear flat bottom (Corning Inc., Corning, NY, USA) at 2.6×10^4 cells/well and stimulated for 24 h with the fatty acid combinations or with individual FFA, with or without insulin. Caspase-3 activity was evaluated with the Apo-ONE Homogeneous Caspase 3/7 Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA), according to manufacturer's instructions. After 2 to 4 h of incubation, the activity was measured on a microplate reader (Synergy 2 Multi-Mode, Biotek, Winooski, VT, USA) at 520 nm, the fluorescent emission wavelength of the substrate cleaved by caspase-3.

2.2.5.5 Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry

To determine the impact of fatty acid combinations and insulin on cell cycle phase modulation, VSMC were plated into 6-well plates at a seeding density of 4×10^4 cells/well and stimulated for 24 h as mentioned above. After trypsinization and washing in PBS-BSA 0.5 %, cells were permeabilized with 0.1 % saponin in PBS for 10 minutes and then fixed in a 1:1 acetone/methanol mix at -20°C for another 10 minutes. For DNA staining, after 3 washing steps, 50 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (Sigma) in PBS-BSA 0.5 % containing 5 $\mu\text{g/ml}$ of ribonuclease A (Sigma) was added to cells for 30 minutes. Following 2 washing steps, cell cycle phases were evaluated on a flow cytometer with a 488 nm wavelength argon laser (Coulter EPICS XL, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and analyzed with the Weasel software (Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Australia). Data are presented as the percentage of cells in each phase of cell cycle.

2.2.5.6 Statistical Analysis

In all experiments, data are expressed as means \pm SEM and each group of data was compared using one-way ANOVA with Tukey-Kramer or Dunnett multiple comparison tests. A $P < 0.05$ was considered statistically significant.

2.2.6 Results

2.2.6.1 Fatty Acid Combinations Inhibit VSMC Proliferation

A 72 h treatment with either AD or VD FFA combination at 900 μ M decreased by 35 to 40 % the number of cells when compared to BSA alone (Fig. 1). This decrease was significant for AD and VD when combined with a 1 nM insulin stimulation (AD: $18\,587 \pm 1575$ cells/well and VD: $17\,810 \pm 720$ cells/well vs. BSA: $30\,175 \pm 2200$ cells/well, $P < 0.0001$) whereas in absence of insulin, it was significant only for VD (VD: $16\,413 \pm 1446$ cells/well vs. BSA: $25\,143 \pm 3024$ cells/well, $P = 0.0285$).

2.2.6.2 AD and VD FFA Combinations Both Cause the Induction of Apoptosis of VSMC

The observed inhibition of proliferation was related to an enhanced apoptosis rate. Indeed, a 24 h treatment with both FFA combinations at 900 μ M significantly increased caspase-3 activity compared to BSA control condition (AD: 2.90 ± 0.21 -fold, VD: 3.00 ± 0.24 -fold vs. BSA without insulin, $P < 0.0001$; Fig. 2a and AD: 2.73 ± 0.25 -fold, VD: 3.65 ± 0.17 -fold vs. BSA with insulin, $P < 0.0001$; Fig. 2b). While caspase-3 activity was the same between AD and VD stimulations in absence of insulin, a co-treatment with 1 nM insulin increased it for VD compared to AD ($P = 0.0220$; Fig. 2b). Since this difference between the two FFA combinations was not observed in the inhibition of proliferation (Fig.

1), the increased level of apoptotic VSMC with VD stimulation combined with insulin may be due to a blockage in a cell cycle phase. However, analysis of PI stained cells by flow cytometry revealed no significant difference in the cell cycle phases between stimulations with AD and VD FFA combinations in absence or presence of insulin (Fig. 3a and b). Therefore, enhanced apoptosis following VSMC stimulation with VD FFA combination in presence of insulin was not related to a cell cycle blockage.

2.2.6.3 Saturated Fatty Acids Are the Main Inducers of Apoptosis in AD and VD Combinations

To investigate the contribution to apoptosis induction of the different FFA, VSMC were also stimulated with each single fatty acid for 24 h at the same concentration than the one found either in AD or in VD combinations (Table 1). Caspase-3 activity was mainly induced by palmitic (PAM) and stearic (STA) acids, both SFA, at the concentrations found in AD (PAM: 75 ± 5 RFU, $P < 0.01$ vs. PAL and ARA, $P < 0.001$ vs. ALA), (STA: 86 ± 5 RFU, $P < 0.05$ vs. OLA, $P < 0.001$ vs. PAL, ALA and ARA) when compared with caspase-3 activity caused by monounsaturated and polyunsaturated fatty acids (MUFA and PUFA) (OLA: 52 ± 8 RFU, PAL: 27 ± 7 RFU, ALA: 2 ± 10 RFU, ARA: 20 ± 8 RFU) (Fig. 4a). Similar results were demonstrated at the concentrations found in VD (PAM: 116 ± 15 RFU, $P < 0.001$ vs. OLA: 29 ± 2 RFU, PAL: 0 ± 10 RFU and ALA: -4 ± 6 RFU), (STA: 168 ± 2 RFU, $P < 0.001$ vs. OLA, PAL and ALA) (Fig. 4b). When stimulations with individual FFA were combined with 1 nM insulin, a similar pattern was obtained for concentrations present in AD (PAM: 120 ± 3 RFU, $P < 0.01$ vs. PAL: 60 ± 13 RFU, $P < 0.001$ vs. OLA: 33 ± 4 RFU, ALA: 26 ± 2 RFU and ARA: 25 ± 14 RFU), (STA: 141 ± 6 RFU, $P < 0.001$ vs. OLA, PAL, ALA and ARA) (Fig. 4c) and VD (PAM: 131 ± 5 RFU, $P < 0.001$ vs. OLA: 20 ± 2 RFU, PAL: 0.33 ± 1.20 RFU and ALA: 29 ± 7 RFU), (STA: 145 ± 5 RFU, $P < 0.001$ vs. OLA, PAL and ALA) (Fig. 4d).

2.2.6.4 Saturated Fatty Acids Alone Induce Higher Caspase-3 Activity than when Combined in AD and VD

SFA induced much higher apoptosis at concentrations found in both AD and VD when added alone to the culture media than when mixed in the combinations. PAM induced a 6.8 fold-increase (75 ± 5 RFU), STA a 7.9 fold-increase (86 ± 5 RFU) and, interestingly, the MUFA OLA a 4.8 fold-increase (52 ± 8 RFU) in caspase-3 activity compared to the AD combination (11 ± 2 RFU, $P < 0.001$ vs. PAM and STA, $P < 0.05$ vs. OLA; Fig. 4a). In contrast, apoptosis was increased by 16 fold with PAM (116 ± 15 RFU) and by 23 fold with STA (168 ± 2 RFU) compared to the VD combination (7.3 ± 0.3 RFU, $P < 0.001$; Fig. 4b). In presence of 1 nM insulin, similar results were obtained at AD concentrations for PAM (7.1 fold-increase, 120 ± 3 RFU) and for STA (8.3 fold-increase, 141 ± 6 RFU) compared to the AD combination (17 ± 0.6 RFU, $P < 0.01$), but not significant with OLA stimulation (1.9 fold-increase, 33 ± 4 RFU vs. AD combination) (Fig. 4c). A similar pattern was induced with single FFA at VD concentrations (PAM: 20 fold-increase, 131 ± 5 RFU and STA: 22 fold-increase, 145 ± 5 RFU) compared to the VD combination (6.7 ± 0.9 RFU, $P < 0.01$; Fig. 4d).

2.2.6.5 Oleate Attenuates the Impact of Saturated Fatty Acids on Apoptosis Level in a Dose Dependant Manner

VSMC were stimulated for 24 h with PAM or STA at the same concentrations than those in AD and VD combinations. These stimulations were made alone or combined to increasing doses of OLA until reaching the concentration of this fatty acid in AD ($443 \mu\text{M}$) or VD ($650 \mu\text{M}$). OLA reduces the impact of SFA on caspase-3 activity in a dose dependent manner at both AD and VD concentrations. At AD concentrations of SFA, OLA, at the two highest doses tested, significantly attenuated the effect of PAM (PAM $244 \mu\text{M}$ + OLA $225 \mu\text{M}$: 49 ± 9 RFU, + OLA $443 \mu\text{M}$: 35 ± 1 RFU vs. PAM $244 \mu\text{M}$: 106 ± 5 RFU, $P < 0.05$; Fig. 5a) and at all doses tested for STA (STA $139 \mu\text{M}$ + OLA $50 \mu\text{M}$: 79 ± 3

RFU, + OLA 100 μ M: 77 ± 12 RFU, + OLA 225 μ M: 62 ± 12 RFU, + OLA 443 μ M: 44 ± 10 RFU vs. STA 139 μ M: 137 ± 5 RFU, $P < 0.01$; Fig. 5a). When combined to SFA at VD concentrations, all doses of OLA significantly attenuated the level of apoptosis for both PAM and STA (PAM 135 μ M + OLA 50 μ M: 45 ± 9 RFU, + OLA 100 μ M: 40 ± 4 RFU, + OLA 225 μ M: 34 ± 1 RFU, + OLA 443 μ M: 30 ± 1 RFU, + OLA 650 μ M: 27 ± 2 RFU vs. PAM 135 μ M: 152 ± 15 RFU, $P < 0.001$) (STA 106 μ M + OLA 50 μ M: 65 ± 1 RFU, + OLA 100 μ M: 49 ± 6 RFU, + OLA 225 μ M: 38 ± 1 RFU, + OLA 443 μ M: 31 ± 2 RFU, + OLA 650 μ M: 32 ± 0.3 RFU vs. STA 106 μ M: 207 ± 2 RFU, $P < 0.001$) (Fig. 5b).

With a 1 nM insulin co-treatment, the reducing effect of OLA on PAM at AD concentration was significant for all doses (PAM 244 μ M + OLA 50 μ M: 48 ± 7 RFU, + OLA 100 μ M: 32 ± 2 RFU, + OLA 225 μ M: 30 ± 1 RFU, + OLA 443 μ M: 24 ± 2 RFU vs. PAM 244 μ M: 150 ± 3 RFU, $P < 0.01$; Fig. 5c) and, as already observed without insulin, on STA too (STA 139 μ M + OLA 50 μ M: 68 ± 9 RFU, + OLA 100 μ M: 41 ± 4 RFU, + OLA 225 μ M: 33 ± 1 RFU, + OLA 443 μ M: 31 ± 2 vs. STA 139 μ M: 178 ± 6 RFU, $P < 0.01$; Fig. 5c). At VD concentrations in presence of insulin, OLA maintained its capacity to reduce SFA-induced caspase-3 activity (PAM 135 μ M + OLA 50 μ M: 53 ± 4 RFU, + OLA 100 μ M: 43 ± 2 RFU, + OLA 225 μ M: 40 ± 0.3 RFU, + OLA 443 μ M: 34 ± 1 RFU, + OLA 650 μ M: 32 ± 1 RFU vs. PAM 135 μ M: 174 ± 5 RFU, $P < 0.01$) (STA 106 μ M + OLA 50 μ M: 48 ± 1 RFU, + OLA 100 μ M: 42 ± 1 RFU, + OLA 225 μ M: 40 ± 2 RFU, + OLA 443 μ M: 37 ± 2 RFU, + OLA 650 μ M: 34 ± 2 RFU vs. STA 106 μ M: 199 ± 5 RFU, $P < 0.01$) (Fig. 5d).

2.2.6.6 The Combination of Oleate and SFA Has a Higher Reducing Effect than Oleate Alone on Apoptosis Level at AD Concentrations

Interestingly, when PAM and OLA were combined at concentrations present in AD, the caspase-3 activity was significantly lower than with OLA alone (PAM 244 μ M + OLA 443 μ M: 35 ± 1 RFU vs. OLA 443 μ M: 74 ± 8 RFU, $P < 0.05$; Fig. 5a). In presence of 1

nM insulin, this phenomenon was observed starting from 100 μM OLA when combined with PAM (PAM 244 μM + OLA 100 μM : 32 ± 2 RFU, + OLA 225 μM : 30 ± 1 RFU, + OLA 443 μM : 24 ± 2 RFU vs. OLA 443 μM : 54 ± 4 RFU, $P < 0.01$; Fig. 5c) and from 225 μM OLA when combined with STA (STA 139 μM + OLA 225 μM : 33 ± 1 RFU, + OLA 443 μM : 31 ± 2 RFU vs. OLA 443 μM , $P < 0.05$; Fig. 5c). This observation was not made at VD concentrations, either with or without insulin.

2.2.7 Discussion

A high plasmatic concentration of FFA is a common feature in patients suffering atherosclerosis in combination with T2D. It is generally accepted that SFA, known to induce apoptosis in many cell types, have a pro-atherogenic role on vascular cells [17,20]. In contrast, MUFA have a protective impact with an anti-apoptotic effect [13,15]. Since most studies are conducted with only one or two FFA at a time, little is known about the impact of relevant complex groups of FFA on vascular cells. In this study, we assessed the impact of two FFA combinations, containing the same FFA but in different proportions, on VSMC viability. The AD combination was richer in SFA than the VD combination, which contained a higher proportion of MUFA. The AD combination was inspired by the Western diet composition, while the VD combination was rather modeled on the Mediterranean diet. The hyperinsulinemia found in diabetic and atherosclerotic patients was reproduced by the addition of insulin to FFA combinations in the cellular assays.

The first parameter evaluated was VSMC proliferation. Since BSA, used for FFA solubility, and insulin are individually known to be pro-proliferative [29,30], an enhanced mitogenic action was expected with those mixed proteins. The detectable FFA effects *in vitro* though are exceeding BSA effects, as studies have demonstrated a pro-proliferative impact of oleic acid [25] and an anti-proliferative impact of stearic acid [15] compared to BSA controls. When using FFA combinations, we rather observed an inhibition of VSMC proliferation, significant with VD combination in absence of insulin. The anti-mitotic effect

of AD combination became apparent in the hyperinsulinemic condition. This observation suggests that insulin cannot counteract the impact of FFA combinations on VSMC proliferation. Indeed, the pro-proliferative effect of insulin alone on VSMC is relatively low, with around 20 % increase in proliferation for cells treated 72 hours with insulin doses from 0.5 to 5 nM compared to untreated cells (data not shown).

Since a large proportion of FFA in the combinations used for this study was composed of pro-apoptotic SFA, we hypothesized that the observed inhibition of VSMC proliferation could be due to an induction of apoptosis. With individual FFA, at concentrations found in AD and VD combinations, the highest caspase-3 activity was associated to SFA. Also, the apoptosis rate of VSMC was much lower with mixed FFA than with the majority of individual FFA, except for the PUFA. This important observation suggests the presence in the combinations of one or more FFA with a protective impact on cell viability. Because oleic acid is the most abundant FFA in the combinations and is well known for its anti-apoptotic activity, we postulated that it may be primarily responsible for the protective effect. We confirmed the anti-apoptotic dose-dependent properties of oleic acid on VSMC stimulated with palmitic or stearic acids at concentrations found in both combinations. This effect could be due to an enhanced SFA internalization into triacylglycerol (TAG) vesicles by oleic acid. It was reported that internalized oleic acid is preferentially integrated into cellular TAG vesicles. In contrast, SFA are rather metabolized in their active form involved in lipotoxicity effects. However, the combination of SFA with oleic acid favors the integration of SFA into TAG vesicles, with an inverse correlation between FFA lipotoxicity and storage levels into TAG [15,31,32].

Surprisingly, oleic acid attenuated VSMC apoptosis levels more strongly when combined to a SFA than when used alone, but only at AD concentrations. This observation suggests a competition between pro- and anti-apoptotic mechanisms that relies on given relative concentrations of SFA and MUFA. At AD concentrations, the phenomenon was significant only when oleic acid was almost two times more abundant (1.82 fold) than palmitic acid. With stearic acid, a similar ratio was reached with 225 μ M oleic acid (1.62

fold). In this case, significant inhibition of caspase-3 activity was not reached most probably because of the higher pro-apoptotic potential of stearic acid compared to palmitic acid. A better protective effect was obtained at a 3:1 ratio (oleic acid/stearic acid), without being significant, although very close. At VD concentrations, oleic acid combined to a SFA tends to have the same effect. However, since the apoptosis level with the VD concentration of oleic acid (650 μ M) alone was initially lower than at AD concentration, it becomes difficult to further reduce it when added to SFA. This could explain why the effect seems to be more important at AD concentrations. It also highlights the importance of MUFA in the AD combination, which is rich in harmful SFA.

In presence of insulin, the basal apoptosis rate observed with oleic acid was lower than without insulin. This combined protective effect was transposed in a further reduction of VSMC apoptosis when single SFA was added at AD concentration. This effect was observed this time with both palmitic and stearic acids even with lower oleic acid doses. It is known that insulin increases fatty acid transporter CD36 translocation on cell surface, increasing therefore FFA uptake [33]. Since it has been demonstrated that there is no specific preference for FFA binding to CD36 [34], this probably did not have an impact on oleic acid uptake compared to SFA uptake. However, as an anabolic hormone, insulin is known to reduce palmitic acid β -oxidation and to increase its esterification into TAG in skeletal muscle [35]. Thus, oleic acid could be more effective in presence of insulin in VSMC due to a combined promotion of SFA integration into TAG vesicles rather than to a preferential cellular uptake.

Besides oleic acid and SFA, AD and VD combinations contained other FFA such as palmitoleic, linolenic and arachidonic acids. These three FFA were in much lower proportions, but still could have affected VSMC viability. Indeed, palmitoleic and linolenic acids are recognized to reduce the pro-apoptotic impact of SFA in different cell types by inhibiting endoplasmic reticulum stress [16,36,37,38]. It is probable though that the concentration of palmitoleic acid in VD combination was too low to have any impact on cell viability. When testing for linolenic acid, we observed an apoptosis level similar to the

one obtained with its respective BSA control at AD concentration. At VD concentration, the apoptosis level was even lower with linolenic acid than with its BSA control, hence corroborating with the anti-apoptotic effect described above. In presence of insulin however, apoptosis rates were slightly higher. Since PUFA are particularly sensitive to oxidation, they could potentially be oxidized more easily in a hyperinsulinemic condition, thus increasing apoptosis rates. This is although a hypothesis, since to our knowledge, no study was ever published concerning possible links between insulin and PUFA oxidation levels. For arachidonic acid, it has been demonstrated in turn that its oxidation-derived products have a pro-apoptotic impact on VSMC [39]. As it is only part of the AD mix, we were expecting a higher apoptosis rate for this combination than for VD. Nevertheless, in the previously mentioned study, the investigators noticed decreasing cell viability from a minimal concentration of 20 μM for this FFA [39]. Since arachidonic acid concentration in the AD combination was 17.1 μM , it was likely too low to create an impact on VSMC apoptosis.

Taken together the results from this investigation suggest that the AD combination was not more harmful for VSMC than the VD combination in a hyperinsulinemic condition. In our previous study, VSMC apoptosis rates were higher when cells were stimulated with insulin-treated adipocyte supernatants derived from mice fed with the AD rather than with the VD. The adipose tissue of mice was conditioned *in vivo* by each high fat diet for 20 weeks, resulting in metabolic alterations leading to T2D development [27]. Adipocytes were then isolated, stimulated or not with insulin and supernatants were collected to obtain conditioned media for VSMC stimulations. In that case, stimulation media contained other components than FFA, including adipokines, which influenced VSMC functionality and viability. Adiponectin, one of the most important hormones secreted by adipocytes, is associated to an anti-atherogenic impact. It impairs palmitic acid-induced apoptosis of endothelial cells by reducing ROS production. Adipocytes also secrete leptin, which has a pro-atherogenic impact [40] and a mitogenic effect on VSMC [41].

