



HAL
open science

Propriétés anti-athérogènes du DHA : effets nutriginomiques au niveau aortique et rôle potentiel des métabolites issus de la peroxydation

Laurie L. Joumard-Cubizolles

► To cite this version:

Laurie L. Joumard-Cubizolles. Propriétés anti-athérogènes du DHA : effets nutriginomiques au niveau aortique et rôle potentiel des métabolites issus de la peroxydation. Alimentation et Nutrition. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2013. Français. NNT : . tel-02810465

HAL Id: tel-02810465

<https://hal.inrae.fr/tel-02810465>

Submitted on 6 Jun 2020

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
N° d'ordre

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
pour l'obtention du grade de Docteur
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Nutrition

soutenue le 17 Décembre 2013

Laurie JOUMARD-CUBIZOLLES

Propriétés anti-athérogènes du DHA : effets nutriginomiques au
niveau aortique et rôle potentiel des métabolites issus de la
peroxydation

Président :

M. Claude Dubray, Professeur d'Université, INSERM-CIC 501, Université d'Auvergne, Clermont-Fd

Rapporteurs :

M. Thierry Durand, Directeur de Recherche, IBMM, UMR 5247, CNRS, Montpellier

Mme Jeanette A.M Maier, Professeur d'Université, Faculté de Médecine, Milan

Examinateur :

M. Jean-Yves Le Guennec, Directeur de Recherche, INSERM U1046, Montpellier

Directeur et co-directeur de la thèse :

M. Andrzej Mazur, Directeur de Recherche, UNH, UMR1019 INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Fd

M. Jean-Michel Chardigny, Directeur de Recherche, UNH, UMR1019 INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Fd

Encadrant de la thèse :

M^{lle} Cécile Gladine, Chargée de Recherche, UNH, UMR1019 INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Fd

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Andrzej Mazur pour son encadrement durant ces trois années de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée dans la réalisation de ce travail et pour ses nombreux conseils. Je tiens également à remercier Jean-Michel Chardigny pour avoir accepté de co-diriger cette thèse.

Je remercie spécialement Cécile Gladine pour son encadrement tout au long de ma thèse. Merci pour tout ce que tu as su m'enseigner durant ces trois années. Merci pour ton soutien, ton aide, tes conseils précieux et ta disponibilité. Et enfin, merci de m'avoir aidée à dépasser mes limites dans cette dernière ligne droite.

Je tiens également à remercier les membres du jury :

Madame Jeanette Maier et Monsieur Thierry Durand pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail,

Monsieur Jean-Yves Le Guennec pour participer à ce jury en tant qu'examineur,

Et enfin Monsieur Claude Dubray qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie également l'ensemble des membres de mon comité de thèse pour leur aide et leurs remarques constructives qui m'ont aidée dans la réflexion scientifique :

Monsieur Patrick Brachet

Madame Blandine Comte

Madame Corinne Malpuech-Brugère

Monsieur Christophe Chambon

Monsieur Antonino Nicoletti

Merci aux différents membres de l'équipe MicroCard : Christine, Dragan, Edmond pour ses questions pertinentes, Laurent-Emmanuel pour ses conseils, Nicolas pour sa formation en protéomique, Dominique pour sa collaboration sur l'étude *in vitro*, mais aussi Séverine et Marie-Anne pour leur collaboration dans les manipulations d'immunohistochimie.

Merci également à l'équipe Phemabio : Blandine pour son « coaching » anglais et ses précieux conseils, Sergio grâce à qui EndNote n'a plus de secret pour moi !, Yoann pour son soutien, Jérémie le petit nouveau mais aussi Claudine et Mathieu.

Merci à la plateforme de protéomique et plus spécialement Christophe et Didier pour la spectrométrie de masse. Merci également à Céline Boby, de la plateforme de transcriptomique, pour son aide.

Je tiens également à remercier particulièrement Madame Giulia Chinetti pour m'avoir accueillie chaleureusement à deux reprises au sein de son équipe et pour m'avoir permis d'acquérir de nouvelles compétences. Merci également à Corinne et Bruno pour leur grande disponibilité et leur gentillesse ; sans oublier Fédérica, Loïc et Mélanie pour leur aide technique.

Merci aux personnes de l'Université Blaise Pascal avec qui j'ai pu collaborer au cours de mes vacances. Merci à Patrick, Isabelle, Ludovic et Julie pour le très bon accueil qu'ils m'ont réservée et la confiance qu'ils m'ont accordée.

Je tiens à remercier chaleureusement mes deux anciens collègues thésards avec qui j'ai pu passer d'excellents moments.

Sylvain ou « Le Glaude », merci pour ta bonne humeur, pour tous ces fous-rires autour de Bref en passant par Gloria Gaynor et sans oublier Axelle Red.

Emilie, plus qu'une collègue une véritable amie, merci pour ces longues discussions à refaire le monde autour d'un (ou deux ...) verres de rosé, merci pour tous ces fous-rires mais surtout pour ton soutien sans faille même de l'autre côté de l'Atlantique.

Un grand merci à Marine, ma plus proche amie thésarde avec qui nos chemins se suivent depuis déjà de nombreuses années. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, merci pour ta gentillesse, ton soutien et toutes ces grandes discussions. Merci tout simplement d'avoir été là dans cette dernière ligne droite.

Merci à tous mes collègues thésards, techniciens, ingénieurs : Carole, Audrey, Eva, Rosa, Claire, Wafa, Lahlou, Malek, Laure, Anne, Raphaël, Cyril. Merci également à Marie-Laure pour ses conseils précieux lors de la rédaction de ce manuscrit mais également à Cécile du 4^{ème}, Laurent, Christiane, Valérie, Ophélie, Sylvie pour leur bonne humeur et leur gentillesse.

Et enfin un grand merci à mes proches :

Merci à tous mes amis, ma famille et ma belle-famille de m'avoir soutenue et d'avoir cru en moi. Merci pour tous les bons moments passés à vos côtés.

Le plus grand merci revient à mes parents pour leur amour, leur confiance et leur soutien sans faille. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir poussée à donner le meilleur de moi-même. Merci d'avoir été là pour m'encourager durant ces longues (très longues études), sans vous je ne serai pas là aujourd'hui. Merci également à mon petit frère chéri, Anthony, pour son soutien et son amour, merci d'être ce que tu es. Merci également à ma petite belle-sœur, Anaïs, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ta joie de vivre.

Enfin, pour terminer, je tiens à remercier mon mari, Emmanuel, pour ses encouragements et son soutien mais surtout pour m'avoir supportée dans les moments plus difficiles. Merci pour ton amour, et tous les bons moments passés à tes côtés.

Sommaire

| | |
|---|----|
| <i>Résumé</i> | 1 |
| <i>Abstract</i> | 2 |
| <i>Liste des Publications et Communications</i> | 3 |
| <i>Liste des Figures</i> | 5 |
| <i>Liste des Abréviations</i> | 7 |
| <i>Avant-Propos</i> | 11 |
| <i>Revue Bibliographique</i> | 13 |
| I- Les maladies cardiovasculaires (MCV) | 13 |
| I-1- Incidence des MCV | 13 |
| I-2- Facteurs de risque des MCV | 14 |
| I-2-1- Facteurs de risque non modifiables..... | 14 |
| I-2-2- Facteurs de risque modifiables | 15 |
| I-3- Physiopathologie de l'athérosclérose..... | 16 |
| I-3-1- Initiation de l'athérosclérose : formation de la strie lipidique..... | 17 |
| I-3-2- Progression de l'athérosclérose : formation de la lésion fibro-lipidique..... | 18 |
| I-3-3- Evolution de la plaque d'athérosclérose vers une lésion compliquée | 19 |
| I-3-4- Importance des macrophages dans la physiopathologie de l'athérosclérose..... | 19 |
| II- Effets cardio- et athéro-protecteurs des acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne (AGPIω3-LC) | 22 |
| II-1- Rappel sur les AGPI ω 3 | 22 |
| II-2- Effets cardio- et athéro-protecteurs des AGPI ω 3-LC : études épidémiologiques..... | 24 |
| II-2-1- Etudes épidémiologiques d'observation..... | 24 |
| II-2-2- Etudes d'intervention | 26 |
| II-2-3- Cas particulier de l'athérosclérose..... | 30 |
| II-3- Effets athéro-protecteurs des AGPI ω 3-LC: études animales..... | 32 |
| III- Effets et mécanismes athéro-protecteurs des AGPIω3-LC : cibles tissulaires et moléculaires | 36 |
| III-1- Effets hypotriglycéridémiant | 36 |
| III-1-1- Constat épidémiologique..... | 36 |
| III-1-2- Mécanismes d'action..... | 36 |
| III-1-2-1- Réduction de la synthèse des VLDL-triglycérides..... | 37 |
| III-1-2-2- Induction du catabolisme des triglycérides plasmatiques..... | 39 |
| III-2- Impact sur la fonction endothéliale | 40 |
| III-2-1- Constat épidémiologique..... | 40 |
| III-2-2- Mécanismes d'action..... | 40 |
| III-2-2-1- Production d'oxyde nitrique..... | 41 |
| III-2-2-2- Adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales | 41 |

| | |
|--|------------|
| III-3- Impact sur l'inflammation | 42 |
| III-3-1- Constat épidémiologique..... | 42 |
| III-3-2- Mécanismes d'action..... | 43 |
| III-3-2-1- Effet sur la chimiotaxie des cellules immunitaires..... | 43 |
| III-3-2-2- Effet sur l'activité des cellules immunitaires | 44 |
| IV- Métabolisme oxygéné des AGPIω3-LC..... | 50 |
| IV-1- Oxygénation par voie enzymatique..... | 50 |
| IV-1-1- Les eicosanoïdes | 51 |
| IV-1-2- Les résolvines, protectines et marésines | 51 |
| IV-1-2-1- Les résolvines | 51 |
| IV-1-2-2- Les docosatriènes : protectines et marésines..... | 52 |
| IV-1-3- Autres métabolites enzymatiques oxygénés..... | 53 |
| IV-2- Oxygénation par voie non-enzymatique : la peroxydation lipidique..... | 54 |
| IV-2-1- Les aldéhydes issus de l'EPA et du DHA | 55 |
| IV-2-2- Les isoprostanes dérivées de l'EPA et du DHA..... | 55 |
| V- Bioactivité des métabolites oxygénés issus des AGPIω3-LC..... | 59 |
| V-1- Bioactivité des métabolites enzymatiques | 59 |
| V-1-1- Les eicosanoïdes | 59 |
| V-1-2- Les résolvines, protectines et marésines..... | 59 |
| V-1-2-1- Les résolvines | 60 |
| V-1-2-2- Les protectines | 61 |
| V-1-2-3- Les marésines..... | 61 |
| V-1-3- Autres médiateurs lipidiques | 62 |
| V-2- Bioactivité des métabolites issus de la peroxydation lipidique..... | 62 |
| V-2-1- Les AGPI ω 3-LC peroxydés | 62 |
| V-2-2- Le 4-HHE..... | 63 |
| V-2-3- Les Isoprostanes..... | 64 |
| <i>Objectifs & Stratégie.....</i> | <i>67</i> |
| <i>Résultats</i> | <i>69</i> |
| Première partie..... | 69 |
| Publication n°1..... | 70 |
| Publication n°2..... | 84 |
| Deuxième Partie | 130 |
| Publication n°3..... | 131 |
| <i>Discussion Générale.....</i> | <i>154</i> |
| I- Impacts de la supplémentation en DHA sur les modulations globales d'expression génique et protéique au niveau aortique | 154 |
| I-1- Choix expérimentaux | 154 |

| | |
|---|------------|
| I-2- Enseignements tirés de l'approche nutriginomique..... | 156 |
| II- Propriétés anti-inflammatoires des neuroprostanes..... | 159 |
| II-1- Choix expérimentaux..... | 159 |
| II-2- Enseignements tirés de l'approche ciblée <i>in vitro</i> sur macrophages..... | 160 |
| <i>Conclusions & Perspectives.....</i> | <i>162</i> |
| <i>Références Bibliographiques.....</i> | <i>164</i> |

Résumé

De nombreuses études épidémiologiques font état des effets bénéfiques des acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne (AGPI ω 3-LC) vis-à-vis de l'athérosclérose et les incidents cardiovasculaires associés. Ces acides gras sont principalement représentés par l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) et sont naturellement abondants dans les produits de la mer. Les effets athéro-protecteurs des AGPI ω 3-LC passeraient par une réduction de la triglycéridémie, une augmentation de la relaxation endothéliale, ainsi qu'une réduction de l'inflammation. Leur action spécifique au niveau vasculaire est suggérée, toutefois les travaux sur ce tissu restent très rares. En ce qui concerne les mécanismes d'action, même s'ils sont amplement étudiés, ils restent encore que partiellement compris du fait de la complexité d'action des AGPI ω 3-LC au niveau cellulaire. En effet, les AGPI ω 3-LC affectent directement ou indirectement de nombreuses protéines membranaires ou cytosoliques, y compris les facteurs de transcription, ce qui engendre la modulation de l'expression de nombreux gènes. La complexité s'accroît encore si l'on considère l'ensemble des métabolites oxygénés issus des AGPI ω 3-LC. Parmi ceux-ci, les métabolites issus de la peroxydation lipidique sont susceptibles d'être produits en abondance au cours de l'athérogenèse mais leur bioactivité est quasiment inconnue. Globalement, même si les effets cardio-protecteurs des AGPI ω 3-LC et les mécanismes d'action associés ont fait l'objet de nombreuses recherches, il reste des points majeurs à éclaircir tels que 1) l'identification des cibles cellulaires et moléculaires au niveau vasculaire ; 2) la bioactivité des métabolites peroxydés qui pourraient être des acteurs clés dans la prévention de l'athérosclérose. Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse ont été d'étudier l'impact du DHA au niveau vasculaire et d'évaluer la bioactivité de certains métabolites issus de la peroxydation lipidique du DHA.

Les travaux visant à étudier les propriétés athéro-protectrices du DHA ont jusqu'à présent été conduits exclusivement de façon ciblée ce qui ne permet pas d'obtenir une vision globale et intégrée de son spectre d'action. Ainsi, la nutriginomique nous a paru être une approche pertinente et originale pour étudier, de façon ouverte et sans *a priori*, les effets du DHA au niveau vasculaire. Pour cela, une étude *in vivo* a été réalisée sur des souris athérosclérotiques LDLR^{-/-} recevant ou non une supplémentation en DHA (2% de l'apport énergétique journalier). Le rôle athéro-protecteur du DHA a été confirmé dans une étude précédente rapportant notamment une diminution de 35% de l'étendue des lésions au niveau aortique dans le groupe DHA. Au niveau protéique, nous avons mis en évidence une altération significative de l'expression de protéines intervenant principalement au niveau des métabolismes glucidique et lipidique mais aussi dans les défenses anti-oxydantes. Au niveau génique, la composante inflammatoire s'est avérée être une cible majeure du DHA au niveau vasculaire. Plus précisément, la supplémentation en DHA a réduit l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire, la chimiotaxie et la présentation de l'antigène. Par ailleurs, plusieurs gènes se sont avérés être des marqueurs phénotypiques des macrophages et l'analyse des régulateurs transcriptionnels montrait une implication probable de PPAR γ , IFN γ et NF κ B dans les modulations d'expression génique observées. L'ensemble de nos analyses suggèrent donc une orientation préférentielle des macrophages vers un phénotype réparateur de type M2 chez les souris recevant la supplémentation en DHA. Ceci a été conforté par une analyse immunohistochimique au niveau aortique qui a révélé une plus grande abondance d'arginase I, un marqueur spécifique des macrophages réparateurs de type M2.

Pour aller plus loin dans la compréhension des propriétés anti-inflammatoires du DHA, et pour répondre à notre second objectif, nous avons choisi une approche plus ciblée alliant une étude *in vitro* sur un modèle de macrophages humains et l'utilisation de métabolites peroxydés spécifiques du DHA : les neuroprostanes. Cette étude nous a permis de conforter notre hypothèse selon laquelle le DHA pourrait agir au moins en partie *via* ses métabolites peroxydés. En effet, l'exposition des macrophages à deux types de neuroprostanes (les 4-F_{4t} et les 14-A₄-Neuroprostanes) a permis de réduire significativement l'expression et la sécrétion de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires. Par ailleurs, des résultats préliminaires suggèrent que ces effets anti-inflammatoires des neuroprostanes seraient indépendants de PPAR γ mais liés à une inhibition de la voie NF κ B.

En conclusion, l'étude *in vivo* et l'utilisation de la nutriginomique nous ont permis d'explorer de façon ouverte et non biaisée l'impact du DHA au niveau vasculaire. Les résultats majeurs de cette partie de notre travail sont que le DHA : 1) active le métabolisme énergétique et les défenses anti-oxydantes ; 2) diminue l'état inflammatoire avec une implication probable du DHA dans l'orientation phénotypique des macrophages vers un phénotype réparateur de type M2. Les résultats obtenus *in vitro* sur macrophages primaires humains confirment quant à eux que les métabolites peroxydés du DHA contribuent à ses propriétés anti-inflammatoires. Les recherches futures viseront à étudier plus précisément l'impact du DHA et de ses métabolites sur l'orientation phénotypique des macrophages qui pourrait être un nouveau mécanisme d'action anti-athérogène du DHA.

Mots clés : athérosclérose, AGPI ω 3-LC, DHA, aorte, nutriginomique, inflammation, peroxydation lipidique, neuroprostanes, macrophages.

Abstract

Numerous epidemiological studies have reported beneficial effects of long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (LC- ω 3PUFAs) on atherosclerosis and associated cardiovascular events. These fatty acids are mainly represented by eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) and are naturally abundant in seafood. LC- ω 3PUFAs exert their athero-protective action mainly by a reduction of triglyceridemia, increased endothelial relaxation, and reduced inflammation. Their specific action at the vascular level is suggested however, studies on this tissue remain scarce. Their mechanisms of action, even widely studied, are still only partially understood because of the complexity of action of LC- ω 3PUFAs at the cellular level. Indeed, LC- ω 3PUFAs directly or indirectly affect several membrane or cytosolic proteins, including transcription factors, which modulate numerous gene expression. The complexity is further increased when considering a wide range of oxygenated metabolites derived from LC- ω 3PUFAs. Among them, the metabolites from lipid peroxidation may be produced in abundance during atherogenesis but their bioactivity is almost unknown. Although the cardiovascular protective effects of LC- ω 3PUFAs and the associated mechanisms of action have been widely studied there are still major issues to be clarified, such as 1) the identification of cellular and molecular targets at the vascular level; 2) the bioactivity of peroxidized metabolites that could play a key role in the prevention of atherosclerosis. Therefore, the objective of this thesis was to study the impact of DHA at the vascular level and to evaluate the bioactivity of selected metabolites from DHA lipid peroxidation.

Studies on anti-atherogenic properties of DHA have so far been carried out only in a targeted manner that does not provide a comprehensive and integrated view of its spectrum of action. Thus, nutrigenomics appears to be a relevant and original approach to study, openly and without bias, the effects of DHA at the vascular level. For this, *in vivo* study was performed on LDLR^{-/-} atherosclerotic mice supplemented or not with DHA (2% of daily energy intake). The athero-protective effect of DHA has been confirmed in the previous study performed by our team reporting a 35% decrease of the atherosclerotic lesion in the DHA group. Aorta proteome study demonstrated a significant alteration of the expression of proteins involved mainly in the carbohydrate and lipid metabolism and also in antioxidant defenses. At the transcriptome level, the inflammatory component of atherosclerosis appears to be a major target of DHA at the vascular level. More precisely, DHA supplementation reduced the expression of genes involved in cell adhesion, chemotaxis and antigen presentation. In addition, several genes were found to be phenotypic markers of macrophages and analysis of transcriptional regulators showed a possible contribution of PPAR γ , IFN γ and NF κ B to the observed modulation of gene expression. So, our results suggest a preferential orientation of macrophages to a M2 type repair phenotype in mice receiving DHA supplementation. This was confirmed by immunohistochemical analysis at the aorta which revealed a greater abundance of arginase I, a specific marker of M2 type macrophages.

To go further in understanding the anti-inflammatory properties of DHA, and to meet our second objective, we chose a focused *in vitro* study of the action of specific DHA peroxidized metabolites: the neuroprostanes on a human macrophages. This study allowed us to confirm our hypothesis that DHA may act at least in part *via* its peroxidized metabolites. In fact, the macrophages exposition to two types of neuroprostanes (4-F_{4t} and 14-A₄-Neuroprostanes) has significantly reduced the expression and secretion of several pro-inflammatory mediators. Preliminary results suggest that these anti-inflammatory effects are PPAR γ -independent but related to inhibition of NF κ B pathway.

In conclusion, *in vivo* study, and nutrigenomics approach, allowed us to explore the impact of DHA at the vascular level by an open and unbiased way. The major results are that DHA: 1) activates energy metabolism and antioxidant defenses; 2) reduces the inflammatory component of atherosclerosis with a possible involvement of DHA in the phenotypic direction of macrophages to a M2 type repair phenotype. The results obtained *in vitro* on primary human macrophages confirmed that DHA peroxidized metabolites contribute to its anti-inflammatory properties. Future research will aim to investigate more precisely the impact of DHA and its metabolites on the phenotypic direction of macrophages which could be a new mechanism of anti-atherogenic action of DHA.

Key words: atherosclerosis, LC- ω 3PUFAs, DHA, aorta, nutrigenomic, inflammation, lipid peroxidation, neuroprostanes, macrophages.

Liste des Publications et Communications

Publications

1- Proteomic analysis of aorta of LDLR^{-/-} mice given omega-3 fatty acids reveals modulation of energy metabolism and oxidative stress pathway

Laurie Joumard-Cubizolles, Cécile Gladine, Nicolas Gérard, Christophe Chambon, Patrick Brachet, Blandine Comte, Andrzej Mazur

European Journal of Lipid Science and Technology, 2013

2- The omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid favorably modulates the inflammatory pathways and macrophage polarization within aorta of LDLR^{-/-} mice

Cécile Gladine, Monika Zmojdzian, **Laurie Joumard-Cubizolles**, Marie-Anne Verny, Blandine Comte, Andrzej Mazur

En préparation

3- Neuroprostanes derived from the docosahexaenoic acid peroxidation exert an anti-inflammatory action on human macrophages

Laurie Joumard-Cubizolles, Cécile Gladine, Dominique Bayle, Nathalie Hennuyer, Giuseppe Zanoni, Giulia Chinetti, Andrzej Mazur

En préparation

Communications orales

1- **Joumard-Cubizolles L.**, Gladine C., Zmojdzian M., Gérard N., Chambon C., Brachet P., Comte B., Mazur A.

Propriétés anti-athérosclérotiques du DHA : approche nutriginomique au niveau aortique chez la souris LDLR^{-/-}.

1^{ères} Assises de Nutrition et Métabolisme, Saint Galmier, France, 16 et 17 Octobre 2013

2- **Joumard-Cubizolles L.**, Gladine C., Zmojdzian M., Gérard N., Chambon C., Brachet P., Comte B., Mazur A.

Nutrigenomic effect of omega-3 fatty acids in the aorta of LDLR^{-/-} mice.

10th NuGOweek NUTRIGENOMICS & More, Freising-Weihenstephan, Allemagne, 9-12 Septembre 2013

3- **Joumard-Cubizolles L.**, Gladine C., Zmojdzian M., Gérard N., Chambon C., Brachet P., Comte B., Mazur A.

Effet anti-athérogène du DHA : étude du rôle et des mécanismes d'action des métabolites issus de la peroxydation.

Journée des doctorants de l'Unité de Nutrition Humaine (UNH), INRA, Clermont-Ferrand/Theix, France, 6 Septembre 2012

4- Joumard L., Gladine C., Zmojdzian M., Gérard N., Brachet P., Comte B., Mazur A.
Immunodétection des adduits protéiques aldéhydiques de type hydroxyalkénal au niveau vasculaire : études in vivo et in vitro.

9^{ème} Congrès Annuel de la NSFA, Biarritz, France, 14-16 Juin 2012

5- Joumard L., Zmojdzian M., Gérard N., Thien S., Yakoub S., Brachet P., Comte B., Rock E., Gladine C., Mazur A.

Immunodétection des adduits aldéhydiques de type hydroxyalkénal dans le protéome et le tissu aortique de souris athérosclérotiques – mise au point méthodologique.

Journée Scientifique du CRNH d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France, 24 Novembre 2011

6- Joumard L., Comte B., Brachet P., Gladine C., Malpuech-Brugère C., Chardigny JM., Mazur A.

Intérêt des acides gras polyinsaturés oméga-3 dans la prévention nutritionnelle de l'athérosclérose : contribution de la peroxydation lipidique et impact sur le protéome vasculaire.

Journée des doctorants de l'Unité de Nutrition Humaine (UNH), INRA, Clermont-Ferrand/Theix, France, 24 Mai 2011

Communications affichées

1- Joumard L., Gladine C., Zmojdzian M., Gérard N., Brachet P., Comte B., Mazur A.

Immunodétection des adduits protéiques aldéhydiques de type hydroxyalkénal au niveau vasculaire : études in vivo et in vitro.

Journées de l'Ecole Doctorale, Clermont-Ferrand, France, 24-25 Mai 2012

9^{ème} Congrès Annuel de la NSFA, Biarritz, France, 14-16 Juin 2012

2- Joumard L., Zmojdzian M., Gérard N., Thien S., Yakoub S., Brachet P., Comte B., Rock E., Gladine C., Mazur A.

Immunodétection des adduits aldéhydiques de type hydroxyalkénal dans le protéome et le tissu aortique de souris athérosclérotiques – mise au point méthodologique.

Journée de la Recherche (IFR), Clermont-Ferrand, France, 1^{er} Décembre 2011

Obtention d'une bourse pour participation à un congrès international

Bourse de la Société Française de Nutrition (SFN), Septembre 2013



Liste des Figures

Figure 1 : Proportion de décès par pathologies non transmissibles chez les personnes de moins de 70 ans en 2008

Figure 2 : Facteurs de risque cardiovasculaire modifiables et non modifiables

Figure 3 : Relation entre facteur de risque et infarctus du myocarde chez l'homme et la femme après ajustement selon l'âge, le sexe et la région géographique

Figure 4 : Structure de la paroi artérielle

Figure 5 : Processus inflammatoire impliqué dans le développement de l'athérosclérose

Figure 6 : Formation de la lésion compliquée et thrombose

Figure 7 : Polarisation des macrophages et implication dans le développement de l'athérosclérose

Figure 8 : Schéma représentant les différentes familles d'acides gras et leurs principaux membres

Figure 9 : Nomenclature des AGPI : exemple du DHA

Figure 10 : Voie de conversion de l'acide α -linoléique en ses dérivés à longue chaîne

Figure 11 : Teneurs en EPA et DHA dans les produits de la mer et autres aliments

Figure 12 : Association entre la consommation de poisson (1 portion par semaine) et la mortalité coronarienne

Figure 13 : Relation entre la consommation de poisson ou d'AGPI ω 3-LC et le risque de maladies cardiovasculaires

Figure 14 : Pourcentage de lésions athérosclérotiques chez les Alaskiens natifs *versus* non natifs en fonction de l'âge

Figure 15 : Etendue des lésions athérosclérotiques au niveau des aortes de souris LDLR^{-/-}

Figure 16 : Evolution du nombre de publications relatives aux propriétés cardio-protectrices des AGPI ω 3-LC

Figure 17 : Effets physiologiques des AGPI ω 3 pouvant influencer le risque cardiovasculaire

Figure 18 : Effet hypotriglycéridémiant, dose-dépendant, des AGPI ω 3-LC

Figure 19 : Mécanismes d'action impliqués dans l'effet hypotriglycéridémiant des AGPI ω 3-LC

Figure 20 : Modulation de la lipogenèse et de la β -oxydation par les AGPI ω 3-LC

Figure 21 : Effet hypotriglycéridémiant de l'huile de poisson et expression génique de la LPL dans le tissu adipeux

Figure 22 : Modification de la FMD de l'artère brachiale chez des sujets recevant un traitement placebo ou des AGPI ω 3-LC

Figure 23 : Activation de l'enzyme eNOS et production de NO suite à l'exposition de cellules endothéliales humaines à l'EPA

Figure 24 : Expression protéique de l'enzyme iNOS et production de NO dans des cellules musculaires lisses exposées à l'EPA ou au DHA

Figure 25 : Expression d'E-sélectine, VCAM-1 et adhésion des neutrophiles à la surface de cellules endothéliales humaines traitées avec des AGPI ω 3-LC

Figure 26 : Effet du DHA sur la sécrétion des cytokines IL-6 et IL-8 par les cellules endothéliales humaines

Figure 27 : Niveau d'expression de MCP-1 dans des monocytes humains issus de sujets supplémentés en huile de poisson

Figure 28 : Mécanismes par lesquels une modification d'apport en acides gras peut affecter la réponse immunitaire

Figure 29 : Relation, dose-dépendante, entre la consommation d'huile de thon et la quantité d'EPA, DHA et acide arachidonique dans les phospholipides membranaires de neutrophiles humains

Figure 30 : Synthèse et effet des médiateurs lipidiques enzymatiques dérivés de l'acide arachidonique, de l'EPA et du DHA

Figure 31 : Voie d'activation de NFκB

Figure 32 : Effet des AGPIω3-LC sur les facteurs de transcription NFκB et PPARs

Figure 33 : Mécanismes d'action des AGPIω3-LC

Figure 34 : Schéma représentant la multiplicité des cibles tissulaires, cellulaires et moléculaires des AGPIω3-LC

Figure 35 : Biosynthèse des eicosanoïdes dérivés de l'EPA

Figure 36 : Biosynthèse des résolvines de la série E dérivées de l'EPA

Figure 37 : Biosynthèse des résolvines de la série D dérivées du DHA

Figure 38 : Biosynthèse de la protectine D1 dérivée du DHA

Figure 39 : Biosynthèse de la marésine 1 dérivée du DHA

Figure 40 : Métabolisme de l'EPA et du DHA par la voie de la CYP450 époxygénase

Figure 41 : Schéma de la peroxydation lipidique des AGPIω3-LC

Figure 42 : Voie de formation des F₃-IsoP par oxydation non-enzymatique de l'EPA

Figure 43 : Voie de formation des A₃/J₃-IsoP par oxydation non-enzymatique de l'EPA

Figure 44 : Voie de formation des F₄-NeuroP par oxydation non-enzymatique du DHA

Figure 45 : Voie de formation des A₄/J₄-NeuroP par oxydation non-enzymatique du DHA

Figure 46 : Métabolites oxygénés issus de l'oxydation enzymatique et non-enzymatique des AGPIω3-LC

Figure 47 : Mécanismes d'action de la résolvine E1 *via* les récepteurs couplés aux protéines G : BLT1 et ChemR23

Figure 48 : Effet du 4-HHE sur l'expression de l'HO-1 dans des cellules endothéliales HUVEC incubées pendant 2 h en présence de 1, 5 ou 10 μM de 4-HHE

Figure 49 : Schéma représentant l'inhibition de la voie de signalisation de NFκB par les isoprostanes cyclopentenones dérivés de l'EPA

Figure 50 : 14-A₄-NeuroP inhibe l'expression d'iNOS et COX-2 *via* l'inactivation de la voie de signalisation de NFκB dans les macrophages

Liste des Abréviations

4-HHE : 4-hydroxy-2-hexenal

4-HNE : 4-hydroxy-2-nonenal

AA : acide arachidonique

ACC1 : acétyl-CoA carboxylase 1

AGMI : acides gras mono-insaturés

AGPI : acides gras polyinsaturés

AGPI ω 3 ou ω 6: acides gras polyinsaturés oméga-3 ou oméga-6

AGPI ω 3-LC : acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne

AGS : acides gras saturés

ALA : acide α -linoléinique

ALX : récepteur de la lipoxine A4

ANC : apports nutritionnels recommandés

ANSES : agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ApoB100 : apolipoprotéine B100

Apo CII ou CIII : apolipoprotéine CII ou CIII

ApoE : apolipoprotéine E

ApoE^{-/-} : souris déficientes pour l'ApoE

AVC : accidents vasculaires cérébraux

BK : bradykinine

BLT1 : leukotriene B4 receptor 1

CCL-5 : chemokine (C-C) motif ligand 5

CCR2 : C-C chemokine receptor type 2

CCR5 : C-C chemokine receptor type 5

CD36 : cluster of differentiation 36

CépiDC : centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès

ChemR23 : chemerin-receptor 23 ou chemokine-like receptor 1

ChREBP : carbohydrate regulatory element binding protein

CML : cellules musculaires lisses

COX : cyclo-oxygénase

cPLA₂ : phospholipase A₂ cytosolique

CXCR1 : CXC chemokine receptor type 1

CYP450 : cytochromes P450

DART1 : diet and reinfarction trial 1

DART2 : diet and angina randomized trial 2

DGAT : acyl-CoA diacylglycerol acyltransférase

DHA : acide docosahexaénoïque

DiHDHA : acide dihydroxy-docosahexaénoïque

DiHDoPE : acide dihydroxy-docosapentaénoïque

DiHETE : acide dihydroxy-eicosatétraénoïque

DPA : acide docosapentaénoïque

ELAM-1 : endothelial leukocyte adhesion molecule 1
eNOS : endothelial nitric oxide synthase
EPA : acide eicosapentaénoïque
EpDoPE : dihydroxy-docosapentaénoïque
EpETE : acide époxy-eicosatétraénoïque

FA : fatty acids
FAS : fatty-acid synthase
FMD : dilatation artérielle médiée par le flux
FXR : récepteur des acides biliaires ou Farnesoid X Receptor

GISSI : gruppo italiano per la sperimentazione dell streptochinasi nell'infarto miocardio prevenzione
GPR : récepteur couplé aux protéines G

HDL : lipoprotéine de haute densité
HDHA ou HDoHE : acide hydroxy-docosahexaénoïque
HEPE : acide hydroxy-eicosapentaénoïque
HO-1 : hème oxygénase 1
HpDHA : acide hydropéroxy-docosahexaénoïque
HpEPE : acide hydropéroxy-eicosapentaénoïque
HSP90 : heat shock protein 90 kDa

IC : intervalle de confiance
ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1
IFN γ : interferon γ
I κ B : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
IKK: I κ B kinase
IL- : interleukine
IL-1R : interleukin-1 receptor
IMC : indice de masse corporelle
IsoP : isoprostane
I_{TO} : courant sortant transitoire

JELIS : japanese EPA lipid intervention study

LA : acide linoléique
LDL : lipoprotéine de faible densité
LDLox : LDL oxydées
LDLR : récepteur aux lipoprotéines de faible densité
LDLR^{-/-} : souris dépourvues de récepteurs LDL
LOX-1 : lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1
LOX : lipoxygénase
LPL : lipoprotéine lipase
LPS : lipopolysaccharide bactérien
LT : leucotriène
LXR α : récepteur des oxystérols ou Liver X Receptor α
LXREs : éléments de réponse aux LXR

M1 : macrophages classiques

M2 : macrophages alternatifs
MaR1 : marésine 1
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MCP-1 : monocyte chemotactic protein 1
M-CSF : macrophage colony-stimulating factor
MCV : maladies cardiovasculaires
MDA : malondialdéhyde
MLX : max-like factor X
MMPs : métalloprotéinases
MONICA : multinational MONItoring of trends determinants in CARdiovascular disease

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène
NEFA : non esterified fatty acids
NeuroF : neurofurane
NeuroK : neurokétale
NeuroP : neuroprostane
NFκB : nuclear factor-kappa B
NFκB RE : éléments de réponse à NFκB
Ni-Hon-San : Nipon-Honolulu-San Francisco
NO : oxyde nitrique
Nrf2 : NF-E2 p45-related factor 2

OMS : organisation mondiale de la santé

PA : activateur de plasminogène
PAP : acide phosphatidique phosphohydrolase
PAR : population attributable risk
PC : étude prospective
PCAM-1 : platelet cell adhesion molecule 1
PD1 : protectine D1
PDGF : platelet-derived growth factor
PG : prostaglandine
PGI : prostacycline
PKC : protein kinase C
PMN : polymorphonucléaire
PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor
PPREs : éléments de réponse à PPAR

RCT : étude randomisée
ROS : espèces oxygénées réactives
RR : risque relatif
RvD : résolvines de la série D
RvE : résolvines de la série E
RXRα : récepteur de l'acide rétinoïque ou Retinoid X Receptor α

SCIMO : study on prevention of Coronary atherosclerosis by Intervention with Marine Omega-3 fatty acids
SOD1 : superoxyde dismutase 1
SR-A : scavenger receptor A
SREBP-1c : sterol regulatory element-binding protein 1c

SU.FOL.OM3 : SUplémentation en FOLates et OMéga-3

TG : triglycérides

Th : lymphocyte T helper

TLR4 : toll-like receptor 4

TNF α : tumor necrosis factor α

TX : thromboxane

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1

VLA-4 : very late antigen 4

VLDL : lipoprotéine de très faible densité

AVANT-PROPOS

Avant-Propos

Les maladies chroniques sont de loin la première cause de mortalité au niveau mondial représentant près de 60% des décès à l'heure actuelle. En France, 15 millions de personnes souffrent d'une maladie chronique ce qui, outre les aspects sanitaires, a d'importantes répercussions personnelles et professionnelles. Les principales autorités de santé publique au niveau mondial s'accordent à dire que la nutrition peut jouer un rôle clé dans la prévention des maladies chroniques. En ce qui concerne l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires associées qui sont au centre de nos préoccupations, la nutrition lipidique a depuis longtemps été identifiée comme un levier d'action particulièrement pertinent. Dans ce domaine, les données de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) indiquent clairement que tant sur le plan quantitatif que qualitatif, les lipides peuvent largement influencer l'incidence des maladies cardiovasculaires (MCV). Ainsi, d'après l'ANSES, un apport en lipides totaux de 35 à 40% de l'apport énergétique est recommandé chez l'adulte. D'un point de vue qualitatif, l'apport des différentes familles d'acides gras, à savoir les acides gras saturés (AGS), les acides gras mono-insaturés (AGMI) et les acides gras polyinsaturés incluant les oméga-6 et oméga-3 (AGPI ω 6 et AGPI ω 3) doit être équilibré pour contribuer au mieux à la prévention des MCV. Par exemple, il est admis qu'un apport énergétique supérieur à 12% en AGS est associé à un risque accru de développer une pathologie cardiovasculaire. Les AGMI sont quant à eux plus neutres vis-à-vis du risque de MCV mais les données épidémiologiques montrent néanmoins une corrélation inverse entre leur consommation et la mortalité cardiovasculaire. Enfin, en ce qui concerne les AGPI, la notion de rapport ω 6/ ω 3 est primordiale et devrait respecter une valeur aux alentours de 4/1 pour contribuer au mieux à la réduction du risque de MCV. Notre intérêt pour cette famille particulière d'acides gras s'est focalisé sur les AGPI ω 3 à longue chaîne (AGPI ω 3-LC), l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), qui sont naturellement abondants dans les produits de la mer et largement reconnus pour leurs propriétés athéro- et cardio-protectrices. Celles-ci ont été initialement attribuées aux propriétés hypotriglycéridémiantes des AGPI ω 3-LC mais plus récemment il a été admis que les AGPI ω 3-LC exercent aussi leur action athéro-protectrice au niveau local. Toutefois les travaux au niveau vasculaire restent relativement rares. D'un point de vue plus mécanistique, de grandes zones d'ombre persistent probablement en raison de la complexité d'action des AGPI ω 3-LC. En effet, ces derniers ont de multiples cibles cellulaires

et moléculaires engendrant directement ou indirectement la modulation de nombreux gènes. Le niveau de complexité s'accroît encore si l'on considère l'ensemble des métabolites oxygénés potentiellement bioactifs générés *via* des voies enzymatiques ou non-enzymatiques. Jusqu'à présent, les études visant à élucider les mécanismes d'action athéro-protectrice des AGPI ω 3-LC ont essentiellement utilisé des approches *in vitro* ciblées, difficilement extrapolables *in vivo* et fournissant une vision probablement très limitée de l'action cellulaire et moléculaire des AGPI ω 3-LC. Au vue de cette limite, la nutriginomique, consistant en l'étude de l'interaction entre les gènes et les nutriments, associée aux outils bioinformatiques, a été jugée comme une approche particulièrement pertinente et parfaitement originale pour identifier, sans *a priori*, les cibles moléculaires des AGPI ω 3-LC au niveau vasculaire. Par ailleurs, la prise en compte de l'oxygénation non-enzymatique du DHA nous est apparue comme une évidence dans ce contexte d'étude associant un stress oxydant lié à l'athérosclérose et la prédisposition des AGPI ω 3-LC, et plus particulièrement du DHA, à la peroxydation lipidique. Ceci nous a conduits à la mise en place d'une étude *in vitro* dans laquelle les effets des métabolites peroxydés spécifiques du DHA, à savoir les neuroprostanes, ont été testés.