Adipocyte supernatants from AD and VD groups used to stimulate VSMC had lower adiponectin levels but higher leptin levels compared to those from the control diet.

In addition, the nature and quantity of released FFA by adipocytes is influenced by the ingested diets. After ingestion, FFA are metabolized and stored in adipocytes. Upon adipocyte isolation, the ratio of FFA released in supernatants could be quite different from the initial proportions found in the diets, due in part to metabolic alterations developed by mice fed on high fat diets [27]. While some evidences suggest that FFA composition of TAG stored in adipocytes is similar to the FFA composition ingested, conflicting results propose that the ratio of secreted FFA is not always similar to the ratio of FFA into TAG [42,43,44,45,46]. FFA relative release compared to its percentage into TAG depends on FFA chain length and insaturation degree. Accordingly, a higher release is reported for palmitoleic, linolenic and arachidonic acids. This selective mechanism might be altered according to the dysfunction degree in adipocytes, with hypertrophy found to be more extensive in cells from mice fed with AD compared to those from mice fed with VD, a pattern associated to increased lipolysis [47]. Therefore, FFA relative release combined to adipocyte dysfunction contribute to explain the difference between results on VSMC viability of our present *in vitro* and previous *in vivo* based works even if the FFA ratios used in the actual combinations were selected from those found in the mice diets. In the current experimental setting, no adipokines were involved and the exact FFA concentrations in media were known, offering a better defined environment for VSMC stimulation.

In conclusion, these results demonstrate that complex groups of FFA representative of what is found in modern diets may have a negative impact on VSMC viability. They highlight the importance of MUFA in combinations containing high proportions of SFA to attenuate increased VSMC apoptosis rates. They also underline that the relative concentration of a given FFA in a combination is as important as its total concentration on the pro- and anti-apoptotic balance.

2.2.8 Acknowledgments

We would like to thank Dre Christine Des Rosiers's teamwork for all advices on preparation of fatty acid solutions.

This work was supported by a grant from the Montreal Heart Institute Foundation to Dr Jean-François Tanguay.

Corinne St-Denis was supported by a training grant for graduate studies from the Montreal Heart Institute Foundation and by excellence and writing grants from the Medicine and the Postdoctoral and Superior Studies Faculties of Université de Montréal.

2.2.9 Conflict of Interest

None of the authors has a conflict of interest.

2.2.10 References

1. World Health Organization (October 7th 2011) Causes of Death in 2008. http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death_2008/en/index.html
2. Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126.
3. Glass CK, Witztum JL (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104: 503-516.
4. Clarke M, Bennett M (2006) The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability. *Am J Nephrol* 26: 531-535.
5. Centers for Disease Control and Prevention (November 7th 2011) National Diabetes Fact Sheet. http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs_2011.pdf
6. Xu J, Zou MH (2009) Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation* 120: 1266-1286.
7. Absher PM, Schneider DJ, Baldor LC, Russell JC, Sobel BE (1999) The retardation of vasculopathy induced by attenuation of insulin resistance in the corpulent JCR:LA-cp rat is reflected by decreased vascular smooth muscle cell proliferation in vivo. *Atherosclerosis* 143: 245-251.
8. Wang Y, Zhang B, Bai Y, Zeng C, Wang X (2010) Changes in proteomic features induced by insulin on vascular smooth muscle cells from spontaneous hypertensive rats in vitro. *Cell Biochem Biophys* 58: 97-106.
9. Anfossi G, Russo I, Doronzo G, Trovati M (2009) Contribution of insulin resistance to vascular dysfunction. *Arch Physiol Biochem* 115: 199-217.
10. Fung TT, Rimm EB, Spiegelman D, Rifai N, Tofler GH, et al. (2001) Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *Am J Clin Nutr* 73: 61-67.

11. Heidemann C, Schulze MB, Franco OH, van Dam RM, Mantzoros CS, et al. (2008) Dietary patterns and risk of mortality from cardiovascular disease, cancer, and all causes in a prospective cohort of women. *Circulation* 118: 230-237.
12. Rho MC, Ah Lee K, Mi Kim S, Sik Lee C, Jeong Jang M, et al. (2007) Sensitization of vascular smooth muscle cell to TNF-alpha-mediated death in the presence of palmitate. *Toxicol Appl Pharmacol* 220: 311-319.
13. Mattern HM, Hardin CD (2007) Vascular metabolic dysfunction and lipotoxicity. *Physiol Res* 56: 149-158.
14. Artwohl M, Roden M, Waldhausl W, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer SM (2004) Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. *FASEB J* 18: 146-148.
15. Harvey KA, Walker CL, Xu Z, Whitley P, Pavlina TM, et al. (2010) Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells. *J Lipid Res* 51: 3470-3480.
16. Akazawa Y, Cazanave S, Mott JL, Elmi N, Bronk SF, et al. (2010) Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *J Hepatol* 52: 586-593.
17. Eitel K, Staiger H, Brendel MD, Brandhorst D, Bretzel RG, et al. (2002) Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 299: 853-856.
18. Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinas GA, Donath MY (2003) Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes* 52: 726-733.
19. de Vries JE, Vork MM, Roemen TH, de Jong YF, Cleutjens JP, et al. (1997) Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J Lipid Res* 38: 1384-1394.

20. Dyntar D, Eppenberger-Eberhardt M, Maedler K, Pruschy M, Eppenberger HM, et al. (2001) Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. *Diabetes* 50: 2105-2113.
21. Hu FB (2003) The Mediterranean diet and mortality--olive oil and beyond. *N Engl J Med* 348: 2595-2596.
22. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, et al. (1999) Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 99: 779-785.
23. Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, et al. (2004) Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* 292: 1440-1446.
24. Renard CB, Askari B, Suzuki LA, Kramer F, Bornfeldt KE (2003) Oleate, not ligands of the receptor for advanced glycation end-products, promotes proliferation of human arterial smooth muscle cells. *Diabetologia* 46: 1676-1687.
25. Yun MR, Lee JY, Park HS, Heo HJ, Park JY, et al. (2006) Oleic acid enhances vascular smooth muscle cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Pharmacol Res* 54: 97-102.
26. Jiang X, Zhang Y, Hou D, Zhu L, Xu W, et al. (2010) 17beta-estradiol inhibits oleic acid-induced rat VSMC proliferation and migration by restoring PGC-1alpha expression. *Mol Cell Endocrinol* 315: 74-80.
27. El Akoum S, Lamontagne V, Cloutier I, Tanguay JF (2011) Nature of Fatty Acids in High Fat Diets Differentially Delineates Obesity-Linked Metabolic Syndrome Components in Male and Female C57BL/6J Mice. *Diabetol Metab Syndr* 3: 34.
28. Ray JL, Leach R, Herbert JM, Benson M (2001) Isolation of vascular smooth muscle cells from a single murine aorta. *Methods Cell Sci* 23: 185-188.

29. Cruzado M, Risler N, Castro C, Ortiz A, Ruttler ME (1998) Proliferative effect of insulin on cultured smooth muscle cells from rat mesenteric resistance vessels. *Am J Hypertens* 11: 54-58.
30. Francis GL (2010) Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology* 62: 1-16.
31. Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG (2001) Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 50: 1771-1777.
32. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., et al. (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3077-3082.
33. Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A (2010) Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev* 90: 367-417.
34. Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA (1996) Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J Membr Biol* 153: 75-81.
35. Luiken JJ, Dyck DJ, Han XX, Tandon NN, Arumugam Y, et al. (2002) Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E491-495.
36. Katsoulis E, Mabley JG, Samai M, Green IC, Chatterjee PK (2009) alpha-Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Eur J Pharmacol* 623: 107-112.
37. Zhang Y, Dong L, Yang X, Shi H, Zhang L (2011) alpha-Linolenic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of stearic acid lipotoxicity on primary rat hepatocytes. *Lipids Health Dis* 10: 81.
38. Zhang Y, Yang X, Shi H, Dong L, Bai J (2011) Effect of alpha-linolenic acid on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of palmitic acid lipotoxicity in primary rat hepatocytes. *Lipids Health Dis* 10: 122.

39. Kalyankrishna S, Parmentier JH, Malik KU (2002) Arachidonic acid-derived oxidation products initiate apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 70: 13-29.
40. Fantuzzi G (2005) Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115: 911-919; quiz 920.
41. Beltowski J (2006) Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 189: 47-60.
42. Conner WE, Lin DS, Colvis C (1996) Differential mobilization of fatty acids from adipose tissue. *J Lipid Res* 37: 290-298.
43. Halliwell KJ, Fielding BA, Samra JS, Humphreys SM, Frayn KN (1996) Release of individual fatty acids from human adipose tissue in vivo after an overnight fast. *J Lipid Res* 37: 1842-1848.
44. Raclot T, Groscolas R (1993) Differential mobilization of white adipose tissue fatty acids according to chain length, unsaturation, and positional isomerism. *J Lipid Res* 34: 1515-1526.
45. Raclot T, Langin D, Lafontan M, Groscolas R (1997) Selective release of human adipocyte fatty acids according to molecular structure. *Biochem J* 324 (Pt 3): 911-915.
46. Raclot T, Mioskowski E, Bach AC, Groscolas R (1995) Selectivity of fatty acid mobilization: a general metabolic feature of adipose tissue. *Am J Physiol* 269: R1060-1067.
47. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP (2008) Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 367-377.

2.2.11 Tables

Table 1. Molar ratios of the two fatty acid combinations.

Fatty acid ($\mu\text{M}/900 \mu\text{M}$)	AD combination	VD combination
C16:0 PAM	244	135
C16:1n-7 PAL	39	1.8
C18:0 STA	139	106
C18:1n-9 OLA	443	650
C18:3n-3 ALA	18	8.1
C20:4n-6 ARA	17.1	0
Total SFA	383	241
Total MUFA <i>cis</i>	482	652
Total PUFA <i>cis</i>	35.1	8.1

PAM Palmitic acid, *PAL* Palmitoleic acid, *STA* Stearic acid, *OLA* Oleic acid, *ALA* Alpha-linolenic acid, *ARA* Arachidonic acid, *SFA* Saturated fatty acids, *MUFA* Monounsaturated fatty acids, *PUFA* Polyunsaturated fatty acids

2.2.12 Figure Legends

Figure 1. Effect of fatty acid combinations on VSMC proliferation. Cells were stimulated for 72 h with either AD or VD fatty acid combinations at 900 μM , in the presence or not of 1 nM insulin. Cell proliferation was evaluated by manual counts. Data

are means \pm SEM and represent the number of cells per well of a culture plate ($n = 7$). * $P < 0.05$ vs. BSA. ††† $P < 0.001$ vs. BSA I.

Figure 2. Impact of fatty acid combinations on the induction of apoptosis of VSMC. Cells were treated for 24 h with either AD or VD fatty acid combinations at 900 μ M in the absence (**a**) or presence (**b**) of a co-treatment with 1 nM insulin. The induction of apoptosis was measured by caspase-3 activity. Data are means \pm SEM and represent the relative caspase-3 activity (fold-increase) compared to BSA controls ($n = 4$). *** $P < 0.001$ vs. BSA. ††† $P < 0.001$ vs. BSA I. ‡ $P < 0.05$ AD I vs. VD I.

Figure 3. Influence of fatty acid combinations on the modulation of VSMC cell cycle phases. Cells were treated for 24 h with either AD or VD fatty acid combinations at 900 μ M in the absence (**a**) or presence (**b**) of a co-treatment with 1 nM insulin. Cell cycle modulation was evaluated by flow cytometry with a PI staining. Data are means \pm SEM and are expressed as percentage of cells in each cell cycle phase ($n = 4$). The black bars represent VD combination, the gray bars are for AD combination and the white bars for BSA.

Figure 4. PAM and STA are the main inducers of VSMC apoptosis in the fatty acid combinations. Cells were stimulated for 24 h with individual fatty acids present in the combinations at concentrations found in AD combination (**a**, **c**) or VD combination (**b**, **d**) in the absence (**a**, **b**) or presence (**c**, **d**) of a co-treatment with 1 nM insulin. The induction of apoptosis was measured by caspase-3 activity. Data are means \pm SEM (BSA control values for each fatty acid were subtracted) and represent the relative fluorescence intensity (RFU) of the product of Z-DEVD-R110 substrate, cleaved by the active caspase-3 into its R110 fluorescent form ($n = 3$). The black bars represent AD or VD combination, the bars with a large grid are for SFA, those with a small grid for MUFA and the dotted bars are for

PUFA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. AD or VD combination. †† $P < 0.01$ and ††† $P < 0.001$ vs. PAM. $\delta P < 0.05$ and $\delta\delta\delta P < 0.001$ vs. STA.

Figure 5. Protective effect of OLA on VSMC apoptosis induced by SFA. Cells were stimulated for 24 h with PAM or STA alone or combined with increasing doses of OLA in the absence (**a, b**) or presence (**c, d**) of 1 nM insulin. Concentrations used for PAM, STA and for maximal doses of OLA were those found in AD (**a, c**) or VD (**b, d**) combinations. The induction of apoptosis was measured by caspase-3 activity. Data are means \pm SEM and represent the relative fluorescence intensity (RFU) formed by active caspase-3 ($n = 3$). † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, ††† $P < 0.001$ vs. PAM. $\delta\delta P < 0.01$, $\delta\delta\delta P < 0.001$ vs. STA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. OLA alone (black bars).

2.2.13 Figures

Figure 1.

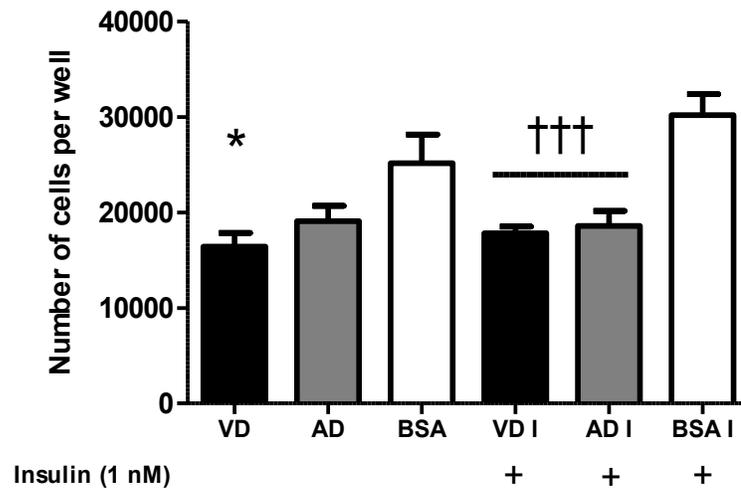


Figure 2.

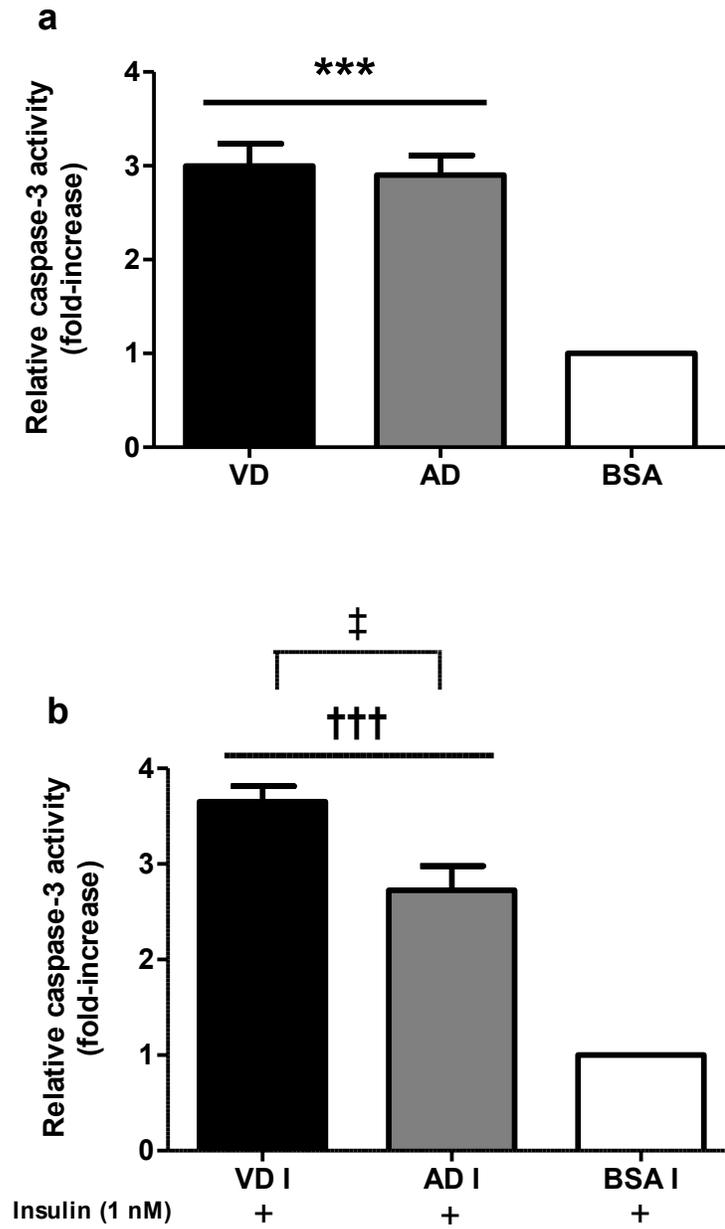


Figure 3.

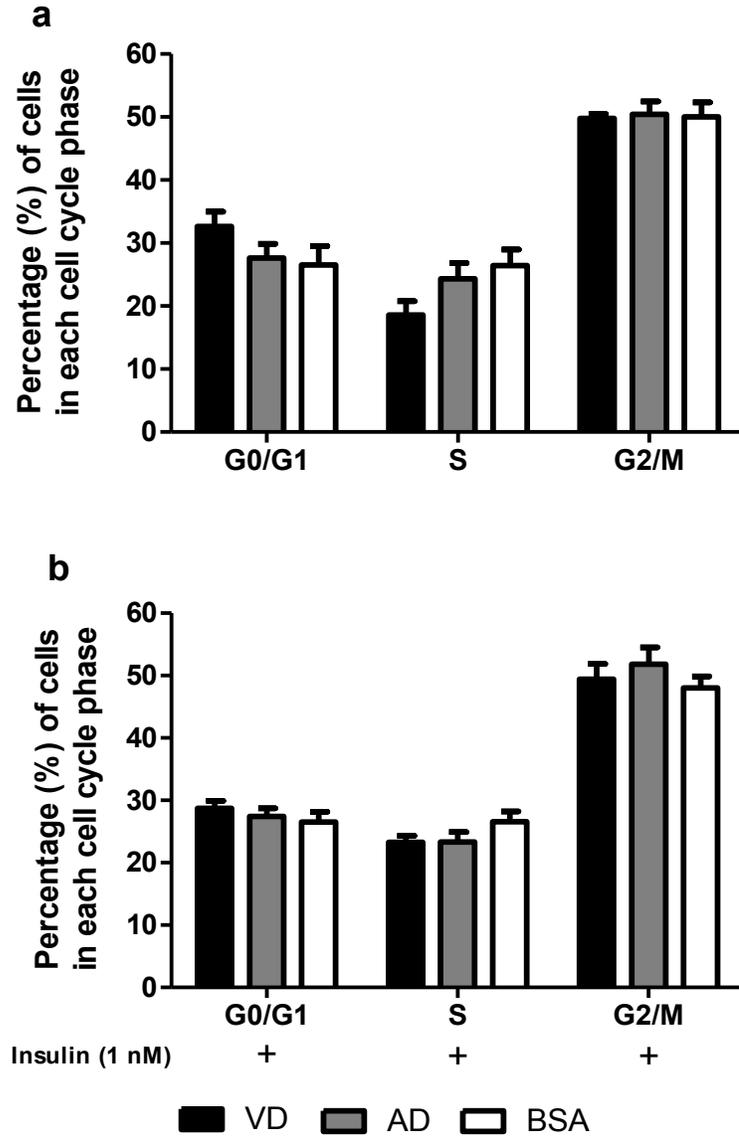
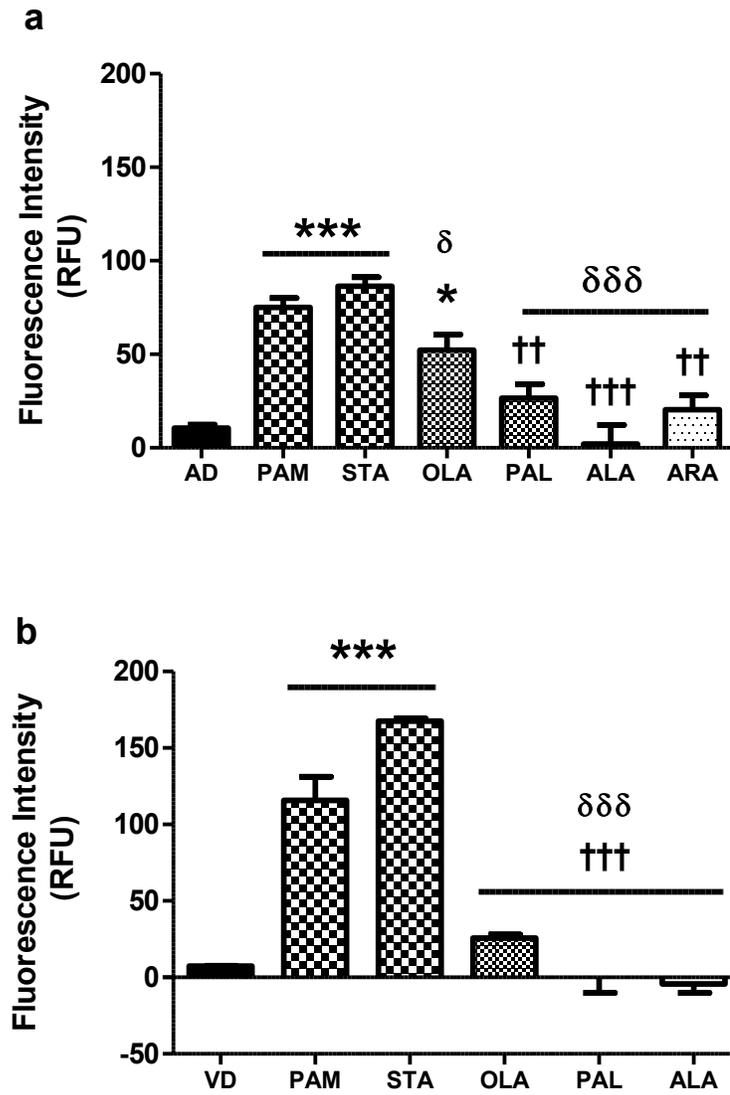


Figure 4.



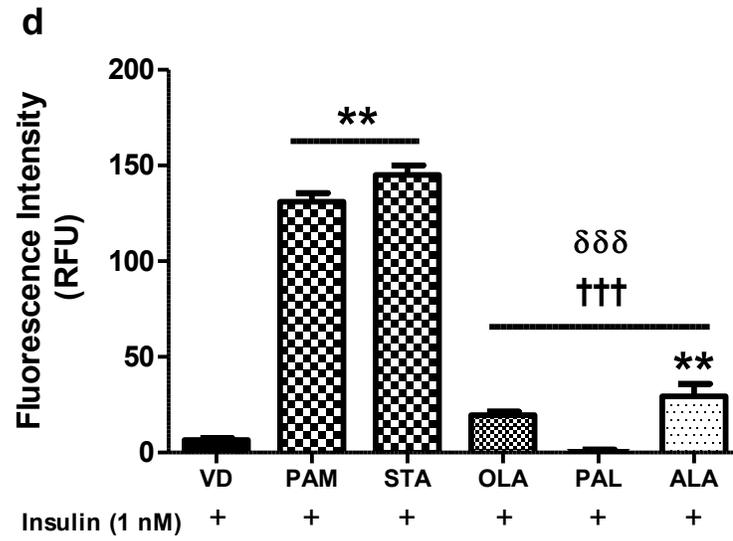
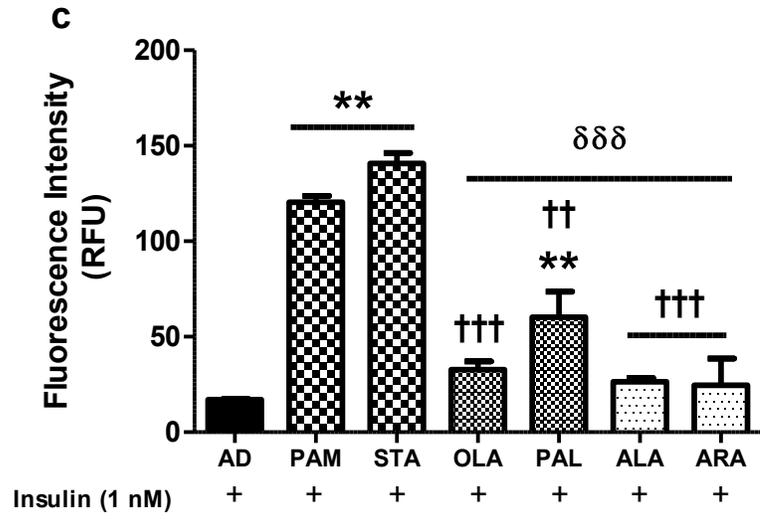
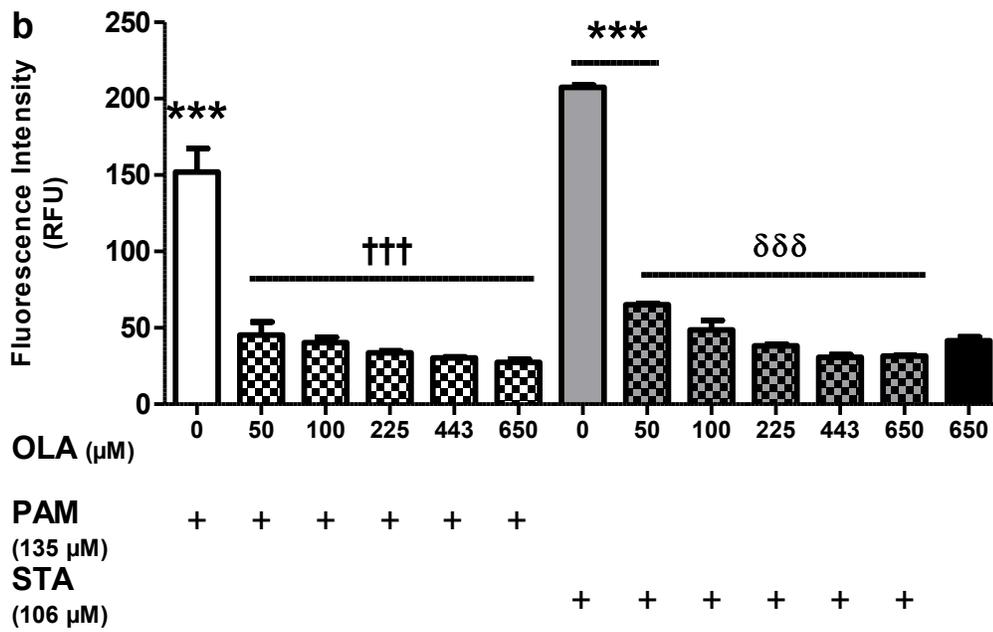
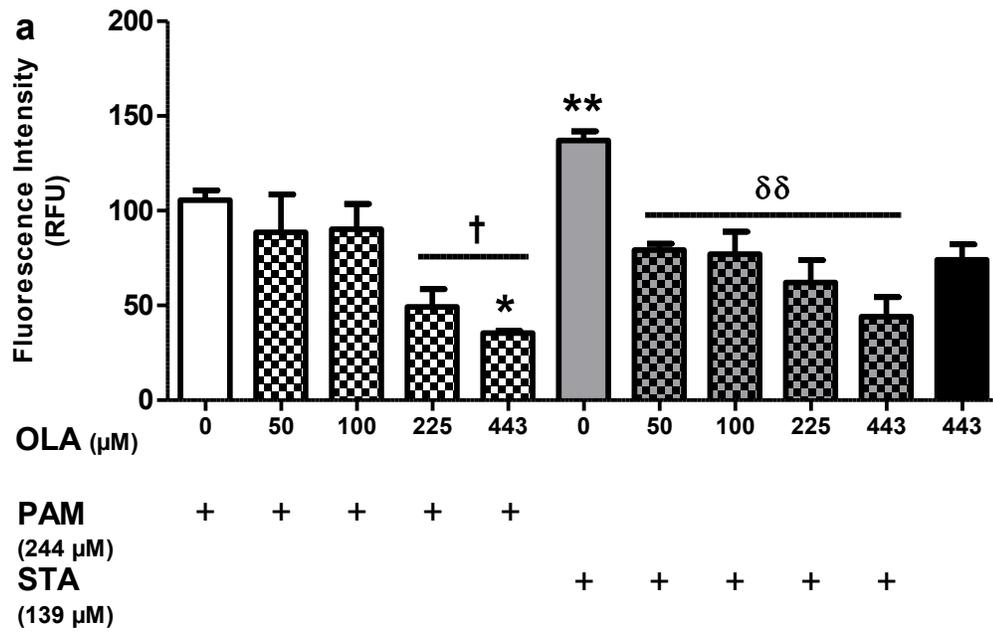
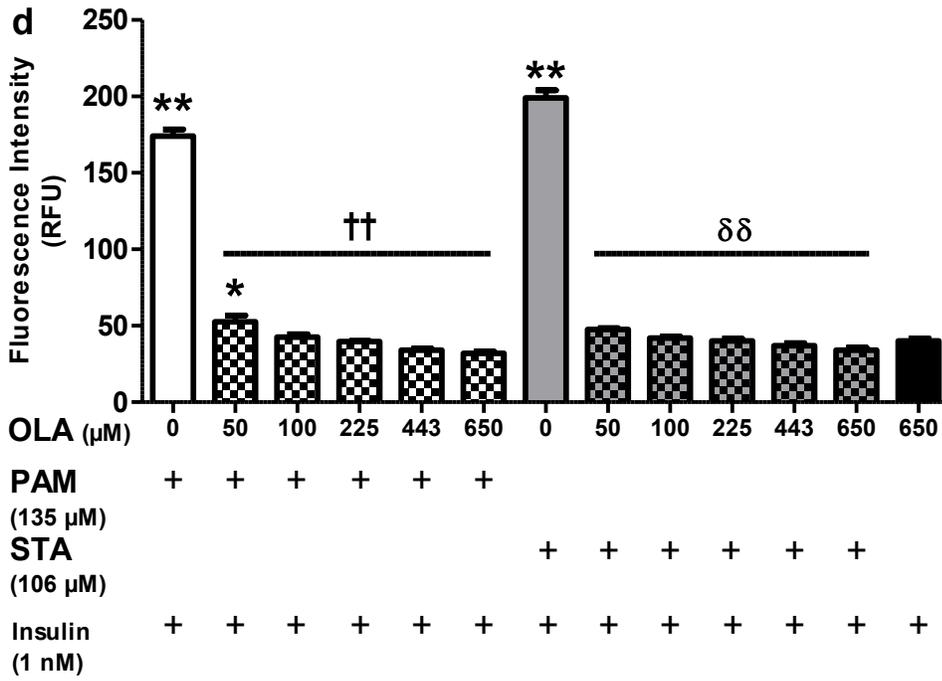
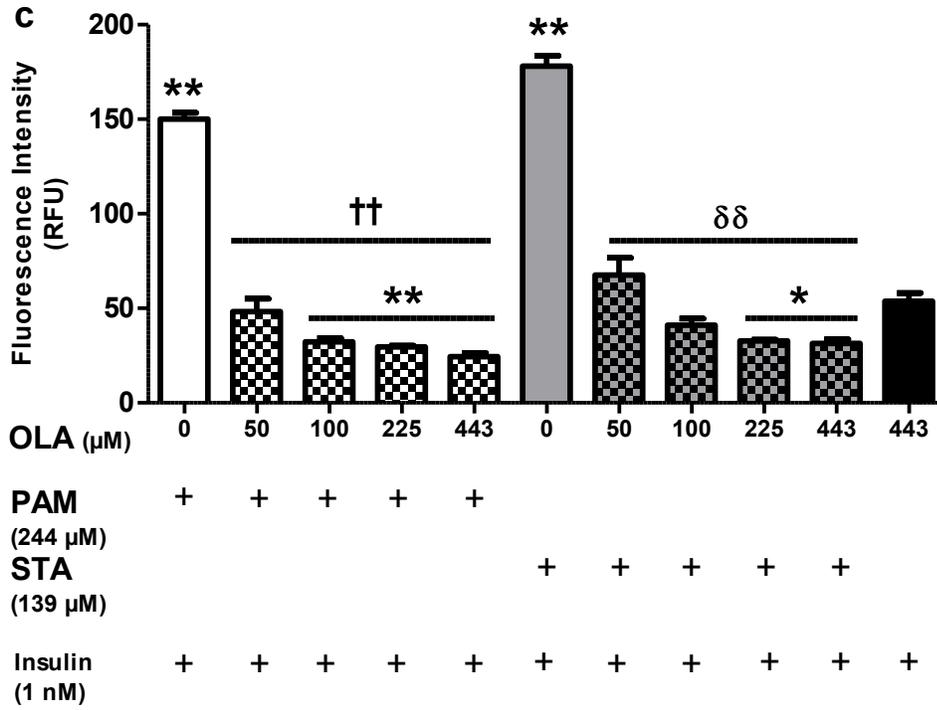


Figure 5.





3. Résultats supplémentaires

3.1 Caractérisation du phénotype des CMLV en culture

La technique utilisée pour l'isolation des CMLV à partir d'aortes de souris, décrite par JL Ray et al (113), permet normalement d'exclure tout autre type cellulaire. Cependant, puisque l'aorte contient également des CE dans son intima et des fibroblastes dans son adventice, il était primordial de s'assurer du phénotype des cellules isolées. Pour ce faire, l'expression de deux protéines spécifiques aux CML a été évaluée à l'aide de la microscopie confocale sur les cellules mises en culture. Il s'agit d' α -SMA (pour *alpha-Smooth Muscle Actin*) et de SM-22 α (aussi appelée transgéline). La figure 9 ci-dessous montre le marquage positif pour ces deux protéines, confirmant que les cellules isolées sont bien des CMLV. Les cellules maintiennent ce phénotype au moins jusqu'aux quatrième et cinquième passages, auxquels les expériences réalisées au cours de ce projet ont toutes été effectuées.

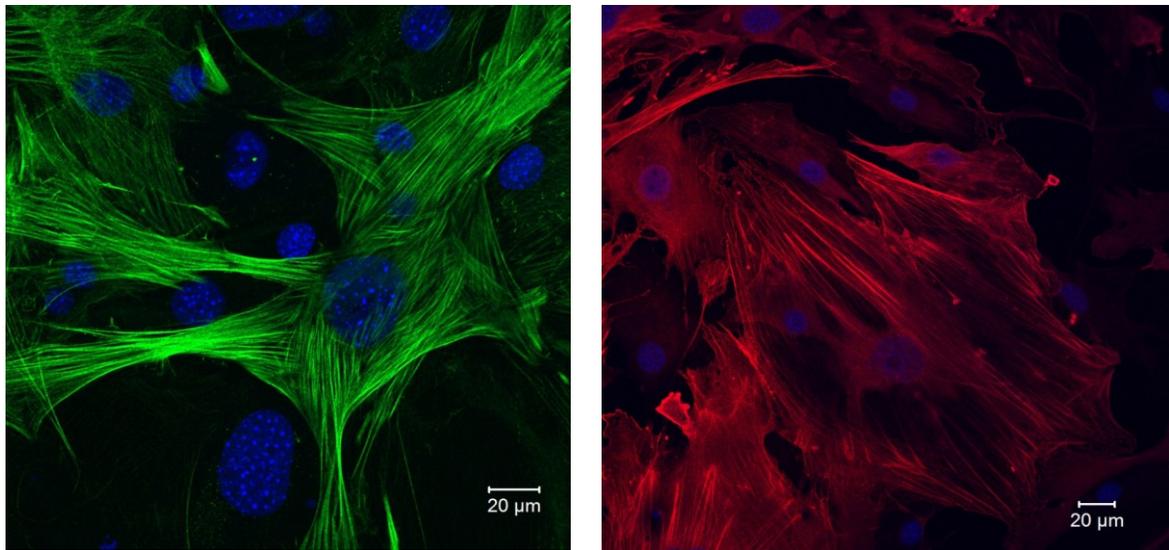


Figure 9. Confirmation du phénotype des CMLV. Des cellules isolées d'aortes de souris et mises en culture ont été marquées à passage 4 avec α -SMA (vert) et SM-22 α (rouge), de même qu'avec un marqueur nucléaire (TOPRO-3, bleu), puis visualisées en microscopie confocale. Le marquage positif confirme le phénotype musculaire lisse des cellules.

3.2 L'effet des combinaisons d'AGL sur l'activité métabolique des CMLV

Les expériences de comptes cellulaires présentées dans l'article scientifique (section 2.2.6.1) ont permis de démontrer que les combinaisons d'AGL avaient un effet inhibiteur sur la prolifération des CMLV lorsque comparées à un véhicule contenant uniquement de l'albumine de sérum bovin (contrôle de BSA). Cette inhibition a également été confirmée par une réduction de l'activité métabolique des CMLV traitées avec les combinaisons d'AGL lors d'essais MTS, tel que démontré à la figure 10 par une réduction de l'absorbance du formazan lorsque comparée au contrôle de BSA. La réduction observée était cependant significative uniquement en absence d'insuline (DV : $0,205 \pm 0,012$ et DA : $0,188 \pm 0,010$ vs BSA : $0,363 \pm 0,029$, $P < 0,0001$). Le formazan est le produit coloré quantifiable qui résulte de la réduction du MTS par les enzymes déshydrogénases retrouvées dans les cellules métaboliquement actives. De ce fait, le nombre de cellules vivantes est proportionnel à l'absorbance générée par la quantité de formazan produit.