La première partie de mon manuscrit consiste en une revue bibliographique qui est organisée en 5 chapitres. Le premier rappelle quelques notions sur les maladies cardiovasculaires et leur physiopathologie. Le second est focalisé sur le rôle des AGPI ω 3-LC dans la prévention nutritionnelle des maladies cardiovasculaires et de l'athérosclérose, et est suivi par la description des effets et mécanismes athéro-protecteurs des AGPI ω 3-LC. Enfin les deux derniers chapitres de l'introduction se sont concentrés spécifiquement sur le métabolisme oxygéné des AGPI ω 3-LC et la bioactivité de leurs métabolites. La seconde partie de mon manuscrit présente les objectifs et la stratégie adoptée dans mon travail de thèse dont les résultats sont exposés sous forme de trois articles (1 accepté et 2 en préparation). La discussion générale est consacrée à l'interprétation des résultats obtenus et leur discussion par rapport aux connaissances actuelles. Enfin, les perspectives qui découlent de mon travail viennent clore ce manuscrit.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

Revue Bibliographique

I- Les maladies cardiovasculaires (MCV)

Les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Les MCV comprennent les cardiopathies coronariennes (angine de poitrine, infarctus du myocarde), les maladies cérébro-vasculaires (accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques ou hémorragiques), les artériopathies périphériques (artérite des membres inférieurs), les cardiopathies rhumatismales, les malformations cardiaques congénitales et les thromboses veineuses et embolies pulmonaires (d'après l'OMS, organisation mondiale de la santé). La plupart de ces pathologies cardiovasculaires sont la traduction d'une pathologie chronique, l'athérosclérose, évoluant sur des décennies. L'athérosclérose se caractérise par un remaniement de l'intima par l'accumulation de lipides, d'éléments sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires. Cette pathologie évolutive aboutit au rétrécissement de la lumière artérielle par le développement d'une plaque d'athérosclérose. Selon sa taille, la plaque peut obstruer les vaisseaux et conduire à une ischémie chronique à l'origine de l'angine de poitrine ou de l'artérite. A un stade avancé de la pathologie, la plaque peut se compliquer et se rompre conduisant alors à des événements aigus comme l'infarctus du myocarde et les AVC.

I-1- Incidence des MCV

Les MCV représentent la principale cause de mortalité dans le monde avec 17,3 millions de décès enregistrés en 2008, soit 30% de la mortalité totale toutes causes confondues (d'après l'OMS) (**Figure 1**). Avec respectivement 7,3 millions et 6,2 millions de décès enregistrés en 2008, l'infarctus du myocarde et les AVC sont les deux causes principales de mortalité par MCV (d'après l'OMS). Dans l'Union Européenne, les MCV sont également la première cause de mortalité avec 1,9 millions de décès par an soit 42% de la mortalité totale (d'après l'OMS, statistiques 2008). En France, entre 2008 et 2010, 27% des décès annuels (environ 150 000) étaient dus aux maladies de l'appareil circulatoire. Ces dernières représentent la deuxième cause de mortalité après les cancers (d'après le CépiDC, centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès). D'ici 2030, d'après l'OMS, 23,3 millions de personnes devraient décéder de MCV et ces maladies devraient rester les

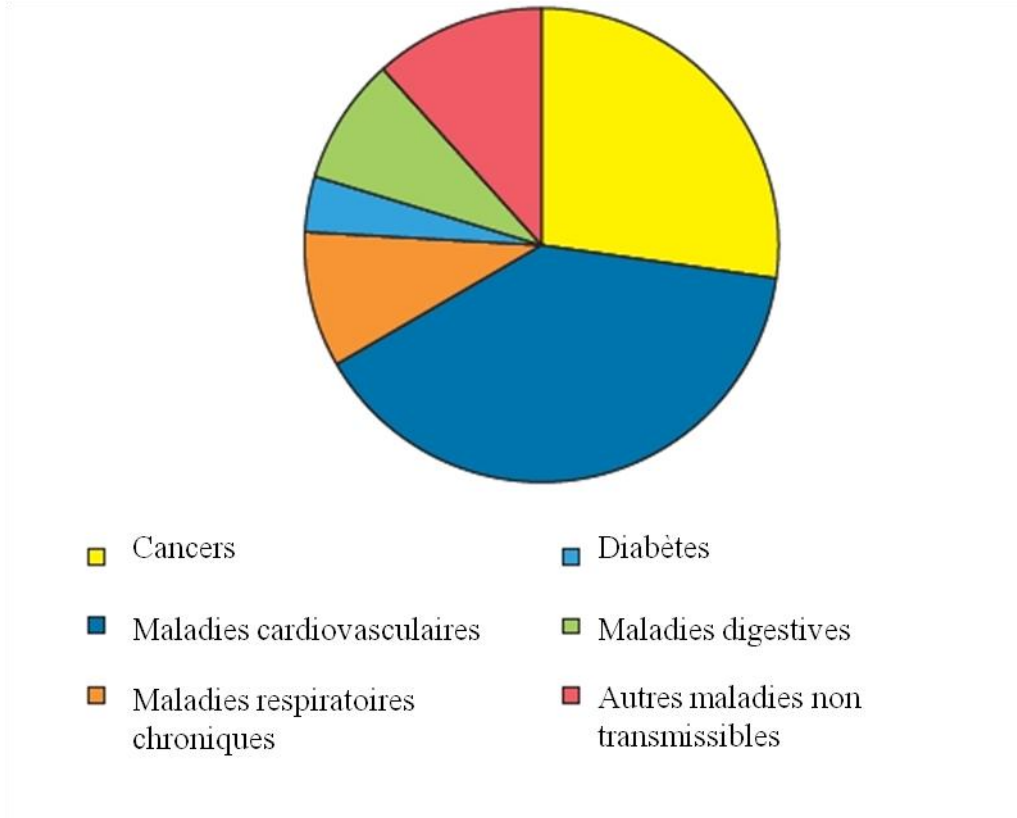


Figure 1 : Proportion de décès par pathologies non transmissibles chez les personnes de moins de 70 ans en 2008
(OMS, 2010, «Global status report on noncommunicable diseases»)

premières causes de mortalité. Enfin, il faut souligner qu'en plus de leur coût humain, les pathologies cardiovasculaires ont également un impact important sur les coûts de santé publique.

I-2- Facteurs de risque des MCV

Les facteurs de risque des MCV ont été déterminés dans de nombreuses études épidémiologiques (ex. études Ni-Hon-San, Framingham, Seven Countries, MONICA) (Freund *et al.*, 1993; Menotti *et al.*, 1993; Robertson *et al.*, 1977; Tunstall-Pedoe *et al.*, 1999). Ces études ont permis de corrélérer plusieurs paramètres (dyslipidémies, hypertension artérielle, tabagisme, habitudes alimentaires, ...) avec la survenue des MCV. Les facteurs de risque ont été classés en deux catégories principales : les facteurs de risque dits non modifiables (âge, sexe, antécédents familiaux) et les facteurs de risque dits modifiables ou comportementaux (tabagisme, consommation d'alcool, dyslipidémies, alimentation, inactivité physique ...) (**Figure 2**).

I-2-1- Facteurs de risque non modifiables

Concernant les facteurs de risque non modifiables, il a été établi que le risque de développer une MCV est fortement influencé par l'âge et le sexe. En effet, la mortalité cardiovasculaire augmente avec l'âge de manière quasi exponentielle et les femmes (jusqu'à la ménopause) sont moins sensibles que les hommes à la survenue de pathologies cardiovasculaires (Baudin & Cohen 2009) (Berdah & Amah 2009).

La transmission familiale de caractéristiques génétiques peut également contribuer à l'apparition de MCV. Des mutations dans les gènes codant pour : le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLR) ou l'apolipoprotéine E (ApoE) sont respectivement à l'origine de l'hypercholestérolémie familiale et de la dysbétalipoprotéïnémie (Brown & Goldstein 1976; Rall & Mahley 1992). Ces mutations entraînent des altérations fonctionnelles du LDLR ou de l'ApoE et conduisent à une moindre clairance des lipoprotéines de faible et très faible densité (LDL et VLDL) engendrant des concentrations plasmatiques élevées en LDL et VLDL pouvant provoquer des événements cardiovasculaires prématurés (Nabel 2003; Rader *et al.*, 2003). Des troubles de la coagulation ou l'hypertension artérielle peuvent également être transmis génétiquement et conduire à la survenue de MCV (Nabel 2003; Ridker *et al.*, 1995).

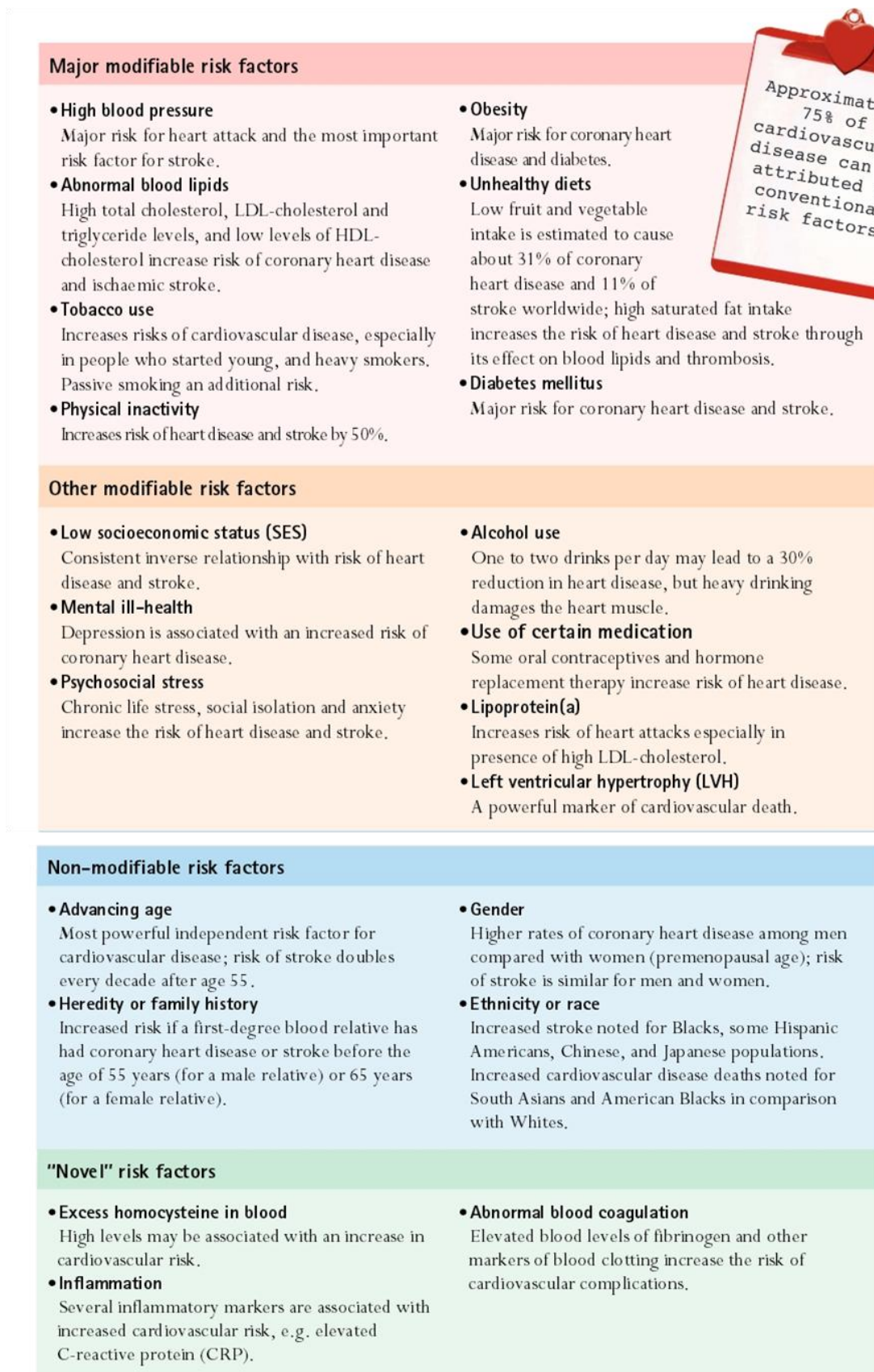


Figure 2 : Facteurs de risque cardiovasculaire modifiables et non modifiables
(OMS, 2004, «The atlas of heart disease and stroke»)

I-2-2- Facteurs de risque modifiables

Les facteurs de risque modifiables incluent le tabagisme, l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle, le diabète de type II, l'obésité, la sédentarité, les habitudes alimentaires, la consommation excessive d'alcool ou encore des facteurs psychologiques (ex. stress).

L'importante étude cas-témoins INTERHEART réalisée sur environ 30 000 sujets répartis sur 52 pays a rapporté que neuf facteurs de risque (dyslipidémie, tabagisme, hypertension, diabète, obésité, stress, consommation excessive d'alcool, consommation faible de fruits et légumes et faible activité physique) sont associés à la survenue de 90% des infarctus du myocarde (Yusuf *et al.*, 2004) (**Figure 3**).

Les études épidémiologiques Ni-Hon-San (Nipon-Honolulu-San Francisco, réalisée sur des Japonais vivant au Japon, à Honolulu ou à San Francisco), Framingham (conduite sur des sujets vivant dans cette ville Américaine) et MONICA (multinational MONItoring of trends determinants in CARDiovascular disease, étude réalisée par l'OMS sur des sujets répartis dans 21 pays à travers le monde) ont été utilisées pour mettre en évidence les facteurs de risque des MCV et ont établi diverses corrélations. L'étude Ni-Hon-Son a rapporté une association entre l'augmentation de la cholestérolémie attribuée à une modification du comportement alimentaire et l'incidence de l'infarctus du myocarde (Robertson *et al.*, 1977). L'étude Framingham a établi une corrélation entre le risque de survenue d'une MCV et l'hypertension artérielle, la dyslipidémie (élévation du cholestérol total et du LDL-cholestérol et diminution du HDL(lipoprotéine de haute densité)-cholestérol) et le tabagisme (Freund *et al.*, 1993). Enfin, l'étude MONICA a estimé que l'indice de masse corporelle (IMC), le tabagisme, la pression artérielle ou encore la cholestérolémie pourraient contribuer à 40% pour les hommes et 15% pour les femmes à l'incidence des maladies coronariennes (Kuulasmaa *et al.*, 2000). Concernant le tabagisme, il a été rapporté que fumer plus de 20 cigarettes par jour augmenterait de 70 à 80% le risque de développer une pathologie coronarienne par rapport aux non-fumeurs (Keil 2000). Dans ces études, l'hypertension artérielle et la dyslipidémie apparaissent également comme des facteurs de risque importants, et ces deux paramètres sont souvent associés. Une méta-analyse a rapporté qu'entre 40 et 69 ans, une augmentation de la pression systolique de 20 mmHg double le risque de troubles cardiovasculaires aussi bien chez l'homme que chez la femme (Lewington *et al.*, 2002). Les taux de LDL et HDL plasmatiques constituent de bons critères de prédiction des MCV. Ainsi, des concentrations faibles en LDL (<130 mg/dL) et élevées en HDL (>40 mg/dL) sont associées à un moindre

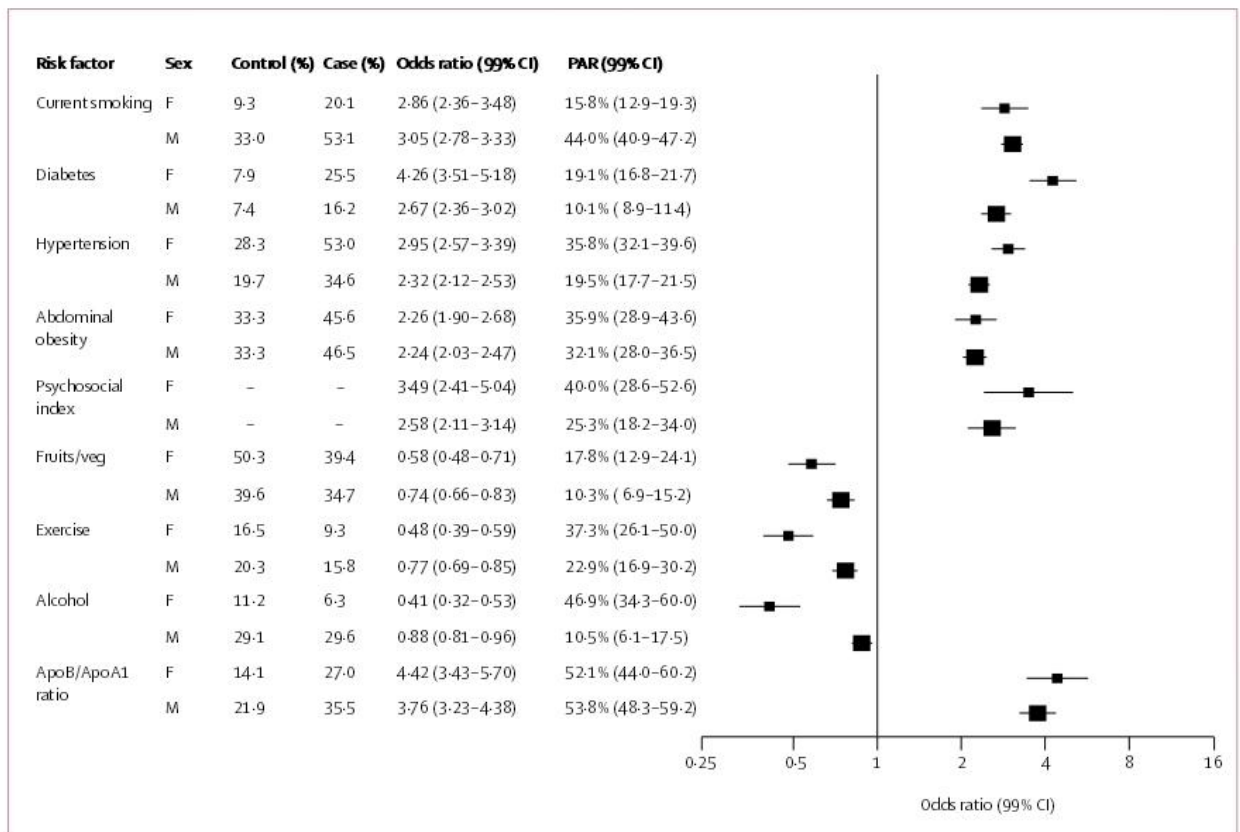


Figure 3 : Relation entre facteur de risque et infarctus du myocarde chez l'homme et la femme après ajustement selon l'âge, le sexe et la région géographique
(Yusuf et al., 2004)

PAR = population attributable risk

IC = intervalle de confiance

risque de MCV (Keil 2000). De plus, l'hypertriglycéridémie (>200 mg/dL) est également un facteur de risque reconnu des MCV.

Le diabète de type II est également un facteur de risque important des MCV. Une méta-analyse a rapporté que le taux d'accidents coronariens fatals est supérieur chez des personnes souffrant de diabète de type II (5,4%) par rapport à des patients n'en souffrant pas (1,6%) (Huxley *et al.*, 2006). Enfin l'obésité et la surcharge pondérale, dues principalement à de mauvaises habitudes alimentaires et à un mode de vie sédentaire, en association avec le diabète, l'hypertension et l'hyperlipidémie représente un ensemble de facteur de risque important des MCV (Musaad & Haynes 2007). L'OMS estime qu'en 2015, environ 2,3 milliards de personnes seront en surpoids dans le monde et 700 millions seront obèses ce qui contribue largement aux perspectives alarmantes relatives à l'incidence des MCV évoquées plus haut.

Récemment de nouveaux facteurs de risque ont été mis en évidence, il s'agit de marqueurs inflammatoires, pro-thrombotiques ou certains métabolites (homocystéine) (d'après l'OMS).

Il est intéressant de noter que les facteurs de risque comportementaux sont responsables d'environ 80% des maladies coronariennes et cérébraux vasculaires (d'après l'OMS) ce qui souligne toute la pertinence d'une approche de prévention en complément des approches curatives classiques. Dans ce domaine, la nutrition et plus particulièrement la nutrition lipidique représentent un levier d'action particulièrement intéressant.

I-3- Physiopathologie de l'athérosclérose

Comme rapporté précédemment, l'athérosclérose est la composante principale des MCV. Cette pathologie se développe dans les artères de gros et moyen calibre (aorte, artères carotidiennes, coronaires, iliaques et fémorales) et évolue de manière progressive sur plusieurs décennies. La paroi artérielle est organisée en trois tuniques, de la lumière vasculaire vers l'extérieur : l'intima, la media et l'adventice (**Figure 4**). C'est au niveau de l'intima, tunique constituée d'une monocouche de cellules endothéliales, que se développe plus précisément l'athérosclérose. La média et l'adventice sont, respectivement, essentiellement formées de cellules musculaires lisses (CML) et de tissus conjonctifs entrecoupés de fibroblastes et CML. Le processus d'athérogénèse, est décrit comme la succession de trois stades lésionnels qui évoluent de la strie lipidique vers la lésion fibro-lipidique (plaque fibreuse) jusqu'à la lésion compliquée. Il est important de noter que les cellules

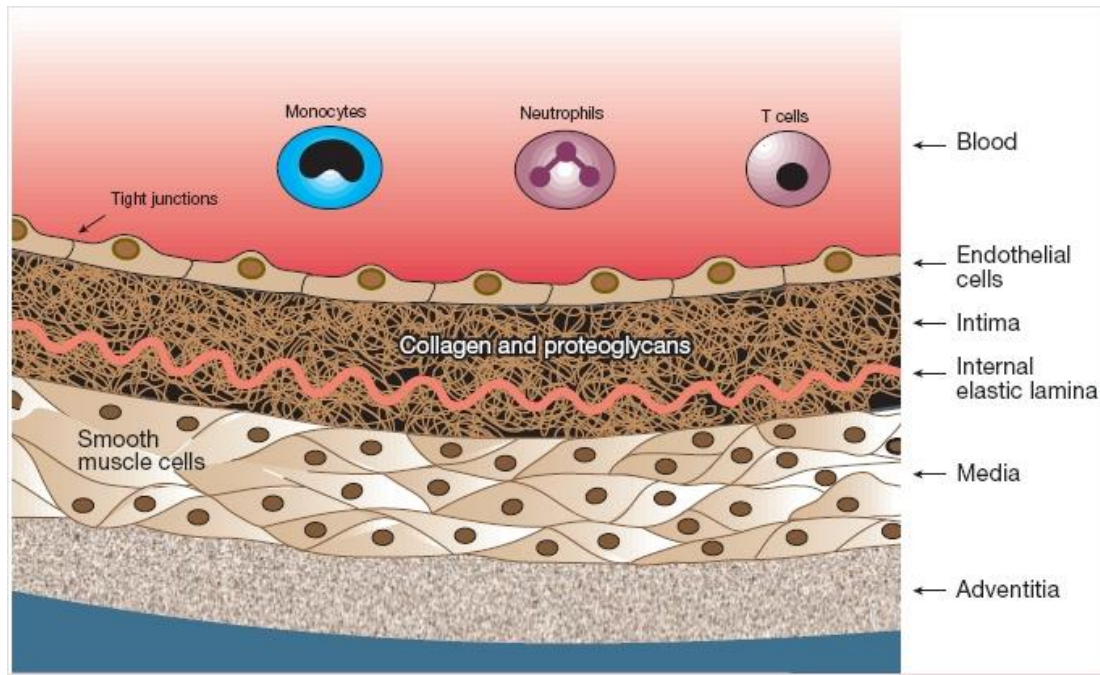


Figure 4 : Structure de la paroi artérielle
(Lusis 2000)

La paroi artérielle est formée de 3 couches ou tuniques morphologiquement distinctes. L'intima, tunique la plus interne, est délimitée par une monocouche de cellules endothéliales situées près de la face luminale et de fibres élastiques (lamina interne) à la face périphérique. L'intima est une matrice extracellulaire de tissu conjonctif composée de collagène et protéoglycane. La media, tunique moyenne, est composée de CML. L'adventice, tunique la plus externe, est composée de tissus conjonctifs entrecoupés de CML et fibroblastes.

inflammatoires et plus particulièrement les macrophages interviennent à chacune de ces étapes et jouent un rôle clé dans l'ensemble de ce processus (Lusis 2000).

I-3-1- Initiation de l'athérosclérose : formation de la strie lipidique

L'accumulation de LDL dans l'espace sous-endothélial de la paroi artérielle constitue l'événement initiateur du processus d'athérogénèse. L'accumulation de ces lipoprotéines peut résulter d'une augmentation de la perméabilité endothéliale due à une modulation des facteurs hémodynamiques (forces de cisaillement par exemple) ou d'une concentration plasmatique en LDL élevée. Les LDL circulantes ont la capacité de diffuser entre les cellules endothéliales, de manière passive par transcytose. Leur rétention dans l'intima se fait par interaction entre l'apolipoprotéine B100 (ApoB100) présente à leur surface et les protéoglycanes de la matrice extracellulaire. Une fois piégées dans l'intima, les LDL s'accumulent dans l'espace sous-endothélial où elles vont subir des modifications oxydatives sous l'action des espèces oxygénées réactives (reactive oxygen species ou ROS) produits en abondance par les divers types cellulaires constitutifs du tissu vasculaire. L'accumulation de particules LDL oxydées (LDLox) dans l'espace sous-endothélial va par la suite déclencher une réponse inflammatoire de l'endothélium. En effet, les LDLox vont favoriser le recrutement et l'infiltration des monocytes circulants au sein de l'intima en induisant l'activation de l'endothélium. Cette dernière se caractérise notamment par l'expression de molécules d'adhésion telles que VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), P-sélectine, E-sélectine et fibronectine à la surface des cellules endothéliales (Hulsmans & Holvoet 2010; Lusis 2000). Ces molécules d'adhésion vont permettre l'adhésion et le recrutement des monocytes à l'endothélium *via* leur liaison aux ligands de la famille des intégrines (VLA-4, very late antigen 4, intégrine β -2) présents à la surface des leucocytes. Le recrutement des monocytes implique également la production de facteurs chimiotactiques tels que MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), IL-8 (interleukine-8), CCL-5 (chemokine (C-C motif) ligand 5) par les cellules endothéliales et les macrophages ainsi que l'expression des récepteurs à ces chimiokines par les monocytes (CCR2 (C-C chemokine receptor type 2), CXCR1 (CXC chemokine receptor type 1) et CCR5 (C-C chemokine receptor type 5), respectivement) (Swirski & Nahrendorf 2013). Les monocytes ainsi recrutés vont pénétrer dans l'espace sous-endothélial par un phénomène de diapédèse où ils vont se différencier en macrophages sous l'influence du facteur hématopoïétique de différenciation et de prolifération, le M-CSF (macrophage colony-stimulating factor). Les macrophages vont alors

internaliser, par l'intermédiaire de leurs récepteurs scavengers (« éboueurs »), les particules LDLox formant ainsi les cellules spumeuses. Deux types de récepteurs scavengers, SR-A (scavenger receptor A) et CD36 (cluster of differentiation 36) sont principalement impliqués dans la captation et l'internalisation des LDLox. L'expression de ces récepteurs scavengers est régulée par le facteur de transcription PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) et par les cytokines telles que TNF α (tumor necrosis factor- α) et IFN γ (interferon- γ). Les cellules spumeuses ainsi formées vont s'accumuler et contribuer à la formation des stries lipidiques caractéristiques de la plaque au stade précoce du développement (Lusis 2000). Les LDLox peuvent également inhiber la production d'oxyde nitrique, un médiateur chimique aux propriétés anti-athérogènes et notamment vasorelaxantes. Cette inhibition est également caractéristique de l'activation endothéliale (Lusis 2000).

I-3-2- Progression de l'athérosclérose : formation de la lésion fibro-lipidique

Au cours du processus d'athérogenèse, les macrophages et les lymphocytes activés par les LDLox et infiltrant la lésion d'athérosclérose, entretiennent une réaction inflammatoire chronique (**Figure 5**). En effet, ils sécrètent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN γ , etc.) ainsi que des facteurs de croissance comme le PDGF (platelet-derived growth factor) (Tedgui & Mallat 2006). La sécrétion de ces molécules amplifie l'effet des LDLox et entretient le processus inflammatoire pro-athérogène en favorisant l'expression des chimiokines et des molécules d'adhésion dans les cellules endothéliales. De plus, l'activation des macrophages et lymphocytes accélère la génération de ROS. En effet, les macrophages activés expriment des enzymes telles que les myéloperoxydases et la NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène) oxydase qui vont générer des ROS (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, acide hypochloreux) entretenant ainsi le stress oxydant impliqué dans le développement de l'athérosclérose (Hulsmans & Holvoet 2010). Les cytokines pro-inflammatoires et facteurs de croissance sont également à l'origine de la migration des CML de la média vers l'intima (Dzau *et al.*, 2002). Les CML ayant migré peuvent exprimer à leur surface des récepteurs tels que LDLR, CD36 ou LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1) qui vont reconnaître et internaliser les LDLox de la même façon que les macrophages (Silverstein 2009; Sun & Chen 2011). Les CML vont alors se transformer en cellules spumeuses et contribuer à l'avancement de la plaque d'athérome en s'associant avec les cellules spumeuses formées par les macrophages. L'infiltration de lipides, essentiellement cholestérol et ses

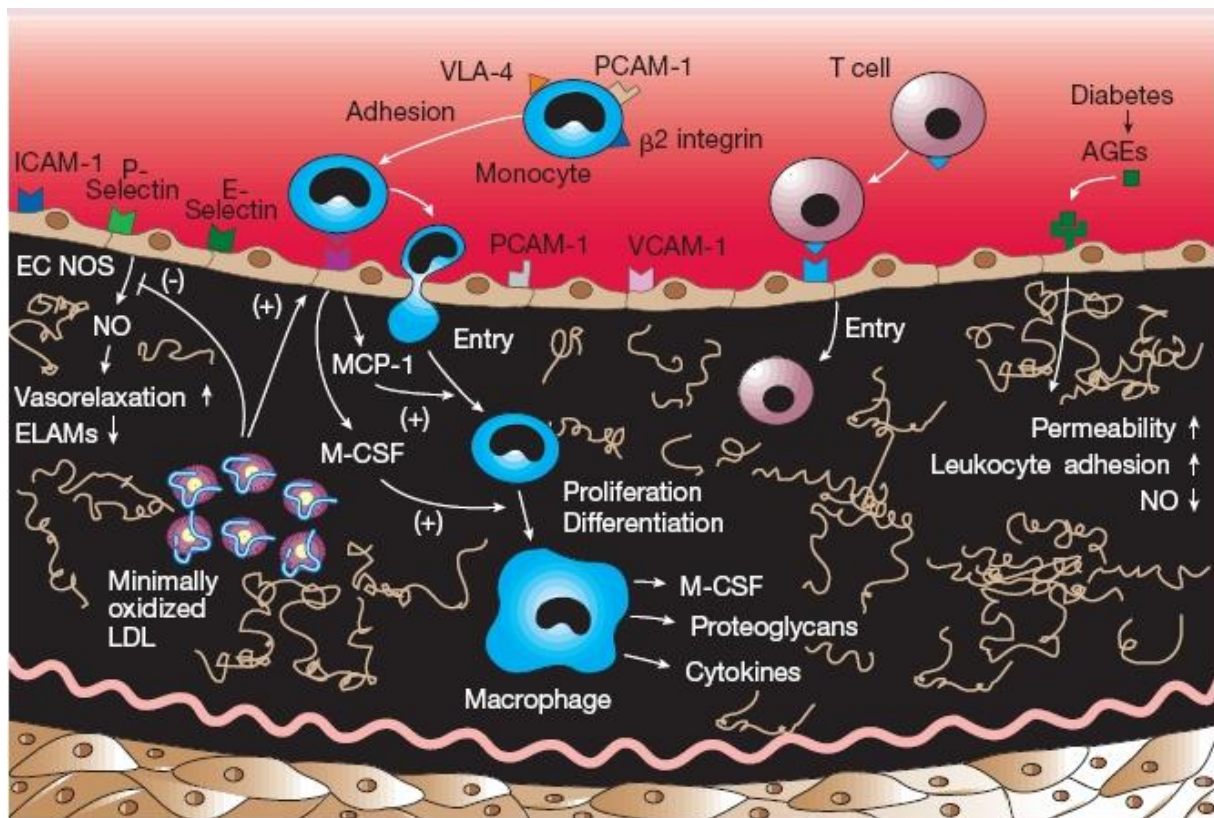


Figure 5 : Processus inflammatoire impliqué dans le développement de l'athérosclérose
(Lusis 2000)

Les LDLox stimulent les cellules endothéliales qui vont produire des molécules d'adhésion, des protéines chimiotactiques telles que MCP-1, et des facteurs de croissance comme le M-CSF conduisant à un recrutement des monocytes au niveau de la paroi artérielle. Les LDLox ont aussi la capacité d'inhiber la production d'un vasodilatateur, l'oxyde nitrique (NO) et l'expression d'ELAMs. Les molécules d'adhésion importantes pour le recrutement des monocytes sont ICAM-1, P-sélectine, E-sélectine et VCAM-1. Les molécules à la surface des monocytes leur permettant d'adhérer sont l'intégrine-β2, VLA-4 et PCAM-1 (platelet cell adhesion molecule).

esters, l'accumulation de cellules spumeuses et la prolifération des CML conduit à l'évolution de la strie lipidique vers la lésion fibro-lipidique ou plaque fibreuse. Celle-ci est formée d'un core lipidique qui évoluera en core nécrotique, conséquence de l'apoptose des cellules spumeuses. Le core lipidique est entouré d'une chape fibreuse formée *via* la synthèse de composants de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, protéoglycane ...) par les CML (Lusis 2000).

I-3-3- Evolution de la plaque d'athérosclérose vers une lésion compliquée

Progressivement, la plaque fibro-lipidique peut conduire à la formation d'une plaque compliquée dite vulnérable. La rupture de la chape fibreuse ou l'érosion de la plaque conduisent à des phénomènes tels que l'hémorragie intraplaque (augmentation soudaine du volume de la plaque) et la thrombose (mise en contact du matériel de la plaque avec le sang circulant). Ceci va conduire à l'obstruction totale ou partielle des vaisseaux provoquant l'accident cardiovasculaire (Virmani *et al.*, 1999). Là encore, l'inflammation va jouer un rôle important dans la vulnérabilité de la plaque. En effet, la production de cytokines IL-1 et TNF α par les macrophages induit l'expression d'enzymes, les métalloprotéinases (MMPs) capables de dégrader le collagène et les autres constituants de la matrice extracellulaire. De plus, la synthèse d'IFN γ par les cellules T inhibe la production de collagènes et donc la production de matrice extracellulaire par les CML. Enfin, les propriétés anti-thrombotiques des cellules endothéliales sont également altérées par les cytokines IL-1 ou TNF α qui modifient l'activité coagulante et les propriétés fibrinolytiques des cellules endothéliales. D'autres facteurs comme une poussée hypertensive ou un effort important peuvent également favoriser la rupture de la plaque. La stabilité de la plaque peut également être influencée par la calcification et la néo-vascularisation, deux caractéristiques communes aux lésions avancées (Lusis 2000) (**Figure 6**).