Le kit pour réaliser les essais MTS, le *CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit*, provient de la compagnie Promega et le protocole utilisé est celui recommandé par le manufacturier. Brièvement, les CMLV ont été stimulées pendant 72 h avec les combinaisons d'AGL, avec ou sans insuline, puis elles ont été incubées pendant 1 h à 37°C avec le mélange MTS/PMS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]/phenazine methosulfate). L'absorbance à 490 nm du formazan produit a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque (Synergy Multi-Mode).

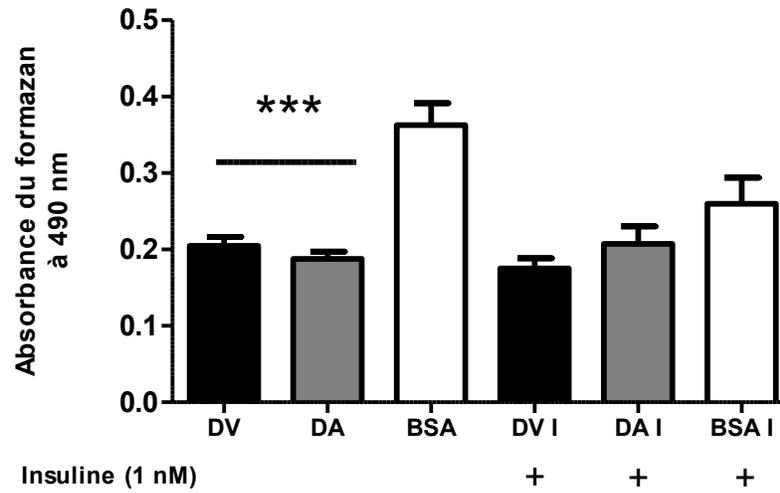


Figure 10. Effet des combinaisons d'AGL sur l'activité métabolique des CMLV. Les cellules ont été stimulées pendant 72 h soit avec la combinaison DV ou DA à 900 μ M, en présence (DV I, DA I et BSA I) ou non de 1 nM d'insuline. L'activité métabolique des cellules a été déterminée par essais MTS. Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM (pour *standard error of the mean* ou erreur type de la moyenne). Les différentes colonnes du graphique montrent l'absorbance à 490 nm du formazan produit par la réduction du MTS dans les cellules métaboliquement actives (trois expériences indépendantes en absence d'insuline et une expérience indépendante en présence d'insuline). *** $P < 0,001$ vs BSA.

4. Discussion

L'objectif principal de ces travaux de maîtrise était d'évaluer l'impact de deux combinaisons des mêmes AGL à forte concentration, combinés à des proportions différentes, sur la prolifération et la sensibilité à l'apoptose des CMLV. Les effets d'une haute dose d'insuline sur ces fonctions ont également été mesurés, afin de recréer la condition d'hyperinsulinémie retrouvée chez les patients souffrant de DT2 avec athérosclérose coronarienne.

La majorité des études s'entendent pour dire que les AGS ont un impact pro-apoptotique sur les cellules vasculaires alors que les AGMI ont quant à eux un rôle plutôt protecteur en atténuant cet effet. Toutefois, la plupart de ces recherches évaluent l'impact que d'un ou deux AGL à la fois. Peu de données existent quant aux effets de groupes complexes d'AGL, plus représentatifs de l'alimentation humaine, sur la viabilité des CMLV. Les recherches antérieures de l'équipe du Dr Jean-François Tanguay ont permis de déterminer que la composition en AGL dans une diète pouvait moduler le profil sécrétoire des adipocytes et affecter ainsi la fonctionnalité des CMLV. Ceci a été démontré à l'aide d'adipocytes provenant de souris nourries avec l'une ou l'autre des deux diètes riches en gras (DA et DV). Les adipocytes avaient été stimulés ou non *in vitro* avec de l'insuline, les surnageants avaient ensuite été récoltés pour être mis en contact avec des CMLV. Pour ce présent projet de maîtrise, nous avons voulu vérifier *in vitro* l'effet direct de deux combinaisons d'AGL (également nommées DA et DV), dont les compositions s'inspirent des diètes des précédents travaux, sur la viabilité des CMLV en présence ou non d'une forte dose d'insuline.

Ainsi, les résultats de ce projet ont permis de démontrer que la présence de groupes complexes d'AGL à une forte concentration inhibe la prolifération des CMLV en induisant leur apoptose. Nous avons également pu préciser que cette induction d'apoptose par les combinaisons d'AGL était principalement due aux AGS présents dans ces combinaisons et que l'acide oléique avait la capacité de la réduire. Nos expériences avec des AGS combinés à des doses croissantes d'acide oléique suggèrent que, sans cet AGMI, les taux d'apoptose avec les combinaisons seraient beaucoup plus élevés. Ces expériences nous ont également

permis d'établir que l'acide oléique atténuait plus fortement le taux d'apoptose des CMLV lorsque combiné aux AGS que lorsqu'il était seul, mais ce, uniquement aux ratios retrouvés dans la combinaison DA; un phénomène amplifié en condition hyperinsulinémique. Ces résultats suggèrent donc la présence d'une compétition entre les mécanismes pro-apoptotiques et anti-apoptotiques dépendante des ratios des AGL concernés et de la présence d'insuline.

Cette étude démontre pour la première fois que les proportions d'AGL de différentes classes (AGS vs AGMI) semblent toutes aussi importantes que leurs concentrations totales dans une combinaison quant à leurs effets sur la fonction vasculaire et ce, plus particulièrement en condition d'hyperinsulinémie. Ces observations pourraient avoir un impact majeur pour l'élaboration de diètes destinées aux patients diabétiques et athérosclérotiques.

4.1 La stabilité du phénotype des CMLV en culture

Avant de débiter les expériences avec les combinaisons d'AGL, il était primordial de s'assurer de la stabilité du phénotype des CMLV mises en culture. Trouver des marqueurs spécifiques aux cellules du muscle lisse n'est pas chose facile. En effet, la plupart d'entre eux peuvent être exprimés par d'autres types cellulaires sous certaines conditions physiologiques ou pathologiques. Il est donc préférable de confirmer le phénotype des CMLV à l'aide d'au moins deux marqueurs, bien que plusieurs études n'en utilisent souvent qu'un, soit l' α -SMA, le marqueur des CML le plus populaire. Or cette protéine peut également être exprimée par des fibroblastes activés (myofibroblastes) de l'adventice lors du remodelage vasculaire en cas de lésions (114, 115). Les CMLV utilisées dans mon projet proviennent d'aortes de souris saines dont l'adventice a été enlevé; il est donc peu probable qu'il y ait présence de myofibroblastes. Le marquage positif observé à la figure 9, présentée à la section 3.1, sur la majorité des cellules pour deux protéines du muscle lisse (SM-22 α et α -SMA), nous permet ainsi d'affirmer que nous sommes bel et bien en présence de CML.

SM-22 α et α -SMA sont deux protéines impliquées dans la contractilité des CML, la première dans sa régulation et la deuxième faisant partie de l'appareil de contraction. Ces protéines sont donc plus fortement exprimées parmi les CMLV en stade contractile que parmi celles en stade prolifératif (10). Une forte proportion de CMLV en stade contractile est caractéristique d'un vaisseau sanguin sain. Puisque les CMLV utilisées dans ce présent projet proviennent de souris de type sauvage en santé et que l'expression des deux marqueurs sélectionnés est maintenue, nous pouvons conclure que le phénotype des CMLV est stable, du moins jusqu'à un minimum de cinq cycles d'amplification en culture.

L'utilisation de CMLV provenant de souris de type sauvage a été sélectionnée dans un premier temps pour ce présent projet de maîtrise, afin d'obtenir tout d'abord des résultats sur un modèle sain. Cependant, à titre de suite du projet, il serait pertinent de

refaire les expériences en condition pathologique avec des CMLV isolées de souris athérosclérotiques, telles que les souris ApoE $-/-$. En effet, les CMLV présentes dans les plaques d'athérome sont retrouvées sous différents phénotypes en fonction du stade de la pathologie. Tel que décrit à la section 1.2.2.2, les CMLV de la média vont proliférer et migrer vers l'intima d'une artère pour former un cap fibreux. Les cellules sont donc dans un stade plutôt prolifératif que contractile. Selon leur stade, les CMLV n'ont pas la même fonction et n'expriment pas les mêmes protéines aux mêmes proportions. Les cellules en stade contractile expriment principalement des protéines impliquées dans la fonction de contraction, tandis que les cellules en stade prolifératif expriment plutôt des protéines de la matrice extracellulaire (10). Les CMLV de la plaque d'athérome peuvent également se transdifférencier en cellules spumeuses en phagocytant les molécules de cholestérol qui s'accumulent dans l'intima (116). Ce mélange de phénotypes présents au moment de l'isolation et de la mise en culture des CMLV pourrait moduler les résultats obtenus lors des stimulations avec les combinaisons d'AGL lorsque comparés aux résultats obtenus avec des CMLV saines principalement en stade contractile.

4.2 La préparation des combinaisons d'acides gras

4.2.1 Le choix des différents acides gras dans les combinaisons

Ce projet découle de travaux effectués précédemment dans notre laboratoire. Le profil d'AGL utilisé pour former les combinaisons testées *in vitro* s'inspire du profil d'AGL dans les diètes riches en gras ayant alors servies à nourrir les souris (voir le tableau I présenté à la section 1.5 pour le pourcentage des différents AGL dans chacune des diètes, de même que pour les pourcentages totaux en AGS, AGMI et AGPI). La majorité des AGL de la DA sont d'origine animale. Il est donc normal d'y observer une plus forte proportion en AGS que dans la DV, puisque tel que mentionné dans la section 1.4.1, les AGS sont surtout retrouvés dans la viande. Dans la DV, la majorité des AGL sont d'origine végétale, d'où le fait qu'il y ait une plus forte proportion en AGMI, puisque ceux-ci sont principalement présents dans les huiles végétales. Les ratios entre les différents AGL dans ces diètes sont très représentatifs de ceux retrouvés dans notre alimentation et dans notre organisme. En effet, les acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique sont les AGL les plus abondants dans notre régime alimentaire et donc, dans la composition lipidique du corps (117). Les pourcentages retrouvés dans le plasma de sujets sains correspondent par ailleurs très bien aux pourcentages retrouvés plus particulièrement dans la DA (acide palmitique 28 %, acide stéarique 12 %, acide oléique 35 % et acide linoléique 12 %) (118). Par sa plus forte teneur en AGS, la DA s'apparente à la diète occidentale, tandis que la DV est plutôt inspirée de la diète méditerranéenne.

Pour la confection des combinaisons d'AGL utilisées dans ce projet-ci, nous nous sommes assurés qu'elles soient les plus représentatives possible du profil retrouvé dans les diètes, en se limitant toutefois aux six AGL les plus abondants au lieu des dix présents dans les diètes (voir le tableau II présenté à la section 1.5 pour le pourcentage de chaque AGL présent dans les combinaisons, de même que leurs concentrations relatives sur un total de 900 μ M). En plus d'alléger le processus de préparation des AGL, cette sélection permettait

de faire ressortir les différences principales tout en conservant bon nombre des interactions possibles. La concentration de 900 μM a été choisie puisqu'elle correspond à une forte concentration plasmatique d'AGL, légèrement plus élevée que celles retrouvées dans le sang des patients diabétiques, sans être pour autant aussi élevée qu'une dose pharmacologique (1000-1500 μM) (119).

Puisqu'ils sont les plus abondants chez les mammifères et dans les diètes décrites dans le tableau I, la plupart des AGL à 16 et 18 atomes de carbone ont été intégrés dans les combinaisons. Bien que l'acide linoléique fasse partie de cette catégorie, nous avons décidé de l'exclure des combinaisons, car le but initial de ce projet était d'analyser les différences entre les deux combinaisons, or cet AGL est retrouvé dans la même proportion dans la DA et la DV. Les acides myristique, myristoléique et arachidique ont également été exclus étant donné leurs très faibles concentrations. Même s'il est lui aussi en assez faible proportion, l'acide arachidonique a été inclus, puisqu'il n'est présent que dans la DA. Au final, les pourcentages des AGL retrouvés dans les combinaisons sont semblables à ceux retrouvés dans les diètes. La principale différence entre les combinaisons et les diètes est le pourcentage d'AGPI totaux, qui est plus faible dans les combinaisons dû à l'absence de l'acide linoléique.

4.2.2 Les modes de solubilisation des acides gras

Les acides gras sont des molécules de nature hydrophobe étant donné leur chaîne hydrocarbonée non polaire. Ils sont donc très peu solubles dans un milieu aqueux et voir même insolubles dans le cas des AGL à longues chaînes (120). Puisque différentes façons de dissoudre les AGL sont répertoriées dans la littérature et que notre équipe n'avait jamais utilisé de telles solutions en culture cellulaire, des mises au point quant au mode de solubilisation des AGL ont d'abord dû être effectuées avant d'initier le projet.

4.2.2.1 Solubilisation dans l'éthanol

Par leur structure hydrophobe, les AGL se solubilisent bien dans les solvants organiques tels que l'éthanol. Plusieurs études publiées ont d'ailleurs utilisé l'éthanol comme agent de solubilisation des AGL (91, 100, 121-123). En plus d'être une approche simple, c'est l'un des rares solvants organiques à être non toxique pour les cellules à faible concentration. Ce fut donc le premier choix testé pour la préparation des combinaisons d'AGL. Il est cependant vite devenu évident, lors des premiers essais de prolifération des CMLV, que l'éthanol était toxique pour les cellules et interférait avec les effets des AGL. En effet, nous avons testé trois concentrations différentes des combinaisons d'AGL pour ces premiers essais, soit 300, 600 et 900 μM , de même que trois véhicules contenant seulement de l'éthanol, aux mêmes concentrations que celles retrouvées dans les combinaisons (0,3 à 0,9 % v/v). Nous avons observé une diminution de l'activité métabolique des cellules en fonction de la dose d'AGL, nous laissant croire qu'ils diminuaient la prolifération des CMLV. Cependant, une baisse similaire de l'activité métabolique était également observée en fonction de la concentration d'éthanol dans les conditions témoins. À une faible concentration d'éthanol, soit celle contenue dans une solution de 300 μM d'AGL, c'est-à-dire 0,3 % (v/v), l'activité métabolique était la même que celle en milieu de culture sans éthanol ni AGL. Par contre, elle était beaucoup plus faible aux concentrations d'éthanol contenues dans les solutions d'AGL de 600 et 900 μM , soit 0,6 et 0,9 % (v/v) respectivement. Ainsi, les résultats observés étaient dus à une toxicité de l'éthanol, dont la concentration finale dans le milieu de culture des CMLV était trois fois trop élevée pour la condition de 900 μM d'AGL envisagée pour nos essais. Il a donc fallu essayer un nouveau mode de solubilisation des AGL qui ne contiendrait pas de composé risquant d'être toxique pour les cellules.

4.2.2.2 Formation de sels d'acides gras

Une autre méthode de dissolution des AGL consiste à les intégrer dans une solution aqueuse alcaline. Ainsi, en ajoutant de l'hydroxyde de sodium (NaOH) dans de l'eau en présence des AGL, les ions Na^+ vont réagir avec le groupement carboxyle des acides gras (COO^- dans l'eau) pour former des sels d'acides gras. Ce procédé modifie la polarité des AGL, les rendant beaucoup plus faciles à dissoudre dans l'eau. Cette méthode, appelée saponification, est à la base de la fabrication du savon, en permettant d'hydrolyser des molécules de TG en présence de NaOH pour former des sels d'AGL et du glycérol (124). Différentes études évaluant les impacts des AGL sur la fonctionnalité des CMLV utilisent cette méthode pour la préparation de leurs solutions (99, 104). Donc, pour la deuxième mise au point de solubilisation, les AGL présents dans les combinaisons ont cette fois-ci été dissous dans de l'eau chauffée à 80°C contenant du NaOH 1N, avec un excès de 10 % par rapport à la concentration des AGL. L'eau chaude contribue à faciliter la solubilisation des AGL (125). Avec cette façon de procéder, il n'y avait pas de risque de toxicité de solvant pour les cellules. Pour achever la préparation des solutions des AGL en vue des expériences, ces derniers ont par la suite été complexés à la BSA.

4.2.2.3 Les acides gras complexés à l'albumine

La grande majorité des études réalisées sur les effets biologiques des acides gras utilisent des AGL complexés à l'albumine et ce, pour deux raisons principales : afin de faciliter la solubilisation des AGL en milieu aqueux et pour se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques. L'albumine, une protéine de 67 KDa, représente environ 60 % des protéines totales du sérum. Elle est donc de loin la protéine la plus abondante dans la circulation sanguine. Ces principales fonctions sont de participer à la maintenance de la pression oncotique et du pH dans le sang en plus de servir de transporteur pour diverses molécules telles que les AGL, les ions métalliques, les stéroïdes et certaines drogues. L'albumine a également des propriétés antioxydantes, puisqu'elle peut lier les espèces

réactives à l'oxygène (ROS) et également diminuer leur production en chélatant des ions métalliques (126, 127).

Ainsi, pour les deux raisons mentionnées plus haut, les AGL solubilisés dans l'eau alcaline ont immédiatement été complexés à la BSA, puis congelés. Cette série de procédures a permis de maintenir les AGL dissous dans l'eau, empêchant leur précipitation lors de la baisse de température. Puisque les AGL insaturés sont également sensibles à l'oxydation lorsqu'exposés à l'air, la lumière et la chaleur, le fait de les conserver à la noirceur dans un congélateur sous forme d'aliquots utilisés une seule fois et gardés pour une durée maximale prédéterminée permet de ralentir ce processus (128). Cette durée maximale a été fixée à une année d'après les conseils de collègues expérimentés en matière de préparation de solutions d'acides gras. Les propriétés antioxydantes de l'albumine pourraient également être utiles pour contrer l'oxydation des AGL, étant donné que cette protéine est connue pour protéger contre la lipoperoxydation des lipides membranaires (129).

Les AGL ont été complexés à l'albumine à un ratio molaire de 3,3 : 1 (AGL : BSA). En conditions physiologiques, le ratio molaire AGL : albumine est généralement entre 0,5 : 1 et 1,5 : 1; les variations étant dues à différents états métaboliques, tels que suite à un jeûne ou à un exercice. Ce ratio peut excéder 2 : 1, voir même atteindre 6 : 1 sous certaines conditions pathologiques comme c'est le cas pour les individus souffrant d'un DT2 non contrôlé (126, 130). Le ratio utilisé dans ce projet nous permet donc de recréer des conditions apparentées à celles retrouvées chez des patients diabétiques.

Il est à noter qu'il était important que chaque expérience réalisée au cours de ce projet inclue une condition témoin renfermant seulement de la BSA (non complexée aux AGL), à la même concentration que celle retrouvée dans les conditions avec les combinaisons d'AGL. Ce contrôle a permis de discriminer les effets dus à la BSA des effets liés aux AGL. En effet, la BSA est reconnue pour avoir un impact sur la viabilité des cellules, notamment par un effet pro-prolifératif sur plusieurs types cellulaires (127). Un

témoin sans BSA aurait également pu être ajouté, à titre de condition basale, mais cela n'a pas été jugé essentiel dans le cadre de ces expériences.

4.3 L'impact des acides gras sur la viabilité des CMLV

Une fois le mode de préparation des combinaisons d'AGL choisi, leur effet sur la prolifération des CMLV est le premier paramètre qui a été évalué. Dès le départ, nous avons observé une différence de prolifération au niveau du véhicule contenant la BSA entre les conditions avec et sans insuline. En effet, la prolifération des CMLV était augmentée par le véhicule contenant la BSA en présence d'insuline comparativement au véhicule sans insuline. Cette augmentation pourrait être due à l'action mitogénique combinée de la BSA et de l'insuline. Lorsque la BSA est complexée aux AGL cependant, l'impact de ceux-ci sur la prolifération des cellules n'est pas altéré puisque des études ont montré les effets pro-prolifératifs de l'acide oléique (99) et anti-prolifératifs de l'acide stéarique (94) lorsque comparés à la BSA. Du côté des combinaisons d'AGL dans notre étude, une inhibition de la prolifération a été observée lorsque comparée au véhicule. En absence d'insuline, cette inhibition était significative seulement avec la combinaison DV. En présence d'insuline, étant donné que cette hormone augmente le niveau de prolifération en présence du véhicule contenant la BSA, il devient possible de détecter un effet significatif d'inhibition de la prolifération également avec la combinaison DA. Ceci suggère que l'insuline ne contrecarre pas l'impact inhibiteur des AGL sur la prolifération des CMLV. D'ailleurs, l'effet pro-prolifératif de l'insuline seul sur les CMLV est relativement faible puisque nous avons observé seulement environ 20 % d'augmentation de la prolifération chez les cellules stimulées pendant 72 h avec des concentrations d'insuline allant de 0,5 à 5 nM comparativement aux cellules non traitées (données non présentées).

La prolifération des CMLV a également été analysée par essai MTS, qui permet de tenir compte de l'impact du traitement sur l'activité métabolique. Ici aussi nous avons vu une différence de résultats entre les véhicules + BSA, en présence ou non d'insuline. En effet, l'activité métabolique était plus élevée avec le véhicule + BSA en absence d'insuline comparativement au véhicule + BSA en présence d'insuline. Dans ce deuxième groupe, les essais MTS ont été réalisés sur les cellules provenant uniquement de deux souris différentes

alors qu'elles provenaient de six animaux dans le cas de la solution témoin de BSA sans insuline. Cette différence de « n » est simplement due au manque de temps pour réaliser un plus grand nombre d'expériences en présence d'insuline. Il est fort probable que de recommencer l'expérience en présence d'insuline pour augmenter le « n » aurait corrigé cette situation. De fait, l'albumine et l'insuline sont toutes deux connues pour leur effet prolifératif (127, 131, 132). D'ailleurs, nos essais de prolifération ont démontré un plus grand nombre de cellules en présence du véhicule + BSA et d'insuline lorsque comparé au véhicule + BSA sans insuline. Un plus grand nombre de cellules signifie en général plus d'activité métabolique. De plus, l'insuline est responsable d'augmenter le transport du glucose du milieu extracellulaire vers le cytoplasme des CMLV (52), augmentant ainsi l'activité de la glycolyse et du cycle de Krebs. Le métabolisme du glucose implique plusieurs enzymes déshydrogénases (133, 134), enzymes responsables de réduire le MTS en formazan, le produit mesurable par colorimétrie des essais MTS (135). L'insuline devrait donc augmenter la réduction du MTS et de ce fait, l'absorbance du formazan de la condition témoin dans nos essais. Puisque les résultats obtenus dans nos expériences ne vont pas dans ce sens alors que logiquement, en fonction des raisons énumérées ci-haut, ils le devraient, il a été décidé que les essais MTS ne seraient pas intégrés à l'article scientifique. Il semble plutôt plus probable que ces résultats soient un artéfact. Étant donné qu'ils ont été réalisés avec un « n » de deux souris et en une seule fois, l'expérience devrait être refaite pour vérifier cette hypothèse.

Il est à noter qu'indépendamment du glucose, de fortes concentrations d'insuline de l'ordre de 10 UI/L (UI pour unités internationales) augmentent l'activité de la pyruvate déshydrogénase (136), une enzyme impliquée dans la première étape du cycle de Krebs (134). Cependant, cette concentration est beaucoup plus élevée que celle de 1 nM, correspondant à environ 0,16 UI/L, utilisée dans le présent projet. Il est donc moins probable que l'insuline ait eu un impact direct sur la pyruvate déshydrogénase dans nos expériences d'essais MTS.

Du côté des stimulations avec les combinaisons d'AGL, l'activité était réduite comparativement aux témoins, confirmant les résultats obtenus lors des essais par comptes cellulaires. Cependant, cette baisse d'activité s'est avérée significative seulement en absence d'insuline. Ceci est dû à l'activité métabolique réduite observée avec le véhicule + BSA en condition hyperinsulinémique, diminuant ainsi l'écart avec les résultats obtenus pour les combinaisons d'AGL.

Les combinaisons utilisées dans ce projet contiennent une assez forte proportion d'AGS (43 % pour la DA et 27 % pour la DV), qui sont réputés pour causer l'apoptose d'un grand nombre de types cellulaires. Nous nous sommes donc par la suite demandés si l'inhibition de la prolifération des CMLV serait due à une augmentation des taux d'apoptose. L'activité de la caspase-3 des cellules a alors été mesurée. Cette technique a été choisie, car étant située à la toute fin de la cascade des caspases, la caspase-3 est active seulement lorsque le mécanisme d'induction de l'apoptose est déjà bien enclenché. C'est une protéine effectrice qui migre vers le noyau cellulaire pour initier la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. Elle est activée autant par la voie extrinsèque (récepteurs de mort) que par la voie intrinsèque (voie mitochondriale) de l'apoptose, laissant ainsi un grand choix de mécanismes possibles d'induction de l'apoptose par les AGL (137-139). Grâce à cette technique, nous avons montré que l'inhibition de la prolifération était effectivement corrélée à une augmentation de l'apoptose par les combinaisons d'AGL. En absence d'insuline, les taux d'apoptose entre la DA et la DV étaient similaires. En présence de l'hormone cependant, l'induction de l'apoptose était plus élevée avec la DV. Cette différence entre les deux combinaisons n'était pas reflétée par les résultats des essais de prolifération, c'est-à-dire que la prolifération des CMLV n'était pas plus fortement inhibée avec la DV.

Nous avons alors supposé que les AGL de la combinaison DV pourraient être à l'origine d'un blocage du cycle cellulaire et qu'il serait plus prononcé qu'avec la DA. Ce blocage aurait été renforcé par l'hyperinsulinémie et aurait ainsi induit plus fortement l'apoptose. Une tendance de diminution de la réplication de l'ADN (phase S du cycle

cellulaire) a été observée avec les combinaisons d'AGL, corroborant avec l'inhibition de la prolifération déterminée dans les expériences précédentes. Les résultats obtenus n'ont cependant pas été totalement concluants, car aucun n'était statistiquement significatif. Aucune différence entre l'absence et la présence d'insuline n'a été observée. Nous avons donc mis cette possibilité de côté et nous nous sommes plutôt intéressés à décortiquer l'implication de certaines composantes des combinaisons en allant vérifier l'impact de chacun des AGL sur l'induction de l'apoptose. Nous avons découvert que l'apoptose engendrée par les combinaisons d'AGL était principalement due à la présence d'AGS, autant aux concentrations retrouvées dans la DA que dans la DV et ce, avec ou sans insuline. Tel que mentionné dans la littérature, plusieurs mécanismes pourraient être à l'origine de cette induction de l'apoptose spécifique aux AGS. Ci-dessous sont décrites quelques voies potentielles par lesquelles nous pensons que les AGS pourraient agir.

4.3.1 Mécanismes potentiels d'induction de l'apoptose par les AGS

4.3.1.1 Synthèse de céramides

Les céramides sont composés d'une chaîne d'acide gras liée à une sphingosine (un alcool aminé). Ils sont le constituant de base des sphingolipides, très abondants dans la membrane plasmique. Les céramides ont donc un rôle structural, mais ils peuvent également jouer un rôle signalétique par leur présence dans le cytoplasme. Les céramides intracellulaires sont générés par différentes voies. Ils peuvent entre autres être hydrolysés des sphingolipides. La plus importante des voies, en ce qui a trait à ce projet, est leur synthèse *de novo* dans le réticulum endoplasmique par plusieurs étapes enzymatiques successives. La première étape de ce processus s'effectue par la sérine-palmitoyl transférase à l'aide d'une sérine et d'un palmitoyl-CoA. Ce dernier est la forme active de l'acide palmitique, un AGS (140, 141). Ainsi, une accumulation d'acide palmitique dans les

cellules peut amener à une accumulation de céramides cytoplasmiques, car ils ne peuvent être tous intégrés dans la membrane plasmique.

Les céramides sont associés à une induction de l'apoptose chez plusieurs types cellulaires, notamment les cardiomyocytes (108), les cellules du muscle squelettique (112) et les cellules- β du pancréas (110). Dans ces études, les hauts taux d'apoptose sont corrélés avec la présence de l'acide palmitique et des céramides lors de stimulations des cellules. L'ajout de fumonisine B1, un inhibiteur de la synthèse *de novo* des céramides, a permis de confirmer le rôle pro-apoptotique des céramides via leur synthèse à partir de l'acide palmitique. Le ou les mécanismes par lesquels les céramides induisent l'apoptose ne sont cependant pas encore très bien connus. Il se pourrait, selon certaines études, que ce soit via l'augmentation du stress oxydatif (141).

Pour déterminer si l'augmentation des taux d'apoptose par les combinaisons d'AGL utilisées dans mon projet était due à l'augmentation de la synthèse *de novo* des céramides, les concentrations cytoplasmiques des céramides dans les CMLV stimulées pourraient être évaluées à l'aide de la spectrométrie de masse. La fumonisine B1 pourrait aussi être ajoutée aux combinaisons pour pouvoir confirmer cette hypothèse.

4.3.1.2 Impact sur les cardiolipines

Découvertes pour la première fois dans un cœur de bœuf, d'où elles tirent leur nom, les cardiolipines (CL) sont des phospholipides composés de quatre chaînes d'acides gras. Elles sont retrouvées presque exclusivement dans la membrane interne et aux sites de jonction entre les membranes interne et externe des mitochondries. En plus d'un rôle structural, les CL ont d'autres fonctions. En effet, plusieurs complexes de la chaîne de respiration mitochondriale, responsables de la production d'énergie sous forme d'ATP, ont besoin d'être associés aux CL pour maintenir leurs fonctions enzymatiques et leurs conformations (142). Les CL sont aussi associées à des mécanismes apoptotiques par leur liaison avec le cytochrome c. En temps normal, cette protéine située en périphérie de la

membrane interne mitochondriale a pour rôle de transférer les électrons entre les complexes III et IV de la chaîne de respiration. Cependant, lorsqu'il est relâché dans le cytosol suite à différents stimuli, le cytochrome c est impliqué dans la voie apoptotique en formant un apoptosome avec la caspase-9 et Apaf-1 (pour *Apoptosis-protease activating factor 1*) qui activera à son tour la caspase-3 (143). Puisque le cytochrome c est lié aux CL, il doit nécessairement s'en détacher afin de pouvoir être relâché dans le cytoplasme.

Certaines études ont démontré qu'il existait un lien entre la quantité de CL présents dans les membranes mitochondriales et la relâche du cytochrome c dans le cytosol. Moins il y avait de CL, plus le cytochrome c était relâché. Elles ont également mis en évidence que la diminution du contenu lipidique des membranes sous forme de CL était induite par une stimulation des cellules avec de l'acide palmitique (144-146). Une de ces études a même observé que l'ajout de CL exogènes aux mitochondries des cellules diminuait la relâche de cytochrome c causée par l'acide palmitique (146).

Afin de vérifier si la proportion des CL est diminuée dans les membranes des mitochondries lorsque les CMLV sont stimulées avec les combinaisons d'AGL et d'évaluer si ceci contribue à l'induction de l'apoptose, nous pourrions aller vérifier la quantité de cardiolipines par chromatographie sur couche mince. Parallèlement, la présence de cytochrome c dans le cytosol des cellules pourrait être évaluée par immunobuvardage de type Western.

4.3.1.3 Impact sur la perméabilité des mitochondries

Le gonflement extrême des mitochondries est une des étapes de l'apoptose. Cette particularité est due à l'augmentation de la perméabilité de la membrane interne mitochondriale, appelée mPT (pour *mitochondrial Permeability Transition*), par la formation d'un pore (*mPTP*) laissant passer librement l'eau, de petites molécules et des ions. La mPT cause une altération du potentiel membranaire des mitochondries, lesquelles deviennent alors inaptes à produire de l'ATP. Cette incapacité, combinée à la relâche du

cytochrome c via le mPTP, entraîne la mort des cellules (147). Ainsi, une autre façon pour les AGS d'induire l'apoptose serait en favorisant l'ouverture du mPTP, tel que démontré dans certaines études par un potentiel de membrane déclinant lorsque les cellules sont traitées avec de l'acide palmitique (145, 146, 148).

Pour ce projet-ci, le potentiel membranaire des mitochondries des CMLV stimulées avec les combinaisons pourrait être mesuré par cytométrie en flux grâce à la sonde JC-1, afin de voir si les AGL ont un impact sur la mPT. Cette sonde est une molécule lipophile portant une charge positive qui peut pénétrer librement les mitochondries dont le potentiel membranaire (négatif) n'est pas aboli. En formant des agrégats dans la matrice mitochondriale, elle fluoresce dans le rouge. La sonde ne peut pas aller dans les mitochondries avec un potentiel de membrane perturbé, tel que retrouvé dans les cellules apoptotiques, et elle s'accumule alors dans le cytoplasme sous forme de monomères et fluoresce dans le vert (149).

4.3.1.4 Génération de ROS

Le stress oxydatif se produit lorsqu'il y a un déséquilibre entre la production de ROS et les défenses antioxydantes. Cela peut être parce que la production de ROS est augmentée ou parce que les défenses antioxydantes sont affaiblies ou encore, un mélange des deux. Le stress oxydatif est associé à des dommages cellulaires induisant bien souvent l'apoptose dans plusieurs pathologies, notamment les MCV, le DT2 et les maladies neurodégénératives. Une grande proportion des ROS, surtout les superoxydes (O_2^-), sont générées par les mitochondries. Dans ces dernières, les O_2^- sont principalement produits à travers la chaîne de transport d'électrons (la chaîne de respiration) (150). Ils sont déversés dans la matrice mitochondriale et dans l'espace intermembranaire. Mis à part les mitochondries, une autre source principale d' O_2^- est la NADPH oxydase. Cette enzyme est située dans la membrane plasmique et est responsable de la production cytoplasmique d' O_2^- . Les O_2^- générés sont rapidement transformés en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) puis

dégradés par des catalases en eau et en oxygène lorsqu'ils sont produits à une concentration normale (150). Des concentrations trop élevées de H_2O_2 , dues à une surproduction d' O_2^- , sont toutefois néfastes et causent l'apoptose des cellules telles que les CMLV (151).

L'acide palmitique est connu pour augmenter la production des ROS dans les cellules vasculaires (152) et les cellules du muscle squelettique (153). L'étude sur ce dernier type cellulaire a par ailleurs démontré que cet AGS induisait la production d' O_2^- via la chaîne de transport d'électrons mitochondriale et via l'activation de la NADPH oxydase. Comme mentionné à la section 4.3.1.1, la production de ROS pourrait aussi être due à l'augmentation des céramides par les AGS (141, 150).

Afin de vérifier si les stimulations des CMLV avec les combinaisons d'AGL augmentent la production de ROS, nous pourrions incuber les cellules avec du DCFH-DA, puis visualiser les résultats par cytométrie en flux (154). Cette sonde fluorescente réagit surtout avec le H_2O_2 et un peu avec l' O_2^- . Pour savoir si la production de ROS est liée à l'induction de l'apoptose des CMLV, nous pourrions inclure dans nos stimulations un inhibiteur de la NADPH oxydase (du DPI, pour diphénylène iodonium) puis aller mesurer l'activité de la caspase-3 (153, 155). Pour s'assurer que l'apoptose causée par les ROS soit due particulièrement aux AGS, il faudrait bien sûr faire des stimulations avec chacun des AGL de façon individuelle, car les ROS peuvent être produits aussi par d'autres types d'AGL. Étant donné leur sensibilité à la lipoperoxydation, les AGPI sont en effet susceptibles de pouvoir entraîner la génération de ROS (150).

4.3.1.5 Effets sur les transporteurs des AGL

Lorsque l'expression et la translocation des transporteurs d'AGL à la surface des cellules sont augmentées, les AGL peuvent être présents en plus forte concentration dans le cytoplasme et mener à une induction de l'apoptose. Dans les travaux précédemment réalisés dans notre laboratoire, une augmentation de l'expression de l'ARNm du CD36 a été observée chez les CMLV stimulées avec des surnageants d'adipocytes provenant des

souris nourries avec les diètes riches en gras. À la suite de ces résultats, il est possible d'envisager que l'apoptose accrue chez les CMLV stimulées avec des combinaisons d'AGL puisse être liée à l'augmentation de l'expression des transporteurs d'AGL.

L'expression des transporteurs d'AGL est régulée par les PPAR (pour *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) (80). Les PPAR sont des facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides. Ils sont également impliqués dans la régulation de mécanismes anti-inflammatoires et dans les tonus et remodelage vasculaires. Ils existent trois classes de PPAR (PPAR α , PPAR γ et PPAR β/δ), lesquelles sont toutes exprimées par les CMLV. Les ligands endogènes connus des PPAR sont les AGL insaturés, principalement les AGPI, et les phospholipides oxydés pour PPAR α et les écosanoïdes pour PPAR γ (156, 157). Ainsi, en fonction de ces assertions, les AGS ne semblent pas impliqués dans l'activation des PPAR et l'augmentation subséquente de l'expression des transporteurs des AGL.

Si nous observions une augmentation de l'expression des transporteurs des AGL, tels que le CD36 et les FATP, chez les CMLV suite à une stimulation avec les combinaisons d'AGL, il est probable que ce serait dû aux AGPI ou aux AGMI. Afin de le savoir, il nous faudrait analyser l'expression de l'ARNm du CD36 et des FATP par qPCR (PCR quantitatif) ainsi que leur expression à la surface des cellules par cytométrie en flux chez les CMLV traitées avec chaque AGL présent dans les combinaisons.

4.3.2 Mécanisme protecteur potentiel de l'acide oléique

En plus de constater l'impact prépondérant des AGS sur l'apoptose des CMLV, nous avons également remarqué que les taux de cette dernière étaient beaucoup plus élevés avec les AGL individuels qu'avec les combinaisons DA et DV. Nous avons donc supposé qu'il y avait présence d'un ou plusieurs AGL ayant un effet protecteur sur la viabilité des cellules. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons stimulé les CMLV avec l'un et l'autre des deux AGS présents dans les combinaisons, soit l'acide palmitique et l'acide stéarique,

seuls ou combinés avec des doses croissantes d'acide oléique. Les concentrations utilisées pour les AGS et pour les doses maximales d'acide oléique étaient celles retrouvées dans les combinaisons DA et DV. L'acide oléique a été choisi, puisqu'il est connu pour son action anti-apoptotique, tel que décrit dans la section 1.4.4, et qu'il est l'AGL le plus abondant dans les combinaisons. Suite aux stimulations, nous avons observé que l'acide oléique atténuait les taux d'apoptose engendrés par les AGS de façon dose dépendante, pour toutes les conditions testées. Un mécanisme possible par lequel l'acide oléique pourrait inhiber les actions néfastes des AGS est décrit dans la prochaine section.