I-3-4- Importance des macrophages dans la physiopathologie de l'athérosclérose

L'athérosclérose est donc le résultat d'une réaction inflammatoire mal contrôlée où les macrophages jouent un rôle primordial. En outre, ce sont les leucocytes les plus abondants quel que soit le stade des lésions (Hansson & Libby 2006). L'intérêt scientifique accordé aux

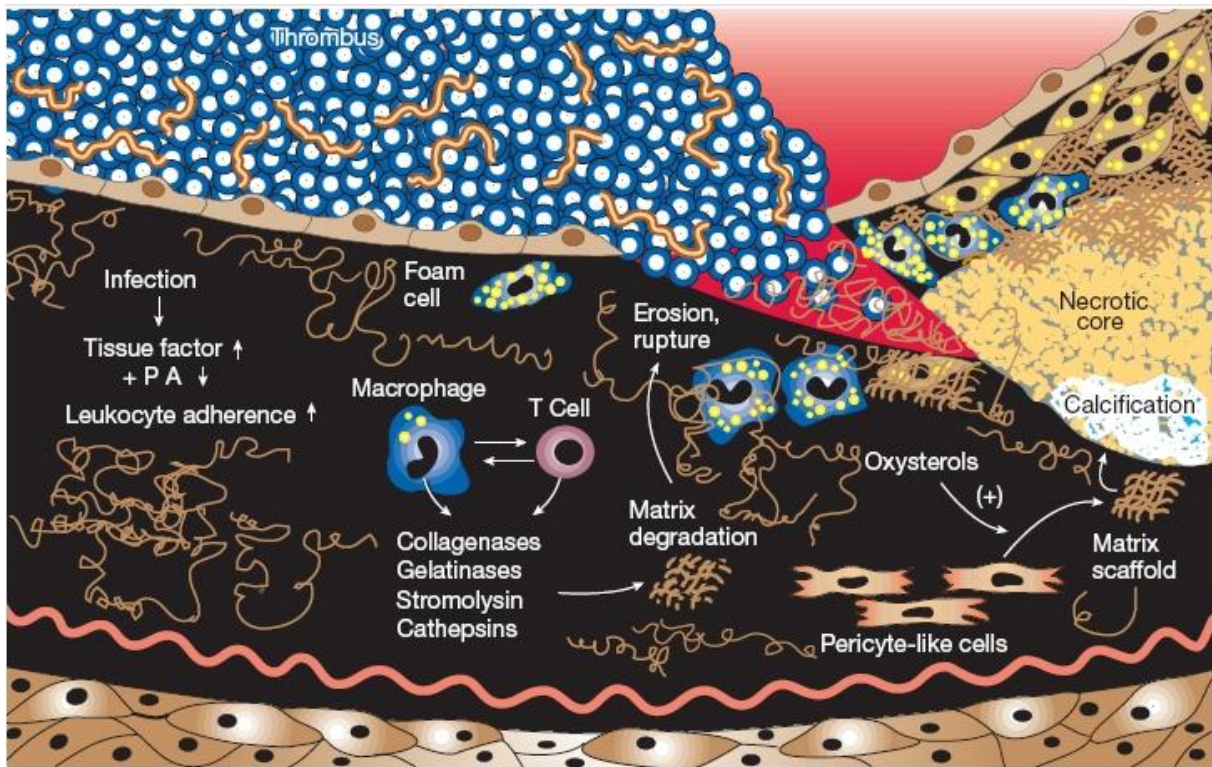


Figure 6 : Formation de la lésion compliquée et thrombose
(Lusis 2000)

La plaque vulnérable possède une chape fibreuse amincie résultant de la dégradation de la matrice par diverses protéinases (collagénases, gélatinases, stromolysines et cathepsines) et de l'inhibition de la sécrétion de matrice. Parmi les facteurs qui déstabilisent la plaque et induisent la thrombose, certains peuvent avoir des effets systémiques (induction de protéines de la phase d'infection aiguë) et d'autres des effets locaux (induction de l'expression du facteur tissulaire et réduction de l'activateur du plasminogène (PA)). La calcification des lésions est un processus régulé qui implique la sécrétion dans l'intima, par des cellules « pericytes-like », d'une matrice pour la déposition du phosphate de calcium. La formation du thrombus consiste en la mise en contact du matériel de la plaque avec le sang circulant.

macrophages et à leur contribution au cours de l'athérogenèse a donc toujours été légitimement important. Il s'est néanmoins encore accru ces dernières années depuis la mise en évidence d'une grande hétérogénéité et plasticité des macrophages leur permettant d'adapter leur phénotype à leur microenvironnement. Deux phénotypes extrêmes sont habituellement décrits dans la littérature : les macrophages dits « classiques » ou M1 qui sont induits par les cytokines de type Th1 (lymphocyte T helper 1), telles que IFN γ , IL-1 β ou le LPS (lipopolysaccharide bactérien) et les macrophages « alternatifs » ou M2 induits par des cytokines Th2 (lymphocyte T helper 2), telles que l'IL-4 et l'IL-13 (Gordon 2003). Les macrophages de type M1 produisent des ROS, des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α , IL-6), sont impliqués dans la prolifération des CML et jouent un rôle de vasodilatateur leur conférant ainsi un rôle pro-athérogène. Au contraire les macrophages M2 expriment des récepteurs scavengers, des récepteurs de type mannose, l'arginase 1. Bien que leur rôle dans l'athérosclérose ne soit pas clairement défini, il semblerait qu'ils exercent un effet anti-athérogène du fait de leur capacité à résoudre la réponse inflammatoire de type Th1. Ces deux types de macrophages et probablement des phénotypes intermédiaires sont retrouvés au sein des lésions d'athérosclérose (Bouhlef *et al.*, 2007; Gui *et al.*, 2012). Plus précisément, l'équipe de Caligiuri a récemment montré que les lésions précoces de souris ApoE^{-/-} sont préférentiellement infiltrées par les macrophages M2 alors que les macrophages M1 sont principalement retrouvés dans les lésions avancées. La progression de la lésion semble ainsi corrélée avec une prédominance de macrophages M1 par rapport aux M2 suggérant un « switch » phénotypique en défaveur des macrophages M2 lors de la progression de la lésion d'athérome (Khallou-Laschet *et al.*, 2010). Ces notions de plasticité macrophagique et de switch phénotypique offrent de nouvelles pistes de recherche dans le domaine de la prévention de l'athérosclérose (**Figure 7**).

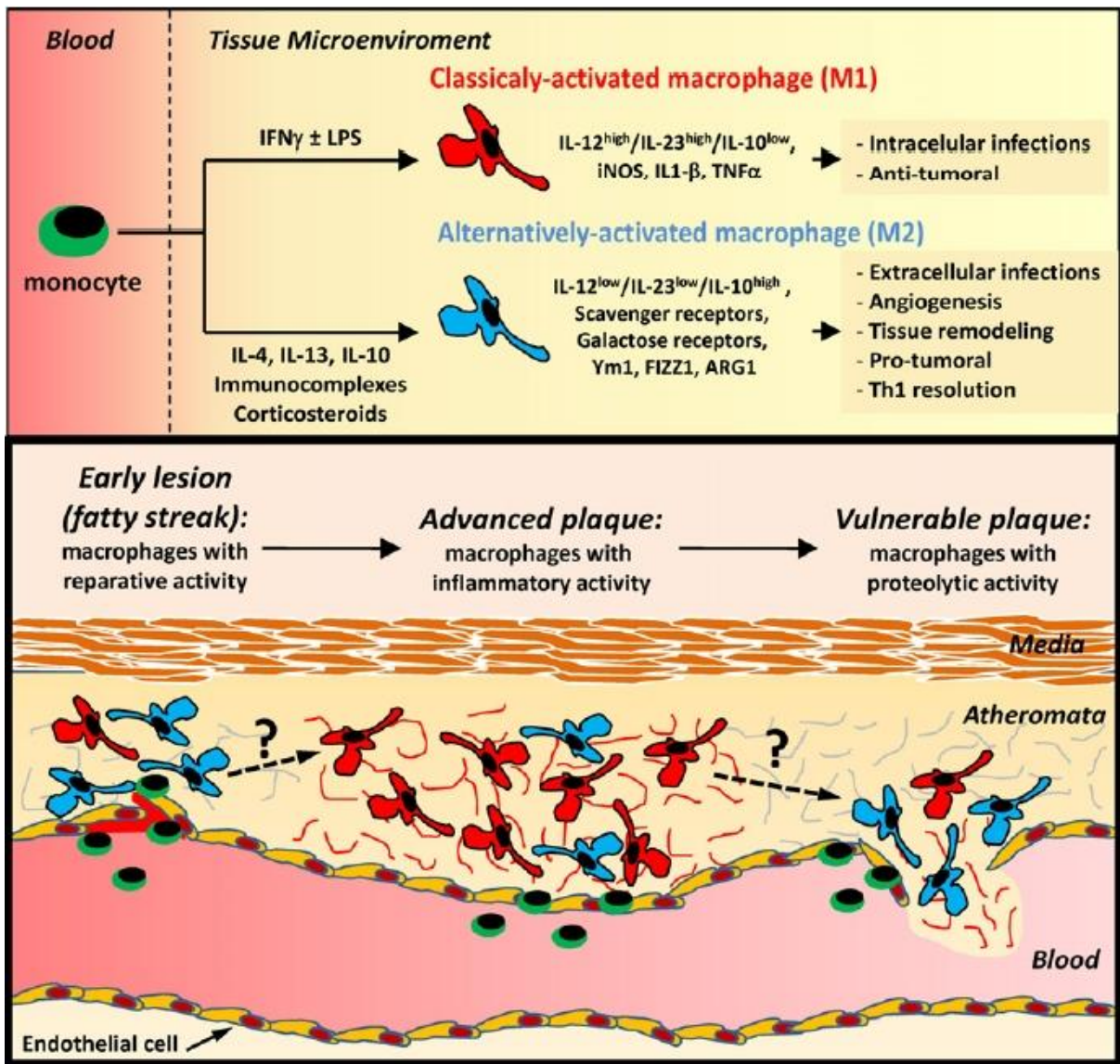


Figure 7 : Polarisation des macrophages et implication dans le développement de l'athérosclérose
(Pello et al., 2011)

Malgré l'identification de la plupart des facteurs de risque et la très bonne connaissance de la physiopathologie, l'athérosclérose et les MCV associées restent la première cause de mortalité au niveau mondiale. La durée de mise en place de la pathologie et la mise en évidence de la contribution prépondérante des facteurs de risque modifiables dans l'incidence des MCV sont deux arguments forts justifiant la promotion d'approches préventives. Dans ce domaine, la nutrition et la nutrition lipidique représentent d'intéressants leviers d'action comme ceci sera abordé dans le chapitre suivant. Enfin, parmi toutes les cibles possibles, la modulation de la polarisation des macrophages pourrait être une piste de recherche particulièrement pertinente dans laquelle l'impact de la nutrition reste quasiment inexploré.

II- Effets cardio- et athéro-protecteurs des acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne (AGPI ω 3-LC)

II-1- Rappel sur les AGPI ω 3

Les acides gras sont regroupés par familles distinctes selon le nombre de carbone qui les compose et la présence ou non d'insaturations dans leur chaîne hydrocarbonée. On retrouve ainsi les acides gras saturés (AGS) qui ne présentent aucune double liaison. Les plus fréquemment rencontrés sont l'acide palmitique (C16) et l'acide stéarique (C18). Ensuite, la présence d'une seule double liaison au niveau de la chaîne carbonée fait qualifier l'acide gras de mono-insaturé (AGMI), c'est le cas notamment de l'acide oléique (C18:1 oméga-9). Enfin, à partir de deux doubles liaisons, on parle d'acides gras polyinsaturés (AGPI). Cette dernière famille est divisée en deux sous-familles : la famille des oméga-6 et la famille des oméga-3, qui se distinguent par la position de la première double liaison portée respectivement par le sixième (n-6 ou ω 6) ou le troisième carbone (n-3 ou ω 3) à partir de l'extrémité méthyle terminale. Les AGPI ω 6 et ω 3 (C20 et C22) dérivent de deux précurseurs indispensables, respectivement, l'acide linoléique et l'acide α -linoléique (**Figure 8**). Les AGPI peuvent être désignés par leur nom commun ou par une nomenclature indiquant le nombre d'atomes de carbone présents dans la chaîne suivi du nombre de doubles liaisons et de la position de la première double liaison à partir de l'extrémité méthyle (**Figure 9**). Le plus simple des membres de la famille des AGPI ω 3, l'acide α -linoléique noté 18:3 ω 3, est formé de 18 atomes de carbone et 3 doubles liaisons. Il est synthétisé dans les végétaux à partir de l'acide linoléique (18:2 ω 6) *via* une réaction de désaturation catalysée par la delta-15-désaturase qui permet l'insertion d'une double liaison. L'acide α -linoléique est qualifié d'« essentiel » car, l'organisme humain ne possédant pas l'enzyme delta-15-désaturase nécessaire à sa synthèse, il doit obligatoirement être apporté par l'alimentation. Par contre, les plantes étant capables de synthétiser cet acide gras, les tissus végétaux et huiles végétales sont de bonnes sources d'apport. L'acide α -linoléique est ainsi retrouvé en quantité notable dans les graines et huiles de colza, de sauge, de lin, de chanvre, de soja et dans les noix (Calder 2004).

Bien que les mammifères ne puissent synthétiser l'acide α -linoléique, ils peuvent le métaboliser *via* une succession de réactions de désaturation et d'élongation, se déroulant principalement dans le foie au niveau du réticulum endoplasmique. L'étape de désaturation consiste en l'insertion d'une double liaison entre deux atomes de carbone alors que l'étape

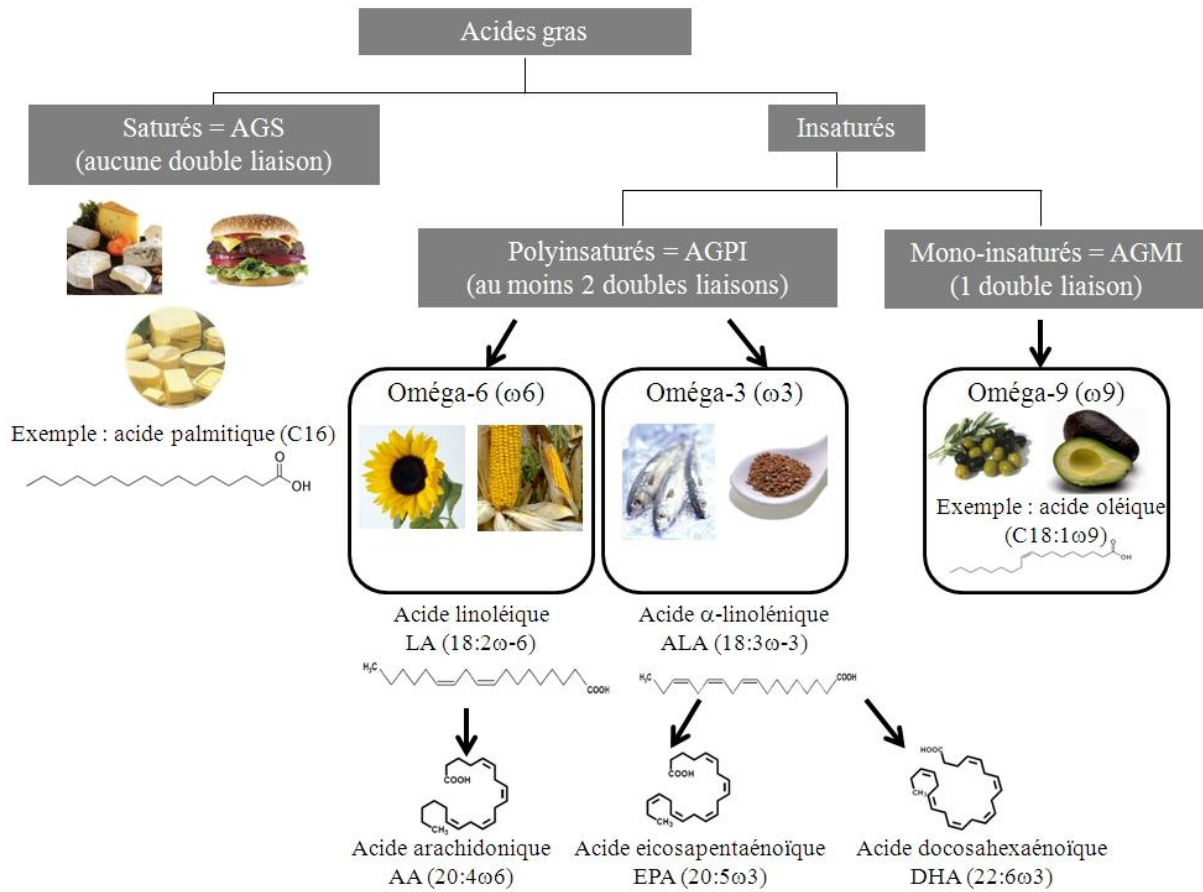


Figure 8 : Schéma représentant les différentes familles d'acides gras et leurs principaux membres

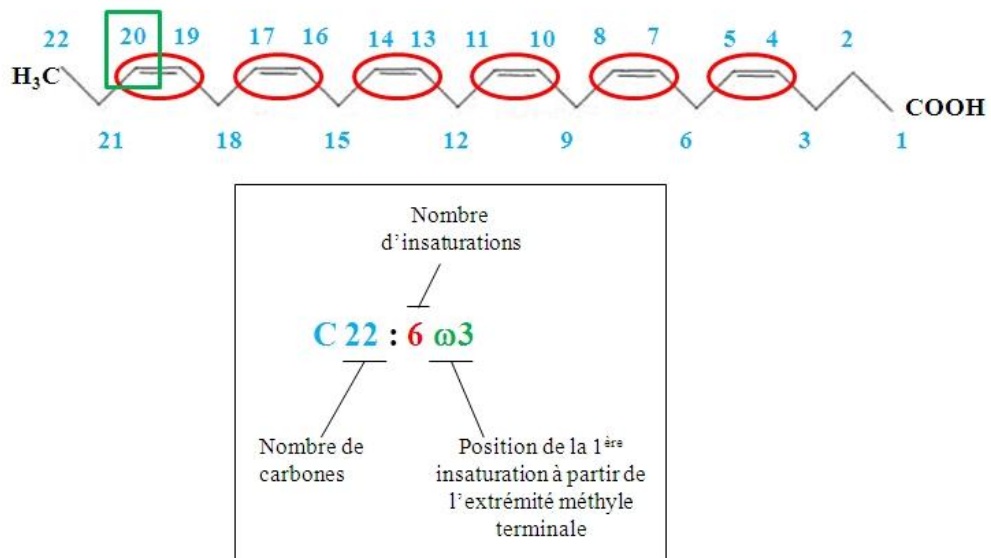


Figure 9 : Nomenclature des AGPI : exemple du DHA

d'élongation permet l'ajout de deux atomes de carbone à l'extrémité carboxyle de l'acide gras (Massaro *et al.*, 2008). L'acide α -linoléique va ainsi servir de précurseur métabolique aux dérivés à longue chaîne, ayant une longueur strictement supérieure à 18 atomes de carbone. La conversion de l'acide α -linoléique en AGPI à longue chaîne fait intervenir des enzymes de deux types : des désaturases (la delta-6-désaturase et la delta-5-désaturase) et des élongases (élongase-2 et -5). L'acide α -linoléique va ainsi être converti par la delta-6-désaturase en acide stéaridonique (18:4 ω 3) qui sera lui-même converti en acide eicosatétraénoïque (20:4 ω 3) par l'élongase-5. L'acide eicosatétraénoïque sera par la suite désaturé par la delta-5-désaturase pour produire l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 ω 3) qui va pouvoir servir de précurseur à l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 ω 3). Cette voie de conversion de l'EPA en DHA implique l'ajout de deux atomes de carbone à l'EPA pour former l'acide docosapentaénoïque (DPA, 22:5 ω 3) auquel sont rajoutés deux atomes de carbones supplémentaires pour produire l'acide tétracosapentaénoïque (24:5 ω 3), réactions réalisées par l'élongase-2. Ce dernier va ensuite être désaturé par la delta-6-désaturase pour former l'acide tétracoshexaénoïque (24:6 ω 3) qui *via* sa β -oxydation partielle va former le DHA. Cette étape finale dans la synthèse du DHA se déroule au niveau des peroxysomes (Alessandri *et al.*, 2009). Le DHA ainsi formé pourra, par la suite, être rétro-converti en EPA *via* un cycle de β -oxydation mitochondriale ou peroxysomale (**Figure 10**). La rétro-conversion du DHA en EPA nécessite la réduction d'une double liaison avant d'entrer dans le cycle de β -oxydation (Jump *et al.*, 2012). Il est important de noter que plusieurs études de supplémentation en acide α -linoléique ont rapporté une conversion relativement limitée en EPA et DHA chez l'homme. Seulement 5% de l'acide α -linoléique serait converti en EPA et moins de 0,5% serait utilisé pour produire du DHA (Plourde & Cunnane 2007). Le taux de conversion en EPA et DHA étant faible chez l'homme, il apparaît nécessaire d'apporter les AGPI ω 3-LC par le biais de l'alimentation. Ceux-ci sont retrouvés en quantité significative dans le poisson et notamment dans les poissons à chair grasse (Calder 2004) (**Figure 11**). Comme rapporté plus haut, le DHA peut être rétro-converti en EPA *via* un cycle de β -oxydation. Cependant ce processus est complexe et fait intervenir une succession de réactions d'oxydation, de réduction et d'isomérisation. Le DHA ne constitue donc pas un bon substrat pour la voie de la β -oxydation peroxysomale et seulement 0,5 à 4% du DHA serait β -oxydé contre 60% de l'acide α -linoléique (Plourde & Cunnane 2007). Ainsi, le DHA, et également l'EPA, formés ou apportés par l'alimentation vont préférentiellement être estérifiés dans les phospholipides

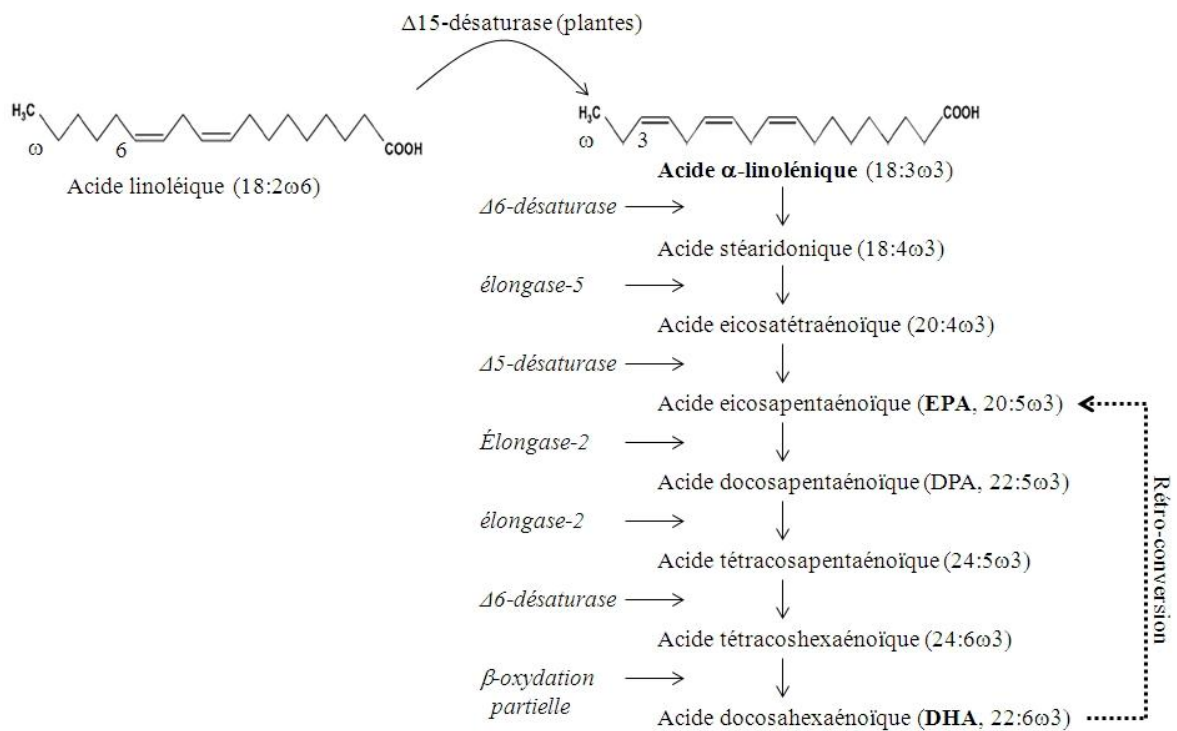


Figure 10 : Voie de conversion de l'acide α -linoléique en ses dérivés à longue chaîne
(d'après Jump et al., 2012)

| Aliment | EPA, g/100 g | DHA, g/100 g |
|----------------------|--------------|--------------|
| Sardines en conserve | 0,89 | 0,10 |
| Maquereau | 0,71 | 0,12 |
| Hareng | 0,51 | 0,11 |
| Saumon | 0,50 | 0,40 |
| Crabe en conserve | 0,47 | 0,08 |
| Moules | 0,41 | 0,02 |
| Truite | 0,23 | 0,09 |
| Carrelet | 0,16 | 0,04 |
| Morue | 0,08 | 0,01 |
| Crevettes | 0,06 | <0,01 |
| Eglefin fumé | 0,05 | 0,01 |
| Venaison | 0,04 | 0,09 |
| Rôti d'agneau | 0,03 | 0,04 |
| Rôti de bœuf | 0,02 | 0,02 |
| Rôti de porc | 0,01 | 0,02 |
| Poulet | 0,01 | 0,02 |

Figure 11 : Teneurs en EPA et DHA dans les produits de la mer et autres aliments
(Massaro et al., 2008)

membranaires plutôt que d'être β -oxydés (Sprecher 2000). Ces acides gras sont généralement incorporés en position sn-2 des phospholipides membranaires et le DHA est l'AGPI ω 3-LC retrouvé en plus grande quantité dans les tissus incluant le muscle cardiaque et les cellules endothéliales vasculaires (Jump *et al.*, 2012).

II-2- Effets cardio- et athéro-protecteurs des AGPI ω 3-LC : études épidémiologiques

Au cours des trois dernières décennies, un grand nombre de données épidémiologiques a mis en évidence les bénéfices de la consommation des produits de la mer sur la santé cardiovasculaire. Historiquement, les premières observations ont été faites chez les populations Inuits d'Alaska, du nord du Canada et du Groenland présentant un faible taux de mortalité par maladies cardiovasculaires malgré une consommation élevée de matières grasses. Cette faible incidence a été associée à une consommation importante et régulière de poissons gras et mammifères marins (Bang *et al.*, 1980) qui sont naturellement riches en AGPI ω 3-LC tels que l'EPA et le DHA. Ces acides gras ainsi consommés à dose très élevée (5-15 g par jour) ont finalement été suggérés comme étant les nutriments cardio-protecteurs. Par la suite, des observations similaires ont été faites chez les populations Japonaises (Yano *et al.*, 1988) et Chinoises (Yuan *et al.*, 2001) consommant elles aussi de grandes quantités de poisson. Depuis, de nombreuses études épidémiologiques d'observation et d'intervention ont été réalisées pour étudier les corrélations entre la consommation des AGPI ω 3-LC et l'incidence de l'athérosclérose et des pathologies cardiovasculaires associées. Ces études ont été complétées par de nombreuses expérimentations sur divers modèles animaux qui ont permis d'aller plus loin dans l'étude de causalité.

II-2-1- Etudes épidémiologiques d'observation

Les études épidémiologiques d'observation sont directement menées au sein des populations et peuvent être de deux types :

- les études de cohorte sélectionnent les sujets en fonction de l'exposition (exposés *versus* non exposés) et le suivi se fait le plus souvent de façon prospective, c'est-à-dire pendant une période déterminée ou jusqu'à l'apparition de la maladie.
- les études cas-témoins répartissent les sujets en fonction de l'apparition de la maladie (cas) ou non (témoins) et sont généralement des études d'observation rétrospectives.

Ces études peuvent être menées sur de grands effectifs et pour de longues périodes mais n'excluent pas les facteurs confondants. Des méta-analyses, combinant les résultats de plusieurs études indépendantes, peuvent également être réalisées. Elles permettent d'augmenter la puissance statistique du fait d'un plus grand nombre de cas étudiés.

De nombreuses **études épidémiologiques d'observation** ont été effectuées afin d'étudier les effets santé des AGPI ω 3-LC. Elles ont été réalisées soit à l'aide de questionnaires portant sur la consommation de poisson, soit basées sur la mesure du taux plasmatique d'AGPI ω 3-LC, en prévention primaire, c'est-à-dire chez des sujets sains n'ayant jamais eu d'accident cardiovasculaire. Globalement, la plupart de ces études conduites sur des populations occidentales mettent en évidence l'effet bénéfique des AGPI ω 3-LC sur les maladies cardiovasculaires. Par exemple, l'étude « **Chicago Western Electric Study** » réalisée sur 1 822 hommes montre une diminution de 42% du taux d'infarctus du myocarde fatal chez des personnes consommant 35 g de poisson par jour (Daviglus *et al.*, 1997). L'étude « **Nurses' Health Study** » conduite sur 84 688 femmes rapporte une association inverse et dose-dépendante entre une consommation régulière de poisson et l'incidence des maladies coronariennes avec un effet marqué sur la mortalité coronarienne (Hu *et al.*, 2002). L'étude « **Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study** » réalisée sur 1 871 hommes confirme qu'une teneur plasmatique importante en AGPI ω 3-LC (environ 3,5% des acides gras totaux) est associée à une réduction, d'environ 45%, des événements coronariens (Rissanen *et al.*, 2000). L'étude « **US Physicians' Health** », sur 20 551 hommes, a mis en évidence que la consommation de poisson au moins une fois par semaine réduit de 52% le risque de mort subite cardiaque sans modifier de manière significative l'infarctus du myocarde, la mort cardiaque non subite et la mortalité cardiovasculaire (Albert *et al.*, 1998). La diminution du taux de morts subites peut aller jusqu'à 81% pour des sujets ayant des niveaux plasmatiques élevés d'AGPI ω 3-LC (environ 7% des acides gras totaux) (Albert *et al.*, 2002). Enfin, une **étude cas-témoins réalisée à Seattle** sur 827 sujets a montré que la consommation d'une portion de poisson par semaine réduit de 50% la survenue d'arrêts cardiaques (Siscovick *et al.*, 2000). Cependant quelques rares études ne permettent pas de conclure quant à un effet bénéfique des AGPI ω 3-LC sur les maladies cardiovasculaires (Ascherio *et al.*, 1995; Hunter *et al.*, 1988). Ce manque d'effet a été attribué à un apport en AGPI ω 3-LC trop faible ou à l'interaction avec d'autres nutriments tels que les acides gras saturés (Massaro *et al.*, 2008). Il est également nécessaire de prendre en compte le type de

poisson consommé et le mode de préparation qui influencent grandement la quantité d'AGPI ω 3-LC consommée (Mozaffarian *et al.*, 2003).

Plusieurs **méta-analyses** réalisées sur plus de 200 000 sujets concluent également à une diminution du risque cardiovasculaire liée à la consommation de poisson. Ainsi, He *et al.*, rapportent une diminution dose-dépendante de la mortalité coronarienne en fonction de la consommation de poisson atteignant -38% pour 5 portions et plus par semaine (He *et al.*, 2004a). Dans une seconde méta-analyse, He *et al.*, associent la consommation de poisson avec une diminution du risque d'accidents vasculaires cérébraux de 10 à 30% suivant la quantité de poisson consommée (He *et al.*, 2004b). La méta-analyse de Whelton rapporte également une diminution de la mortalité coronarienne et de l'ensemble des maladies coronariennes, respectivement de 17% et 15% (Whelton *et al.*, 2004). Une autre méta-analyse regroupant les études avec un suivi supérieur à 1 an a mis en évidence une réduction de la mortalité totale, des décès d'origine cardiaque, des accidents vasculaires cérébraux et de la mort subite qui était dépendante de la consommation en AGPI ω 3-LC issus du poisson (Wang *et al.*, 2006). Enfin, une méta-analyse récente réalisée à grande échelle sur un total de 315 812 participants, conclut également à un effet bénéfique de la consommation de produits de la mer et montre que même un faible niveau de consommation (une portion de poisson par semaine) est associé à une diminution de 16% de la mortalité coronarienne (Zheng *et al.*, 2012) (**Figure 12**).

II-2-2- Etudes d'intervention

Les études d'intervention permettent de conforter les observations épidémiologiques en apportant une preuve expérimentale et contrôlée d'un effet de l'aliment ou du nutriment. Pour juger la viabilité de ce type d'étude, il est nécessaire de prendre en compte un certain nombre de critères dans l'analyse des résultats : nombre de patients inclus, durée de l'intervention, choix de la population, critères d'exclusion.

Des nombreuses études épidémiologiques d'intervention ont été réalisées chez des sujets soit par le biais de conseils diététiques ou de suppléments en AGPI ω 3-LC pris sous différentes formes (huile de poisson, AGPI ω 3-LC purifiés ou ajoutés à un aliment). La majorité de ces études a été réalisée en prévention secondaire, c'est-à-dire chez des sujets présentant des antécédents cardiovasculaires.

Un premier essai **DART1** (Diet and Reinfarction Trial 1) a été réalisé sur 2 033 hommes ayant récemment eu un infarctus du myocarde. Après 2 ans de suivi, une diminution de 29% de la mortalité totale et de 33% des décès par maladie ischémique cardiaque a été rapportée

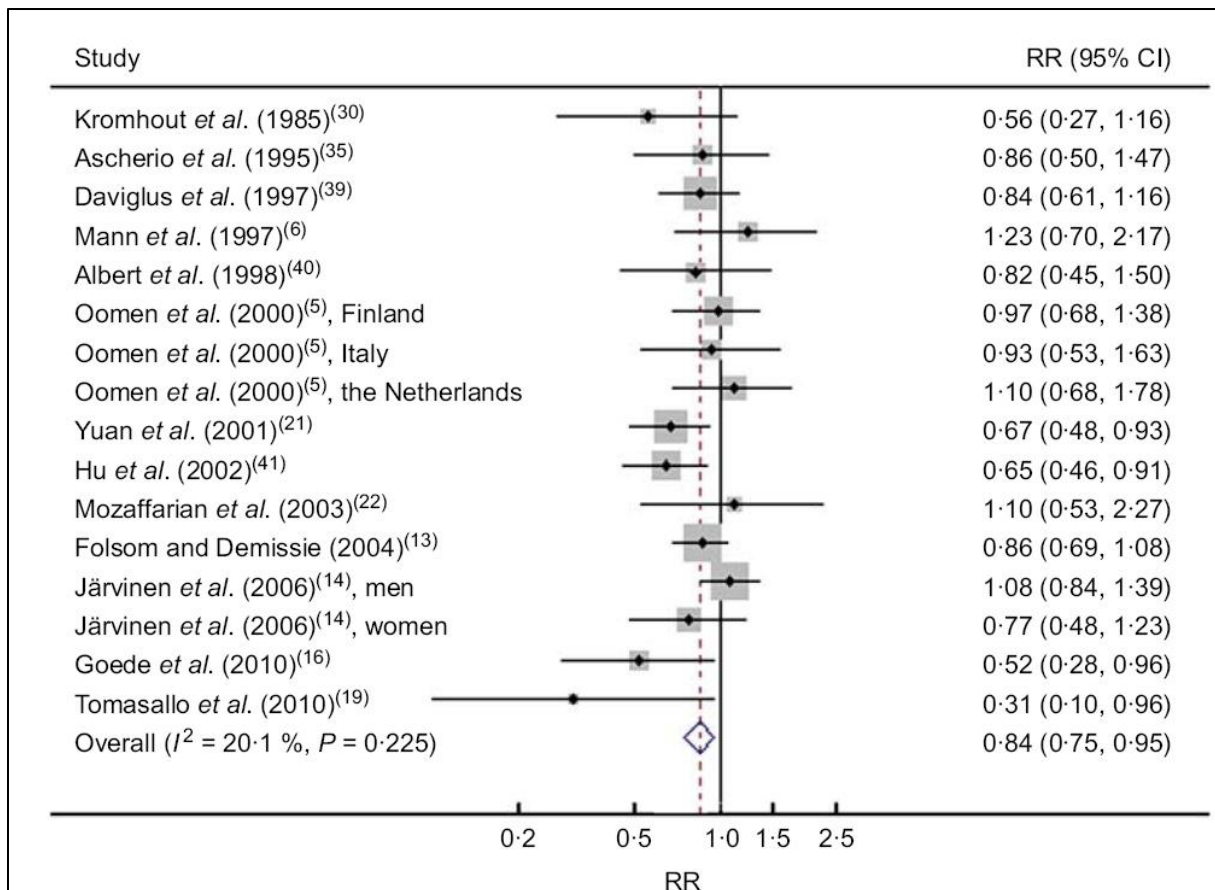


Figure 12 : Association entre la consommation de poisson (1 portion par semaine) et la mortalité coronarienne
(Zheng *et al.*, 2012)

RR = risque relatif

chez les sujets ayant bénéficié de conseils diététiques pour consommer au moins deux portions de poisson par semaine comparativement à des sujets contrôles n'ayant pas reçu de conseil (Burr *et al.*, 1989).