4.3.2.1 Emmagasinage des AG sous forme de vésicules de triglycérides

Lorsque les AGL pénètrent dans les cellules, plusieurs voies d'utilisation sont possibles. Ils peuvent être impliqués dans la synthèse des lipides membranaires, ou encore dans la synthèse des écosanoïdes dans le cas de l'acide arachidonique. Ils peuvent également être dirigés vers les mitochondries pour la production d'ATP via la β -oxydation. Les AGL qui ne sont pas utilisés immédiatement sont emmagasinés sous forme de vésicules de TG à titre de réserve. Tel que décrit dans l'introduction, l'emmagasinage de TG est la fonction première des adipocytes dans le tissu adipeux. Ce n'est cependant pas le cas pour les autres types cellulaires, qui peuvent toutefois emmagasiner les TG lorsqu'ils reçoivent de grandes quantités d'AGL dues aux concentrations plasmatiques élevées. Leur capacité à les entreposer est par contre beaucoup plus limitée que chez les adipocytes. Sous forme de vésicules de TG, les AGL sont neutres, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas métabolisés sous leur forme active d'acyl-CoA et ne peuvent donc pas jouer leur rôle négatif sur les fonctions cellulaires. Ceci pourrait être vu comme un mécanisme protecteur visant à empêcher jusqu'à une certaine mesure la lipotoxicité engendrée par de fortes concentrations d'AGL.

Des études ont démontré que l'acide oléique est préférentiellement entreposé sous forme de vésicules de TG plutôt que métabolisé. Les AGS ne suivent pas cette voie et sont

donc libres d'exercer leurs effets toxiques. Ces mêmes études ont également observé que la combinaison de l'acide oléique avec un AGS favorisait l'internalisation de ce dernier dans les vésicules de TG et qu'il y avait une corrélation inverse entre la lipotoxicité des AGL et le degré d'emmagasiner (94, 158, 159). Ainsi une partie des effets bénéfiques de l'acide oléique semblerait être due au fait qu'il diminue le métabolisme des AGS par leur entreposage sous forme neutre. Nous pourrions vérifier si l'atténuation de l'apoptose par l'acide oléique est due à l'entreposage des AGS sous forme de vésicules de TG lors des stimulations des CMLV avec ces AGL. Il faudrait faire pour cela une coloration à l'huile rouge (*Oil Red O*, qui marque les lipides neutres) pour visualiser la quantité de vésicules. Nous pourrions également utiliser la chromatographie sur couche mince ou la chromatographie gazeuse pour identifier les AGL présents dans les TG de ces vésicules.

4.3.3 Compétition entre mécanismes anti- et pro-apoptotiques

En découvrant que l'acide oléique atténuait l'apoptose induite par les AGS chez les CMLV, nous avons également observé un phénomène surprenant. En effet, il est apparu que l'acide oléique inhibait plus fortement l'apoptose des CMLV lorsque combiné à un AGS que lorsqu'il était seul, mais uniquement aux concentrations retrouvées dans la DA. Ce phénomène n'était pas présent aux concentrations retrouvées dans la DV. Les observations rapportées ci-dessus et à la section 4.3.2 suggèrent non seulement qu'il existe une compétition entre les mécanismes pro-apoptotiques des AGS et les mécanismes anti-apoptotiques de l'acide oléique mais que ce phénomène semble être modulé en fonction des concentrations relatives de ces AGL. La conversion des AGS en acide oléique par l'action d'élongases et de désaturases à l'intérieur des cellules pourrait contribuer à expliquer que la compétition soit modulée selon le ratio AGS : acide oléique et qu'ainsi une stimulation avec l'acide oléique soit plus efficace pour réduire le taux d'apoptose en présence d'un AGS que lorsqu'il est seul (78, 94). En effet, en fonction de la concentration de l'AGS, il y aura une plus ou moins grande conversion en acide oléique, ce dernier venant s'ajouter à l'acide oléique déjà présent lors de la stimulation.

Nous pourrions penser que la compétition entre les mécanismes se joue au niveau de l'absorption des AGL, c'est-à-dire que l'acide oléique empêcherait les AGS de pénétrer dans les cellules. Une étude publiée en 2011 a cependant démontré que l'acide oléique ne diminue pas l'absorption de l'acide palmitique lors d'une stimulation sur des myoblastes du muscle squelettique de souris (160). La compétition entre les AGL a donc lieu à l'intérieur des cellules et elle agit probablement entre les taux de production des métabolites des AGS et les taux d'emmagasinage des AGS dans les vésicules de TG via l'acide oléique.

Le fait que l'acide oléique combiné à un AGS atténue plus fortement l'apoptose des CMLV que l'acide oléique seul et ce, seulement à certaines concentrations, semble indiquer que cet aspect bénéfique est optimal sous certains ratios. Aux concentrations de la DA, cette atténuation était significative seulement lorsque l'acide palmitique (244 μM) était combiné à la plus forte dose d'acide oléique (443 μM), soit lorsqu'il y avait presque deux fois plus (1,82 fois plus) d'acide oléique que d'acide palmitique. En présence d'acide stéarique, ce ratio était presque égalé lorsqu'il était combiné avec 225 μM d'acide oléique (1,62 fois plus d'acide oléique). Nous pourrions donc nous attendre à ce que l'atténuation soit significative sous cette condition. Cependant, puisqu'initialement l'acide stéarique induit un taux d'apoptose plus élevé que l'acide palmitique, il se peut qu'un ratio plus élevé soit nécessaire pour reproduire cette inhibition. Ainsi à un ratio de 3 : 1, lorsque l'acide stéarique était combiné à 443 μM d'acide oléique, l'induction de l'apoptose était plus faible que pour l'acide oléique seul sans toutefois être significative. Il en manquait par contre vraiment très peu pour qu'elle le soit.

Aux concentrations de la DV, un effet significatif d'atténuation plus forte lorsqu'un AGS était combiné avec l'acide oléique n'a pas été obtenu même si une tendance à la baisse a été observée aux doses d'acide oléique les plus fortes. Il est à noter que le taux d'apoptose des CMLV stimulées avec l'acide oléique seul à la concentration retrouvée dans la DV (650 μM) était plus faible que celui des cellules stimulées avec cet AGL à la concentration retrouvée dans la DA (443 μM). Il pourrait alors être plus difficile de réduire ce taux d'apoptose déjà très bas, qui semble près du seuil minimal d'apoptose qui peut être

attribué aux AGL, en combinant les AGS à l'acide oléique. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'effet semble plus important aux concentrations de la DA. Cela fait également ressortir l'importance des AGMI dans la combinaison DA, qui très riche en AGS néfastes.

4.3.3.1 Effets de l'hyperinsulinémie

En présence d'insuline, les taux d'apoptose observés avec l'acide oléique étaient plus faibles comparativement aux taux obtenus en absence d'insuline. L'acide oléique et l'insuline pourraient agir ensemble pour diminuer ces taux. L'effet combiné des deux molécules s'est transposé dans une plus grande inhibition de l'apoptose des CMLV lorsque l'acide oléique était combiné aux AGS comparée à l'acide oléique seul aux concentrations de la DA, avec des résultats significatifs à partir de ratios plus faibles. L'effet a été cette fois-ci observé autant avec l'acide palmitique qu'avec l'acide stéarique et à partir de doses plus faibles d'acide oléique (100 μ M avec l'acide palmitique et 225 μ M avec l'acide stéarique).

Il a été démontré maintes fois que les AGS désensibilisent les cellules en réponse à l'insuline en altérant ses voies de signalisation. En effet, l'acide palmitique a la capacité d'inhiber la voie de PI3K lorsque l'insuline se lie à son récepteur dans les cellules vasculaires et les cellules du muscle squelettique (91, 160, 161). L'acide oléique pour sa part peut restaurer la sensibilité des cellules à l'insuline en levant cette inhibition (160). La voie de signalisation de PI3K est généralement associée à la voie anti-athérogénique de l'insuline chez les cellules vasculaires. Elle est responsable chez les CMLV d'induire le transport du glucose et un stade contractile bien différencié (52). Dans cette condition, les cellules étant plus fonctionnelles, l'acide oléique pourrait être plus efficace pour promouvoir l'internalisation des AGS dans des vésicules de TG. D'un autre côté, il est connu que l'insuline augmente la translocation du CD36 à la surface des cellules, générant ainsi un plus grand apport en AGL à l'intérieur des cellules (80). Nous ne pensons pas que cela pourrait avoir un impact différent sur l'absorption de l'acide oléique lorsque comparée

à celle des AGS, puisqu'il a déjà été démontré que le CD36 n'a pas de préférence de liaison pour des AGL spécifiques (162). Néanmoins, en tant qu'hormone anabolique, l'insuline est également connue pour diminuer la β -oxydation de l'acide palmitique et pour augmenter son estérification en TG chez les cardiomyocytes (163). Ainsi, il semble plus probable que l'acide oléique soit plus efficace en présence d'insuline chez les CMLV dû à la promotion combinée de l'intégration des AGS dans les vésicules de TG plutôt que par une absorption préférentielle de l'acide oléique.

Toutes les observations mentionnées dans la section 4.3.3 pourraient expliquer la différence significative des taux d'apoptose chez les CMLV entre les combinaisons DV et DA en condition hyperinsulinémique obtenue lors des premiers essais caspase-3 (section 2.2.13, figure 2b). Il est à noter cependant que ces résultats n'ont pas été confirmés lors des essais avec les AGL individuels, dans lesquels les combinaisons étaient incluses à titre de comparaison. Ceci peut être expliqué par le fait que dans les essais initiaux, toutes les conditions ont été testées en même temps, avec le même contrôle de BSA utilisé pour comparer les deux combinaisons d'AGL en absence d'insuline et le même contrôle de BSA utilisé pour comparer les deux combinaisons en présence d'insuline. Les autres essais caspase-3, représentés à la section 2.2.13 figure 4, ont tous été réalisés séparément, c'est-à-dire un essai pour chaque lettre de la figure. Cela signifie que chaque essai avait son propre véhicule + BSA pour la comparaison avec la combinaison d'AGL testée. Les taux d'activité caspase-3 devraient être similaires pour tous ces contrôles puisqu'ils avaient tous la même concentration de BSA et, si applicable, la même concentration d'insuline. Cependant, nous avons observé une forte variation pour les véhicules + BSA avec insuline entre l'essai avec la combinaison DA plus insuline (section 2.2.13 figure 4c) et l'essai avec la combinaison DV plus insuline (section 2.2.13 figure 4d). L'activité caspase-3 du véhicule + BSA était beaucoup plus faible dans l'essai avec la combinaison DA, rendant ainsi difficile la comparaison des résultats entre les combinaisons DA et DV en condition d'hyperinsulinémie. Il serait donc important, dans une suite du projet, de refaire d'autres essais caspase-3 avec les CMLV stimulées avec les combinaisons d'AGL en présence ou

non d'insuline, mais cette fois-ci avec toutes les conditions testées en même temps pour éviter les variations entre les contrôles.

4.3.4 Effets des autres AGMI et AGPI

Mis à part les AGS et l'acide oléique, les combinaisons utilisées dans ce projet de maîtrise contenaient d'autres AGL, c'est-à-dire les acides palmitoléique, linoléique et arachidonique. Ces AGL étaient présents en beaucoup plus faibles proportions que les précédents, mais chacun pourrait avoir un impact sur la viabilité des CMLV. L'acide palmitoléique par exemple peut atténuer l'apoptose induite par les AGS en réduisant l'activation des protéines pro-apoptotiques PUMA et Bim et en réduisant le stress du réticulum endoplasmique (RE) (111, 164). Il aurait été intéressant d'aller vérifier si cet AGMI peut agir au même titre que l'acide oléique dans les combinaisons d'AGL en stimulant les CMLV avec des duos d'acide palmitique ou stéarique et d'acide palmitoléique aux concentrations retrouvées dans la DA et la DV. Il est toutefois possible que la concentration d'acide palmitoléique dans la DV soit trop faible pour avoir un quelconque effet sur les cellules. En effet, la concentration de cet AGL dans la DV est de seulement 1,8 μM , alors qu'elle varie entre 200 et 400 μM dans les études mentionnées ci-haut (111, 164).

Les AGPI oméga-3, tels que l'acide linoléique, sont reconnus pour leurs actions bénéfiques sur la santé vasculaire comme mentionné dans la section 1.4. Des études ont démontré que l'acide alpha-linolénique (l'isoforme présente dans nos combinaisons d'AGL) diminue les effets pro-apoptiques des acides palmitique et stéarique en réduisant le stress du RE chez les hépatocytes (165, 166) et les cellules de rein (164). Ce stress du RE, qui cause entre autre des problèmes dans l'assemblage des protéines, peut d'ailleurs être dû à la production de ROS induite par les AGS (167). L'acide oléique est un autre AGL qui peut diminuer le stress du RE (160), puisqu'il internalise les AGS sous forme neutre de TG, empêchant leurs effets néfastes. Il serait donc intéressant de déterminer si les acides

palmitoléique et linoléique pourraient augmenter l'entreposage des AGS dans des vésicules de TG, au même titre que l'acide oléique.

Dans nos résultats obtenus avec les stimulations des CMLV avec chacun des AGL en absence d'insuline, aucune induction significative d'apoptose avec l'acide linoléique n'a été observée. À la concentration retrouvée dans la DA, l'acide linoléique avait un taux d'apoptose similaire à celui de son véhicule + BSA. Pour la concentration retrouvée dans la DV, le taux d'apoptose était même plus faible que celui de son véhicule + BSA, corroborant avec les effets anti-apoptiques de cet AGL discutés ci-haut. Un faible taux d'apoptose était cependant détectable en présence d'insuline. Les AGPI étant particulièrement sensibles à l'oxydation, il est possible qu'en présence d'une forte dose d'insuline ils soient plus facilement oxydés, augmentant ainsi les taux d'apoptose. Ceci est cependant une hypothèse, puisqu'à notre connaissance, aucune étude n'a jamais été publiée concernant les liens pouvant exister entre l'insuline et l'oxydation des AGPI.

Les AGPI oméga-6 montrent quant à eux plutôt des effets néfastes chez les cellules vasculaires. Selon une étude réalisée chez des CMLV, l'acide arachidonique cause l'apoptose des cellules via ses produits d'oxydation (106). Dans nos combinaisons d'AGL, cet AGPI est présent seulement dans la DA et nous pourrions donc nous attendre à ce qu'il augmente le taux d'apoptose engendré par une stimulation avec cette combinaison. Cependant, dans l'étude mentionnée ci-dessus, la concentration d'acide arachidonique utilisée était de 50 μM . Les investigateurs ont également remarqué que la diminution de la viabilité des cellules, démontrée par une baisse d'incorporation de thymidine [^3H] lors de la synthèse d'ADN, était initiée à partir d'une concentration minimale de 20 μM avec cet AGL (23 % de diminution de l'incorporation de thymidine [^3H] comparativement à la condition contrôle). L'effet était cependant beaucoup plus important à une concentration de 50 μM , avec une diminution de 92 % de l'incorporation de thymidine [^3H] lorsque comparée à la condition contrôle (106). La concentration d'acide arachidonique dans la combinaison DA était de 17,1 μM . Cette concentration, assez éloignée de celle de 50 μM utilisée dans l'étude décrite ci-haut, est possiblement trop faible pour avoir un impact sur le

taux d'apoptose lié à la DA et pour créer ainsi une différence avec la combinaison DV qui ne renferme pas d'acide arachidonique.

4.4 La variation des résultats entre les travaux *in vitro* et *in vivo*

Pour faire un bref rappel, nous avons émis en début de projet l'hypothèse qu'en condition hyperinsulinémique la combinaison d'AGL la plus riche en AGS (la DA) induirait plus fortement l'apoptose des CMLV que la combinaison la plus riche en AGMI (la DV). Cette hypothèse avait été formulée suite aux résultats obtenus dans les travaux précédemment réalisés au laboratoire. Dans ceux-ci, le taux d'apoptose des CMLV était plus élevé lorsqu'elles avaient été stimulées avec des surnageants d'adipocytes provenant de souris nourries avec la DA comparativement avec la DV. Cette différence était augmentée par une stimulation des adipocytes avec une forte concentration d'insuline.

Dans le cadre des travaux effectués pour ce projet de maîtrise, la combinaison DA ne semblait pas plus néfaste que la DV et nous avons plutôt obtenu une apoptose plus fortement induite chez les CMLV stimulées avec la combinaison DV en condition hyperinsulinémique. Cette différence peut s'expliquer par le fait que mon projet de maîtrise était réalisé *in vitro* uniquement, tandis que le projet précédent renfermait une partie *in vivo*. Les expériences *in vitro* impliquent un système plus simple, dont l'environnement est strictement contrôlé par l'investigateur. Ainsi, nous savions les concentrations exactes d'AGL que contenait le milieu de stimulation des cellules. Les expériences réalisées en partie *in vivo* sont plus complexes puisqu'elles incluent plusieurs systèmes à la fois. Dans nos travaux précédents, le tissu adipeux des souris était conditionné *in vivo* en maintenant les souris pendant vingt semaines sur l'une ou l'autre des diètes riches en gras, entraînant des altérations métaboliques importantes menant au développement du DT2 (168). Les adipocytes étaient ensuite isolés, stimulés ou non avec de l'insuline, puis les surnageants étaient récoltés pour obtenir un milieu conditionné pour les stimulations des CMLV. Ce milieu de stimulation contenait plusieurs facteurs relâchés par les adipocytes, appelés adipokines. Ainsi, les AGL, mais aussi d'autres molécules pouvaient moduler la réponse

des CMLV dans cette étude. Tous ces facteurs étaient susceptibles d'influencer la viabilité des cellules.

4.4.1 La présence d'hormones et de cytokines *in vivo*

4.4.1.1 Adiponectine et leptine

Le tissu adipeux a une fonction endocrine. Différentes hormones sont donc produites et sécrétées par les adipocytes. Parmi celles-ci se retrouve l'adiponectine, associée à des effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline et à une fonction anti-athérogénique grâce à un rôle anti-inflammatoire. Elle a effectivement la capacité d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-6, entraînant une réduction de l'activité de NF- κ B. Cette inhibition favorise la diminution de l'expression de molécules d'adhérence à la surface des CE (169). Il a également été démontré que l'adiponectine inhibe l'apoptose des CE induite par l'acide palmitique en réduisant la production de ROS (170). Les taux d'adiponectine sont cependant plus faibles chez les obèses et les gens atteints de DT2 (169). Les souris nourries avec les diètes riches en gras dans les travaux de notre laboratoire étaient obèses et diabétiques et avaient des taux réduits d'adiponectine lorsque comparés aux souris nourries avec une diète normale. Il est tout de même possible, même à faibles taux, que l'adiponectine présente dans les surnageants des adipocytes des groupes DA et DV utilisés pour stimuler les CMLV ait eu un impact anti-apoptotique.