L'étude GISSI (Gruppo Italiano per la Sperimentazione della Streptochinasi nell'Infarto Miocardio Prevenzione), premier essai clinique randomisé à grande échelle regroupe 11 334 patients hospitalisés pour un infarctus du myocarde 3 mois, au plus, avant le début de l'intervention. Ces patients ont été randomisés pour recevoir ou non 1 g par jour d'AGPI ω 3-LC sous forme de capsule (850-882 mg par jour d'éthyl-esters d'EPA et DHA, EPA/DHA 1:2). Après 3,5 années de suivi, les patients supplémentés présentaient une réduction des taux de mortalité cardiovasculaire et coronarienne respectivement de 18% et 20% ainsi qu'une diminution de 24% des cas de mort subite par rapport au groupe non supplémenté (GISSI-Prevenzione Investigators (1999). Les effets ont été particulièrement marqués dans les premiers mois de l'intervention avec notamment une réduction de 50% du risque de mort subite après 4 mois de suivi (Marchioli *et al.*, 2002).

L'étude JELIS (Japanese EPA Lipid Intervention Study) est la première à s'intéresser spécifiquement à l'impact de l'EPA sur les maladies cardiovasculaires à la fois en prévention primaire et secondaire. Cet essai a été conduit au Japon sur 18 645 sujets hypercholestérolémiques ($\geq 6,5$ mmol/L) parmi lesquels 15 000 n'avaient jamais eu de problèmes cardiovasculaires. Les sujets ont reçu soit une dose quotidienne d'1,8 g d'éthyl-esters d'EPA purifié sous la forme d'une capsule en combinaison avec des statines soit uniquement des statines (groupe contrôle). Après 5 ans de suivi, une diminution de 19% ($p=0,048$) de la plupart des événements coronariens a été mise en évidence chez les patients supplémentés en EPA et ayant des antécédents cardiovasculaires. Cette diminution était principalement due à une réduction de l'angor instable et des événements coronariens non fatals. Par contre, l'incidence de la mort subite et de la mortalité coronarienne est inchangée entre les deux groupes. Chez les individus sans antécédents cardiovasculaires, une diminution de 18% non significative ($p=0,132$) de l'ensemble des événements coronariens a été rapportée dans le groupe supplémenté (Yokoyama *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2007). Globalement, que l'on soit en prévention primaire ou secondaire, l'effet reste faible et contrairement aux autres essais, les résultats de la JELIS ne rapportent pas d'effets significatifs sur les événements fatals. Cette absence d'effet sur les accidents fatals et l'effet relativement modéré sur les accidents non fatals peut être attribuable à la population étudiée qui, du fait d'une alimentation de base riche en produits de la mer, présente un faible risque coronarien. En effet, l'index oméga-3 (niveau d'EPA/DHA sanguin) a été estimé à environ 11% au Japon

tandis qu'il n'est que de 4% en Europe (von Schacky 2008). De plus, le fait que les sujets soient uniquement supplémentés en EPA et non en EPA et DHA pourrait également expliquer ces résultats.

Un certain nombre d'études d'intervention reste néanmoins peu ou pas concluant. C'est le cas de l'essai **DART2** (Diet and Angina Randomized Trial 2) réalisé pour une période de 9 ans sur 3 114 hommes présentant un angor instable chronique. Un groupe expérimental ayant reçu le conseil de manger au moins deux portions de poisson gras par semaine (200-400 g) ou d'ingérer jusqu'à 3 capsules d'1 g d'huile de poisson par jour (510 mg d'EPA et 345 mg de DHA) a été comparé à un groupe contrôle. Contrairement à l'essai DART1, le taux de mortalité totale n'était pas significativement différent entre les deux groupes alors que les taux de décès cardiaque et de mort subite apparaissent plus élevés chez les patients appartenant au groupe expérimental (Burr *et al.*, 2003). Dans cet essai, la consommation de poisson gras était de 21,9 g par jour dans le groupe expérimental contre 14 g par jour dans le groupe témoin indiquant une différence très modeste à prendre en compte dans l'analyse des résultats (Ness *et al.*, 2004). Les résultats contradictoires entre les deux essais peuvent également être attribuables aux différentes conditions cliniques des sujets (infarctus du myocarde récent *versus* angor instable chronique) (Burr *et al.*, 2005). De plus, les patients à haut risque cardiovasculaire sont le plus souvent sous traitement médicamenteux, susceptible d'interagir avec les suppléments. Dans l'étude DART2, les effets néfastes observés sont augmentés en présence de certains médicaments tels que les β -bloquants ou la nifédipine (Burr 2007). Les études **Omega** (Rauch *et al.*, 2010), **Alpha-Omega** (Kromhout *et al.*, 2010) et **SU.FOL.OM3** (SUpplémentation en FOLates et Oméga-3) (Galan *et al.*, 2010) sur des durées de 1 ; 3,3 et 4,7 ans impliquent respectivement 3 851, 4 837 et 2 501 patients ayant récemment eu un problème cardiovasculaire. Les patients inclus dans l'essai Omega recevaient 1 g par jour d'oméga-3 éthyl-esters-90 (460 mg d'EPA et 380 mg de DHA), ceux de l'essai Alpha-Omega consommaient une margarine supplémentée en EPA et DHA (environ 18,8 g de margarine par jour soit 226 mg d'EPA et 150 mg de DHA) et enfin, les sujets inclus dans l'étude SU.FOL.OM3 recevaient un supplément journalier contenant des AGPI ω 3-LC (600 mg d'EPA et DHA, EPA/DHA 2:1). La conclusion de ces trois essais indique que les AGPI ω 3-LC n'ont pas d'effets sur la santé cardiovasculaire. Cependant, plusieurs limites à ces études ont été rapportées : une durée d'étude trop courte pour l'essai Omega pour pouvoir observer des effets significatifs, peu de patients inclus dans ces études et d'importants traitements médicamenteux (Jump *et al.*, 2012). En effet, dans une étude récente, il a été montré que les

patients de l'essai Alpha-Omega non traités par des statines présentent une réduction de 50% de la plupart des événements cardiovasculaires contrairement aux patients traités et ce de manière indépendante de la supplémentation en AGPI ω 3-LC (Eussen *et al.*, 2012).

Globalement, les résultats des études d'intervention sont relativement contradictoires mais il faut noter que la plupart des études qui ne montrent pas d'effet des AGPI ω 3-LC sont critiquables sur plusieurs points. Par ailleurs, comme souligné dans la revue récente de Mozaffarian & Wu, les patients atteints de maladies cardiovasculaires sont aujourd'hui plus sensibilisés sur les bienfaits d'une alimentation riche en poissons gras. Ainsi dans les groupes contrôles, les patients peuvent avoir un apport en AGPI ω 3-LC semblable à celui des groupes d'intervention résultant d'une différence trop modeste pour montrer un bénéfice des suppléments d'EPA et DHA (Mozaffarian & Wu 2011).

Une dizaine de **méta-analyses** ont également étudié les effets cardio-protecteurs des AGPI ω 3-LC. Parmi celles-ci, seules deux restent non concluantes. C'est le cas de l'étude de Kwak qui regroupe 20 485 patients, présentant des antécédents cardiovasculaires et recevant en moyenne 0,4 à 4,8 g par jour d'EPA+DHA (Kwak *et al.*, 2012). Cependant, cette étude a été largement critiquée pour inclure uniquement des analyses de suivi à court terme ne permettant pas d'observer des effets significatifs. De plus, les auteurs ont exclu de leur méta-analyse l'étude GISSI, un essai de référence dans le domaine (Hu & Manson 2012). Une seconde méta-analyse regroupant plus de 68 600 personnes a également conclu que les AGPI ω 3-LC issus du poisson n'ont pas d'impact sur la mortalité cardiovasculaire ni sur la mortalité toutes causes confondues (Rizos *et al.*, 2012). Cependant, un certain nombre de facteurs peut avoir une incidence sur les résultats de cette étude. La plupart des essais inclus dans cette méta-analyse ont été réalisés en prévention secondaire sur des personnes traitées avec de nombreux médicaments, en particulier des statines qui pourraient bloquer les effets bénéfiques des AGPI ω 3-LC (Eussen *et al.*, 2012). Des études ouvertes, sans simple aveugle, ont également été intégrées ne permettant pas d'écarter les biais méthodologiques liés au placebo ou au supplément. Enfin, l'apport moyen en AGPI ω 3-LC sous forme de mélange d'EPA et DHA était de 1510 mg, une dose qui peut être insuffisante en prévention secondaire (Kromhout 2012). Les 8 autres méta-analyses sont concluantes. Parmi celles-ci, trois font référence et ont conclu à un effet bénéfique des AGPI ω 3-LC, en prévention secondaire, sur la santé cardiovasculaire. Bucher *et al.*, dans une méta-analyse incluant 15 806 patients, sur une durée moyenne de 20 mois, rapportent une diminution de l'infarctus du myocarde fatal et non fatal, respectivement, de 30 et 20% chez des patients recevant entre 0,9 à 9,7 g par jour

d'EPA+DHA. Une diminution de la mort subite et de la mortalité totale a également été mise en évidence (Bucher *et al.*, 2002). Une seconde méta-analyse regroupant 32 779 patients supplémentés en EPA+DHA (0,8 à 5 g par jour), pendant environ 20 mois, a rapporté une diminution de 20% des décès d'origine cardiaque (Leon *et al.*, 2008). Enfin, une méta-analyse incluant 39 044 patients recevant en moyenne 1,8 g d'EPA+DHA par jour, pendant en moyenne 28 mois, rapporte une réduction d'environ 10% de la mortalité cardiovasculaire, de la mort subite, de la mortalité totale et des événements cardiovasculaires non fatals (Marik & Varon 2009).

En complément des méta-analyses, il faut noter la publication très récente de deux revues de synthèse qui offrent une analyse très large de l'impact de la supplémentation en d'AGPI ω 3-LC sur l'incidence des MCV et apportent des éléments clairs en terme de recommandation nutritionnelle. La première consiste en une synthèse regroupant plusieurs méta-analyses d'études d'observation et d'intervention. La conclusion de cette revue récente indique que la consommation de 250 mg par jour d'AGPI ω 3-LC ou d'au moins 2 portions par semaine de poissons gras réduit significativement la mortalité coronarienne (infarctus du myocarde fatal et mort subite) chez les individus avec ou sans antécédents cardiovasculaires. L'effet sur les événements cardiovasculaires et sur la mortalité totale est plus modeste (Mozaffarian & Wu 2011) (**Figure 13**). La seconde revue inclut des études randomisées de supplémentation en EPA et DHA (<6 g par jour) et des études prospectives larges (> 1000 individus avec un suivi de plus de 3 ans). Elle a également rapporté qu'un apport de 200 à 300 mg par jour d'EPA+DHA est suffisant pour exercer un effet cardio-protecteur (Trikalinos *et al.*, 2012).

II-2-3- Cas particulier de l'athérosclérose

L'athérosclérose étant à l'origine de la plupart des événements cardiovasculaires (Lusis 2000), un certain nombre de laboratoires a cherché à déterminer, d'un point de vue épidémiologique, le lien entre consommation d'AGPI ω 3-LC et développement des lésions d'athérosclérose chez l'Homme.

Parmi les **études d'observation**, une étude d'autopsies réalisées sur environ 200 Alaskiens a révélé que la population autochtone, consommant de grandes quantités de poissons, présentait des lésions athérosclérotiques moins étendues par rapport à la population non native ayant un régime alimentaire de type occidental (Newman *et al.*, 1993). Cette différence entre les deux groupes apparaît plus importante dans les tranches d'âge plus jeunes suggérant un effet de l'alimentation directement sur les événements précoces conduisant au développement des

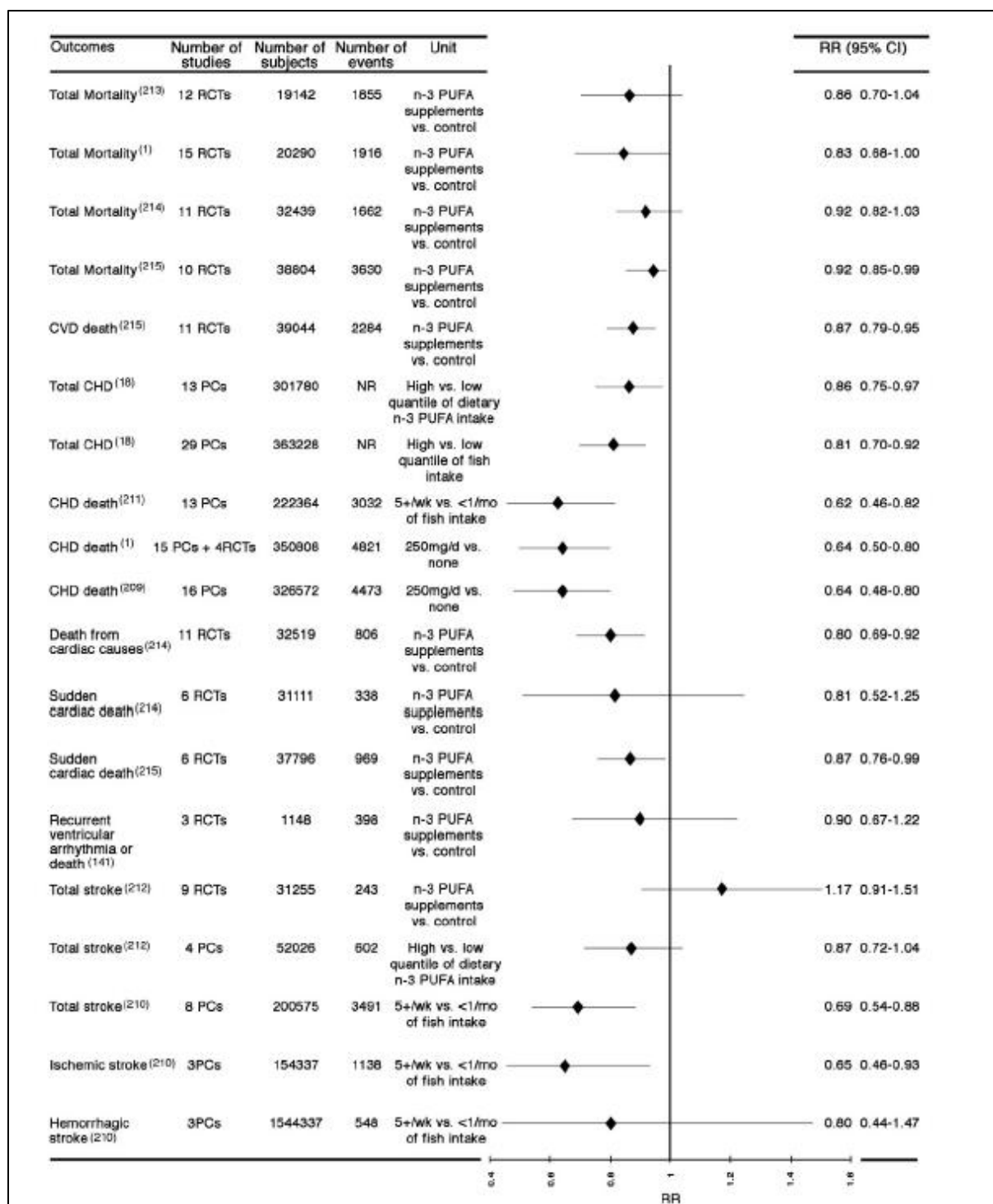


Figure 13 : Relation entre la consommation de poisson ou d'AGPI ω 3-LC et le risque de maladies cardiovasculaires
(Mozaffarian & Wu 2011)

PC = études prospectives ; RCT = études randomisées

lésions d'athérosclérose (Newman *et al.*, 1993) (**Figure 14**). Une seconde étude d'autopsies a été réalisée sur 1 253 jeunes Japonais en comparaison avec 2 876 Américains de la même tranche d'âge (15-34 ans). La surface des lésions représente 15% de l'artère coronaire chez les Japonais contre 50% chez les Américains (Takei *et al.*, 2005). Une autre étude Japonaise réalisée sur 868 sujets rapporte que la teneur en AGPI ω 3-LC est corrélée négativement avec l'épaisseur média-intima et la calcification des artères coronaires, deux critères permettant d'évaluer l'athérosclérose, traduisant donc bien des niveaux plus bas d'athérosclérose (Sekikawa *et al.*, 2008). Enfin, une étude prospective sur environ 300 femmes post-ménopausées souffrant d'une maladie coronarienne a évalué le pourcentage de sténose des artères coronaires par angiographie. En comparaison avec un apport en poisson faible, la consommation d'au moins 2 portions par semaine de poisson ou au moins 1 portion de poisson gras est associée à un pourcentage de sténose moins élevé (4,54 *versus* -0,06 et 5,12 *versus* 0,35, respectivement). Cette consommation est également associée à un moindre rétrécissement du diamètre des artères coronaires et à un développement moins important de nouvelles lésions (Erkkila *et al.*, 2004).

Concernant les **études d'intervention**, elles sont relativement peu nombreuses et les résultats sont peu concluants. Ceci peut s'expliquer par la durée de développement des lésions athérosclérotiques qui est un processus pathologique long pouvant s'étendre sur une trentaine d'années. Cela nécessite donc des durées d'intervention très longues qui sont difficilement réalisables chez l'Homme. Par ailleurs, les techniques non-invasives d'évaluation des lésions d'athérosclérose sont onéreuses et il existe une grande variabilité technique et interindividuelle. Un premier essai a été réalisé sur 59 patients atteints de maladie coronarienne sur une durée totale de 28 mois. Le groupe expérimental a été supplémenté avec de l'huile de poisson à raison de 12 capsules d'1 g par jour (soit environ 2,9 g d'EPA et 1,9 g de DHA). En dépit des fortes doses administrées, ce traitement n'a pas modifié de manière favorable le diamètre des artères coronaires athérosclérotiques, évalué par angiographie coronaire quantitative, et n'a donc pas permis la régression de la maladie coronarienne (Sacks *et al.*, 1995). L'absence d'effet peut être attribuable à une durée d'étude peut être trop courte pour observer un effet bénéfique de l'huile de poisson. De plus, seulement 59 patients ont été inclus dans cet essai et parmi ces derniers 21 n'ont pas terminé le protocole. L'étude SCIMO (Study on prevention of Coronary atherosclerosis by Intervention with Marine Omega-3 fatty acids) conduite sur 223 patients recevant un traitement à l'huile de poisson sous forme de capsule pendant 24 mois (3,3 g d'EPA+DHA par jour les trois premiers mois et 1,65 g les 21 mois suivants) montre que la supplémentation atténuée légèrement, mais de manière non

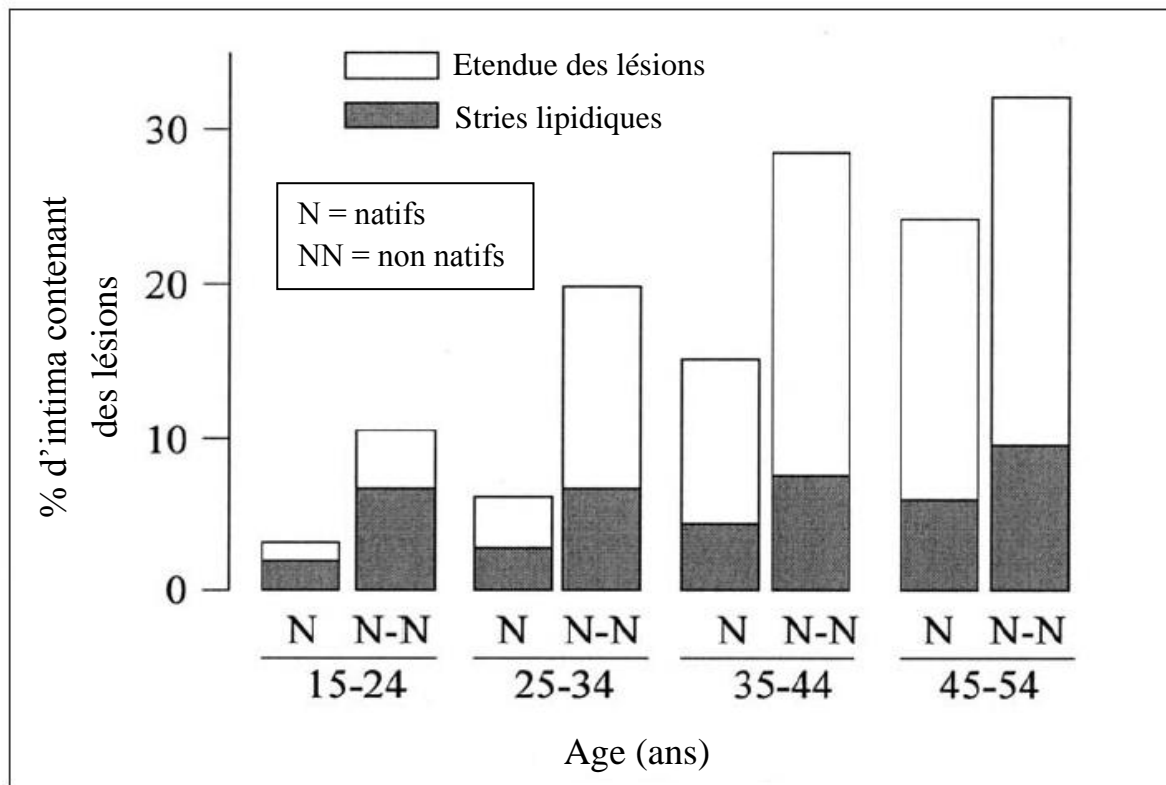


Figure 14 : Pourcentage de lésions athérosclérotiques chez les Alaskiens natifs *versus* non natifs en fonction de l'âge
(De Caterina & Zampolli 2001)

Pourcentage de couverture de l'aorte par des stries lipidiques (blanc) et de l'étendue de la plaque (gris) mesuré après autopsies d'Alaskiens natifs et émigrés.

significative, le développement de l'athérosclérose coronaire, évaluée par coronarographie, chez des patients souffrant de maladie coronarienne (von Schacky *et al.*, 1999). Toutefois, la même équipe n'a pas montré d'effet de la supplémentation sur l'épaisseur intima-média de la carotide, évaluée sur les mêmes sujets (Angerer *et al.*, 2002). L'effet anti-athérogène des AGPI ω 3-LC pourrait être spécifique de certains réseaux vasculaires tels que la circulation coronarienne. Ici l'effet est plus faible dans la carotide en comparaison aux artères coronaires (Angerer *et al.*, 2002). Ainsi des apports de 0,5 à 2 g d'AGPI ω 3-LC par jour seraient efficaces pour la réduction de l'athérosclérose coronaire (Angerer *et al.*, 2002), par contre des doses plus élevées ne semblent pas avoir d'effet (Sacks *et al.*, 1995).

Une **méta-analyse** incluant des études d'observation et d'intervention sur une durée de 3 à 12 mois sur un total de 2 486 sujets, recevant 2,6 à 6 g par jour d'huile de poisson, sains ou présentant une maladie cardiovasculaire n'a pas mis en évidence d'effet des AGPI ω 3-LC sur la resténose coronarienne après angioplastie et l'épaisseur média-intima de la carotide, des marqueurs de l'athérosclérose (Balk *et al.*, 2006a).

II-3- Effets athéro-protecteurs des AGPI ω 3-LC: études animales

Face à la difficulté d'étudier les effets anti-athérosclérotiques des AGPI ω 3-LC chez l'Homme, l'utilisation de modèles animaux d'athérosclérose s'est avérée indispensable et a permis de déterminer précisément l'impact des AGPI ω 3-LC sur le développement de cette pathologie.

De nombreux modèles animaux ont été développés afin d'étudier l'athérosclérose, avec pour chacun ses spécificités. Le singe et le porc sont deux espèces capables de développer des lésions d'athérosclérose de manière spontanée. Toutefois, le développement d'une lésion étant lent chez ces espèces, un régime enrichi en graisses et cholestérol est souvent utilisé pour l'accélérer. Cependant, les contraintes liées à la taille de ces animaux, la grande variabilité interindividuelle et le coût de leur maintien ont limité leur utilisation (Getz & Reardon 2012). Le lapin New-Zealand White est également un modèle d'athérosclérose qui a été beaucoup utilisé puisque la pathologie peut être initiée facilement et rapidement soit par un régime riche en cholestérol ou à base de caséine. Les lapins Watanabe, qui développent une hypercholestérolémie familiale du fait de leur déficience en LDLR, sont également référencés dans la littérature. Le métabolisme lipoprotéique du lapin étant différent de celui de l'Homme, les effets observés chez le lapin sont néanmoins difficilement comparables à l'Homme (De Caterina & Zampolli 2001). Le rat et la souris ont également été utilisés ; ils sont cependant

très résistants à l'athérosclérose et peu comparables à l'Homme du fait d'un métabolisme lipidique très différent. Ainsi, les études sur ces modèles sont rares et peu pertinentes (Harris 1997a). Par contre, l'introduction de modèles transgéniques a permis de développer des lignées de souris sensibles à l'athérosclérose qui présentent un grand intérêt. Deux modèles murins sont fréquemment utilisés : le modèle LDLR^{-/-} et le modèle ApoE^{-/-} (Breslow 1996). Ils diffèrent dans le régime alimentaire nécessaire au développement de l'athérosclérose. Les souris dépourvues de LDLR (LDLR^{-/-}) développent l'athérosclérose uniquement sous un régime de type occidental, riche en graisses alors que les souris déficientes pour l'ApoE (ApoE^{-/-}) développent des lésions d'athérosclérose de manière spontanée, indépendamment du régime (De Caterina & Zampolli 2001). Du fait de sa facilité d'élevage, d'un moindre coût de maintien par rapport aux autres animaux, d'une manipulation génétique aisée et d'un développement rapide de l'athérosclérose, la souris est aujourd'hui le modèle le plus largement utilisé pour étudier l'athérogenèse. Cependant, suivant le modèle de souris transgénique utilisé, l'effet des AGPI ω 3-LC n'est pas le même. En effet, contrairement aux souris LDLR^{-/-}, les souris ApoE^{-/-} ne répondent pas aux AGPI ω 3-LC. Ceci peut être attribuable au fait que les profils lipidiques de ces deux modèles de souris transgéniques ne sont pas les mêmes, de telle sorte qu'une réponse différente à des interventions diététiques est plausible (Zampolli *et al.*, 2006). La souris LDLR^{-/-} constitue donc un modèle de choix pour étudier l'impact des AGPI ω 3-LC sur le développement de l'athérosclérose.

Globalement la plupart des études animales ont rapporté une réduction significative de la taille des lésions athérosclérotiques chez les modèles non murins nourris avec un régime riche en AGPI ω 3-LC, apportés généralement sous forme d'huile de poisson. Ainsi, le développement de l'athérosclérose apparaît diminué chez le singe recevant en moyenne 12% de son apport alimentaire sous forme d'huile de poisson (Davis *et al.*, 1987) ou 3,8 g par jour d'AGPI ω 3-LC apportés par l'huile de poisson (Parks *et al.*, 1990) sur des durées allant de 1 à 3 ans ; chez le porc recevant en moyenne 7,5 g par jour d'AGPI ω LC apportés par l'huile de poisson pendant 16 semaines (Thomas *et al.*, 1990) et chez les lapins New Zealand et Watanabe recevant respectivement 2 mL par jour ou 1,5 mL par kg (poids de l'animal) en huile de poisson sur une durée moyenne de 20 semaines (Mortensen *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1990). Quelques études sont néanmoins contradictoires et ne concluent pas à un effet bénéfique des AGPI ω 3-LC sur le processus d'athérogenèse. C'est notamment le cas de certains essais réalisés chez le lapin New Zealand recevant 2 mL par jour d'huile de poisson purifiée (MaxEpa) pendant 20 semaines et Watanabe recevant également de l'huile de poisson

MaxEPA à raison de 2,5 mL par jour pendant 1 an (Rich *et al.*, 1989; Thiery & Seidel 1987). Cependant, plusieurs limites à ces études ont été rapportées et notamment un manque de contrôles adéquats voire même dans certains cas une absence de contrôle (De Caterina & Zampolli 2001). En ce qui concerne les modèles murins transgéniques qui sont les plus fréquemment utilisés, l'effet des AGPI ω 3-LC dépend beaucoup du modèle. En effet, comme rapporté précédemment, la supplémentation en AGPI ω 3-LC n'a pas d'effet sur les souris ApoE^{-/-} (Adan *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2007; Zampolli *et al.*, 2006). Des études montrent tout de même une réduction de la taille des lésions mais avec de fortes doses de supplémentation en AGPI ω 3-LC allant jusqu'à 20% de l'apport énergétique total (Wang *et al.*, 2004). Au contraire, des souris LDLR^{-/-} supplémentées avec des doses d'AGPI ω 3-LC allant de 1 à 10 % de l'apport énergétique total, présentent une diminution significative de la taille des lésions athérosclérotiques (Brown *et al.*, 2012; Saraswathi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Zampolli *et al.*, 2006) (**Figure 15**).

Ainsi, les effets athéro-protecteurs des AGPI ω 3-LC ont pu être montrés sur plusieurs modèles animaux mais le modèle de souris transgénique LDLR^{-/-} apparaît comme le plus pertinent à l'heure actuelle. Dans l'interprétation des résultats, il est nécessaire de prendre en compte le fait que la supplémentation en huile de poisson ne devrait pas excéder 1 à 2% de l'apport énergétique totale sous forme d'AGPI ω 3-LC pour être au plus près de la réalité. Certaines études restent non concluantes mais peuvent s'expliquer par le type de modèle choisi et par des conceptions d'études différentes. De plus, un manque de contrôles adéquats et des méthodes d'évaluation de l'athérosclérose très variables d'une étude à l'autre ont également été soulignés (De Caterina & Zampolli 2001).

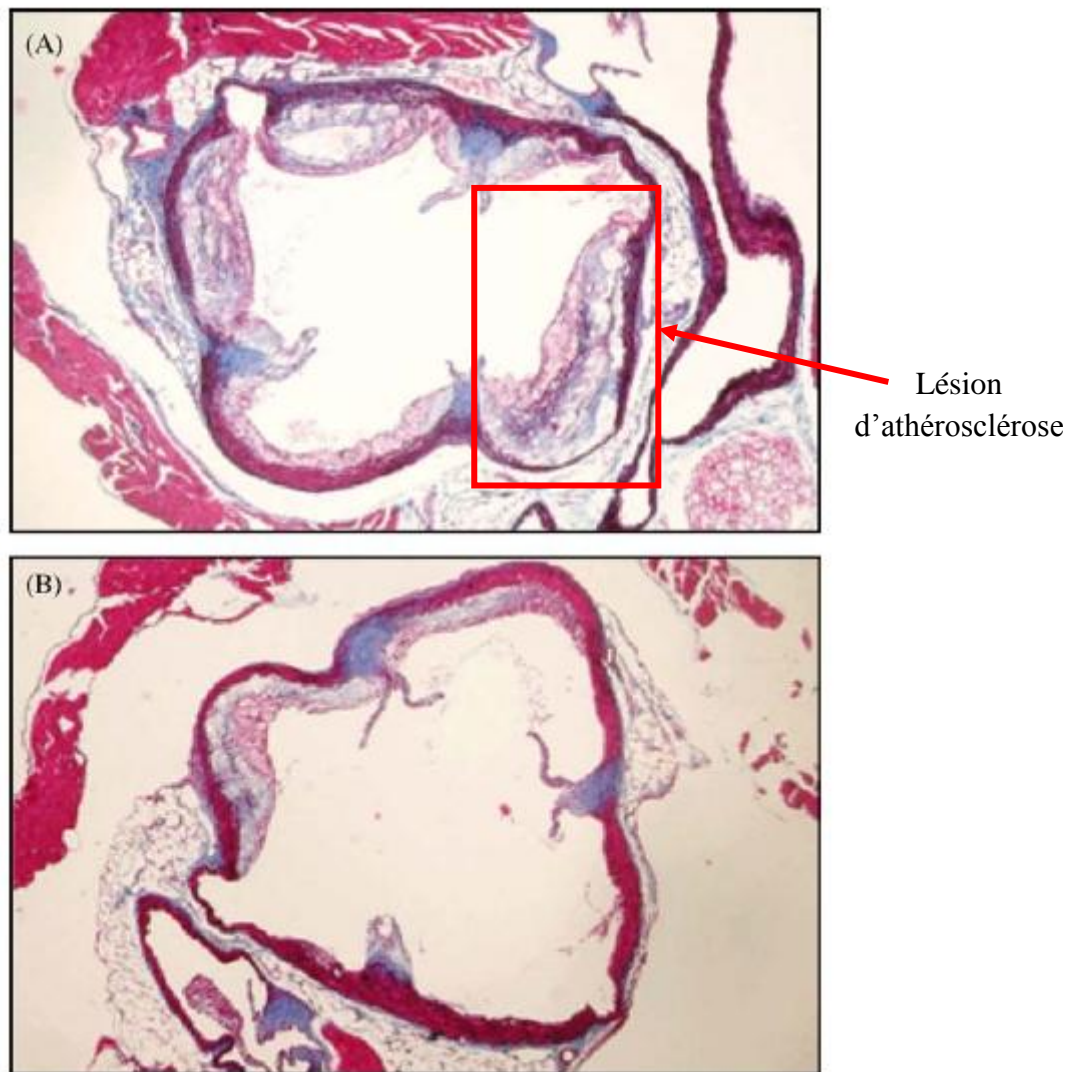


Figure 15 : Etendue des lésions athérosclérotiques au niveau des aortes de souris LDLR^{-/-}
(Zampolli et al., 2006)

(A) Souris contrôles, sans supplément ; (B) Souris supplémentées en huile de poisson. Sections de racines aortiques représentatives, colorées avec l'élastine trichrome.

Une réduction de l'étendue de la lésion athérosclérotique est visible dans le groupe supplémenté en huile de poisson par rapport au groupe contrôle.

L'intérêt pour les AGPI ω 3-LC et leurs propriétés cardio-protectrices n'a cessé d'augmenter depuis les premières observations faites dans les années 70 (**Figure 16**). Même si des études peu concluantes ou contradictoires existent, les équipes qui font référence dans le domaine confirment l'association entre consommation d'AGPI ω 3-LC et réduction du risque de MCV. En ce qui concerne l'athérosclérose, qui a logiquement été identifiée comme une cible intermédiaire possible des AGPI ω 3-LC, les données chez l'Homme sont moins abondantes et moins convaincantes. Néanmoins, l'apparition des modèles murins transgéniques et plus particulièrement des souris LDLR^{-/-}, a permis d'étudier plus efficacement le lien causal entre consommation d'AGPI ω 3-LC et réduction des plaques d'athérome et a confirmé que les effets cardio-protecteurs des AGPI ω 3-LC passent en partie par une réduction de l'athérosclérose.

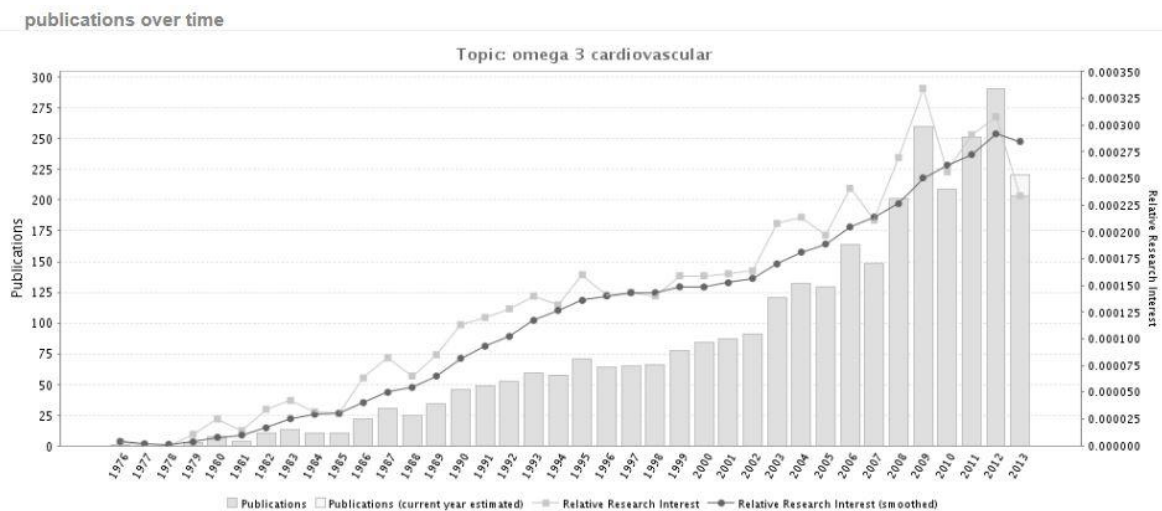


Figure 16 : Evolution du nombre de publications relatives aux propriétés cardio-protectrices des AGPI ω 3-LC
(GoPubMed, <http://www.gopubmed.com>)

III- Effets et mécanismes athéro-protecteurs des AGPI ω 3-LC : cibles tissulaires et moléculaires

Les AGPI ω 3-LC possèdent de multiples cibles cellulaires et moléculaires contribuant à leurs effets cardio-protecteurs. Ils permettent notamment une réduction de la concentration plasmatique en triglycérides, de la pression sanguine et de l'agrégation plaquettaire. Les AGPI ω 3-LC favorisent également la stabilité de la plaque et la relaxation endothéliale et ont des effets anti-inflammatoires, anti-arythmiques et anti-thrombotiques reconnus (Adkins & Kelley 2010) (**Figure 17**). Dans cette partie, nous allons plus spécifiquement nous intéresser aux effets et mécanismes d'action des AGPI ω 3-LC pouvant expliquer leur rôle athéro-protecteur.

III-1- Effets hypotriglycéridémiants

III-1-1- Constat épidémiologique

L'effet hypotriglycéridémiant des AGPI ω 3-LC est clairement reconnu chez l'Homme. En effet, plusieurs études réalisées sur des sujets normaux et hypertriglycéridémiques, supplémentés en AGPI ω 3-LC (1,5 à 5 g par jour), ont rapporté une réduction de la triglycéridémie (Balk *et al.*, 2006b; Harris 1997b; Harris *et al.*, 1997a). Il faut noter que les deux AGPI ω 3-LC majoritaires, EPA et DHA, ont des effets similaires sur ce critère et peuvent réduire les concentrations plasmatiques en triglycérides à la fois à jeun et postprandiale (Kelley *et al.*, 2007) et ce de façon dose-dépendante (Robinson & Stone 2006) (**Figure 18**).

Cependant, l'effet hypotriglycéridémiant des AGPI ω 3-LC bien documenté chez l'Homme n'est pas toujours démontré chez les modèles animaux d'athérosclérose (Harris 1997a) suggérant que le rôle athéro-protecteur des AGPI ω 3-LC serait partiellement indépendant de leurs effets hypotriglycéridémiants.

III-1-2- Mécanismes d'action

L'effet hypotriglycéridémiant des AGPI ω 3-LC passe par une réduction de la production hépatique des VLDL-triglycérides et par une augmentation du catabolisme des triglycérides au niveau périphérique (Harris *et al.*, 2008) (**Figure 19**). Les mécanismes

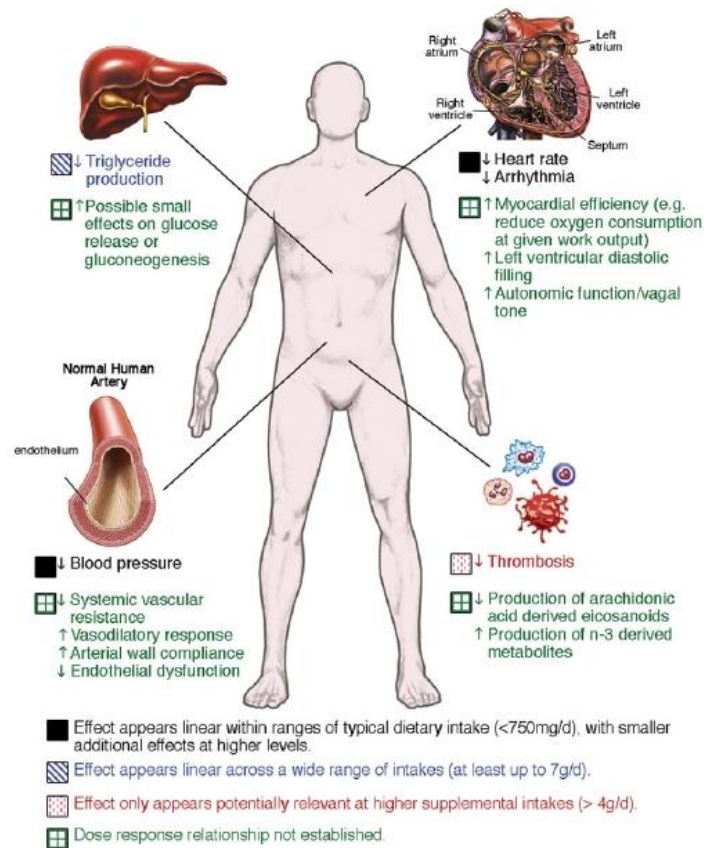


Figure 17 : Effets physiologiques des AGPI ω 3 pouvant influencer le risque cardiovasculaire
(Mozaffarian & Wu 2011)

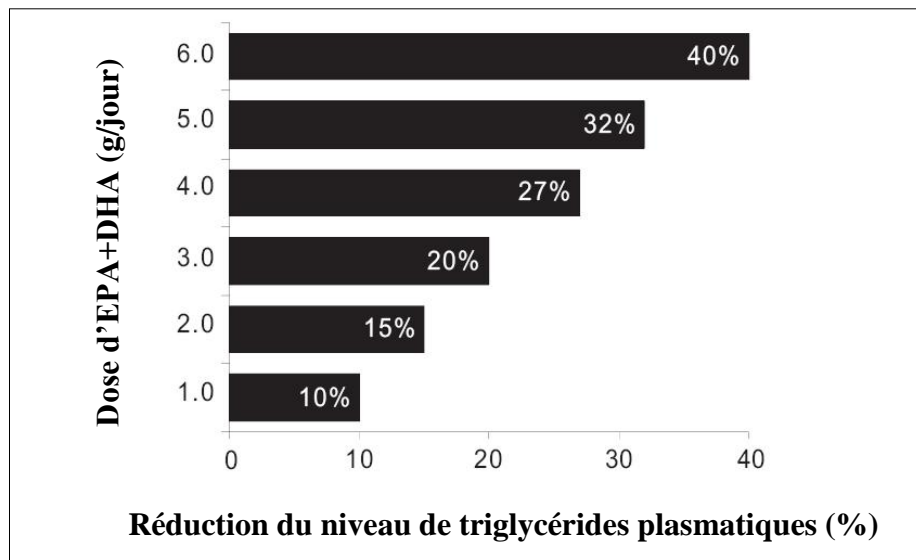


Figure 18 : Effet hypotriglycéridémiant, dose-dépendant, des AGPI ω 3-LC
(Robinson & Stone 2006)

Réduction approximative des triglycérides plasmatiques/g d'EPA+DHA, basée sur une analyse de méta-régression de 19 études.

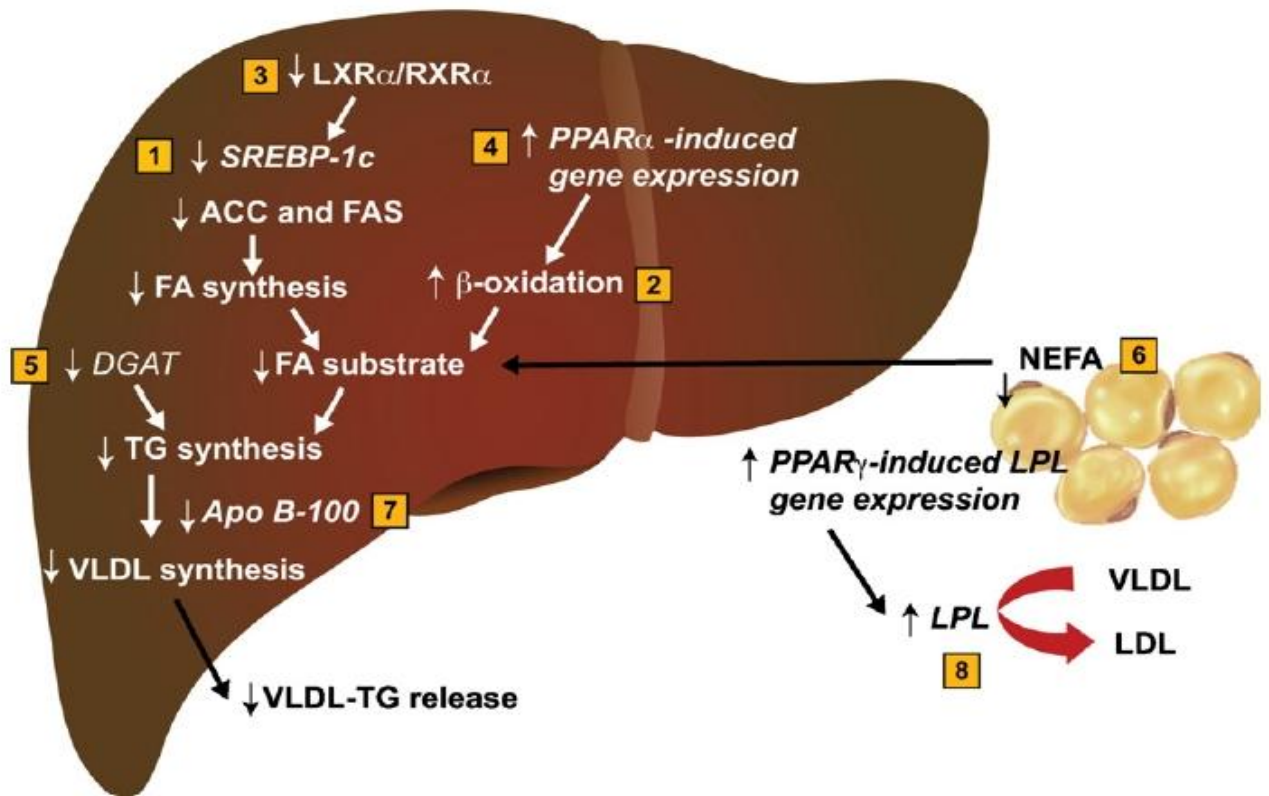


Figure 19 : Mécanismes d'action impliqués dans l'effet hypotriglycéridémiant des AGPI ω 3-LC
(Harris et al., 2008)

La réduction de la sécrétion des VLDL-triglycérides peut provenir d'une réduction de l'expression de SREBP-1c (1) ou d'une augmentation de la β -oxydation mitochondriale et/ou peroxysomale (2), conduisant à diminuer la quantité d'acides gras disponibles pour la synthèse des triglycérides (3). Une diminution de l'expression de SREBP-1c peut être médiée par une inhibition de la liaison du complexe LXR α /RXR α . Une augmentation de la β -oxydation peroxysomale peut être la conséquence d'une augmentation de l'expression de l'acyl-coenzyme A oxydase induite par PPAR α (4). Une diminution de l'activité des enzymes intervenant dans la synthèse des triglycérides (5), des acides gras non estérifiés provenant du tissu adipeux (6), et de la disponibilité de l'ApoB100 (7) sont des mécanismes potentiels pouvant expliquer la réduction des VLDL-triglycérides relâchés. En périphérie, une augmentation de l'activité de la LPL (8) conduit à augmenter l'élimination des VLDL-triglycérides, probablement due à une augmentation de l'expression des gènes PPAR γ et/ou PPAR α .

FA = fatty acids, NEFA = non esterified fatty acids, TG = triglycérides

moléculaires expliquant ces effets ne sont pas complètement élucidés mais plusieurs mécanismes potentiels ont été mis en évidence par des études réalisées chez l'animal et notamment sur foies perfusés ainsi que sur hépatocytes primaires issus d'animaux recevant un régime riche en AGPI ω 3-LC (Harris & Bulchandani 2006).

III-1-2-1- Réduction de la synthèse des VLDL-triglycérides

Les AGPI ω 3-LC réduisent la triglycéridémie en partie *via* l'inhibition de la sécrétion hépatique des VLDL-triglycérides. Cette inhibition est secondaire à une diminution de la synthèse hépatique des triglycérides (Adkins & Kelley 2010). Globalement deux mécanismes majeurs peuvent expliquer cet effet : d'une part une moindre disponibilité des acides gras pour la synthèse des triglycérides et d'autre part une réduction de l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse des triglycérides.

*Effet sur la disponibilité des acides gras

La moindre disponibilité des acides gras servant de substrat pour la synthèse hépatique des triglycérides peut en partie s'expliquer par une **diminution de la lipogenèse hépatique** par les AGPI ω 3-LC. La lipogenèse hépatique permet la conversion enzymatique de l'acétyl-CoA en acides gras. SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding protein-1c) est un facteur de transcription jouant un rôle majeur dans la régulation de la lipogenèse. Son expression est régulée par les récepteurs nucléaires LXR α (récepteur des oxystérols ou Liver X Receptor) et RXR α (récepteur de l'acide rétinoïque ou Retinoid X Receptor) qui forment un hétérodimère se liant sur son promoteur. L'activation de SREBP-1c stimule la synthèse des enzymes intervenant dans la lipogenèse telles que l'acétyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) et la fatty-acid synthase (FAS) (Adkins & Kelley 2010). Une alimentation riche en huile de poisson a été associée, chez la souris, à une diminution des triglycérides plasmatiques et à une réduction de l'expression hépatique du gène SREBP-1c (Le Jossic-Corcros *et al.*, 2005). Une analyse transcriptomique, par puces à ADN, sur des foies de rat a également conclu à une diminution de l'expression de SREBP-1c chez les animaux nourris avec un régime enrichi en DHA (Kramer *et al.*, 2003). Une inhibition de la liaison du complexe LXR α /RXR α sur le promoteur de SREBP-1c, induite par l'EPA et le DHA, pourrait expliquer la diminution de l'expression du gène SREBP-1c et par conséquent la diminution de l'expression des enzymes

de la lipogenèse. Cette inhibition peut être due au fait que les AGPI ω 3-LC sont susceptibles d'entrer en compétition avec les ligands de LXR α empêchant ainsi son activation et sa liaison avec RXR α sur le promoteur de SREBP-1c (Yoshikawa *et al.*, 2002) (**Figure 20**). Certaines études ne rapportent pas l'implication de LXR α dans la modulation de l'expression de SREBP-1c par les AGPI ω 3-LC suggérant que ces mécanismes d'action restent à ce jour encore mal compris (Davidson 2006). Les AGPI ω 3-LC, et plus particulièrement le DHA, peuvent également diminuer l'expression de SREBP-1c au niveau protéique. En effet, le DHA peut entraîner la dégradation protéasomale de la protéine SREBP-1c en bloquant les inhibiteurs du protéasome (Jump 2008).

Une **augmentation de la β -oxydation hépatique**, voie de dégradation des acides gras, va également engendrer une moindre disponibilité des acides gras nécessaires à la synthèse des triglycérides. Il a en effet été rapporté une augmentation de la β -oxydation hépatique chez des sujets sains recevant 9 g par jour d'AGPI ω 3-LC (5,4 g d'EPA et 3,6 g de DHA) (Dagnelie *et al.*, 1994). De plus, des études chez le rat ont rapporté que l'EPA et/ou le DHA augmentent à la fois la β -oxydation peroxysomale et la β -oxydation mitochondriale des acides gras (Harris *et al.*, 2008; Jump 2008). Cet effet passe certainement par l'activation du facteur de transcription PPAR α qui joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme lipidique (Nakamura *et al.*, 2004) (**Figure 20**). En effet, des études ont montré que l'EPA et le DHA pouvaient induire l'expression du gène de l'acyl-CoA oxydase, une enzyme de la β -oxydation, dans les hépatocytes de rat et ce de manière dépendante du facteur de transcription PPAR α (Harris *et al.*, 2008).

Le fait que l'EPA et le DHA soient préférentiellement estérifiés dans les phospholipides pourrait également contribuer à la réduction des acides gras disponibles pour la synthèse des triglycérides (Miller *et al.*, 1993).

*Effet sur les enzymes impliquées dans la synthèse des triglycérides

Les AGPI ω 3-LC peuvent également agir directement sur la synthèse hépatique des triglycérides *via* la **réduction de l'activité de deux enzymes clés : l'acide phosphatidique phosphohydrolase (PAP) et l'acyl-CoA diacylglycérol acyltransférase (DGAT)**. Ces deux enzymes catalysent, respectivement, la conversion de l'acide phosphatidique en diacylglycérol et de diacylglycérol en triglycérides. La capacité de l'EPA et du DHA à diminuer l'activité de la PAP et de la DGAT a notamment été mise en évidence chez le rat, au

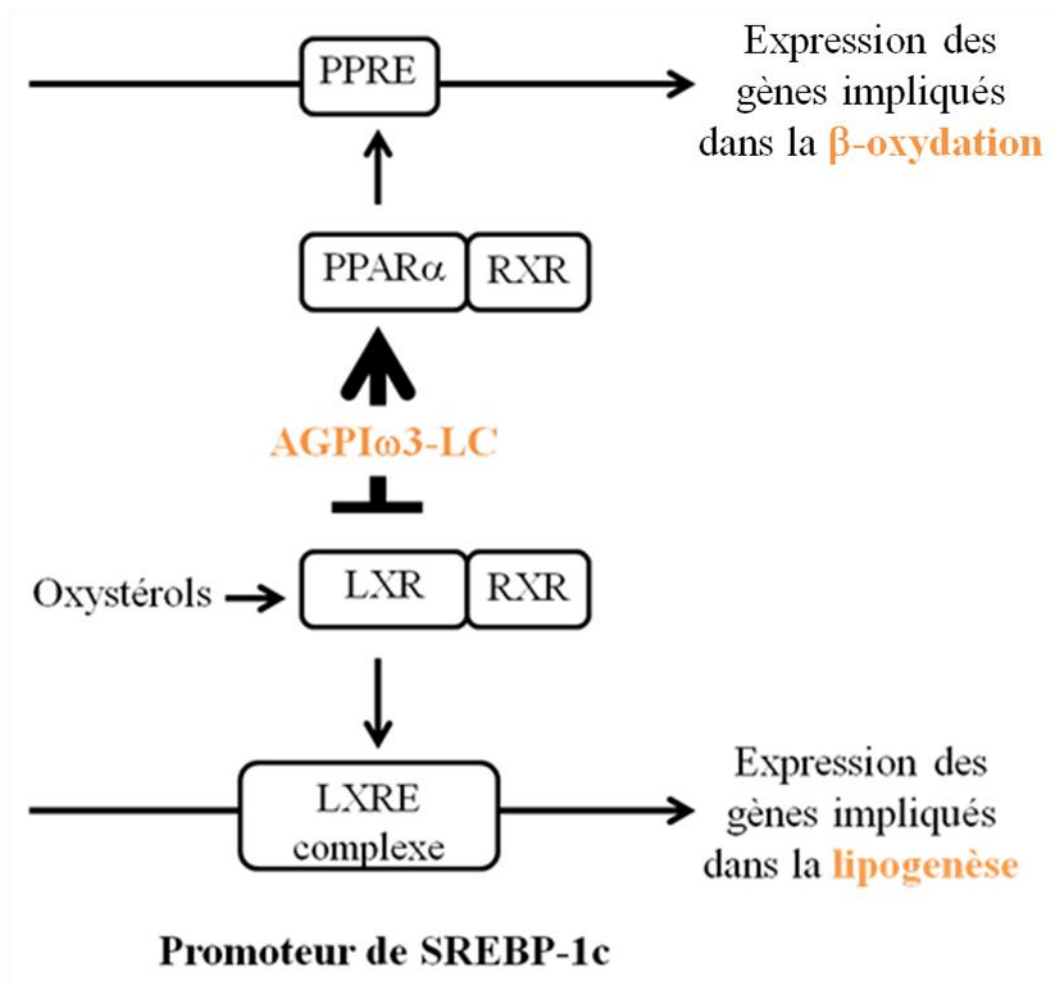


Figure 20 : Modulation de la lipogénèse et de la β -oxydation par les AGPI ω 3-LC

(d'après Yoshikawa et al., 2002)

Les AGPI ω 3-LC suppriment l'expression de SREBP-1c, impliqué dans la lipogénèse, en inhibant la liaison du complexe LXR/RXR sur les éléments de réponse aux LXR (LXREs). Parallèlement, les AGPI ω 3-LC favorisent l'expression des gènes activés par PPAR α , impliqués dans la β -oxydation, *via* la liaison du complexe PPAR α /RXR aux éléments de réponse de PPAR (PPREs).

niveau des microsomes hépatiques. Les mécanismes d'action pouvant expliquer cet effet n'ont pas été définis (Harris & Bulchandani 2006).

*Autre mécanisme

Une **moindre disponibilité de l'ApoB100** pourrait également entraîner une diminution de la synthèse des VLDL et par conséquent une sécrétion moins importante de VLDL-triglycérides. Une étude réalisée sur des hépatocytes primaires de rat a bien rapporté une augmentation de la dégradation de l'ApoB100 par les AGPI ω 3-LC (Fisher *et al.*, 2001) même si l'importance de cette voie dans la réduction de la synthèse hépatique de VLDL n'a pas été établie. L'étude de Pan *et al.* en 2004 confirme l'impact des AGPI ω 3-LC sur la dégradation de l'ApoB100 *via* une activation de la protéolyse post-réticulum endoplasmique. Par ailleurs, cette étude suggère que les métabolites peroxydés issus des AGPI ω 3-LC seraient impliqués dans ce mécanisme (Pan *et al.*, 2004).

III-1-2-2- Induction du catabolisme des triglycérides plasmatiques

Il a été rapporté que les AGPI ω 3-LC augmentent **l'épuration des VLDL et des chylomicrons** *via* une induction de leur hydrolyse par la **lipoprotéine lipase (LPL)** (**Figure 21**) (Khan *et al.*, 2002; Park & Harris 2003). Les AGPI ω 3-LC étant ligands des PPARs (Jump 2002), il est possible que l'induction de l'activité LPL qui leur est associée passe en partie par PPAR γ . De plus, le DHA est également un ligand du récepteur nucléaire FXR (récepteur des acides biliaires ou Farnesoid X Receptor) qui joue un rôle central dans l'homéostasie lipidique (Zhao *et al.*, 2004a). Ce récepteur pourrait être impliqué dans la réduction de la triglycéridémie. En effet, des souris déficientes en FXR présentent un niveau de triglycérides élevé (Sinal *et al.*, 2000). De plus, des études sur cellules HepG2 ont démontré, qu'en présence d'un agoniste, FXR supprime l'expression génique de l'apolipoprotéine CIII (Apo CIII) (Claudel *et al.*, 2003) et induit l'expression génique d'Apo CII (Kast *et al.*, 2001). L'Apo CIII est une apolipoprotéine se trouvant à la surface des particules VLDL, qui a pour rôle d'inhiber l'activité de la LPL et donc par conséquent l'épuration des triglycérides (Shachter 2001). Alors qu'au contraire, l'Apo CII active la LPL et donc l'hydrolyse des triglycérides (Jong *et al.*, 1999). Ces modulations géniques contribuent donc à l'action hypotriglycéridémiantes des agonistes de FXR, dont le DHA fait partie.

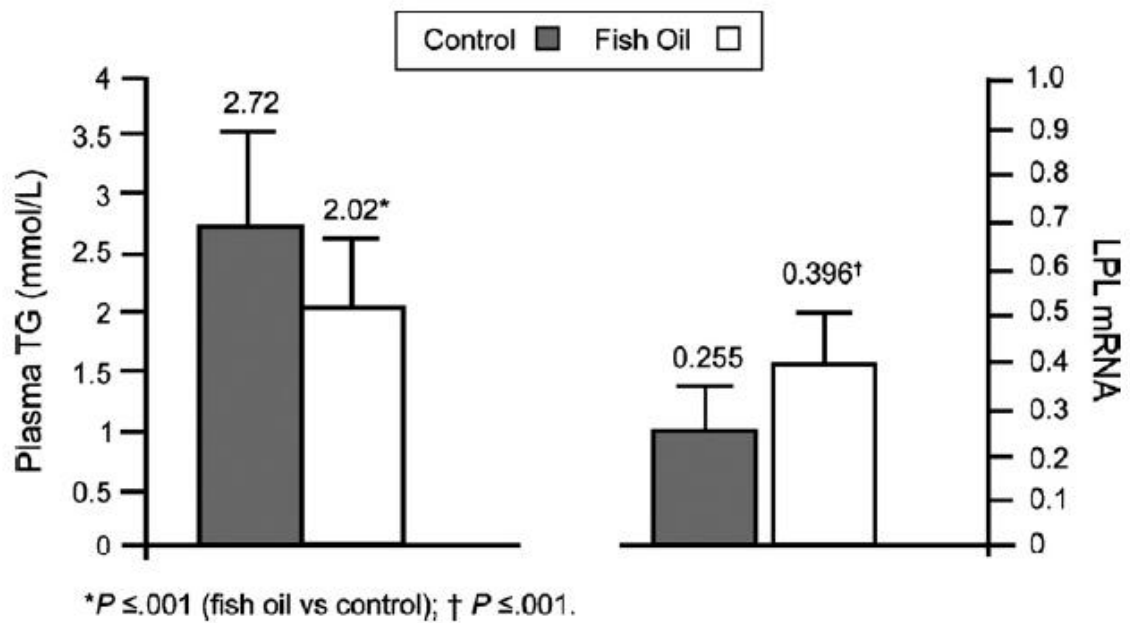


Figure 21 : Effet hypotriglycéridémiant de l'huile de poisson et expression génique de la LPL dans le tissu adipeux
(Harris et al., 2008)

L'effet hypotriglycéridémiant de l'huile de poisson chez des sujets ayant un profil lipoprotéique athérogène est associé avec l'augmentation de l'expression du gène de la LPL dans le tissu adipeux.

III-2- Impact sur la fonction endothéliale

III-2-1- Constat épidémiologique

Comme abordé précédemment, l'activation ou dysfonction endothéliale contribue à l'initiation et au développement de l'athérosclérose. Plusieurs essais cliniques ont démontré une amélioration de la dilatation artérielle médiée par le flux (FMD), une mesure de la fonction endothéliale, après une supplémentation en AGPI ω 3-LC (1 à 4 g par jour) (Goodfellow *et al.*, 2000; Haberka *et al.*, 2011; Schiano *et al.*, 2008) (**Figure 22**). Ceci pourrait être dû à l'augmentation de la production d'oxyde nitrique qui est un puissant vasodilatateur et à la diminution de l'expression de molécules d'adhésion qui sont responsables de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales, deux événements représentatifs de la dysfonction endothéliale. En effet, une augmentation de la production d'oxyde nitrique a été rapportée chez des sujets recevant 3 g par jour d'EPA+DHA (Harris *et al.*, 1997b) ce qui pourrait expliquer l'action bénéfique des AGPI ω 3-LC sur la dysfonction endothéliale (Abeywardena & Head 2001). Malgré quelques études contradictoires (Brown & Hu 2001; de Roos *et al.*, 2009), plusieurs études de supplémentation réalisées chez des sujets sains ont également rapporté une réduction de l'expression des molécules d'adhésion. Par exemple, une diminution de l'expression de la molécule ICAM-1 à la surface de monocytes humains a été rapportée chez des patients recevant 1,6 g par jour d'EPA+DHA (Hughes *et al.*, 1996). De même, une réduction des concentrations circulantes des formes solubles de VCAM-1 et ICAM-1 a également été mise en évidence chez des sujets recevant en moyenne, respectivement, 1,2 à 2,5 g par jour d'AGPI ω 3-LC (Miles *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2012). De plus, une étude *ex-vivo* sur monocytes issus de patients recevant 1,8 g par jour d'EPA+DHA a rapporté une diminution de l'adhésion de ces monocytes aux cellules endothéliales en culture (Luu *et al.*, 2007).

III-2-2- Mécanismes d'action

Les mécanismes d'action moléculaires par lesquels les AGPI ω 3-LC limitent la dysfonction endothéliale ont principalement été mis en évidence par des études réalisées *in vitro* sur cellules endothéliales, sur cellules musculaires lisses et sur cellules immunitaires (monocytes et macrophages).

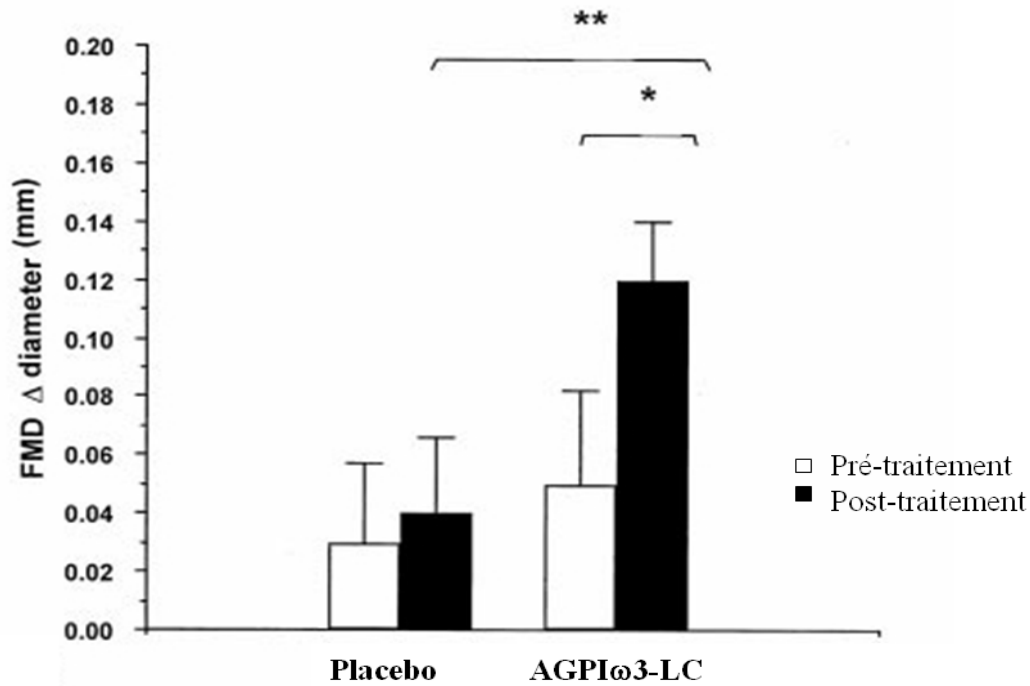


Figure 22 : Modification de la FMD de l'artère brachiale chez des sujets recevant un traitement placebo ou des AGPIω3-LC
(Goodfellow et al., 2000)

FMD = dilatation artérielle médiée par le flux exprimée en changement absolu (mm) par rapport au diamètre de base.

* $p < 0,05$ (comparaison pré et post-traitement dans le groupe AGPIω3-LC)

** $p < 0,05$ (comparaison post-traitement groupe placebo versus AGPIω3-LC)

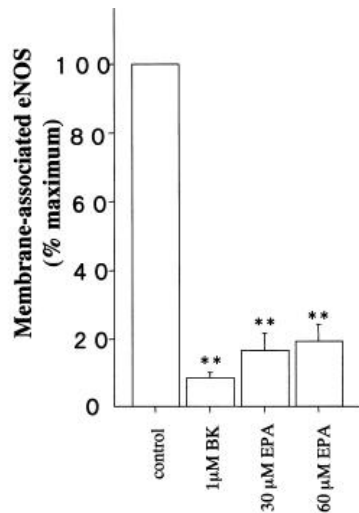
III-2-2-1- Production d'oxyde nitrique

Comme décrit précédemment, les AGPI ω 3-LC améliorent la fonction endothéliale notamment par une augmentation de la production d'oxyde nitrique. Cet effet a également été mis en évidence *in vitro* sur cellules endothéliales (Okuda *et al.*, 1997; Omura *et al.*, 2001) et sur cellules musculaires lisses (Hirafuji *et al.*, 2002; Schini *et al.*, 1993). Sur cellules endothéliales traitées avec de l'EPA il a été rapporté que la production accrue d'oxyde nitrique s'accompagne de **l'activation de l'enzyme eNOS** (endothelial nitric oxide synthase) nécessaire à sa synthèse. A l'état inactif l'eNOS est liée à la cavéoline-1 dans la membrane cellulaire. L'EPA stimule sa dissociation de la cavéoline-1 et sa translocation dans le cytosol permettant ainsi son activation (Omura *et al.*, 2001) (**Figure 23**). De plus, une étude sur cellules endothéliales traitées avec du DHA rapporte une augmentation à la fois de l'expression et de l'activité de l'eNOS. Le DHA entraîne l'augmentation de l'expression de l'eNOS (forme totale et phosphorylée) ainsi que celle de deux protéines impliquées dans l'activation de cette enzyme : l'Akt sous sa forme phosphorylée et la HSP90 (heat shock protein 90 kDa) (Stebbins *et al.*, 2008). Dans les cellules musculaires lisses, la production accrue d'oxyde nitrique est liée à une augmentation de l'expression génique et protéique de **l'enzyme iNOS** (inductible nitric oxide synthase) généralement en réponse à un stimulus inflammatoire. Les AGPI ω 3-LC et le DHA en particulier augmentent de façon modérée l'expression de la iNOS *via* l'activation de la kinase p44/42 MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Hirafuji *et al.*, 2002) (**Figure 24**). Même si une surproduction d'oxyde nitrique dans les cellules musculaires lisses *via* la iNOS peut être néfaste, la production modérée associée au DHA a été considérée comme protectrice vis-à-vis de la dysfonction endothéliale (Hirafuji *et al.*, 2003).

III-2-2-2- Adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales

Des études d'exposition aux AGPI ω 3-LC réalisées *in vitro* (De Caterina *et al.*, 1994; Hughes *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 1995) ou *in vivo* sur des animaux nourris avec de l'huile de poisson (Miles *et al.*, 2000) ont mis en évidence une diminution d'expression de la plupart des molécules d'adhésion à la surface des monocytes (Hughes *et al.*, 1996), des macrophages (Miles *et al.*, 2000) ou des cellules endothéliales (De Caterina *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 1995).

A



B

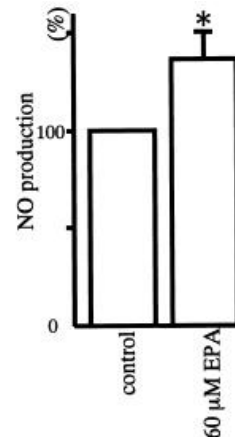


Figure 23 : Activation de l'enzyme eNOS et production de NO suite à l'exposition de cellules endothéliales humaines à l'EPA
(Omura et al., 2001)

(A) Quantification de la dissociation membranaire de l'eNOS marquée par immunohistochimie. BK = bradykinine, stimule la dissociation membranaire de l'eNOS et donc son activation.

* $p < 0,05$ versus control

** $p < 0,01$ versus control

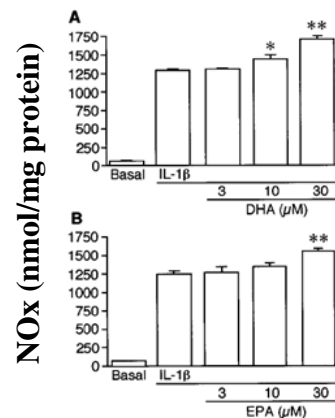
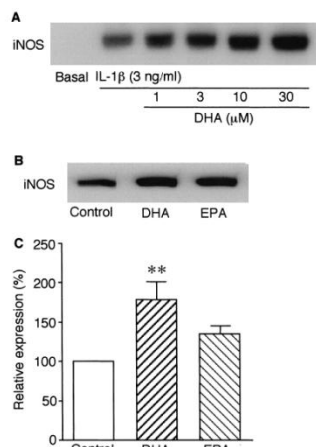


Figure 24 : Expression protéique de l'enzyme iNOS et production de NO dans des cellules musculaires lisses exposées à l'EPA ou au DHA
(Hirafuji et al., 2002&2003)

* $p < 0,05$ versus IL-1β

** $p < 0,01$ versus control ou IL-1β

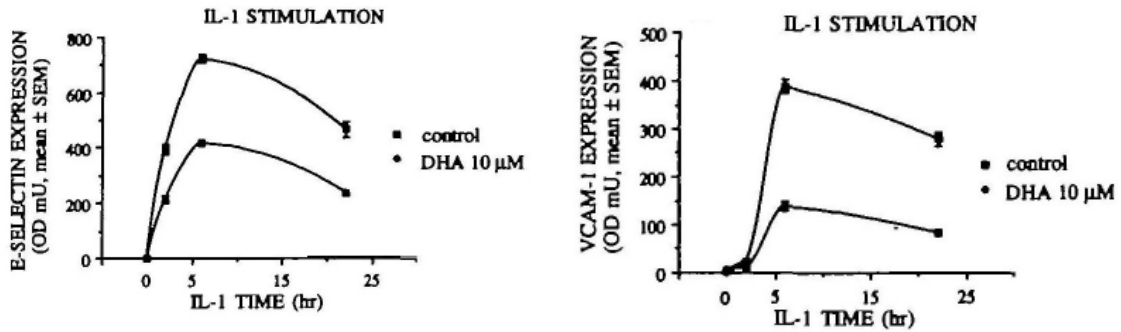
Certaines études *in vitro* ont également rapporté une diminution de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales (De Caterina *et al.*, 1994; De Caterina & Libby 1996; Yates *et al.*, 2011) (**Figure 25**). Concernant les mécanismes d'action moléculaire, la plupart des études suggèrent que l'impact des AGPI ω 3-LC sur l'expression des molécules d'adhésion serait dépendant de la **voie de signalisation de NF κ B** (nuclear factor-kappa B) (De Caterina & Zampolli 2001). En effet, des monocytes humains traités avec de l'EPA (Zhao *et al.*, 2004b) et des macrophages murins traités avec des AGPI ω 3-LC (Novak *et al.*, 2003) présentent une réduction de l'activation de NF κ B suite à une réduction de la phosphorylation d'I κ B (nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor). De la même manière, le DHA est capable de réduire la phosphorylation d'I κ B et ainsi l'activation de NF κ B sur macrophages murins en culture (Lee *et al.*, 2001) et cellules dendritiques de souris (Weatherill *et al.*, 2005). Les AGPI ω 3-LC diminuent donc l'expression des molécules d'adhésion et par conséquent l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales *via* une modulation de la voie de signalisation de NF κ B. Le mécanisme d'action par lequel les AGPI ω 3-LC interagissent avec NF κ B n'est pas complètement élucidé mais il pourrait impliquer les métabolites oxygénés produits par voie enzymatique et non-enzymatique (*cf. Chapitre V*). En effet, plusieurs études *in vitro* utilisant divers modèles de cellules endothéliales et macrophages ont montré que les métabolites peroxydés issus des AGPI ω 3-LC inhibent la voie NF κ B (Sethi *et al.*, 1996) (Brooks *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2004; Musiek *et al.*, 2008; Sethi *et al.*, 2002), et donc par conséquent la production des molécules d'adhésion. Cet effet pourrait passer par l'activation de PPAR α (Mishra *et al.*, 2004; Sethi *et al.*, 2002) ou l'inactivation de la kinase IKK (I κ B kinase) indispensable à la libération du facteur NF κ B et à sa translocation au niveau nucléaire (Brooks *et al.*, 2011; Musiek *et al.*, 2008).