Les adipocytes sécrètent aussi de la leptine, un produit du gène *ob* (pour *obesity*), dont le rôle principal est de réguler la sensation d'appétit. Des concentrations plasmatiques élevées de cette adipokine sont directement corrélées à l'augmentation de la masse du tissu adipeux. Au contraire de l'adiponectine, la leptine a plutôt un rôle pro-inflammatoire et donc pro-athérogénique (169). L'hyperleptinémie est associée entre autres à une dysfonction endothéliale, une augmentation de la production de ROS et à l'augmentation de

la prolifération des CMLV (171). Les souris nourries avec la DA et la DV étaient obèses et leurs taux de leptine étaient fortement augmentés lorsque comparés aux souris nourries avec une diète normale, pouvant ainsi affecter les fonctions des CMLV.

4.4.1.2 Cytokines pro-inflammatoires

Tel que décrit dans l'introduction à la section 1.3.2, les obèses présentent une inflammation chronique du tissu adipeux. Cette inflammation s'accompagne d'une sécrétion élevée de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α et l'IL-6, par les adipocytes et les macrophages. Ces cytokines influencent la production de l'adiponectine et de la leptine, en la diminuant pour la première et en l'augmentant pour la deuxième (24). Chez les CMLV, le TNF- α n'a pas tendance à induire l'apoptose lorsqu'il est seul puisqu'il active la voie de survie via NF- κ B (104, 172). Cependant, lorsqu'il est combiné à d'autres molécules telles que l'acide palmitique, l'apoptose est induite à des niveaux plus élevés que pour chacun des deux composés seuls (104).

Dans notre étude précédente, les adipocytes ont été séparés des macrophages présents dans le tissu adipeux des souris. Cependant, puisque les macrophages sont une importante source de TNF- α (41), il est possible que les concentrations de cette cytokine dans le surnageant des adipocytes n'aient pas été très élevées, résultant en un impact limité sur l'induction de l'apoptose des CMLV stimulées. Puisque les adipocytes des souris obèses et diabétiques sécrétaient aussi des AGL, l'effet pro-apoptotique des surnageants était dû en grande partie à ces molécules. Leur nature et leur quantité étaient probablement influencées par les diètes ingérées par les souris et par la fonctionnalité des adipocytes. Les adipocytes des souris nourries avec la DA étaient plus hypertrophiés que ceux des souris nourries avec la DV, les rendant plus dysfonctionnels. Les adipocytes hypertrophiés et dysfonctionnels ont une capacité réduite à emmagasiner les TG comparativement aux adipocytes normaux, puisqu'ils sécrètent des adipokines pro-inflammatoires altérant cette

fonction et que leur capacité maximale d'emmagasiner a également déjà été atteinte. En conséquence, il est possible que leur taux de lipolyse ait été augmenté (41).

Tous les facteurs mentionnés ci-dessus, à différentes concentrations selon les conditions, pouvaient donc influencer les variations des taux d'apoptose des CMLV stimulées avec les surnageants d'adipocytes des souris alimentées avec la DA ou la DV. Mon projet a permis d'évaluer l'impact des AGL sans l'intervention des autres molécules puisqu'elles n'étaient pas présentes dans le milieu de stimulation.

4.4.2 La différence de ratios des AGL

Une autre des raisons qui pourrait faire que les résultats divergent entre l'étude *in vivo* et celle *in vitro* est la différence de ratios des AGL présents dans le milieu de stimulation des CMLV. Les ratios des AGL dans les combinaisons utilisées dans ce projet étaient basés sur ceux retrouvés dans les diètes ayant servi à nourrir les souris du précédent projet. Ces ratios ne correspondaient cependant pas forcément à ceux résultant du métabolisme des AGL *in vivo* avant les expérimentations sur les CMLV. Effectivement, les AGL présents dans les diètes ont dû subir tout le processus de digestion, absorption dans l'intestin, transport vers le tissu adipeux et relâche par les adipocytes avant que le surnageant ne soit récolté et mis en contact avec les CMLV. Le ratio d'AGL relâchés était donc directement dépendant de l'activité des adipocytes, fortement influencée par l'obésité et l'état diabétique, et pouvait ainsi être très différent du ratio des AGL ingérés initialement. Bien que la composition en acides gras des TG entreposés dans les adipocytes soit relativement très similaire à celle retrouvée dans une diète, certaines évidences suggèrent que la lipolyse des TG et la relâche des AGL par les adipocytes soient un peu plus sélectives. Des études démontrent en effet que le ratio d'AGL sécrétés n'est pas toujours représentatif de la composition en AG dans les TG (173-177). Il varie en fonction de la longueur de la chaîne et du degré d'insaturation des AGL. La mobilisation relative des AGL, c'est-à-dire le pourcentage d'AGL sécrétés comparé au pourcentage des AG dans les

TG, est plus faible avec un nombre allant croissant d'atomes de carbone dans la chaîne aliphatique. Elle est par contre plus élevée avec un nombre grandissant d'insaturations (177). Parmi les AGL présents dans les diètes et les combinaisons utilisées dans notre laboratoire, les études mentionnées ci-haut ont déterminé chez les humains, les rats et les lapins que la mobilisation relative était plus grande pour les acides palmitoléique, linoléique et arachidonique. D'un autre côté, celle pour les acides palmitique, stéarique et oléique était soit plus faible ou sinon assez représentative du pourcentage de ces AGL retrouvé dans les TG. Ce mécanisme sélectif pourrait avoir été altéré en fonction du degré de dysfonction des adipocytes dans notre étude précédente.

Ainsi, ces variations de mobilisation, combinées au degré de dysfonction des adipocytes, pourraient avoir créé une différence de ratios des AGL mis en présence des CMLV entre le projet *in vitro* et le projet *in vivo* et donc faire une différence au niveau de l'impact sur la viabilité des cellules. Pour ce projet-ci, l'idéal aurait été de créer les combinaisons d'AGL en s'inspirant du ratio retrouvé dans le surnageant des adipocytes des souris alimentées avec les diètes riches en gras. Pour le cadre de mon projet de maîtrise, la mesure de la concentration et de la nature de chacun des AGL sécrétés par les adipocytes, bien qu'envisagée, n'a toutefois pu être effectuée.

5. Conclusion

En conclusion, nos travaux démontrent que la viabilité des CMLV est affectée par la présence d'une concentration élevée de groupes complexes d'AGL, dont les ratios s'apparentent l'un à la diète occidentale (DA) et l'autre à la diète méditerranéenne (DV). Les combinaisons d'AGL se sont avérées avoir un effet inhibiteur sur la prolifération des CMLV, un impact lié à leur potentiel pro-apoptotique. Les AGS présents dans les combinaisons sont les principaux responsables de l'induction de l'apoptose des cellules. Cet impact pro-apoptotique n'implique pas un blocage du cycle cellulaire, cependant plusieurs mécanismes pourraient en être à l'origine. La synthèse de céramides, la production de ROS et un impact sur les mitochondries via l'altération de leur perméabilité et une diminution de la proportion de cardiolipines sont particulièrement suspectés. De façon plus importante, nous avons déterminé qu'une stimulation avec chacun des AGL étudiés engendre des taux d'apoptose plus élevés que lorsqu'ils sont tous les six combinés sous la DA ou la DV. Cet effet est principalement dû à la présence d'un AGL protecteur, l'acide oléique, entrant en compétition avec les mécanismes pro-apoptotiques des AGS. L'intégration des AGS dans des vésicules de TG par l'acide oléique est possiblement le mécanisme via lequel a lieu la compétition. Nos travaux mettent également en lumière, pour la première fois, que les concentrations relatives des différents AGL présents dans une combinaison sont toutes aussi importantes que leurs concentrations totales dans ce phénomène de compétition anti- et pro-apoptotique. En effet, nous avons démontré que l'acide oléique atténue l'apoptose de façon plus marquée lorsqu'il est combiné avec un AGS que lorsqu'il est seul. Cet effet est significatif seulement aux concentrations retrouvées dans la combinaison DA et s'avère encore plus prononcé en présence d'insuline. L'augmentation de la sensibilité des cellules à l'insuline par l'acide oléique est probablement impliquée. Nos résultats n'ont pas été dans le même sens que ceux obtenus lors d'une de nos précédentes études, c'est-à-dire que la combinaison la plus riche en AGS n'a pas été plus néfaste que la combinaison la plus riche en AGMI sur les CMLV en condition hyperinsulinémique. Ceci confirme que les AGL et l'insulinémie ne sont pas les seules variables modulant la viabilité des CMLV. Plusieurs autres facteurs tels que les adipokines et l'état métabolique doivent donc être considérés. Tous ces travaux amènent

ainsi de nouvelles connaissances sur les liens existant entre le DT2 et l'athérosclérose. Ils pourraient également s'avérer utiles pour l'établissement de nouvelles diètes pour les patients souffrant de ces deux pathologies.

Pour la suite de ces travaux, il serait pertinent d'étudier les voies via lesquelles les AGS dans les combinaisons induisent l'apoptose des CMLV afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués. Il sera d'autant plus intéressant d'aller vérifier si l'acide oléique diminue cette apoptose en internalisant les AGS dans des vésicules de TG et si les autres AGMI et AGPI présents dans les combinaisons peuvent avoir le même effet. De plus, l'évaluation de l'impact des combinaisons d'AGL sur la viabilité de CMLV provenant de souris athérosclérotiques permettrait de parfaire notre compréhension du phénomène d'accélération du processus d'atteintes vasculaires par le DT2.

6. Bibliographie

1. Collette M. La rigidité artérielle : un marqueur pré-clinique. Le Monde.fr; 2010 [mise à jour le 2010 18 avril; citée le 2011 28 septembre]; disponible sur: <http://collettemathieu.blog.lemonde.fr/category/cours-sur-la-rigidite-arterielle/la-rigidite-arterielle/>.
2. Campbell NA, Mathieu R. Circulation chez les vertébrés. Biologie. 3e éd. Saint-Laurent: Éditions du Renouveau Pédagogique; 1995. p. 820-5.
3. Frayon S, Cueille C, Prat R, Garel J-M. La cellule musculaire lisse vasculaire : A- Localisation, structure et fonction des CMLV. Paris: Université Pierre et Marie Curie; [mise à jour le 2005 28 juin; citée le 2011 28 septembre]; disponible sur: <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cmlv/cmlv-a2.htm>.
4. Luscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. Clin Cardiol. 1997 Nov;20(11 Suppl 2):II-3-10.
5. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. Circ Res. 2007 Feb 2;100(2):158-73.
6. Parham P. La migration des leucocytes vers les tissus est induite par les médiateurs de l'inflammation. Le système immunitaire. Paris: Éditions De Boeck Université; 2003. p. 213-4.
7. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, et al. Mouvements cellulaires dépendant de la myosine. Biologie moléculaire de la cellule. 3e éd. Bruxelles: Éditions De Boeck Université; 2005. p. 791-800.
8. Frayon S, Cueille C, Prat R, Garel J-M. La cellule musculaire lisse vasculaire : C- Régulation de la contraction/relaxation de la CML. Paris: Université Pierre et Marie Curie; [mise à jour le 2005 28 juin; citée le 2011 3 octobre]; disponible sur: <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cmlv/cmlv-c2.htm>.
9. Manuelle C. La protection contre les pertes sanguines. Les 5 fonctions vitales du corps humain : anatomo-physiopathologie. Rueil-Malmaison: Éditions Lamarre; 2008. p. 20-1.
10. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. Neth Heart J. 2007;15(3):100-8.
11. Sherwood L. Thromboembolisme et autres complications de l'athérosclérose. Physiologie humaine. 2e éd. Bruxelles: Éditions De Boeck Université; 2006. p. 267-9.

12. Causes of Death in 2008. World Health Organization; [citée le 2011 octobre 7th]; disponible sur: http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death_2008/en/index.html.
13. Wielgosz A, Arango M, Bancej C, Bienek A, Johansen H, Lindsay P, et al. Suivi des maladies du coeur et des accidents vasculaires cérébraux au Canada. Agence de la Santé Publique du Canada; 2009 [citée le 2011 10 octobre]; disponible sur: <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/2009/cvd-avc/pdf/cvd-avs-2009-fra.pdf>.
14. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Tateno K, Kunieda T, Komuro I. Vascular cell senescence and vascular aging. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Feb;36(2):175-83.
15. Matsushita H, Chang E, Glassford AJ, Cooke JP, Chiu CP, Tsao PS. eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: Preservation by hTERT immortalization. *Circ Res*. 2001 Oct 26;89(9):793-8.
16. Nakajima M, Hashimoto M, Wang F, Yamanaga K, Nakamura N, Uchida T, et al. Aging decreases the production of PGI₂ in rat aortic endothelial cells. *Exp Gerontol*. 1997 Nov-Dec;32(6):685-93.
17. Meyer MR, Haas E, Barton M. Gender differences of cardiovascular disease: new perspectives for estrogen receptor signaling. *Hypertension*. 2006 Jun;47(6):1019-26.
18. Soler EP, Ruiz VC. Epidemiology and risk factors of cerebral ischemia and ischemic heart diseases: similarities and differences. *Curr Cardiol Rev*. 2010 Aug;6(3):138-49.
19. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):233-41.
20. Blood Pressure. World Health Organization; 2008 [citée le 2011 12 octobre]; disponible sur: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence/en/index.html.
21. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115-26.
22. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med*. 2002 Nov;8(11):1235-42.
23. Bibbins-Domingo K, Coxson P, Pletcher MJ, Lightwood J, Goldman L. Adolescent overweight and future adult coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2007 Dec 6;357(23):2371-9.
24. Antuna-Puente B, Fève B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab*. 2008 Feb;34(1):2-11.

25. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001 Feb 23;104(4):503-16.
26. 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 Jun 15;101(12):2658-64.
27. Loppnow H, Werdan K, Buerke M. Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine- and innate-immunity-related inflammatory mechanisms. *Innate Immun*. 2008 Apr;14(2):63-87.
28. Cascieri MA. The potential for novel anti-inflammatory therapies for coronary artery disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Feb;1(2):122-30.
29. Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol*. 2000 May;67(5):591-602.
30. Watkins H, Farrall M. Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress. *Nat Rev Genet*. 2006 Mar;7(3):163-73.
31. Clarke M, Bennett M. The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability. *Am J Nephrol*. 2006;26(6):531-5.
32. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Dec;23(12):2131-7.
33. Winter WE, Signorino MR. Complications of Diabetes. *Diabetes mellitus: pathophysiology, etiologies, complications, management and laboratory evaluation: special topics in diagnostic testing*: American Association for Clinical Chemistry; 2002. p. 51-63.
34. Diabetes Estimates Excel Tables. Bruxelles: International Diabetes Federation; 2010 [citée le 2011 2 novembre]; disponible sur: <http://www.idf.org/node/23640>.
35. Diabète, selon le sexe, provinces et les territoires. Statistique Canada; 2010 [mise à jour le 2011 21 juin; citée le 2011 2 novembre]; disponible sur: <http://www40.statcan.ca/102/cst01/HEALTH54A-fra.htm>.
36. Overweight and obesity. World Health Organization; 2008 [citée le 2011 3 novembre]; disponible sur: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/index.html.
37. Centre des médias : obésité et surpoids. Organisation mondiale de la Santé; 2011 [mise à jour le 2011 mars; citée le 2011 3 novembre]; disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/fr/index.html>.

38. Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Feb;89(2):463-78.
39. Stienstra R, Duval C, Muller M, Kersten S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res.* 2007;2007:95974.
40. Harford KA, Reynolds CM, McGillicuddy FC, Roche HM. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc Nutr Soc.* 2011 Nov;70(4):408-17.
41. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 May;9(5):367-77.
42. de Luca C, Olefsky JM. Stressed out about obesity and insulin resistance. *Nat Med.* 2006 Jan;12(1):41-2; discussion 2.
43. Sethi JK, Hotamisligil GS. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 1999 Feb;10(1):19-29.
44. Guénard H. Pancréas endocrine. *Physiologie humaine.* 3e éd: Éditions Pradel; 2001. p. 466-72.
45. DeFronzo RA, Abdul-Ghani M. Assessment and treatment of cardiovascular risk in prediabetes: impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Am J Cardiol.* 2011 Aug 2;108(3 Suppl):3B-24B.
46. Alberti G, Zimmet P, Shaw J, Grundy SM. IDF worldwide definition of the metabolic syndrome. Bruxelles: Fédération Internationale du Diabète; 2006 [citée le 2011 6 novembre]; disponible sur: <http://www.idf.org/metabolic-syndrome>.
47. Grundy SM. Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Apr;5(4):295-309.
48. Le diabète au Canada: Rapport du Système de surveillance du diabète Agence de la Santé Publique du Canada; 2009 [mise à jour le 2010 8 février; citée le 2011 7 novembre]; disponible sur: <http://www.phac-aspc.gc.ca/ccdpc-cpcmc/ndss-snsd/francais/index-fra.php>.
49. National Diabetes Fact Sheet. USA: Centers for Disease Control and Prevention; 2011 [citée le 2011 novembre 7th]; disponible sur: http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs_2011.pdf.

50. Xu J, Zou MH. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation*. 2009 Sep 29;120(13):1266-86.
51. Jay D, Hitomi H, Griendling KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med*. 2006 Jan 15;40(2):183-92.
52. Anfossi G, Russo I, Doronzo G, Trovati M. Contribution of insulin resistance to vascular dysfunction. *Arch Physiol Biochem*. 2009 Oct;115(4):199-217.
53. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, et al. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Aug;14(8 Suppl 3):S227-32.
54. Kasuya Y, Nakamura J, Hamada Y, Nakayama M, Sasaki H, Komori T, et al. An aldose reductase inhibitor prevents the glucose-induced increase in PDGF-beta receptor in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Aug 11;261(3):853-8.
55. Peiro C, Lafuente N, Matesanz N, Cercas E, Llergo JL, Vallejo S, et al. High glucose induces cell death of cultured human aortic smooth muscle cells through the formation of hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol*. 2001 Aug;133(7):967-74.
56. Ramana KV, Friedrich B, Srivastava S, Bhatnagar A, Srivastava SK. Activation of nuclear factor-kappaB by hyperglycemia in vascular smooth muscle cells is regulated by aldose reductase. *Diabetes*. 2004 Nov;53(11):2910-20.
57. Vykoukal D, Davies MG. Vascular biology of metabolic syndrome. *J Vasc Surg*. 2011 Sep;54(3):819-31.
58. Voet D, Voet JG. Classification des lipides. *Biochimie*. 2e éd. Paris, Bruxelles: De Boeck Université; 1998. p. 278-84.
59. Whitney E, Whitney EN, Rolfes SR. Health Effects and Recommended Intakes of Lipids. *Understanding Nutrition*. 12e éd. Belmont: Wadsworth, Cengage Learning; 2010. p. 151-4.
60. Duyff RL. Chapter 3: Fat Facts. *American Dietetic Association Complete Food and Nutrition Guide*. 3e éd: John Wiley & Sons, Inc.; 2011.
61. The Science of Lorenzo's Oil : The Chemistry of Lipids. Crowleys-Classroom; [citée le 2011 9 novembre]; disponible sur: <http://crowleys-classroom.wikispaces.com/Lorenzo%27s+Oil+page>.