III-3- Impact sur l'inflammation

III-3-1- Constat épidémiologique

La mise en évidence des effets anti-inflammatoires des AGPI ω 3-LC chez l'Homme dépend grandement des marqueurs analysés et aussi du compartiment d'analyse. En effet, une récente revue de synthèse incluant 22 études d'intervention conclut que les effets des AGPI ω 3-LC sur les marqueurs circulants de l'inflammation ne sont pas clairement établis (Myhrstad *et al.*, 2011). Ceci suggère que les effets au niveau systémique sont soit

A



B

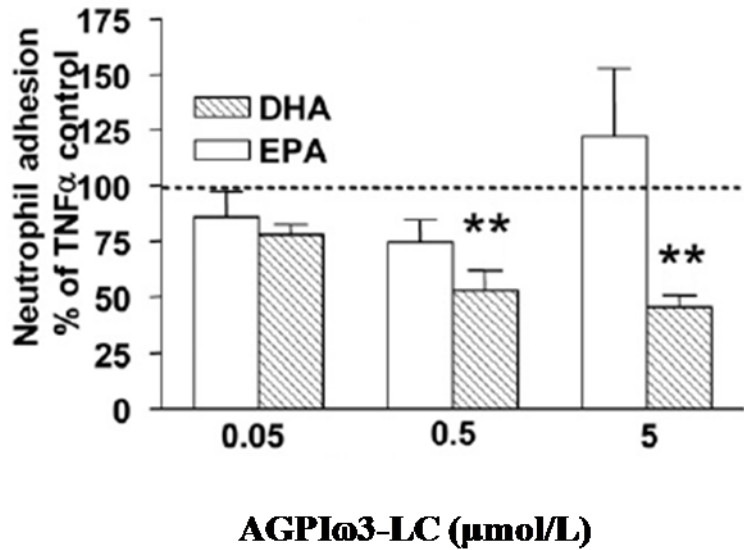


Figure 25 : Expression d'E-sélectine, VCAM-1 et adhésion des neutrophiles à la surface de cellules endothéliales humaines traitées avec des AGPI ω 3-LC
(De Caterina et al., 1994 & Yates et al., 2011)

* $p < 0,05$ versus EPA

relativement faibles soit difficiles à appréhender. Ceci peut être lié à une grande variabilité interindividuelle et à des cinétiques de production des marqueurs systémiques de l'inflammation qui est un paramètre critique trop rarement intégré dans l'analyse des résultats. A ceci s'ajoute les limites habituelles des études d'intervention (dose, durée, nombre de sujets) qui engendrent souvent une grande variabilité et aussi un faible niveau de significativité des résultats (Myhrstad *et al.*, 2011). Néanmoins, quelques études rapportant les niveaux circulants de protéine C-réactive, d'IL-6 et des formes solubles des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 au niveau plasmatique sont concluantes (Thies *et al.*, 2001; Tsitouras *et al.*, 2008; Yusof *et al.*, 2008). Par ailleurs, la méta-analyse de Goldberg portant sur l'impact d'une supplémentation en AGPI ω 3-LC sur les douleurs articulaires chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde conforte elle aussi les effets anti-inflammatoires des AGPI ω 3-LC (Goldberg & Katz 2007). Ceci suggère aussi que les AGPI ω 3-LC auraient surtout une action au niveau local. Ceci a d'ailleurs clairement été mis en évidence dans l'étude de Thies qui rapporte une réduction significative de l'infiltration des macrophages au niveau de la plaque d'athérome chez des sujets ayant reçu 1,4 g par jour d'AGPI ω 3-LC (Thies *et al.*, 2003). Cette réduction de l'infiltration macrophagique au niveau de la plaque d'athérome a également été mis en évidence sur modèles animaux (Nakajima *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009). De plus, une étude réalisée *in vivo* sur aorte de souris ApoE^{-/-} rapporte une réduction de l'expression des MMP-2 et -9 et confirme ainsi l'action locale des AGPI ω 3-LC au niveau vasculaire (Matsumoto *et al.*, 2008).

III-3-2- Mécanismes d'action

Globalement, les AGPI ω 3-LC exercent leurs effets anti-inflammatoires en régulant le recrutement des cellules immunitaires et en modérant leur activité pro-inflammatoire. Ces deux actions majeures sont induites par des mécanismes moléculaires communs qui incluent d'une part une modification des profils en médiateurs lipidiques et d'autre part une modulation de l'expression des gènes de l'inflammation.

III-3-2-1- Effet sur la chimiotaxie des cellules immunitaires

La chimiotaxie est le processus par lequel les leucocytes vont migrer vers un site d'inflammation en réponse à la sécrétion de chemoattractants au niveau de ce site. Plusieurs essais ont rapporté une diminution de la chimiotaxie des neutrophiles et des monocytes

humains après une supplémentation en AGPI ω 3-LC même si les doses de supplémentation utilisées dans ces études sont critiquables (4 à 15 g par jour) (Schmidt *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1992; Sperling *et al.*, 1993). Une étude dose-réponse a mis en évidence qu'une diminution maximale de la chimiotaxie apparaît avec un apport de 1,3 g par jour d'EPA+DHA (Schmidt *et al.*, 1991). Les mécanismes par lesquels les AGPI ω 3-LC diminuent la chimiotaxie ne sont pas complètement élucidés mais ils sont en partie liés à une **réduction de la production des chimioattractants** tel que le leucotriène B4. En effet, la production de ce chimioattractant est réduite de 58 % dans les monocytes issus de sujets recevant 5,4 g d'EPA+DHA (Lee *et al.*, 1985) et de 75% dans les cellules mononucléaires de sujets recevant 6 g par jour de DHA (Kelley *et al.*, 1999). Egalement, comme discuté précédemment, les AGPI ω 3-LC **diminuent l'expression des molécules d'adhésion** contribuant ainsi à un moindre recrutement des leucocytes au niveau du site d'inflammation. Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes d'action des AGPI ω 3-LC sur ces cibles, il faut encore une fois s'intéresser aux métabolites oxygénés qui ont été identifiés comme d'importants contributeurs dans l'inhibition de la chimiotaxie. Ces effets seront plus amplement décrits dans le chapitre V mais on peut simplement noter que les résolvines, protectines et marésines issus du métabolisme enzymatique de l'EPA et du DHA (*cf. Chapitre IV-1-2*) induisent un moindre recrutement des neutrophiles au niveau du site inflammatoire (Spite & Serhan 2010). De plus, il a été rapporté que la résolvine E1 issue de l'EPA est un agoniste du récepteur au leucotriène B4 et peut donc entrer en compétition avec cette molécule bloquant ainsi son activité chimioattractante (Arita *et al.*, 2007).

III-3-2-2- Effet sur l'activité des cellules immunitaires

Des études *in vitro* sur cellules endothéliales humaines et sur monocytes ont rapporté une **réduction de la production des cytokines pro-inflammatoires** IL-6 et IL-8 ainsi qu'une moindre production de TNF α , suite à un traitement aux AGPI ω 3-LC (De Caterina *et al.*, 1994; Novak *et al.*, 2003) (**Figure 26**). De même, des macrophages issus de souris nourries avec un régime enrichi en huile de poisson présentent une diminution de la production de TNF- α , IL-1 β et IL-6 (Yaqoob & Calder 1995). Enfin, plusieurs études réalisées chez des sujets sains supplémentés en AGPI ω 3-LC (2,4 à 9 g par jour) ont démontré une réduction de la production de ces trois mêmes cytokines par les monocytes (Caughey *et al.*, 1996; Meydani *et al.*, 1991) ainsi qu'une réduction du niveau d'expression de MCP-1 (Baumann *et al.*, 1999)

| | IL-6, ng/10 ⁶ Cells | IL-8, ng/10 ⁶ Cells |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Control, no IL-1 α | <0.2 | 0.5 \pm 0.1 |
| Control+IL-1 α , 10 ng/mL | 9.0 \pm 0.9 | 83.3 \pm 3.1 |
| DHA (10 μ mol/L)+IL-1 α , 10 ng/mL | 6.5 \pm 0.6* | 69.3 \pm 1.8* |

Figure 26 : Effet du DHA sur la sécrétion des cytokines IL-6 et IL-8 par les cellules endothéliales humaines

(De Caterina et al., 1994)

* p<0,01 *versus* control stimulé avec IL-1 α

(Figure 27). Les AGPI ω 3-LC peuvent également exercer leur rôle anti-inflammatoire en diminuant la production d'eicosanoïdes pro-inflammatoires issus de l'acide arachidonique (Calder 2012b). En effet, des études réalisées sur monocytes, neutrophiles ou plus globalement sur l'ensemble des cellules mononuclées issues de sujets supplémentés en huile de poisson (9 g par jour) ou EPA+DHA (3,2 g + 2,2 g par jour) rapportent une réduction de la production de prostaglandine E2, de thromboxane B2 (Caughey *et al.*, 1996) et de leucotriène B4, (Lee *et al.*, 1985). Des cellules mononuclées de sujets recevant uniquement du DHA (6 g par jour) présentent également des taux de prostaglandine E2 et de leucotriène B4 diminués, respectivement de 60 et 75% (Kelley *et al.*, 1999). La réduction de la production de ces eicosanoïdes pro-inflammatoires issus de l'acide arachidonique se fait au profit d'une augmentation d'eicosanoïdes biologiquement moins actifs issus de l'EPA tels que le leucotriène B5 ou la prostaglandine E3 (*cf. Chapitre V-1-1*). En effet, une augmentation de la production de leucotriène B5 a été mise en évidence sur macrophages issus de souris nourries avec un régime enrichi en huile de poisson (Chapkin *et al.*, 1991) et sur neutrophiles humains provenant de sujets supplémentés en EPA+DHA (3,2 g + 2,2 g par jour) (Lee *et al.*, 1985). Le leucotriène B5 est 10 à 100 fois moins actif sur la chimiotaxie des neutrophiles par rapport au leucotriène B4 (Goldman *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1984). De même, Bagga *et al.*, ont rapporté une induction de la synthèse d'IL-6 dans les macrophages murins moins importante en présence de la prostaglandine E3 par rapport à la prostaglandine E2 (Bagga *et al.*, 2003). Encore une fois, d'autres types de métabolites oxygénés d'origine enzymatique ou non-enzymatique contribuent à la réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires comme ceci sera développé dans le chapitre V.

Il est intéressant de noter que les effets sur la chimiotaxie ou sur l'activité pro-inflammatoire décrits ci-dessus pourraient s'expliquer par **un changement de polarisation des macrophages** comme cela a été récemment suggéré par le groupe de Clària. Cette équipe a en effet montré que le DHA et son métabolite oxygéné enzymatique, la résolvine D1, étaient associés à une modification du phénotype des macrophages du tissu adipeux (Titos *et al.*, 2011). Ainsi, le DHA serait capable d'induire une polarisation des macrophages de type M1 pro-inflammatoires vers des macrophages de type M2 impliqués dans la résolution de l'inflammation. Ce « switch » phénotypique pourrait expliquer les effets anti-inflammatoires des AGPI ω 3-LC et plus largement la réduction de la production d'espèces oxygénées réactives, l'inhibition des processus de présentation de l'antigène et l'augmentation de la capacité de phagocytose associées aux AGPI ω 3-LC et caractéristiques des macrophages de

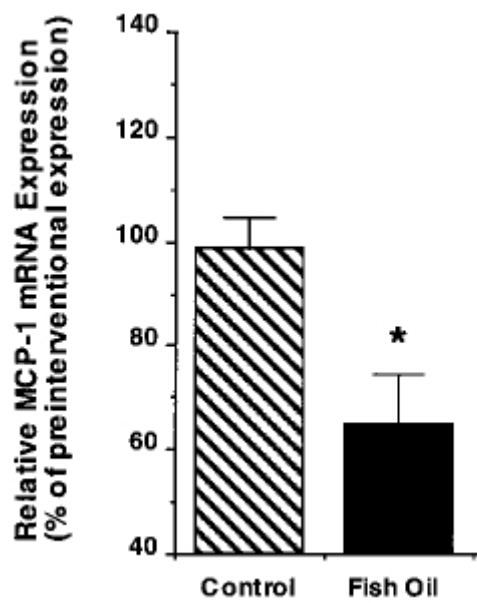


Figure 27 : Niveau d'expression de MCP-1 dans des monocytes humains issus de sujets supplémentés en huile de poisson
(Baumann *et al.*, 1999)

* $p < 0,05$ *versus* control

type M2. A notre connaissance, cette étude est la première à aborder l'impact de la nutrition lipidique sur la polarisation des macrophages qui pourrait être une piste intéressante dans le contexte de l'athérosclérose.

Comme indiqué en introduction de ce chapitre « inflammation », les effets anti-inflammatoires des AGPI ω 3-LC peuvent s'expliquer par deux grands mécanismes communs : d'une part **une modification des profils en médiateurs lipidiques** et d'autre part **une modulation de l'expression des gènes de l'inflammation**. Ces deux mécanismes sont eux-mêmes probablement en grande partie induits par l'incorporation des AGPI ω 3-LC au niveau des phospholipides membranaires des cellules immunitaires (Calder 2007) (**Figure 28**). En effet, cette modification de composition des membranes engendre de fortes modifications de fluidité membranaire et de fonctionnalité des radeaux lipidiques qui elles mêmes peuvent induire de fortes modulations des voies de signalisation. Ces modulations d'expression génique peuvent aussi être liées à une interaction directe des AGPI ω 3-LC et/ou de leurs métabolites avec des récepteurs membranaires. Enfin, les AGPI ω 3-LC et/ou leurs métabolites peuvent aussi interagir au niveau intracellulaire avec de nombreux facteurs de transcription engendrant ainsi la modification de l'expression des gènes (Mozaffarian & Wu 2011).

*Modification du profil en médiateurs lipidiques

La modification du profil en eicosanoïdes induite par une supplémentation en AGPI ω 3-LC s'exerce à deux niveaux. Il existe d'une part **une compétition « physique »** entre les AGPI ω 3-LC et l'acide arachidonique au niveau de leur incorporation en position sn-2 des phospholipides membranaires et d'autre part **une compétition « métabolique »** entre l'EPA et l'acide arachidonique en tant que substrat des enzymes cyclo-oxygénase (COX) et lipoxygénase (LOX) (*cf. Chapitre V-1*). Par ailleurs, les AGPI ω 3-LC inhibent l'expression génique de la COX-2 ce qui contribue encore à diminuer la production d'eicosanoïdes pro-inflammatoires. Les phospholipides membranaires des cellules immunitaires (neutrophiles, lymphocytes, monocytes) issus de sujets ayant un régime alimentaire de type occidental sont particulièrement riches en acide gras oméga-6 et notamment en acide arachidonique (5-10% des acides gras) et contiennent très peu d'AGPI ω 3-LC, EPA et DHA (respectivement 0,5-1% et 2-4%) (Calder 2012b). Une augmentation de la consommation en AGPI ω 3-LC, EPA et DHA, accroît la proportion de ces acides gras dans les phospholipides membranaires de cellules immunitaires aux dépens de l'acide arachidonique, et ce de manière dose-dépendante

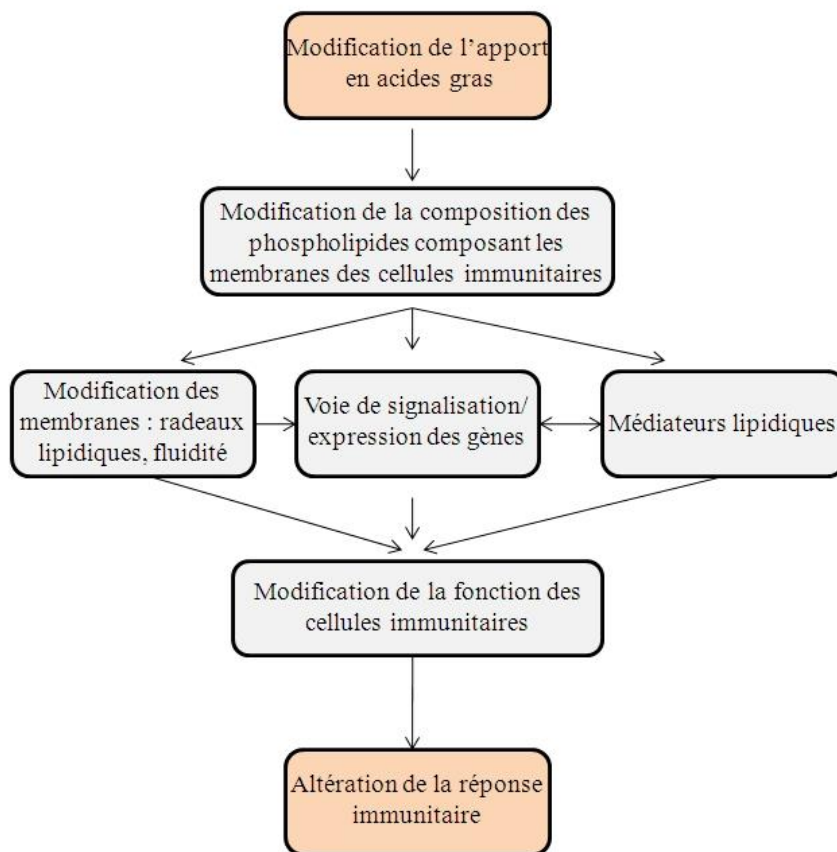


Figure 28 : Mécanismes par lesquels une modification d'apport en acides gras peut affecter la réponse immunitaire
(d'après Calder 2007)

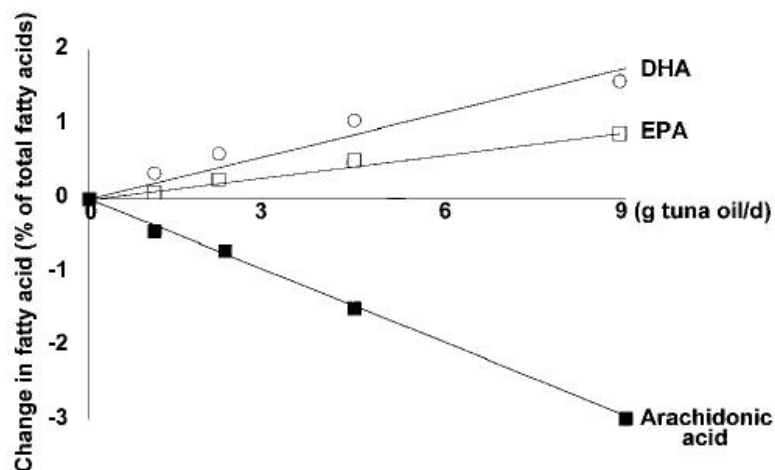


Figure 29 : Relation, dose-dépendante, entre la consommation d'huile de thon et la quantité d'EPA, DHA et acide arachidonique dans les phospholipides membranaires de neutrophiles humains
(Calder 2006)

(Healy *et al.*, 2000) (**Figure 29**). Ainsi, la réduction des prostaglandines et thromboxanes de la série 2 et de leucotriènes de la série 4, est en partie due à une moindre quantité d'acide arachidonique, substrat nécessaire à leur synthèse (Calder 2012b). Par ailleurs, l'EPA réduit aussi la synthèse d'eicosanoïdes de l'acide arachidonique en entrant en compétition avec lui vis-à-vis de la COX et de la LOX. Il faut noter que les eicosanoïdes produits à partir de l'EPA ont une structure différente de ceux provenant de l'acide arachidonique (prostaglandine E3 plutôt que prostaglandine E2 et leucotriène B5 plutôt que leucotriène B4) (Calder 2012b) et sont biologiquement moins actifs. Cette moindre activité biologique peut être due au fait que les récepteurs des eicosanoïdes ont moins d'affinité pour les eicosanoïdes issus de l'EPA par rapport à ceux provenant de l'acide arachidonique (Calder 2013). Comme indiqué plus haut, l'EPA et le DHA vont aussi être métabolisés en résolvines, protectines et marésines (*cf. Chapitre IV-1-2*) qui sont des métabolites oxygénés enzymatiques très impliqués dans la résolution de l'inflammation (Spite & Serhan 2010) (**Figure 30**). Enfin, même si l'identification des autres métabolites issus des AGPI ω 3-LC est encore assez limitée, des travaux récents indiquent clairement que l'EPA et le DHA génèrent de nombreux autres métabolites oxygénés enzymatiques (oxylipines, ...) (Shearer *et al.*, 2010; Shearer & Newman 2009) ou non-enzymatiques (Gao *et al.*, 2006; Gladine *et al.*, 2011; Roberts *et al.*, 1998) (*cf. Chapitre IV*) contribuant très probablement aux effets anti-inflammatoires des AGPI ω 3-LC. L'ensemble des données relatives à la bioactivité des métabolites des AGPI ω 3-LC sera développé dans le chapitre V.

*Modulation de l'expression des gènes de l'inflammation

Une grande partie des effets des AGPI ω 3-LC sur l'expression des gènes de l'inflammation est attribuable à leur **interaction directe ou indirecte avec la voie de signalisation de NF κ B**. NF κ B est un facteur de transcription régulant l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire incluant notamment la COX-2, iNOS, les cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, ...) et les molécules d'adhésion (E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1, ...) (Kumar *et al.*, 2004). A l'état inactif, NF κ B est séquestré dans le cytoplasme par la protéine inhibitrice I κ B. La phosphorylation d'I κ B par la kinase IKK en réponse à un stimulus inflammatoire (cytokines, endotoxine bactérienne, UV, stress oxydant) entraîne la dégradation d'I κ B par le protéasome permettant ainsi la translocation nucléaire de NF κ B et l'activation de la transcription de ses gènes cibles (Calder 2012a) (**Figure 31**).

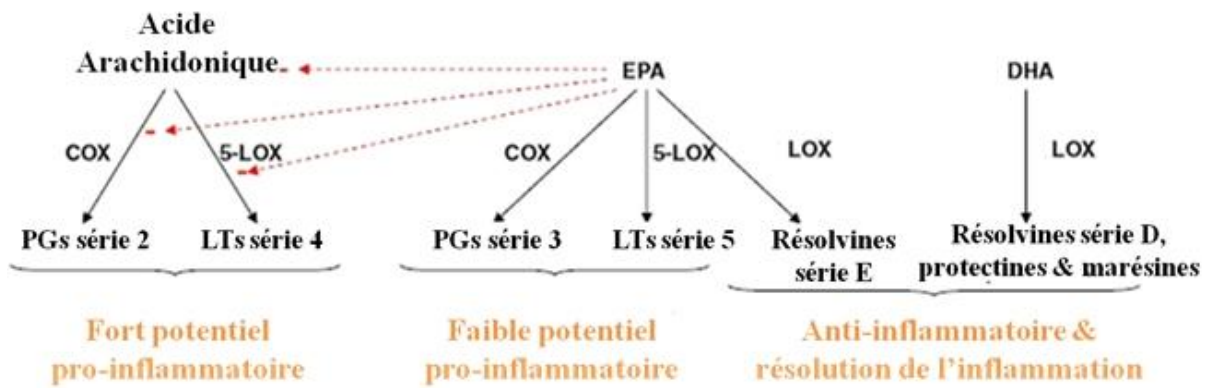


Figure 30 : Synthèse et effet des médiateurs lipidiques enzymatiques dérivés de l'acide arachidonique, de l'EPA et du DHA
(Calder 2011)

LT = leucotriènes, PG = prostaglandines

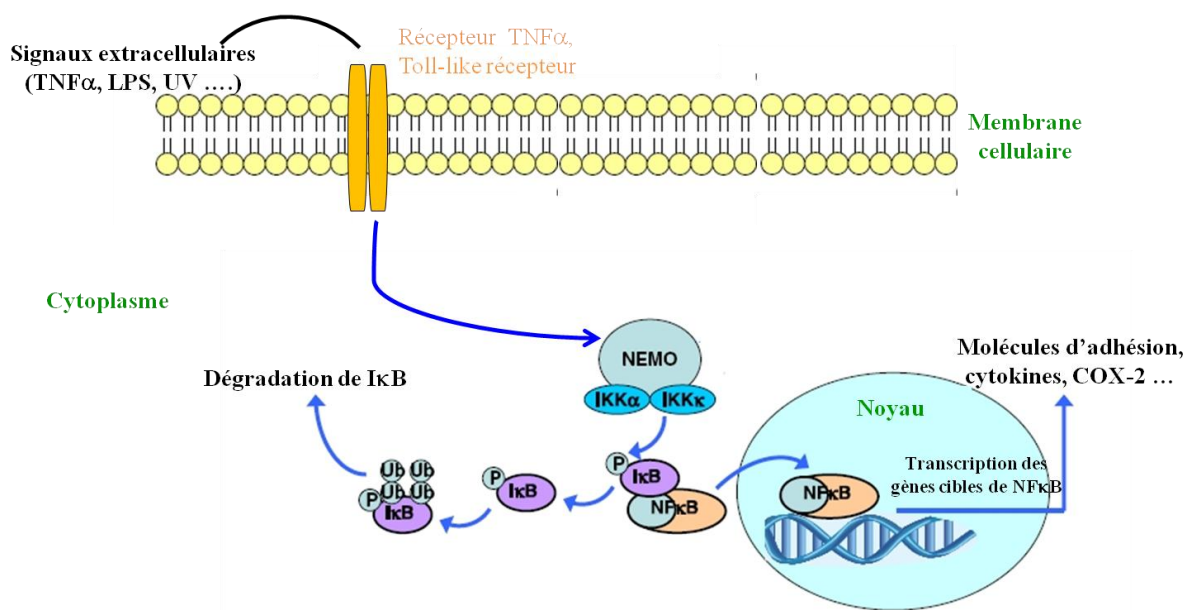


Figure 31 : Voie d'activation de NF κ B

(d'après Calder 2011)

L'inactivation de NFκB par les AGPIω3-LC peut être réalisée à différents niveaux. Le premier site d'action des AGPIω3-LC se situe au niveau de la **phosphorylation d'IκB** qui est diminuée en présence d'AGPIω3-LC (Novak *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004b). De façon intéressante, le groupe de Sethi en 1996 a été le premier à suggérer que cet effet pourrait être médié par les dérivés peroxydés des AGPIω3-LC (Sethi *et al.*, 1996). Plus tard, le groupe de Morrow a clairement montré que cet effet serait en partie attribuable à certains dérivés peroxydés de l'EPA et du DHA à savoir les A₃/J₃-Isoprostanes et les A₄/J₄-Neuroprostanes, *via* la formation d'adduits protéiques sur IKK engendrant son inactivation (Brooks *et al.*, 2011; Musiek *et al.*, 2008). Les AGPIω3-LC peuvent également inhiber l'activation de NFκB *via* **PPARγ**. En effet, l'activation de PPARγ par les AGPIω3-LC engendre une transrépression de NFκB *via* une interaction protéine-protéine modulant son activité (Rigamonti *et al.*, 2008). Ainsi, une fois activé par ses ligands, dont les AGPIω3-LC font partie, le facteur de transcription PPARγ peut interagir physiquement avec NFκB empêchant ainsi sa translocation nucléaire et l'expression de ses gènes cibles (Calder 2012a) (**Figure 32**). Un troisième niveau d'action des AGPIω3-LC se situe au niveau des récepteurs membranaires et plus précisément de **TLR4** (toll-like receptor 4), **GPR120** (récepteur 120 couplé aux protéines G) ou encore **IL-1R** (interleukin-1 receptor) qui sont tous trois impliqués dans la signalisation de l'inflammation dépendante de NFκB. Concernant le TLR4, plusieurs études ont montré que les AGPIω3-LC empêcheraient son activation par le LPS (Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2006). Ceci serait lié à une inhibition de la dimérisation et du recrutement de TLR4 au niveau des radeaux lipidiques (Wong *et al.*, 2009). L'activation du récepteur 120 couplé aux protéines G (GPR120) par les AGPIω3-LC est quant à elle associée à la rétention d'IκB au niveau cytosolique (Oh *et al.*, 2010). Enfin, l'interaction des AGPIω3-LC ou de leurs métabolites avec d'autres protéines membranaires telles que la **NADPH oxydase** ou la **PKC** (protéine kinase C) serait aussi indirectement liée à l'inhibition de la voie NFκB comme illustré en **Figure 33** (Massaro *et al.*, 2008).

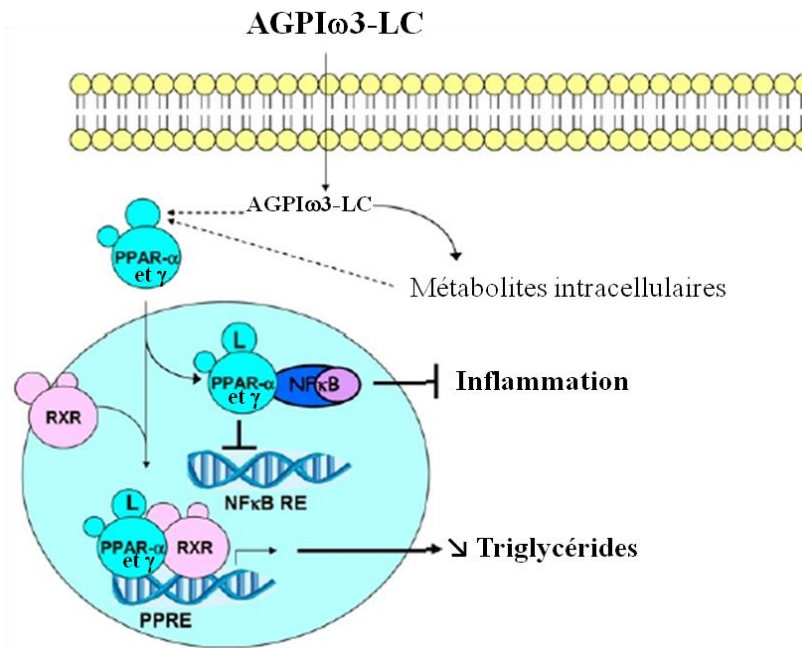


Figure 32 : Effet des AGPI ω 3-LC sur les facteurs de transcription NF κ B et PPARs
(d'après Calder 2012a)

NF κ B RE = éléments de réponse à NF κ B

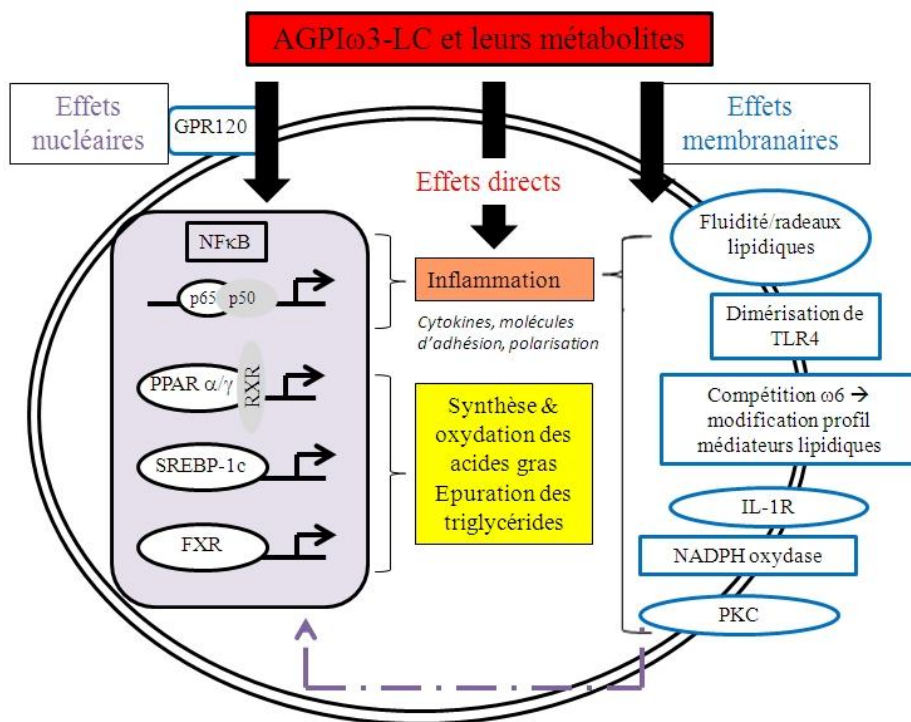


Figure 33 : Mécanismes d'action des AGPI ω 3-LC
(d'après Jump et al., 2012)

Les effets athéroprotecteurs des AGPI ω 3-LC s'expliquent donc en grande partie par leur capacité à prévenir l'hypertriglycéridémie et la dysfonction endothéliale et au contrôle de l'inflammation particulièrement marqué au niveau local. Il faut noter la multiplicité des cibles tissulaires, cellulaires et moléculaires (**Figure 34**) qui rend la compréhension des mécanismes d'action des AGPI ω 3-LC difficile. La complexité s'accroît encore s'il l'on considère l'ensemble les métabolites oxygénés susceptibles de contribuer aux effets des AGPI ω 3-LC. On peut donc imaginer que notre vision des modifications induites par les AGPI ω 3-LC, notamment au niveau de l'expression génique, reste encore très limitée tant sur l'identification des gènes cibles que sur la nature des molécules effectrices qui ne sont pas forcément les AGPI ω 3-LC sous leur forme native.

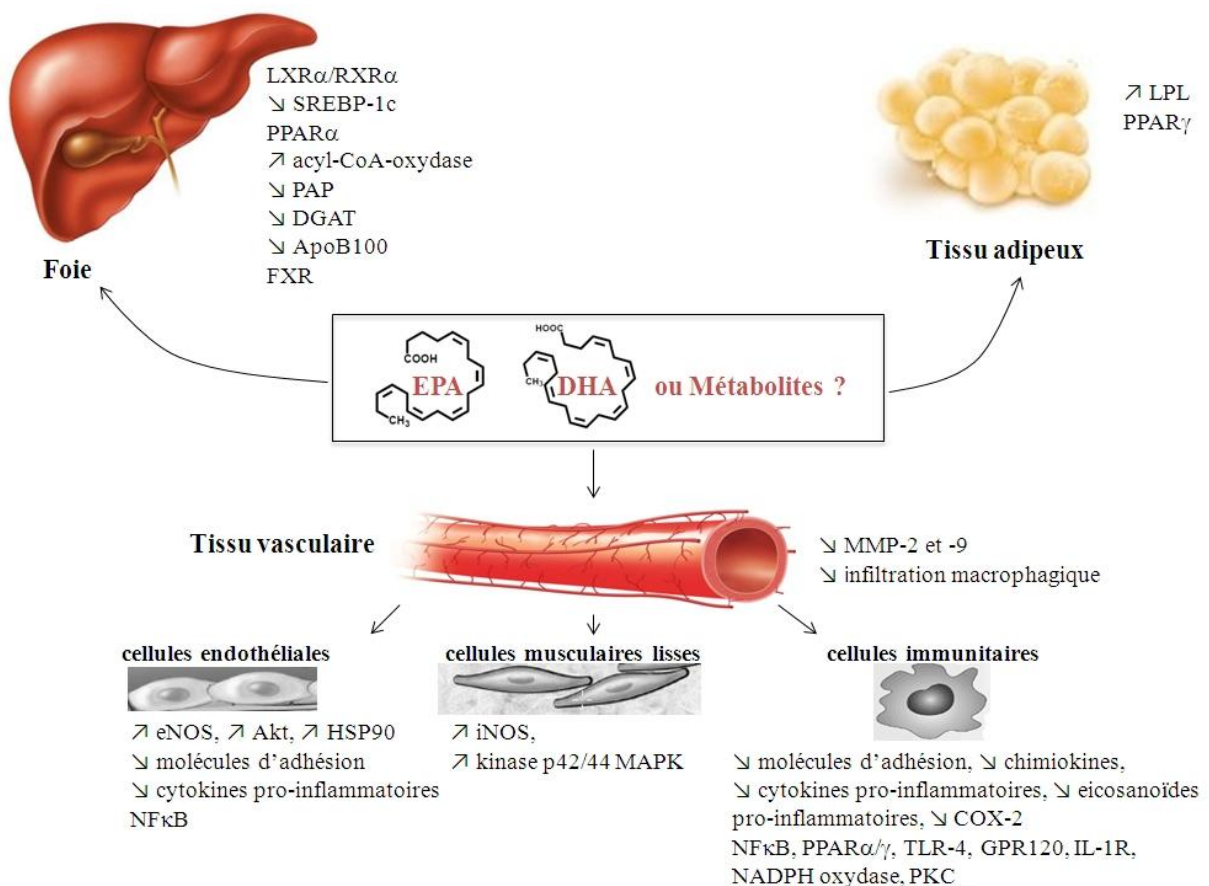


Figure 34 : Schéma représentant la multiplicité des cibles tissulaires, cellulaires et moléculaires des AGPI ω 3-LC

IV- Métabolisme oxygéné des AGPI ω 3-LC

Contrairement à d'autres types d'acides gras principalement dédiés à la production d'énergie *via* la β -oxydation, les AGPI en général et les AGPI ω 3-LC en particulier servent de précurseurs à de nombreux métabolites oxygénés biologiquement actifs produits *via* des processus d'oxydation enzymatique et non-enzymatique et globalement identifiés sous le terme d'oxylipines (Maskrey *et al.*, 2013).

IV-1- Oxygénation par voie enzymatique

Les dérivés oxygénés des AGPI ω 3-LC issus de la voie enzymatique sont générés par trois grandes classes principales d'enzyme : les COX, les LOX et les cytochromes P450 (CYP450). D'autres métabolites tels que des alcools, diols et époxydes peuvent aussi être produits par l'action indépendante et coordonnée d'enzymes incluant des lipooxygénases, peroxydases, alcool déshydrogénases, époxygénases et époxydes hydrolases (Shearer & Newman 2009). Pour être pris en charge par ces enzymes, les AGPI ω 3-LC doivent au préalable être libérés des phospholipides membranaires par l'action de la phospholipase A₂ cytosolique (cPLA₂) (Strassburg *et al.*, 2012). Les **COX** sont retrouvées sous deux formes différentes : la forme constitutive retrouvée dans la majorité des cellules (COX-1) et la forme inducible par des facteurs pro-inflammatoires qui est retrouvée notamment dans les cellules endothéliales vasculaires, cellules musculaires lisses et cellules inflammatoires (COX-2) (Vila 2004). Les COX sont insérées dans le reticulum endoplasmique et dans la membrane nucléaire de façon à fixer l'acide gras libéré par la cPLA₂ (Funk 2001). Concernant les **LOX**, trois isoformes principales sont présentes chez l'Homme (5-LOX, 12/15-LOX et 12-LOX) et sont différenciellement et fortement exprimées dans les cellules immunitaires. La 5-LOX est principalement exprimée dans les leucocytes ; la 12/15-LOX dans les éosinophiles, monocytes et cellules épithéliales alors que la 12-LOX est restreinte aux plaquettes sanguines (Maskrey *et al.*, 2013). Les **CYP450** représentent une importante famille d'enzymes regroupant des centaines de cytochromes différents. Il est important de noter que contrairement à l'acide arachidonique et à l'EPA, le DHA n'est pas substrat des COX, alors que ces trois AGPI sont substrats des LOX (Jump *et al.*, 2012) suggérant des orientations métaboliques vers d'autres voies.

IV-1-1- Les eicosanoïdes

Les eicosanoïdes sont de loin les métabolites oxygénés les plus précisément identifiés *in vivo* et les plus largement étudiés, en particulier ceux issus de l'acide arachidonique (Strassburg *et al.*, 2012). Ils incluent les **prostaglandines (PGs)** et les **thromboxanes (TXs)** générés par les COX et également les **leucotriènes (LTs)** générés par les LOX. Comme indiqué précédemment, l'acide arachidonique est un substrat préférentiel de ces enzymes mais l'EPA peut aussi être métabolisé par cette voie qui va ainsi produire des prostanoïdes de la série 3 et des leucotriènes de la série 5 (Calder 2012b). Plus précisément, l'EPA est converti en prostaglandine G₃ (PGG₃) puis en prostaglandine H₃ (PGH₃) *via* la voie de la COX. La prostaglandine H₃ va permettre d'une part la formation d'autres prostaglandines de la série 3 (PGE₃, PGF_{3α}, PGD₃) par l'action de synthases spécifiques et d'autre part la formation de thromboxanes (TXA₃, TXB₃) et prostacyclines (PGI₃). L'EPA peut également être converti, *via* la 5-LOX, en acide 5-hydropéroxy-eicosapentaénoïque (5-HpEPE) permettant la formation de leucotriènes de la série 5 (LTA₅, LTB₅, LTC₅, LTD₅, LTE₅) (**Figure 35**).

IV-1-2- Les résolvines, protectines et marésines

Plus récemment, de nouveaux médiateurs lipidiques produits à partir de l'EPA et du DHA *via* l'action des LOX, ont été mis en évidence par le groupe de Serhan (Serhan *et al.*, 2000). Parmi ceux-ci, trois familles distinctes ont été identifiées : les résolvines, les protectines et les marésines.

IV-1-2-1- Les résolvines

Les résolvines (ou « resolution-phase interaction products») sont des composés di- et tri- hydroxylés biosynthétisés à partir de l'EPA et du DHA (Hong *et al.*, 2003). On retrouve ainsi les membres de la série E (RvE) issus de l'EPA et les membres de la série D (RvD) issus du DHA (Serhan *et al.*, 2008).

La famille des **résolvines E** contient notamment la RvE1 et la RvE2. La RvE1 est le premier membre à avoir été mis en évidence et étudié en détail. Sa structure a été entièrement caractérisée, il s'agit de l'acide 5(S),12(R),18(R),trihydroxy-6Z,8E,10E,14Z,16E-EPA. Il a été rapporté que la RvE2 serait synthétisée dans des proportions plus importantes que la RvE1

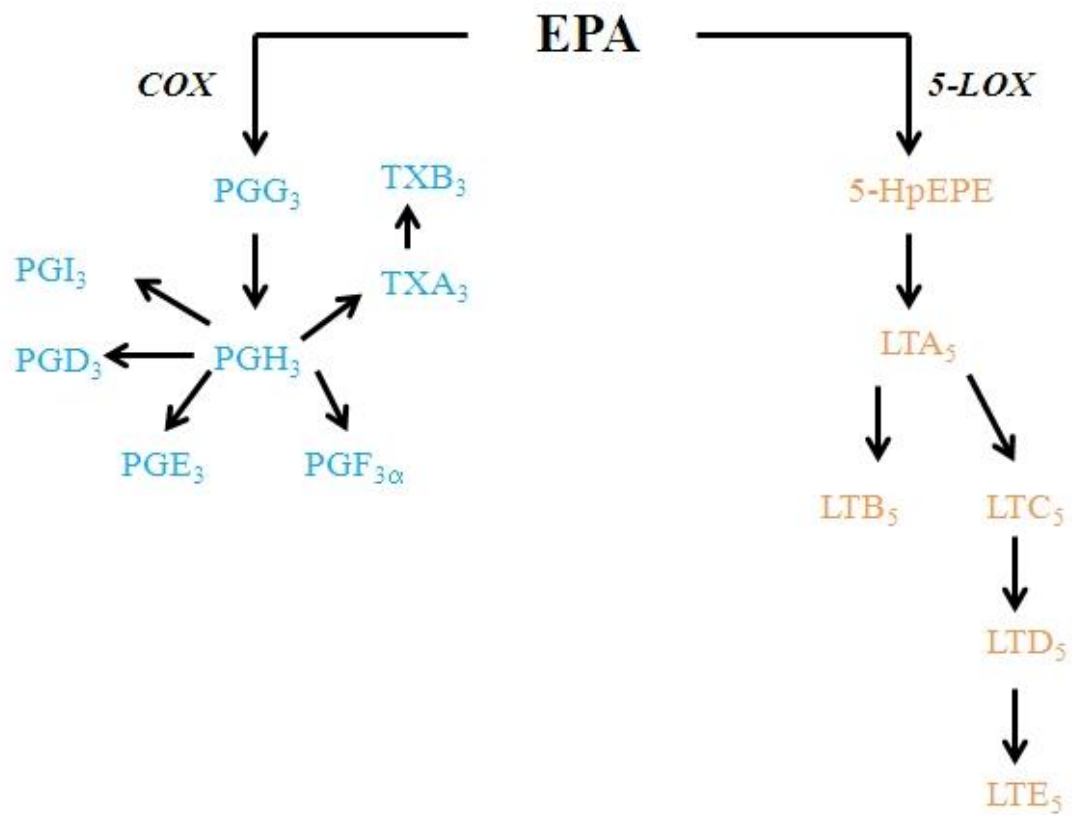


Figure 35 : Biosynthèse des eicosanoïdes dérivés de l'EPA
 (d'après Strassburg et al., 2012)

(Tjonahen *et al.*, 2006). La synthèse de ces deux résolvines nécessite tout d'abord la conversion de l'EPA en acide 18-hydroxy-eicosapentaénoïque (18-HEPE) par la cytochrome P450 mono-oxygénase. Cet intermédiaire est ensuite transformé par la 5-LOX en 5(S)-hydropéroxy-18-HEPE. Ce dernier, peut donner *via* la 5-LOX un époxyde intermédiaire (5(S),6-époxy-18-HEPE) précurseur de la RvE1 ou subir une réduction donnant la RvE2 (Arita *et al.*, 2005; Tjonahen *et al.*, 2006) (**Figure 36**).

Le DHA est précurseur des **résolvines de la série D** (17(S)-résolvines) regroupant quatre membres notés RvD1 à RvD4. La structure de la RvD1 a été caractérisée, il s'agit de l'acide 7(S),8(R),17(S),trihydroxy-4Z,9E,11Z,13Z,15E,19Z-DHA. La synthèse de ces résolvines se fait *via* l'intervention successive de deux enzymes, la 15-LOX et la 5-LOX. Le DHA est tout d'abord converti en acide 17(S)-hydropéroxy-docosahexaénoïque (17(S)-HpDHA) par la 15-LOX. Ce dernier va être métabolisé par la 5-LOX pour produire des intermédiaires 7(S),8-époxy-17(S)-hydroxy-docosahexaénoïque (7(S),8-époxy-17(S)-HDHA) et 4(S),5-époxy-17(S)-HDHA qui seront, respectivement, hydrolysés de manière enzymatique en RvD1 et RvD2 et en RvD3 et RvD4 (Kohli & Levy 2009; Serhan *et al.*, 2002) (**Figure 37**).

IV-1-2-2- Les docosatriènes : protectines et marésines

Les docosatriènes sont une famille de médiateurs lipidiques issus du DHA qui se distinguent par la présence d'un triène conjugué dans leur structure. Cette famille regroupe des composés di-hydroxylés nommés protectines et marésines (Serhan *et al.*, 2008; Spite & Serhan 2010).

Les **protectines** sont biosynthétisées *via* un mécanisme faisant intervenir la 15-LOX qui va convertir le DHA en un intermédiaire le 17(S)-HpDHA. Ce dernier sera rapidement converti en 16(17)-époxyde qui, *via* une hydrolyse enzymatique, formera le 10,17-dihydroxy-docosahexaénoïque (10,17-diHDHA) également appelé 10,17(S)-docosatriène. Sa structure est la suivante : acide 10(R),17(S),dihydroxy-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-DHA (**Figure 38**). Ce composé est aujourd'hui connu sous le nom de protectine D1 (PD1) en raison de sa forte activité protectrice dans l'inflammation (Kohli & Levy 2009; Serhan *et al.*, 2008). Plusieurs isomères de la PD1 ont été identifiées dont la PDX (10(S),17(S),dihydroxy-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-DHA) qui a été découverte en 2005 par Butovich (Butovich 2005) et

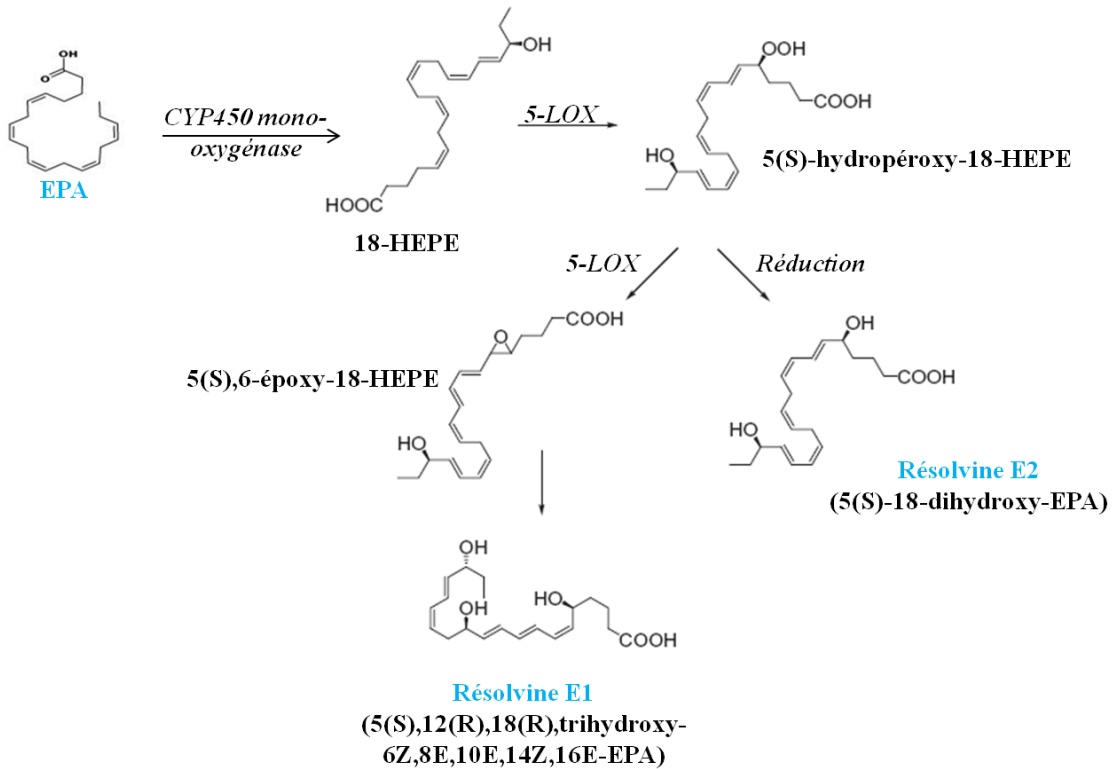


Figure 36: Biosynthèse des résolvines de la série E dérivées de l'EPA
(d'après Kohli & Levy 2009)

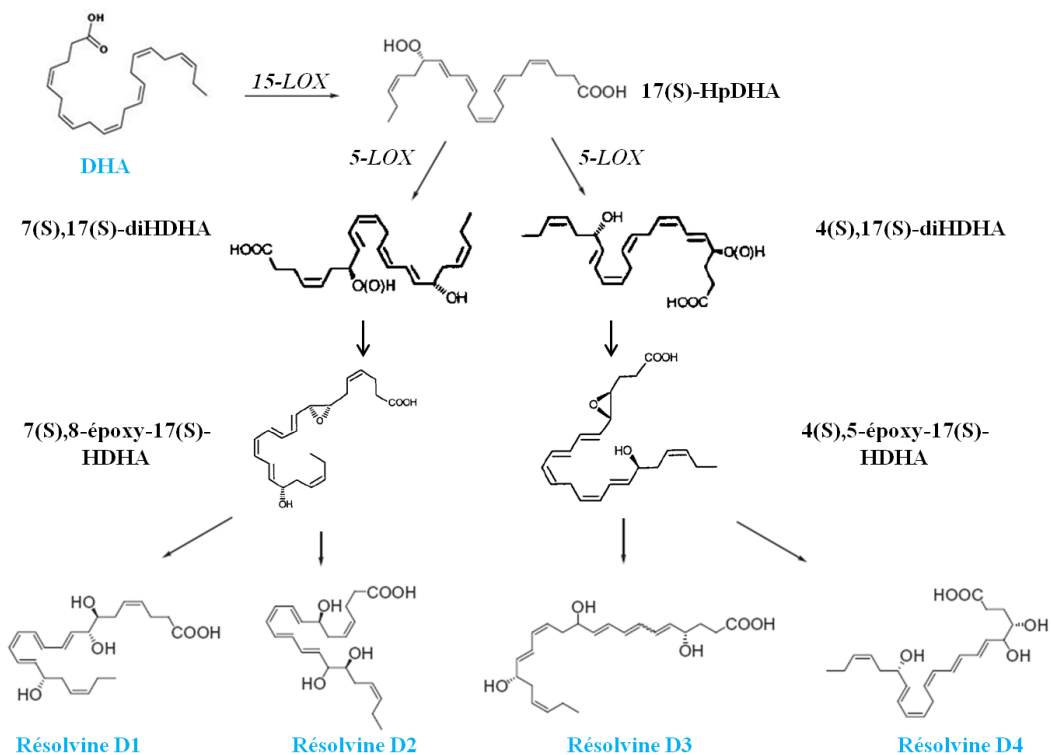


Figure 37 : Biosynthèse des résolvines de la série D dérivées du DHA
(d'après Kohli & Levy 2009)

dont la structure et la détermination de la configuration absolue du centre C10 ont été confirmées récemment par Chen *et al.*, (Chen *et al.*, 2011).

Les **marésines** (macrophage mediators in resolving inflammation) sont des médiateurs lipidiques qui ont été identifiés récemment par l'équipe de Serhan en 2009. Ils ont été mis en évidence dans les macrophages pendant la phase de résolution de l'inflammation et résultent de la conversion enzymatique du DHA. Le composé majeur de cette famille est la marésine 1 (MaR1). Sa biosynthèse fait au préalable intervenir la conversion du DHA en acide 14(S)-HpDHA probablement par la 12-LOX. Cet intermédiaire est ensuite converti enzymatiquement en 13(14)-époxyde qui sera hydrolysé par voie enzymatique *via* un cation carbonium pour donner la MaR1 ou acide 7,14(S),dihydroxy-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z-DHA. Un isomère de la MaR1, le 7(S),14(S)-diHDHA, peut également être formé par un mécanisme de double dioxygénation (action séquentielle de la 12-LOX et de la 5-LOX). Cependant il a été rapporté que la bioactivité de cet isomère est moins importante que celle de l'acide 7(S),14(S),dihydroxy-4Z,8E,10Z,12E,16Z,19Z-DHA (Serhan *et al.*, 2009; Spite & Serhan 2010) (**Figure 39**).

IV-1-3- Autres métabolites enzymatiques oxygénés

D'autres métabolites oxygénés issus de l'EPA et du DHA ont également été mis en évidence. Ils sont générés par l'action des cytochromes P450s, des époxydes hydrolases et des LOX conduisant respectivement à la formation d'époxydes, de diols et d'alcools.

L'EPA va ainsi être converti par la CYP450 époxygénase en **acides époxy-eicosatétraénoïque** (EpETE) [5,(6) ; 8,(9) ; 11,(12) ; 14,(15) ; 17,(18)] qui seront ensuite hydrolysés par des époxydes hydrolases en **acides dihydroxy-eicosatétraénoïque** (DiHETE). Le DHA sera quant à lui converti en **acides époxy-docosapentaénoïque** (EpDoPE) [4,(5) ; 7,(8) ; 10,(11) ; 13,(14) ; 16,(17) ; 19,(20)] qui seront ensuite hydrolysés par des époxydes hydrolases en **acides dihydroxy-docosapentaénoïque** (DiHDoPE) (Shearer *et al.*, 2010) (**Figure 40**). L'EPA et le DHA peuvent également servir de substrat aux LOX ainsi qu'à d'autres enzymes (glutathione peroxydase par exemple) conduisant à la production d'alcools. Les acides **hydroxy-eicosapentaénoïque** (HEPE) (5-HEPE, 12-HEPE et 15-HEPE) issus de l'EPA et les acides **hydroxy-docosahexaénoïque** (HDoHE ou HDHA) (4-HDHA, 7-HDHA, 11-HDHA, 14-HDHA et le 17-HDHA) issus du DHA pourront eux-mêmes servir de substrat

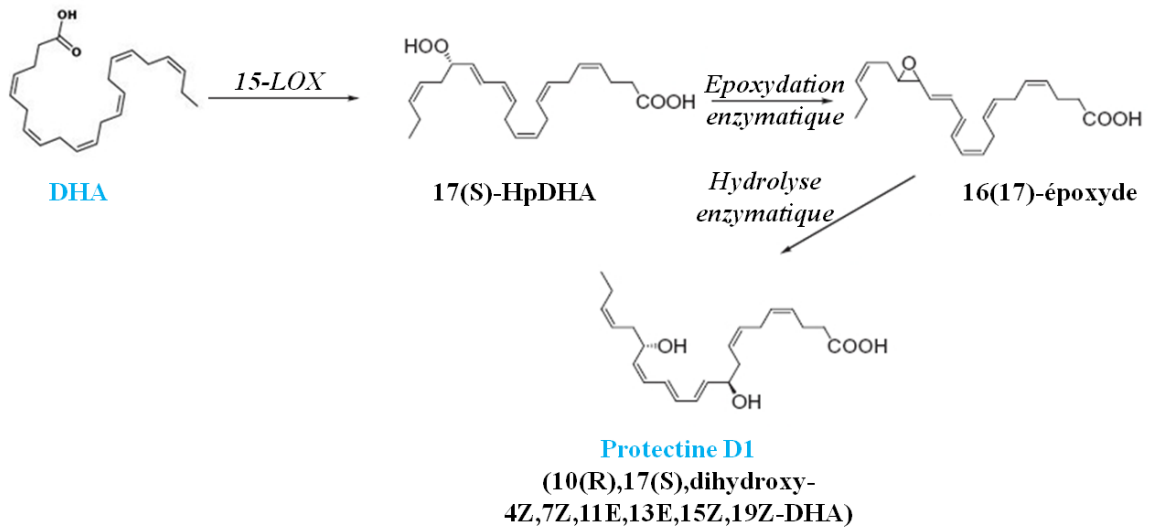


Figure 38: Biosynthèse de la protectine D1 dérivée du DHA
 (d'après Kohli & Levy 2009)

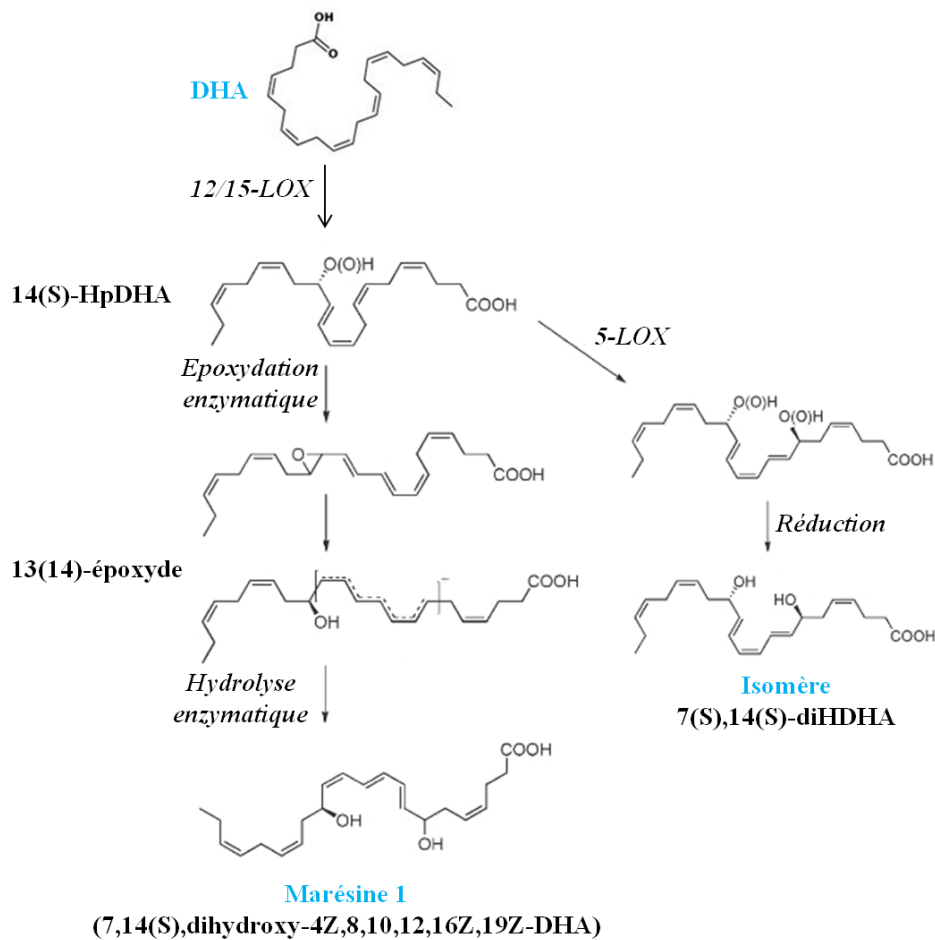


Figure 39 : Biosynthèse de la marésine 1 dérivée du DHA
 (d'après Serhan et al., 2009)

à d'autres enzymes pour produire d'autres types de métabolites (cétones par exemple) (Shearer *et al.*, 2010). Il est important de noter que les alcools (hydroperoxydes) issus de l'EPA et du DHA peuvent également être générés de manière non-enzymatique (voie de la peroxydation lipidique) (Shearer *et al.*, 2010).

IV-2- Oxygénation par voie non-enzymatique : la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique consiste en l'oxydation des lipides par des espèces radicalaires de l'oxygène. Ce processus est un bon marqueur du stress oxydant car les lipides sont les cibles principales des radicaux libres en condition de stress oxydant. Du fait de leurs doubles liaisons, les AGPI contenus dans les phospholipides membranaires sont particulièrement sensibles à la peroxydation lipidique qui se déroule en trois phases : une phase d'initiation, une phase de propagation et une phase de terminaison (Milne *et al.*, 2011).

- Phase d'initiation : Le mécanisme de peroxydation lipidique est initié lorsqu'une espèce radicalaire arrache un atome d'hydrogène à un groupement $-CH_2-$ d'un AGPI. Plusieurs espèces radicalaires peuvent initier la réaction : les radicaux hydroxyles ($\bullet OH$), alkoxyles ($RO\bullet$), peroxydes ($ROO\bullet$) et peroxynitrite ($ONOO^-$) ; le radical hydroxyle étant le plus actif. Des ions métalliques catalytiques tels que les ions cuivre (Cu^I) ou fer (Fe^{II}) peuvent également contribuer à initier la peroxydation lipidique. Cette première phase aboutit à la formation d'un radical d'acide gras libre ($R\bullet$) qui sera stabilisé par un réarrangement électronique conduisant à la formation de diènes conjugués.

- Phase de propagation : Dans cette étape, les diènes conjugués se combinent avec l'oxygène pour former un radical peroxyde ($ROO\bullet$). Ce dernier est lui-même capable d'arracher un atome d'hydrogène à un autre AGPI entraînant la formation d'un hydroperoxyde ($ROOH$) et d'un nouveau radical libre ($R\bullet$) qui assure la propagation de la réaction. Chaque radical $R\bullet$ peut être à l'origine de plusieurs molécules d'hydroperoxydes qui constituent les produits primaires de la peroxydation lipidique. Du fait de leur instabilité, les hydroperoxydes vont rapidement se décomposer en radicaux alkoxyles ($RO\bullet$) ou peroxydes ($ROO\bullet$) à l'origine des produits secondaires de la peroxydation lipidique. En effet, les radicaux alkoxyles vont pouvoir former, par β -clivage, des alcanes et des aldéhydes de type malondialdéhyde (MDA), 4-hydroxy-alkénals (4-hydroxy-2-hexenal lorsque l'AGPI source est un AGPI ω 3). Les radicaux peroxydes sont quant à eux les précurseurs des isoprostanes (**Figure 41**).

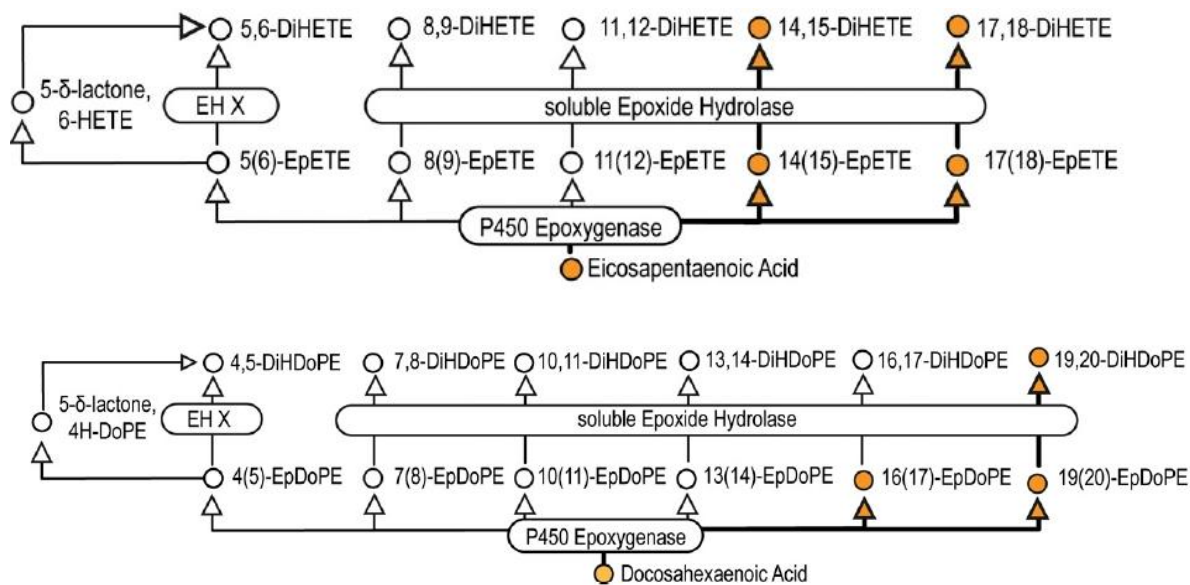


Figure 40 : Métabolisme de l'EPA et du DHA par la voie de la CYP450 époxygénase
(Shearer et al., 2010)

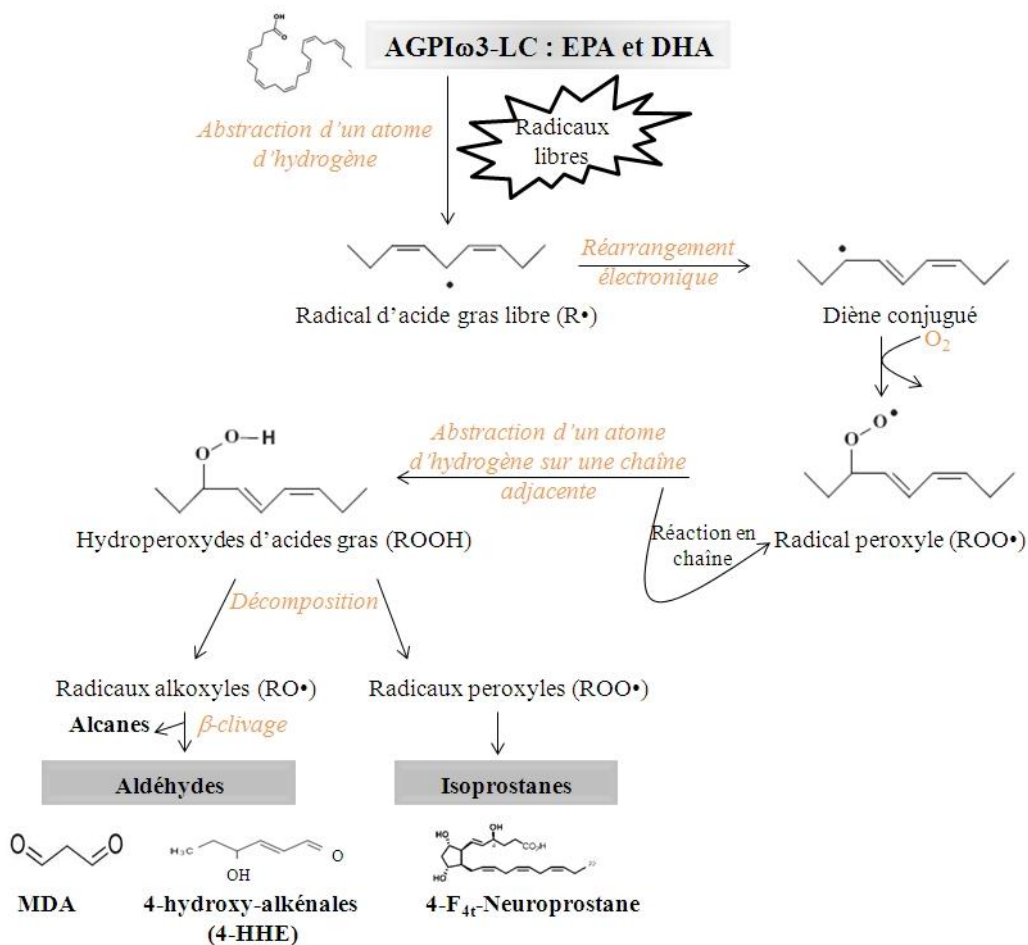


Figure 41: Schéma de la peroxydation lipidique des AGPI ω 3-LC

- Phase de terminaison : Cette étape permet la stabilisation des radicaux. Deux radicaux libres vont réagir ensemble permettant ainsi leur neutralisation. La terminaison peut également avoir lieu en faisant intervenir des molécules anti-oxydantes (Spickett *et al.*, 2010) (Repetto *et al.*, 2012).

Les AGPI tels que l'acide linoléique, l'acide α -linoléique, l'acide arachidonique, l'EPA et le DHA sont tous sensibles à la peroxydation lipidique mais le niveau de sensibilité dépend du nombre de doubles liaisons présentes au sein de leur chaîne hydrocarbonée. En effet, plus un acide gras est insaturé et plus il est peroxydable. Ainsi le DHA apparaît comme l'AGPI le plus sensible à la peroxydation (acide linoléique < acide arachidonique < EPA < DHA) (Milne *et al.*, 2011). Les produits issus de la peroxydation lipidique dépendent de la composition de la chaîne d'acide gras attaquée par les radicaux libres (nombre d'atome de carbone, de doubles liaisons). Ceci engendre une très grande complexité de produits générés (Jahn *et al.*, 2008). Nous allons ici nous limiter aux aldéhydes et isoprostanes qui sont des produits terminaux de la peroxydation lipidique qui ont été identifiés en abondance *in vivo*.

IV-2-1- Les aldéhydes issus de l'EPA et du DHA

La peroxydation lipidique des AGPI ω 3 conduit à la formation d'hydroperoxydes, molécules instables qui sont ensuite décomposées en de nombreux aldéhydes. Les aldéhydes issus des AGPI ω 3 les plus étudiés sont le MDA et le **4-hydroxy-2-hexenal** (4-HHE). Le MDA étant également produit par la peroxydation lipidique des AGPI ω 6, seul le 4-HHE est spécifique des AGPI ω 3. Il a pour source principale le DHA, qui est l'AGPI ω 3 le plus abondant dans les tissus et aussi le plus peroxydable (Catala 2009).

Tout comme son analogue produit à partir des AGPI ω 6 (le 4-hydroxy-2-nonanal, 4-HNE), le 4-HHE est une molécule réactive capable de réagir avec les protéines, les acides nucléiques et les phospholipides pour former des adduits de Michael ou des bases de Schiff. En effet, le 4-HHE peut réagir avec les résidus amino-acyles (histidine, lysine et cystéine) des protéines ; les adduits histidine étant les plus stables. Cependant il faut noter que le 4-HHE est moins réactif que le 4-HNE (Riahi *et al.*, 2010).

IV-2-2- Les isoprostanes dérivées de l'EPA et du DHA

Les isoprostanes aussi appelées « prostaglandines-like » du fait de leur analogie de structure avec les prostaglandines, sont produites en quantité importante en cas de stress

oxydant. Ces molécules sont formées par l'action directe des radicaux libres sur les AGPI-LC estérifiés dans les phospholipides membranaires (Morrow *et al.*, 1990). Les isoprostanes formés *in situ* sur les phospholipides estérifiés sont par la suite libérés par l'action de la phospholipase A₂ (Gao *et al.*, 2006). Il n'est pas exclu que les isoprostanes soient aussi produits à partir des AGPI-LC préalablement libérés des phospholipides par la phospholipase A₂.

Les isoprostanes issus de la peroxydation lipidique de l'EPA portent le nom de **F₃-Isoprostanes** (F₃-IsoP) (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1997). Leur synthèse est initiée par la production de 4 radicaux libres issus de l'EPA par abstraction d'un atome d'hydrogène sur les carbones C7, C10, C13 et C16. Suivant la position de l'atome d'hydrogène qui a été arraché et celle de l'atome d'oxygène qui sera inséré, 8 hydroperoxydes seront formés. Ces derniers vont par la suite générer 6 F₃-IsoP régioisomères correspondant aux séries -5, -8, -11, -12, -15 et -18 (notées 5-F₃-IsoP, 8-F₃-IsoP, ...). Chaque régioisomère est composé de 8 diastéréoisomères racémiques soit un total de 96 composés. Les séries -5 et -18 sont les plus abondantes (Gao *et al.*, 2006) (**Figure 42**). En plus des F₃-IsoP, d'autres composés tels que les **E₃/D₃-IsoP** et les d'A₃/J₃-IsoP peuvent également être formés. Tout comme la synthèse des F₃-IsoP, la formation des E₃/D₃-IsoP fait au préalable intervenir la production de 8 hydroperoxydes qui par la suite seront oxydés pour former 6 endoperoxydes bi-cycliques qui après réarrangement donneront au total 6 séries E₃/D₃-IsoP. Ces composés étant instables ils vont rapidement être déshydratés en cyclopentenones, les **A₃/J₃-IsoP**. Six séries différentes d'A₃/J₃-IsoP sont formées soit au total 48 composés (chaque régioisomère étant composée de 8 diastéréoisomères racémiques mais la perte d'un centre chiral réduit le nombre total de composés à 48) (Brooks *et al.*, 2008) (**Figure 43**).