62. Sardesai V. Essential Fatty Acids. Introduction to Clinical Nutrition. 3e éd. Boca Raton: CRC Press; 2011. p. 74-83.
63. Insel P, Turner RE, Ross D. Fatty Acids are Key Building Blocks. Discovering Nutrition. 3e éd. Sudbury: Jones & Bartlett Learning; 2009. p. 171-4.
64. Fung TT, Rimm EB, Spiegelman D, Rifai N, Tofler GH, Willett WC, et al. Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *Am J Clin Nutr.* 2001 Jan;73(1):61-7.
65. Heidemann C, Schulze MB, Franco OH, van Dam RM, Mantzoros CS, Hu FB. Dietary patterns and risk of mortality from cardiovascular disease, cancer, and all causes in a prospective cohort of women. *Circulation.* 2008 Jul 15;118(3):230-7.
66. Odermatt A. The Western-style diet: a major risk factor for impaired kidney function and chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011 Nov;301(5):F919-31.
67. Bien manger avec le Guide alimentaire canadien. Santé Canada; [mise à jour le 2011 1 septembre; citée le 2011 13 novembre]; disponible sur: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/food-guide-aliment/index-fra.php>.
68. Hu FB. The Mediterranean diet and mortality--olive oil and beyond. *N Engl J Med.* 2003 Jun 26;348(26):2595-6.
69. Zarraga IG, Schwarz ER. Impact of dietary patterns and interventions on cardiovascular health. *Circulation.* 2006 Aug 29;114(9):961-73.
70. The Oldways Mediterranean Diet Pyramid. Boston2009 [citée le 2011 14 novembre]; disponible sur: <http://www.oldwayspt.org/mediterranean-diet-pyramid>.
71. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation.* 1999 Feb 16;99(6):779-85.
72. Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA.* 2004 Sep 22;292(12):1440-6.
73. Voet D, Voet JG. Digestion, absorption et transport des lipides. Biochimie. 2e éd. Paris, Bruxelles: De Boeck Université; 1998. p. 662-6.

74. Sizer FS, Piché LA, Whitney EN. Lipids in the Body. Nutrition: Concepts and Controversies. 2e éd. Toronto: Nelson Education; 2011. p. 156-65.
75. Shi Y, Burn P. Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Aug;3(8):695-710.
76. Voet D, Voet JG. Fonctions des lipoprotéines. *Biochimie.* 2e éd. Paris, Bruxelles: De Boeck Université; 1998. p. 319-23.
77. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2001 Apr;2(4):282-6.
78. Voet D, Voet JG. Biosynthèse des acides gras. *Biochimie.* 2e éd. Paris, Bruxelles: De Boeck Université; 1998. p. 680-9.
79. Fauci A, Kasper D, Braunwald E, Hauser S, Longo D, Jameson J, et al. Harrison's Internal Medicine: Chapter 350. Disorders of Lipoprotein Metabolism. McGraw-Hill's Access Medicine; [citée le 2011 18 novembre]; disponible sur: <http://gk.famrost.nl/fysiologie/harrison/part%2015.%20endocrinology%20and%20metabolism/section%203.%20disorders%20of%20intermediary%20metabolism/350.htm>.
80. Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev.* 2010 Jan;90(1):367-417.
81. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* 2001 Sep;108(6):785-91.
82. Febbraio M, Silverstein RL. CD36: implications in cardiovascular disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(11):2012-30.
83. Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP, et al. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest.* 2005 Nov;115(11):3177-84.
84. Gimeno RE, Ortegon AM, Patel S, Punreddy S, Ge P, Sun Y, et al. Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein. *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):16039-44.
85. Chabowski A, Gorski J, Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A. Evidence for concerted action of FAT/CD36 and FABPpm to increase fatty acid transport across the plasma membrane. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2007 Nov-Dec;77(5-6):345-53.
86. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, et al. L'oxydation du glucose et des acides gras en CO₂. *Biologie moléculaire de la cellule.* 3e éd. Bruxelles: De Boeck Université; 2005. p. 304-15.

87. Voet D, Voet JG. Oxydation des acides gras. Biochimie. 2e éd. Paris, Bruxelles: De Boeck Université; 1998. p. 666-78.
88. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, et al. Les biomembranes: leur composition lipidique et leur organisation structurale. Biologie moléculaire de la cellule. 3e éd. Bruxelles: De Boeck Université; 2005. p. 149-57.
89. Hennen G. Les éicosanoïdes. Endocrinologie. 1ère éd. Bruxelles: De Boeck Université; 2001. p. 165-9.
90. Martinez-Clemente M, Claria J, Titos E. The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in obesity, insulin resistance, and fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011 Jul;14(4):347-53.
91. Wang XL, Zhang L, Youker K, Zhang MX, Wang J, LeMaire SA, et al. Free fatty acids inhibit insulin signaling-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation through upregulating PTEN or inhibiting Akt kinase. *Diabetes*. 2006 Aug;55(8):2301-10.
92. Hennig B, Meerarani P, Ramadass P, Watkins BA, Toborek M. Fatty acid-mediated activation of vascular endothelial cells. *Metabolism*. 2000 Aug;49(8):1006-13.
93. Young VM, Toborek M, Yang F, McClain CJ, Hennig B. Effect of linoleic acid on endothelial cell inflammatory mediators. *Metabolism*. 1998 May;47(5):566-72.
94. Harvey KA, Walker CL, Xu Z, Whitley P, Pavlina TM, Hise M, et al. Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells. *J Lipid Res*. 2010 Dec;51(12):3470-80.
95. Carluccio MA, Massaro M, Bonfrate C, Siculella L, Maffia M, Nicolardi G, et al. Oleic acid inhibits endothelial activation : A direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the mediterranean diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Feb;19(2):220-8.
96. de Roos B, Mavrommatis Y, Brouwer IA. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: new insights into mechanisms relating to inflammation and coronary heart disease. *Br J Pharmacol*. 2009 Sep;158(2):413-28.
97. Artwohl M, Roden M, Waldhausl W, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer SM. Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. *FASEB J*. 2004 Jan;18(1):146-8.
98. Renard CB, Askari B, Suzuki LA, Kramer F, Bornfeldt KE. Oleate, not ligands of the receptor for advanced glycation end-products, promotes proliferation of human arterial smooth muscle cells. *Diabetologia*. 2003 Dec;46(12):1676-87.

99. Yun MR, Lee JY, Park HS, Heo HJ, Park JY, Bae SS, et al. Oleic acid enhances vascular smooth muscle cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Pharmacol Res.* 2006 Aug;54(2):97-102.
100. Jiang X, Zhang Y, Hou D, Zhu L, Xu W, Ding L, et al. 17beta-estradiol inhibits oleic acid-induced rat VSMC proliferation and migration by restoring PGC-1alpha expression. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Feb 5;315(1-2):74-80.
101. Dronadula N, Rizvi F, Blaskova E, Li Q, Rao GN. Involvement of cAMP-response element binding protein-1 in arachidonic acid-induced vascular smooth muscle cell motility. *J Lipid Res.* 2006 Apr;47(4):767-77.
102. Mizutani M, Asano M, Roy S, Nakajima T, Soma M, Yamashita K, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit migration of human vascular smooth muscle cells in vitro. *Life Sci.* 1997;61(19):PL269-74.
103. Delbosc S, Glorian M, Le Port AS, Bereziat G, Andreani M, Limon I. The benefit of docosahexanoic acid on the migration of vascular smooth muscle cells is partially dependent on Notch regulation of MMP-2/-9. *Am J Pathol.* 2008 May;172(5):1430-40.
104. Rho MC, Ah Lee K, Mi Kim S, Sik Lee C, Jeong Jang M, Kook Kim Y, et al. Sensitization of vascular smooth muscle cell to TNF-alpha-mediated death in the presence of palmitate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007 May 1;220(3):311-9.
105. Mattern HM, Hardin CD. Vascular metabolic dysfunction and lipotoxicity. *Physiol Res.* 2007;56(2):149-58.
106. Kalyankrishna S, Parmentier JH, Malik KU. Arachidonic acid-derived oxidation products initiate apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002 Sep;70(1-2):13-29.
107. de Vries JE, Vork MM, Roemen TH, de Jong YF, Cleutjens JP, van der Vusse GJ, et al. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J Lipid Res.* 1997 Jul;38(7):1384-94.
108. Dyntar D, Eppenberger-Eberhardt M, Maedler K, Pruschy M, Eppenberger HM, Spinass GA, et al. Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. *Diabetes.* 2001 Sep;50(9):2105-13.
109. Eitel K, Staiger H, Brendel MD, Brandhorst D, Bretzel RG, Haring HU, et al. Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Dec 20;299(5):853-6.

110. Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinas GA, Donath MY. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes*. 2003 Mar;52(3):726-33.
111. Akazawa Y, Cazanave S, Mott JL, Elmi N, Bronk SF, Kohno S, et al. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *J Hepatol*. 2010 Apr;52(4):586-93.
112. Turpin SM, Lancaster GI, Darby I, Febbraio MA, Watt MJ. Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Dec;291(6):E1341-50.
113. Ray JL, Leach R, Herbert JM, Benson M. Isolation of vascular smooth muscle cells from a single murine aorta. *Methods Cell Sci*. 2001;23(4):185-8.
114. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*. 2004 Jul;84(3):767-801.
115. Zhou HY, Chen WD, Zhu DL, Wu LY, Zhang J, Han WQ, et al. The PDE1A-PKCalpha signaling pathway is involved in the upregulation of alpha-smooth muscle actin by TGF-beta1 in adventitial fibroblasts. *J Vasc Res*. 2010;47(1):9-15.
116. Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 11;100(23):13531-6.
117. Deblay S. Classification des lipides. Les molécules du vivant: dossier d'autoformation. 2e éd. Dijon: Educagri Éditions; 2004. p. 32-5.
118. Hagenfeldt L, Wahren J, Pernow B, Raf L. Uptake of individual free fatty acids by skeletal muscle and liver in man. *J Clin Invest*. 1972 Sep;51(9):2324-30.
119. Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, et al. A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003 Oct;52(10):2461-74.
120. Stoker Hs. Physical properties of fatty acids. *Organic and Biological Chemistry*. 5e éd. Belmont: Brooks/Cole, Cengage Learning; 2009. p. 293-4.
121. Artwohl M, Lindenmair A, Roden M, Waldhausl WK, Freudenthaler A, Klosner G, et al. Fatty acids induce apoptosis in human smooth muscle cells depending on chain length, saturation, and duration of exposure. *Atherosclerosis*. 2009 Feb;202(2):351-62.

122. Schwartz EA, Zhang WY, Karnik SK, Borwege S, Anand VR, Laine PS, et al. Nutrient modification of the innate immune response: a novel mechanism by which saturated fatty acids greatly amplify monocyte inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Apr;30(4):802-8.
123. Chavez JA, Summers SA. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys.* 2003 Nov 15;419(2):101-9.
124. Hornback JM. Preparation of Carboxylic Acids. *Organic Chemistry.* 2e éd. Belmont: Thomson, Brooks/Cole; 2006. p. 815-23.
125. Eggenberger DN, Broome FK, Ralston AW, Harwood HJ. The Solubilities of the Normal Saturated Fatty Acids in Water. *Journal of Organic Chemistry.* 1949;14(6):1108-10.
126. Spector AA. Fatty acid binding to plasma albumin. *J Lipid Res.* 1975 May;16(3):165-79.
127. Francis GL. Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology.* 2010 Jan;62(1):1-16.
128. Médart J. La dénaturation des lipides. *Manuel pratique de nutrition: l'alimentation préventive et curative.* 2e éd. Bruxelles: De Boeck Université; 2009. p. 106-9.
129. Alvarez JG, Storey BT. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod.* 1983 Oct;29(3):548-55.
130. Cistola DP, Small DM. Fatty acid distribution in systems modeling the normal and diabetic human circulation. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest.* 1991 Apr;87(4):1431-41.
131. Cruzado M, Risler N, Castro C, Ortiz A, Ruttler ME. Proliferative effect of insulin on cultured smooth muscle cells from rat mesenteric resistance vessels. *Am J Hypertens.* 1998 Jan;11(1 Pt 1):54-8.
132. Cavalot F, Russo I, Mattiello L, Anfossi G, Massucco P, Mularoni E, et al. Influence of protamine on adhesion, chemotaxis and proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Diabetologia.* 1997 Jan;40(1):67-75.
133. Garrett R, Grisham CM. Glycolysis. *Biochemistry.* 4th éd. Boston: Brooks/Cole, Cengage Learning; 2010. p. 536.

134. Solomon EP, Berg LR, Martin DW. How Cells Make ATP: Energy-Releasing Pathways. *Biology*. 7th éd. Belmont: Brooks/Cole- Thomson Learning; 2004. p. 145.
135. Technical bulletin, CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Promega; [mise à jour le 2009 juin; citée le 2011 21 décembre]; disponible sur: <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/CellTiter%2096%20Aqueous%20One%20Solution%20Cell%20Proliferation%20Assay%20System%20Protocol.ashx>.
136. Rao V, Merante F, Weisel RD, Shirai T, Ikonomidis JS, Cohen G, et al. Insulin stimulates pyruvate dehydrogenase and protects human ventricular cardiomyocytes from simulated ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998 Sep;116(3):485-94.
137. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999 Feb;6(2):99-104.
138. Salvesen GS. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ*. 2002 Jan;9(1):3-5.
139. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet*. 2009 Aug;46(8):497-510.
140. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Feb;9(2):139-50.
141. Li X, Becker KA, Zhang Y. Ceramide in redox signaling and cardiovascular diseases. *Cell Physiol Biochem*. 2010;26(1):41-8.
142. Houtkooper RH, Vaz FM. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Aug;65(16):2493-506.
143. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 2006 Sep;13(9):1423-33.
144. Ostrander DB, Sparagna GC, Amoscato AA, McMillin JB, Dowhan W. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem*. 2001 Oct 12;276(41):38061-7.
145. Hardy S, El-Assaad W, Przybytkowski E, Joly E, Prentki M, Langelier Y. Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin. *J Biol Chem*. 2003 Aug 22;278(34):31861-70.

146. Buratta M, Castigli E, Sciaccaluga M, Pellegrino RM, Spinozzi F, Roberti R, et al. Loss of cardiolipin in palmitate-treated GL15 glioblastoma cells favors cytochrome c release from mitochondria leading to apoptosis. *J Neurochem.* 2008 May;105(3):1019-31.
147. Deby C. Rôle des mitochondries dans l'apoptose. Liège: Université de Liège - Centre de l'Oxygène, Recherche et Développement; [citée le 2011 6 décembre]; disponible sur: <http://www2.ulg.ac.be/cord/mito%20et%20oxygene/mitapopt.html>.
148. Sparagna GC, Hickson-Bick DL, Buja LM, McMillin JB. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Nov;279(5):H2124-32.
149. JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit. Mountain View: Cell Technology, Inc; [citée le 2011 6 décembre]; disponible sur: <http://www.celltechnology.com/products/JC1.htm>.
150. Schonfeld P, Wojtczak L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2008 Aug 1;45(3):231-41.
151. Kato K, Yamanouchi D, Esbona K, Kamiya K, Zhang F, Kent KC, et al. Caspase-mediated protein kinase C-delta cleavage is necessary for apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Dec;297(6):H2253-61.
152. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, et al. 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 Nov;49(11):1939-45.
153. Lambertucci RH, Hirabara SM, Silveira Ldos R, Levada-Pires AC, Curi R, Pithon-Curi TC. Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol.* 2008 Sep;216(3):796-804.
154. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res.* 2002 Sep 6;91(5):406-13.
155. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension.* 2007 Apr;49(4):717-27.
156. Touyz RM, Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol.* 2006 Jul;45(1):19-28.

157. Belfiore A, Genua M, Malaguarnera R. PPAR-gamma Agonists and Their Effects on IGF-I Receptor Signaling: Implications for Cancer. *PPAR Res.* 2009;2009:830501.
158. Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG. Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes.* 2001 Aug;50(8):1771-7.
159. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar 18;100(6):3077-82.
160. Peng G, Li L, Liu Y, Pu J, Zhang S, Yu J, et al. Oleate blocks palmitate-induced abnormal lipid distribution, endoplasmic reticulum expansion and stress, and insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology.* 2011 Jun;152(6):2206-18.
161. Dimopoulos N, Watson M, Sakamoto K, Hundal HS. Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem J.* 2006 Nov 1;399(3):473-81.
162. Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA. Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J Membr Biol.* 1996 Sep;153(1):75-81.
163. Luiken JJ, Dyck DJ, Han XX, Tandon NN, Arumugam Y, Glatz JF, et al. Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Feb;282(2):E491-5.
164. Katsoulieiris E, Mabley JG, Samai M, Green IC, Chatterjee PK. alpha-Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Eur J Pharmacol.* 2009 Nov 25;623(1-3):107-12.
165. Zhang Y, Yang X, Shi H, Dong L, Bai J. Effect of alpha-linolenic acid on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of palmitic acid lipotoxicity in primary rat hepatocytes. *Lipids Health Dis.* 2011;10:122.
166. Zhang Y, Dong L, Yang X, Shi H, Zhang L. alpha-Linolenic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of stearic acid lipotoxicity on primary rat hepatocytes. *Lipids Health Dis.* 2011;10:81.
167. Scheuner D, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr Rev.* 2008 May;29(3):317-33.
168. El Akoum S, Lamontagne V, Cloutier I, Tanguay JF. Nature of Fatty Acids in High Fat Diets Differentially Delineates Obesity-Linked Metabolic Syndrome Components in Male and Female C57BL/6J Mice. *Diabetol Metab Syndr.* 2011 Dec 14;3(1):34.

169. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 May;115(5):911-9; quiz 20.
170. Kim JE, Song SE, Kim YW, Kim JY, Park SC, Park YK, et al. Adiponectin inhibits palmitate-induced apoptosis through suppression of reactive oxygen species in endothelial cells: involvement of cAMP/protein kinase A and AMP-activated protein kinase. *J Endocrinol.* 2010 Oct;207(1):35-44.
171. Beltowski J. Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2006 Nov;189(1):47-60.
172. Giordano A, Avellino R, Ferraro P, Romano S, Corcione N, Romano MF. Rapamycin antagonizes NF-kappaB nuclear translocation activated by TNF-alpha in primary vascular smooth muscle cells and enhances apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Jun;290(6):H2459-65.
173. Conner WE, Lin DS, Colvis C. Differential mobilization of fatty acids from adipose tissue. *J Lipid Res.* 1996 Feb;37(2):290-8.
174. Halliwell KJ, Fielding BA, Samra JS, Humphreys SM, Frayn KN. Release of individual fatty acids from human adipose tissue in vivo after an overnight fast. *J Lipid Res.* 1996 Sep;37(9):1842-8.
175. Raclot T, Mioskowski E, Bach AC, Groscolas R. Selectivity of fatty acid mobilization: a general metabolic feature of adipose tissue. *Am J Physiol.* 1995 Nov;269(5 Pt 2):R1060-7.
176. Raclot T, Groscolas R. Differential mobilization of white adipose tissue fatty acids according to chain length, unsaturation, and positional isomerism. *J Lipid Res.* 1993 Sep;34(9):1515-26.
177. Raclot T, Langin D, Lafontan M, Groscolas R. Selective release of human adipocyte fatty acids according to molecular structure. *Biochem J.* 1997 Jun 15;324 (Pt 3):911-5.