Tout comme pour l'EPA, la peroxydation lipidique du DHA entraîne la formation d'isoprostanes portant le nom de **F₄-Neuroprostanes** (F₄-NeuroP) (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1998 ; Roberts *et al.*, 1998). Ces dernières sont produites selon le même mécanisme que les F₃-IsoP. Leur synthèse est initiée par la production de 5 radicaux libres issus du DHA par abstraction d'un atome d'hydrogène sur les carbones C6, C9, C12, C15 et C18. Après réarrangement électronique, ces derniers vont se combiner avec une molécule d'oxygène pour former des radicaux peroxydes au nombre de 8. Ces derniers vont alors subir une endocyclisation suivie de l'addition de plusieurs molécules d'oxygène formant ainsi 8 intermédiaires endoperoxydes bi-cycliques régioisomères. Ces intermédiaires endoperoxydes étant des molécules très instables, ils vont être réduits pour former 8 F₄-NeuroP régioisomères

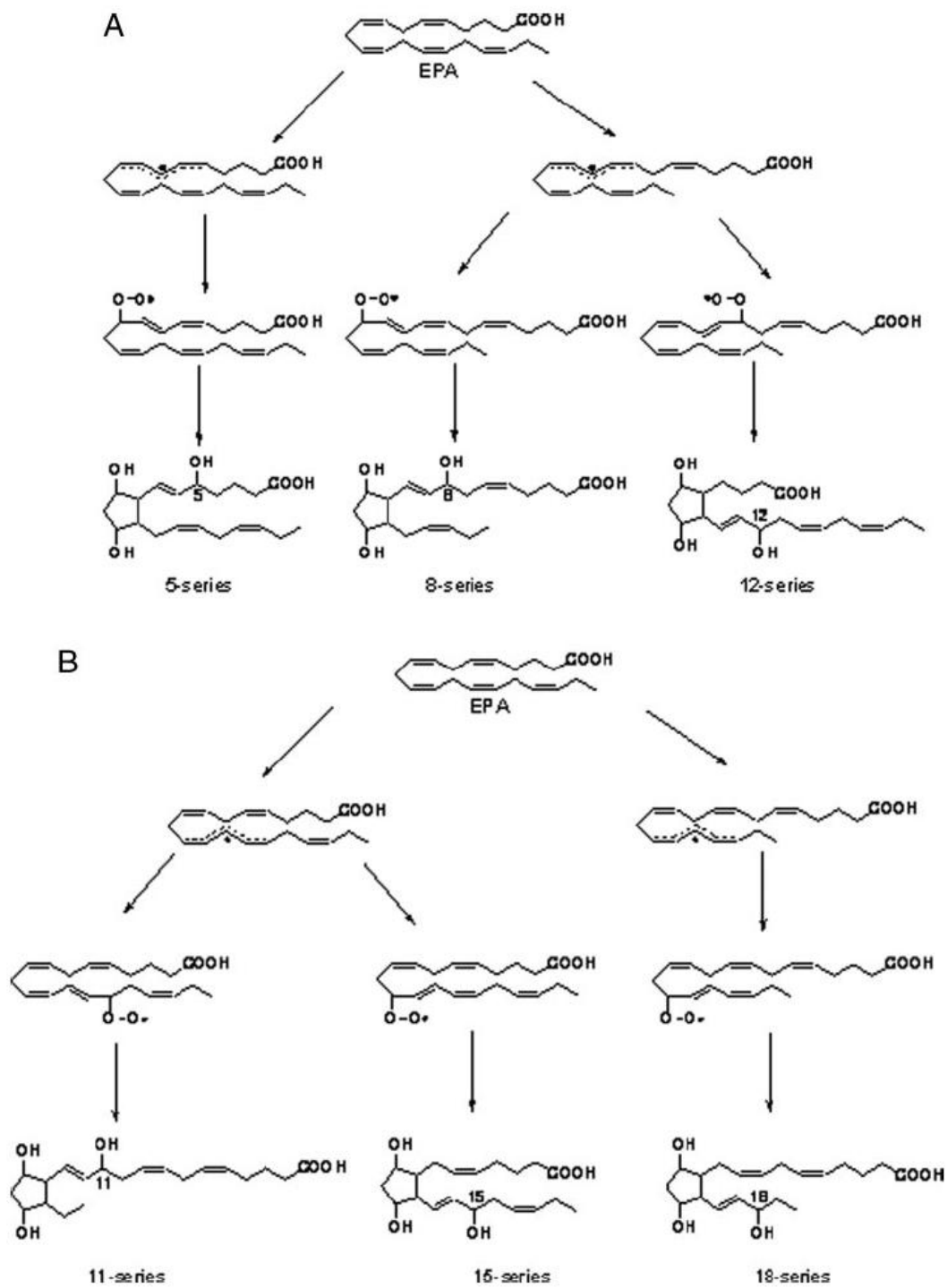


Figure 42 : Voie de formation des F₃-IsoP par oxydation non-enzymatique de l'EPA
(Gao et al., 2006)

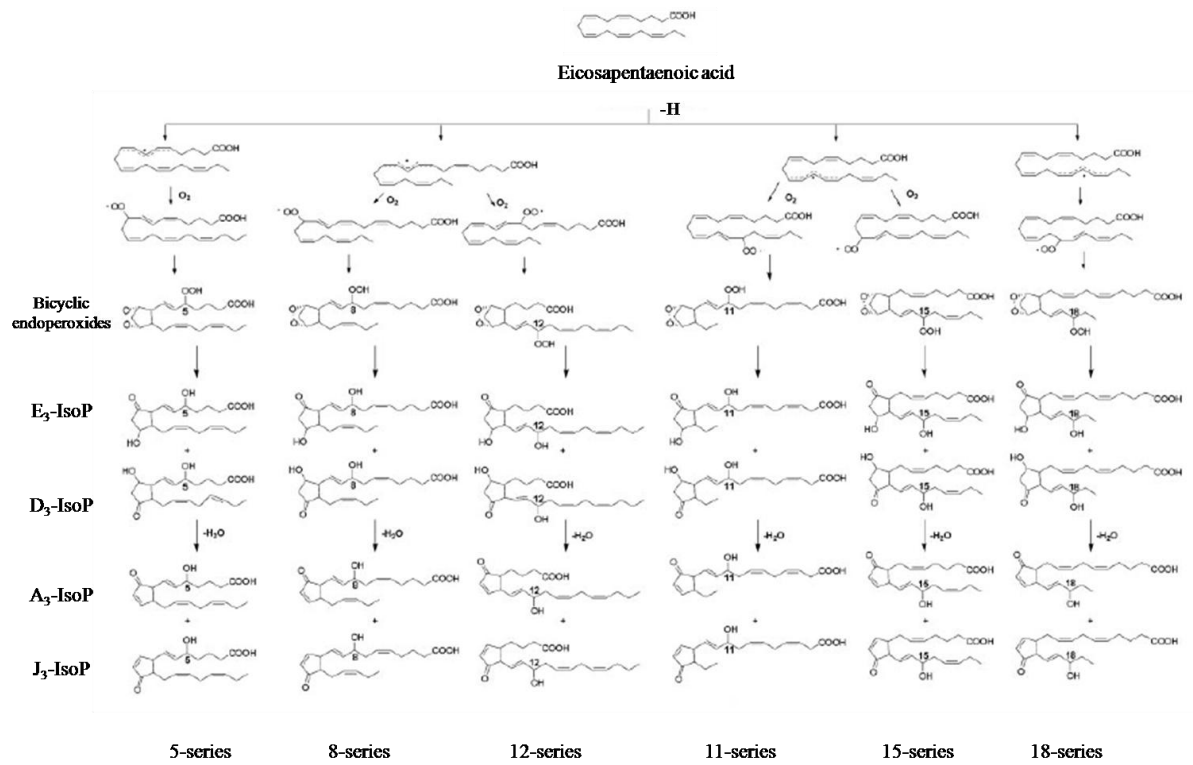


Figure 43 : Voie de formation des A₃/J₃-IsoP par oxydation non-enzymatique de l'EPA
(Brooks et al., 2008)

correspondant aux séries -4, -7, -10, -11, -13, -14, -17 et -20 (notées 4-F₄-NeuroP, 7-F₄-NeuroP) regroupant au total 128 composés (chaque régioisomère étant composé de 8 diastéréoisomères racémiques). Les séries -4 et -20 sont les plus abondamment formées (Yin *et al.*, 2005) (**Figure 44**). En plus des F₄-NeuroP, d'autres composés peuvent également être formés. Il s'agit des **E₄/D₄-NeuroP** et des A₄/J₄-NeuroP. Tout comme la synthèse des F₄-NeuroP, la formation des E₄/D₄-NeuroP fait au préalable intervenir la production de 8 intermédiaires endoperoxydes bi-cycliques régioisomères. Dans ce cas de figure, au lieu d'être réduits, les endoperoxydes intermédiaires vont subir un réarrangement pour générer 8 E₄-NeuroP et 8 D₄-NeuroP régioisomères regroupant au total 256 composés (chaque régioisomère étant composé de 8 diastéréoisomères racémiques). Ces composés sont instables et rapidement déshydratés en milieu aqueux pour former des composés contenant un cyclopentenone, les **A₄/J₄-NeuroP**. La perte d'un centre chiral réduit le nombre total de composés A₄/J₄-NeuroP à 128 (Fam *et al.*, 2002) (**Figure 45**).

D'autres composés sont issus de la peroxydation lipidique du DHA : les **neurofuranes** (NeuroF). Ces composés sont uniquement produits dans des conditions de haute tension en oxygène. Deux mécanismes sont proposés pour la formation des neurofuranes : une voie de clivage des peroxydes cycliques et une voie d'hydrolyse des époxydes. Ces deux mécanismes formeraient 16 régioisomères distincts, chacun comprenant 32 diastéréoisomères racémiques pour un total de 512 composés. La voie d'hydrolyse des époxydes contribuerait à la formation des 16 régioisomères alors que la voie de clivage des peroxydes cycliques formerait seulement 8 des 16 régioisomères. Les nomenclatures Epox et Both sont utilisées pour les régioisomères issus de ces deux voies (par exemple : VI-Epox et VI-Both) (Song *et al.*, 2008). Enfin, les **neurokétales** (NeuroK), des γ -kétos aldéhydes très réactifs sont issus de l'oxydation du DHA. Les NeuroK peuvent rapidement former des adduits sur les résidus lysines des protéines formant ainsi des bases de Schiff. Huit régioisomères de NeuroK sont formés, chacun comportant 8 diastéréoisomères racémiques. Parmi ces régioisomères, 4 ont une structure 1,4-pentadiène et 4 ont une structure 1,4,7-octatriène. Ces structures sont potentiellement susceptibles d'être oxydées formant des NeuroK avec un groupement hydroxyle en plus (Bernoud-Hubac & Roberts 2002).

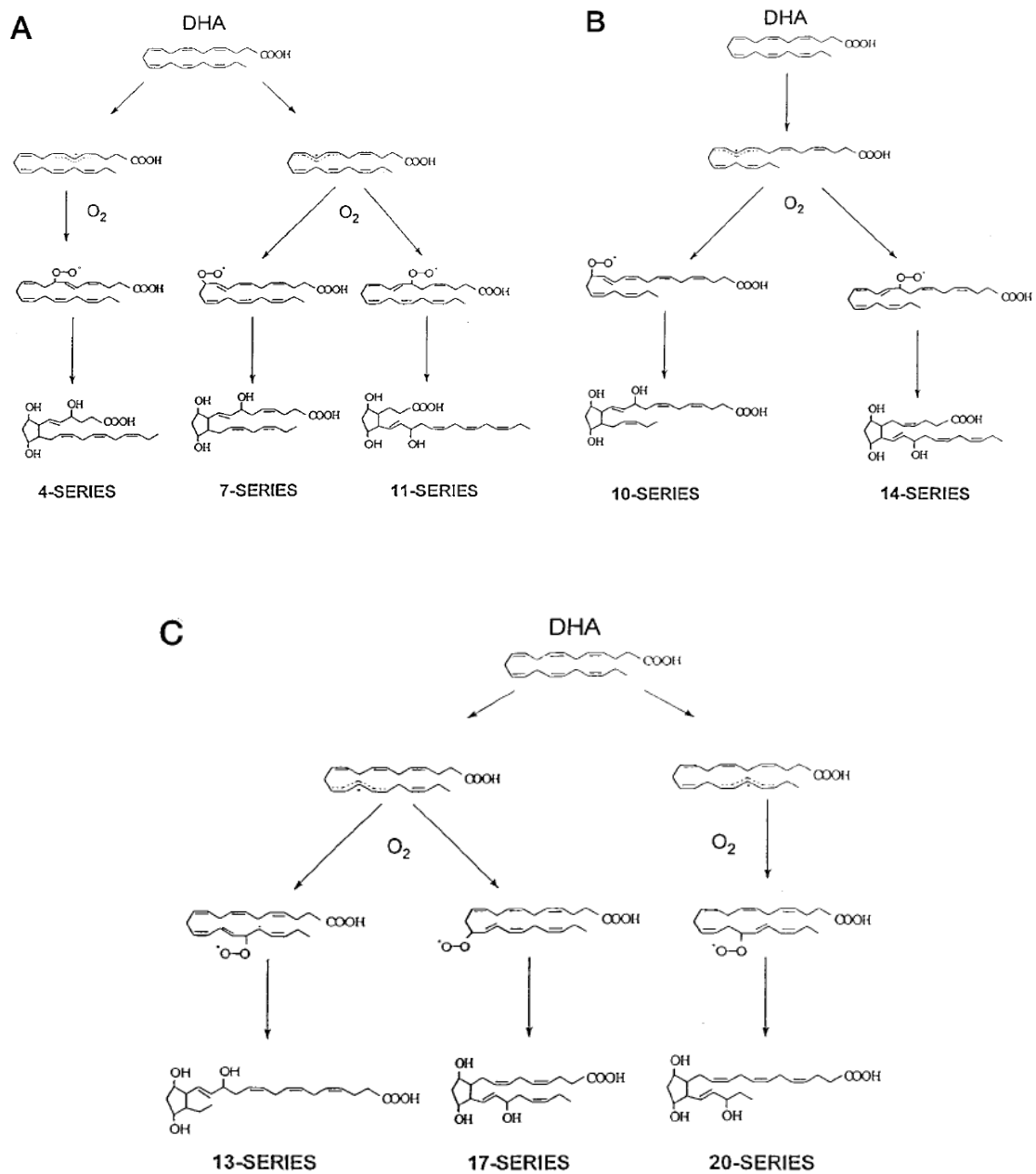


Figure 44 : Voie de formation des F₄-NeuroP par oxydation non-enzymatique du DHA
 (Roberts et al., 1998)

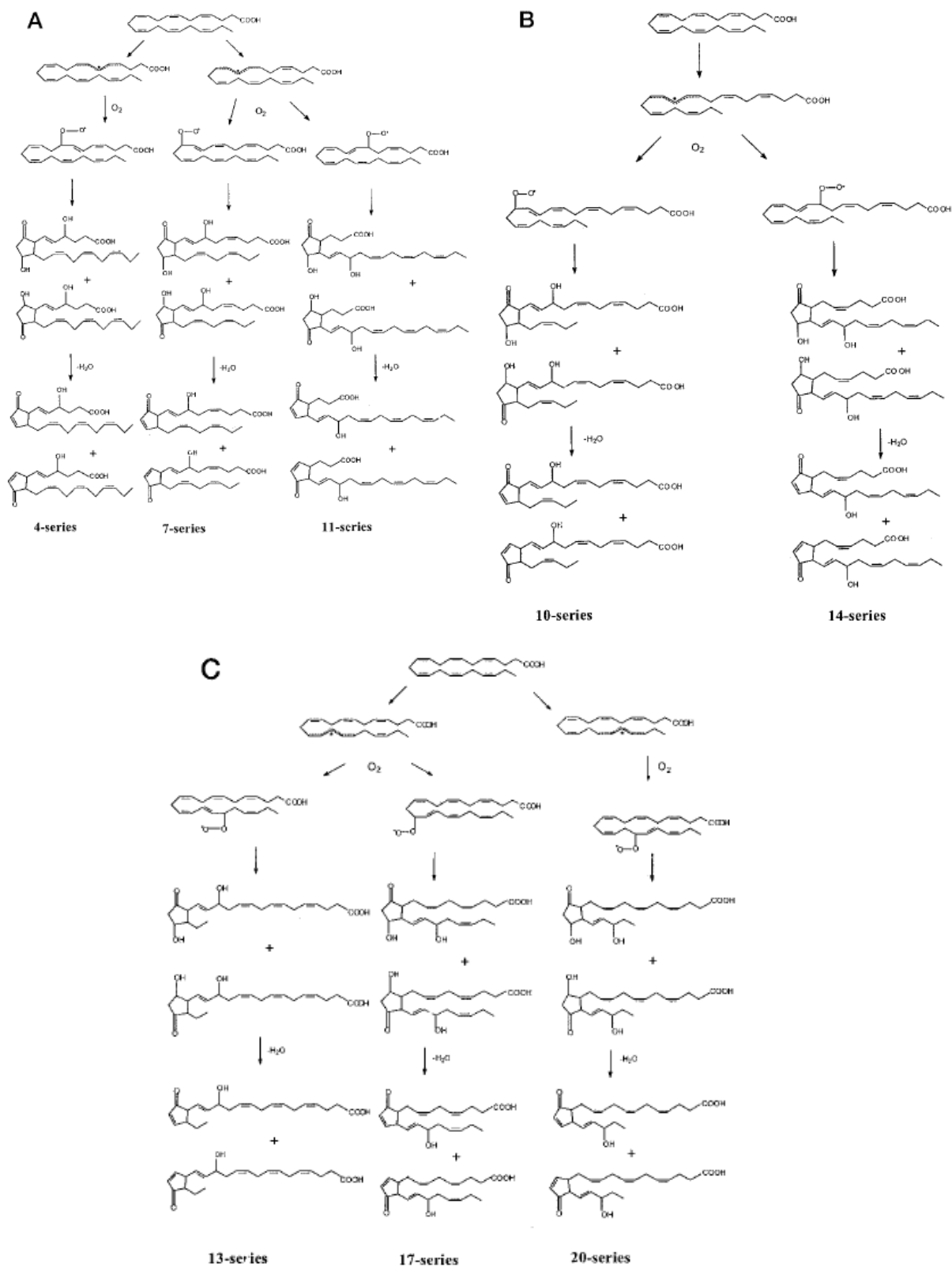


Figure 45 : Voie de formation des A₄/J₄-NeuroP par oxydation non-enzymatique du DHA
(Fam et al., 2002)

Le métabolisme oxydatif non-énergétique des AGPI ω 3-LC se caractérise par une grande complexité tant le nombre et la variabilité structurelle des métabolites oxygénés sont grands (**Figure 46**). Ils incluent bien évidemment les eicosanoïdes produits via les enzymes COX et LOX mais également d'autres types de métabolites enzymatiques identifiés plus récemment tels que les résolvines, protectines et marésines. Longtemps considérés simplement comme des marqueurs de stress oxydant, les métabolites spécifiques issus de la peroxydation non-enzymatique des AGPI ω 3-LC (iso- et neuroprostanes notamment) sont aussi une classe de métabolites oxygénés importante à prendre en compte, en particulier dans les situations de stress oxydant qui exacerbe leur production. Ces données biochimiques suggèrent que les mécanismes d'action athéroprotectrice des AGPI ω 3-LC sont loin d'être élucidés si l'on considère que chacun des métabolites oxygénés pourrait contribuer à la bioactivité des AGPI ω 3-LC.

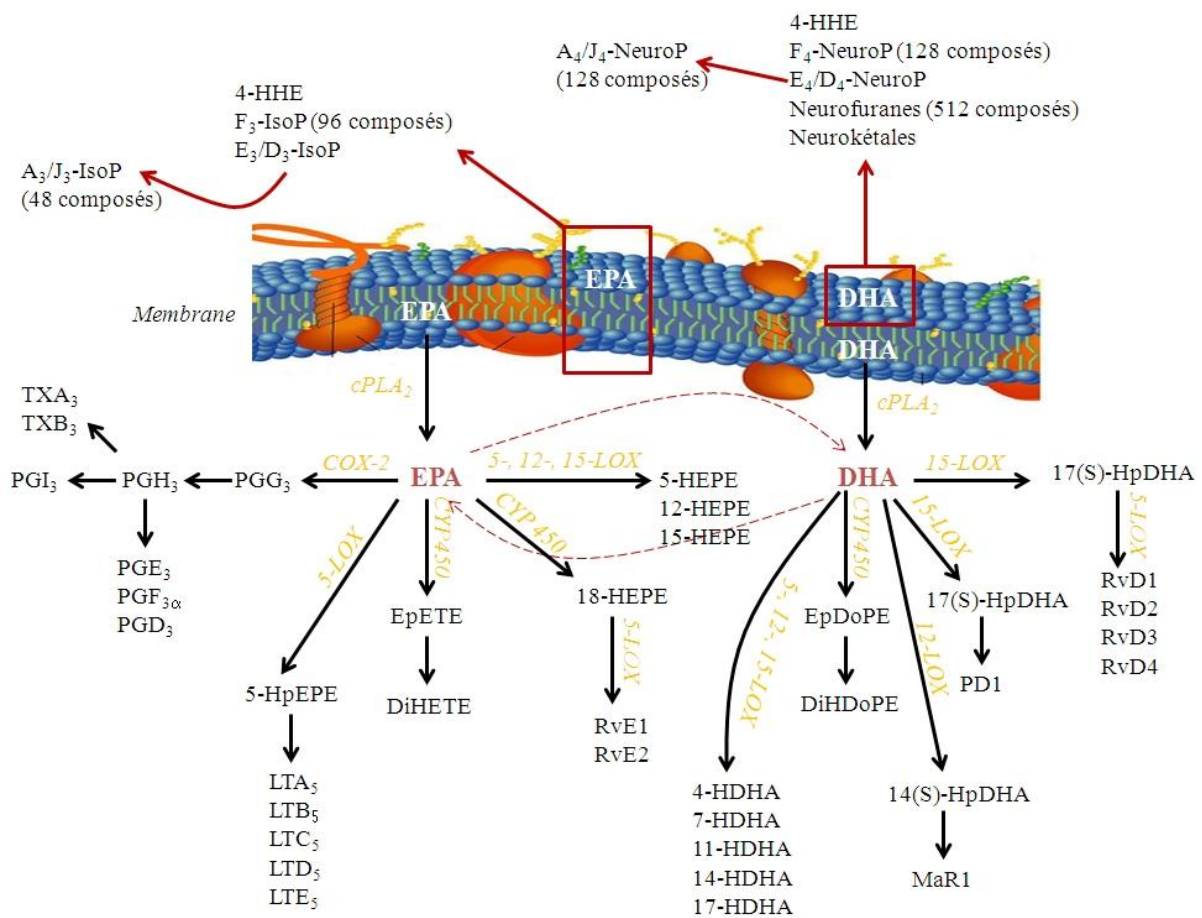


Figure 46 : Métabolites oxygénés issus de l'oxydation enzymatique et non-enzymatique des AGPI ω 3-LC

V- Bioactivité des métabolites oxygénés issus des AGPI ω 3-LC

Comme vu précédemment, les AGPI ω 3-LC sont majoritairement incorporés dans les phospholipides membranaires où ils seront métabolisés pour générer une grande diversité de dérivés oxygénés. Si la bioactivité des métabolites issus de la voie enzymatique a été largement étudiée, celle des produits de la peroxydation lipidique reste peu étudiée et est sujette à controverse. Nous nous focaliserons ici sur les propriétés biologiques en relation avec l'athérosclérose qui sont très majoritairement représentées par des propriétés anti-inflammatoires.

V-1- Bioactivité des métabolites enzymatiques

V-1-1- Les eicosanoïdes

L'EPA peut réduire la production des eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique en entrant en compétition avec ce dernier au niveau de l'incorporation dans les phospholipides membranaires mais aussi pour les enzymes COX et LOX. Cette réduction se fait au profit des eicosanoïdes dérivés de l'EPA qui ont une bioactivité différente voire opposée par rapport à ceux issus de l'acide arachidonique. En effet, ils sont généralement neutres vis-à-vis de l'inflammation et, contrairement à ceux provenant de l'acide arachidonique, ils ont un rôle de vasodilatateur et sont capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire (Adkins & Kelley 2010). Des études ont rapporté une moindre induction de l'expression de COX-2 et de la synthèse de l'IL-6 par la **PGH₃** ainsi qu'une moindre activité du **LTB₅** sur la chimiotaxie des neutrophiles par rapport aux prostaglandines et leucotriènes dérivés de l'acide arachidonique (Bagga *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 1988). Le **TXA₃** a également une activité de pro-agrégant plus faible que le **TXA₂** issu de l'acide arachidonique (Calder 2004). La **PGD₃** et la **PGI₃** ont quant à elles été définies comme des anti-agrégants plaquettaires puissants. Un rôle de vasodilatateur a également été attribué à la **PGI₃** (Das 2000; Whitaker *et al.*, 1979).

V-1-2- Les résolvines, protectines et marésines

Les résolvines, protectines et marésines sont des médiateurs lipidiques aux propriétés anti-inflammatoires impliqués dans la résolution de l'inflammation.

V-1-2-1- Les résolvines

Les **résolvines de la série E** dont la **RvE1** fait partie exercent leur rôle anti-inflammatoire *via* de nombreuses cibles. Elles agissent, à des concentrations nanomolaires, comme de puissants inhibiteurs de la migration trans-endothéliale des leucocytes polymorphonucléaires (PMN) empêchant ainsi leur infiltration au niveau du site d'inflammation. La RvE1 permet également de stimuler l'activité de phagocytose des macrophages et d'atténuer les fonctions de présentation de l'antigène en diminuant la migration des cellules dendritiques et leur production d'IL-12. Elle permettrait aussi de réduire la migration des cellules musculaires lisses vasculaires et de réduire la production de superoxyde par les neutrophiles (Arita *et al.*, 2005; Serhan *et al.*, 2008; Spite & Serhan 2010). Le rôle anti-inflammatoire de la RvE1 a notamment été observé sur différents modèles animaux de maladies inflammatoires tels que la colite, la parodontite, la péritonite et rétinopathie (Spite & Serhan 2010). La RvE1 exercerait son action anti-inflammatoire *via* des récepteurs couplés aux protéines G (GPR) conduisant à inhiber l'activation de NFκB et donc l'expression des médiateurs pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines ...) qui en découlent. En effet, elle peut se lier de manière spécifique au récepteur orphelin ChemR23 (chemerin-receptor 23 ou chemokine-like receptor 1) entraînant la stimulation de l'activité de phagocytose des macrophages et la réduction des fonctions de présentation de l'antigène. Elle peut également se lier sur le récepteur BLT1, récepteur du LTB₄, entrant ainsi en compétition avec le LTB₄ pour antagoniser son action de chimioattractant (Arita *et al.*, 2007; Kohli & Levy 2009) (**Figure 47**). La **RvE2** possède des propriétés similaires à la RvE1 pour inhiber l'infiltration des PMN mais agirait *via* des récepteurs différents (Spite & Serhan 2010).

Les **résolvines de la série D** issues du DHA permettent elles aussi de réduire l'infiltration des PMN et de stimuler l'activité de phagocytose des macrophages *via* leur interaction avec les récepteurs ALX (récepteur de la lipoxine A4) et GPR32. Elles diminuent également la sécrétion de la cytokine IL-1β dans les cellules microgliales. De plus, la **RvD2** stimule la production endothéliale d'oxyde nitrique et réduit l'infiltration des leucocytes (Spite & Serhan 2010). L'effet anti-inflammatoire de ces résolvines a notamment été rapporté dans des modèles de maladies inflammatoires telles que la péritonite, la fibrose consécutive à l'ischémie/réperfusion ou encore la septicémie (Serhan *et al.*, 2008). Récemment, une étude sur macrophages murins de tissu adipeux a rapporté que la **RvD1** joue un rôle anti-

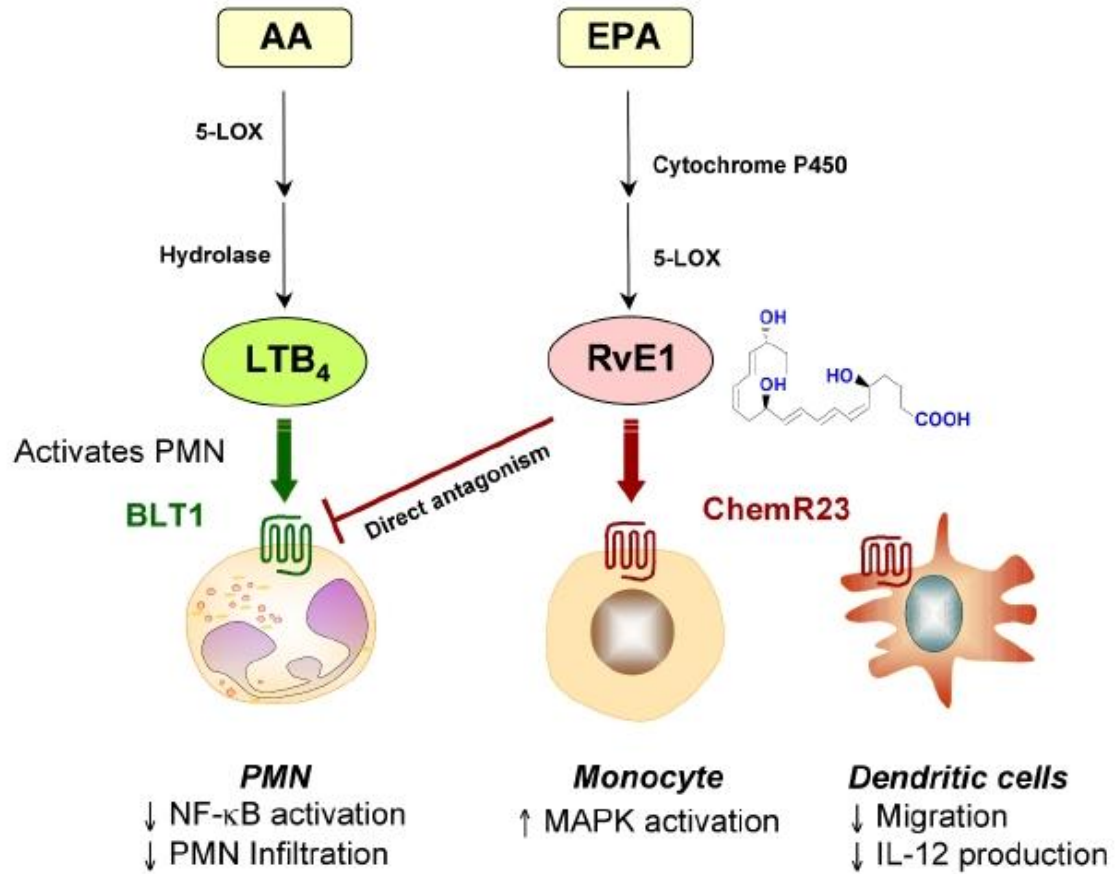


Figure 47 : Mécanismes d'action de la résolvine E1 *via* les récepteurs couplés aux protéines G : BLT1 et ChemR23
(Serhan et al., 2008)

inflammatoire *via* la réduction de l'expression des cytokines TNF α et IL-6 mais aussi en augmentant la phagocytose et en diminuant la production de ROS. De manière intéressante, cette étude a également révélé la capacité de la RvD1 à stimuler l'expression de l'arginase 1, caractéristique du phénotype des macrophages M2, impliqués dans la résolution de l'inflammation (Titos *et al.*, 2011). Cette étude est la première à démontrer que le DHA, notamment *via* la RvD1, peut moduler de façon favorable les macrophages, ce qui pourrait être à l'origine de la plupart des effets anti-inflammatoires observés en présence d'AGPI ω 3-LC (diminution de la production de chimioattractants et cytokines/chimiokines pro-inflammatoires, augmentation de la capacité de phagocytose, diminution de la production de radicaux libres).

V-1-2-2- Les protectines

Tout comme les résolvines, les protectines inhibent l'infiltration des PMN et stimule l'activité de phagocytose des macrophages. La **PD1** exerce également son activité anti-inflammatoire en inhibant la sécrétion de TNF α et d'IFN γ par les cellules T et en favorisant leur apoptose. Elle inhibe également l'expression d'IL-1 β dans les cellules microgliales (Serhan *et al.*, 2008). De plus la PD1 inhibe l'expression de la molécule d'adhésion VCAM-1 (Merched *et al.*, 2008). La PD1 possède de nombreux isomères capables d'inhiber l'infiltration des PMN mais avec une efficacité différente selon leur configuration (Serhan *et al.*, 2006). Récemment un nouvel isomère a été découvert, la PDX. Cette molécule est capable d'inhiber l'agrégation plaquettaire et ceci à des concentrations sub-micromolaires (Chen *et al.*, 2011).

L'effet anti-inflammatoire de la PD1 a été mis en évidence dans des modèles d'asthme, de péritonite, d'ischémie/réperfusion, de rétinopathie et d'AVC. Elle aurait également un rôle protecteur dans la maladie d'Alzheimer et au niveau de la rétine (Serhan 2009).

V-1-2-3- Les marésines

Les marésines sont les composés les plus récemment identifiés. Le produit principal, la MaR1 inhibe l'infiltration des PMN et stimule la phagocytose des macrophages et est par conséquent impliqué dans la résolution de l'inflammation tout comme les résolvines et protectines. Son rôle anti-inflammatoire a notamment été mis en évidence dans un modèle murin de péritonite (Serhan *et al.*, 2009; Spite & Serhan 2010).

V-1-3- Autres médiateurs lipidiques

La bioactivité des alcools et des époxydes issus des AGPI ω 3-LC reste encore mal connue. Néanmoins, il a été rapporté que les alcools issus du DHA sont capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire (Karanian *et al.*, 1996), notamment le **14-HDHA** qui a été identifié comme un puissant anti-agrégant (Lagarde 2008). De plus, les époxydes dérivés de l'EPA et du DHA exercent un rôle de vasodilatateur comme cela a notamment été rapporté pour les **11,(12) ; 14,(15) et 17,(18)-EpETE** issus de l'EPA (Hercule *et al.*, 2007; Morin *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2001) ou le **13,(14)-EpDoPE** issu du DHA (Ye *et al.*, 2002). Un rôle anti-arythmique a également été attribué au **17,(18)-EpETE** (Jump *et al.*, 2012). De plus Morin *et al.*, ont rapporté que ce composé exercerait un rôle anti-inflammatoire *via* une réduction de la voie de signalisation de NF κ B (phosphorylation d'I κ B α et sécrétion de composés pro-inflammatoires) passant par l'activation de PPAR γ . Ces auteurs ont également démontré que le 17,(18)-EpETE exerce son rôle de vasodilatateur en inhibant la MAPK p38 (Morin *et al.*, 2010).

V-2- Bioactivité des métabolites issus de la peroxydation lipidique

L'étude de la bioactivité des métabolites peroxydés des AGPI ω 3-LC est une thématique qui a été peu abordée et qui reste difficile à diffuser tant le postulat selon lequel les molécules issues de la peroxydation lipidique sont cytotoxiques reste fortement ancré dans les esprits. Par ailleurs, les difficultés techniques liées à l'identification et à la quantification des métabolites peroxydés spécifiques des AGPI ω 3-LC et l'absence de standards disponibles dans le commerce ont contribué au faible nombre d'études relatives à cette thématique. Quelques études, pour la plupart conduites *in vitro*, soit de manière indirecte en traitant les cellules avec des AGPI ω 3-LC oxydés, soit de manière directe en les exposant avec des métabolites synthétiques, ont néanmoins permis d'apporter des preuves tangibles de cette bioactivité.

V-2-1- Les AGPI ω 3-LC peroxydés

Le groupe de Sethi a été le premier à démontrer que les propriétés anti-inflammatoires des AGPI ω 3-LC pourraient être en partie attribuables à leurs métabolites peroxydés

(Sethi *et al.*, 1996). Dans cette étude, les auteurs montrent que la **diminution de l'adhésion des monocytes** aux cellules endothéliales n'est observée que lorsque les cellules sont exposées aux AGPI ω 3-LC préalablement oxydés (200 μ M) avec une solution de sulfate de cuivre et acide ascorbique. Cet effet a été associé à une **réduction de l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et ELAM-1** (endothelial leukocyte adhesion molecule 1) (Sethi *et al.*, 1996). Une seconde étude du même groupe a rapporté une réduction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-8 et MCP-1) par des cellules endothéliales exposées avec 100 μ M d'EPA oxydé (Mishra *et al.*, 2004). Une inhibition de l'expression d'iNOS a également été mise en évidence dans des hépatocytes de rat traités avec 500 μ M d'EPA ou DHA peroxydés, le taux d'inhibition étant inversement corrélé avec le niveau de peroxydation (Araki *et al.*, 2011). Dans l'ensemble de ces études, les effets anti-inflammatoires observés ont été associés à une inhibition de l'activation de NF κ B par les AGPI ω 3-LC oxydés (Sethi *et al.*, 1996) (Araki *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2004) dépendante de PPAR α (Mishra *et al.*, 2004). Une autre étude réalisée *in vitro* sur hépatocytes primaires de rat a mis en évidence que le DHA oxydé (600 μ M) était responsable de la **dégradation de l'ApoB100** (Pan *et al.*, 2004). Ceci pourrait conduire à réduire la production et sécrétion de VLDL par le foie et contribuer à l'effet hypolipémiant des AGPI ω 3-LC. En dehors des effets directement anti-athérosclérotiques, d'autres études ont montré que les AGPI ω 3-LC pourraient agir *via* leurs métabolites oxygénés. C'est le cas notamment d'une étude réalisée sur cardiomyocytes de rat qui a mis en évidence que le DHA oxydé (avec du peroxyde d'hydrogène, 1 μ M) plutôt que le DHA lui-même est capable de bloquer le courant sortant transitoire (I_{TO}) et d'activer le courant sortant retardé. Ces résultats suggèrent que la peroxydation du DHA pourrait être responsable de ses **effets anti-arythmiques** observés *in vivo* (Jude *et al.*, 2003). Chacune de ces études a clairement démontré que certaines propriétés biologiques des AGPI ω 3-LC étaient dépendantes de leur peroxydation mais la nature exacte des molécules bioactives n'a pas été rapportée. Des études complémentaires avec des métabolites peroxydés spécifiques a permis d'aller plus loin dans la démonstration.

V-2-2- Le 4-HHE

Concernant la bioactivité du 4-HHE, les études qui ont été pour la plupart réalisées *in vitro*, sont relativement controversées mais également peu comparables notamment sur la dose de 4-HHE testée qui est un critère primordial à prendre en compte dans le design des

études et dans l'analyse des résultats. Ainsi, plusieurs études concluent à une toxicité du 4-HHE sur divers modèles cellulaires. C'est notamment le cas de Lee *et al.*, qui rapportent, sur cellules endothéliales prostatiques de rat (YPEN-1), une induction de l'iNOS par le 4-HHE (30 μ M) *via* l'activation de NF κ B (Lee *et al.*, 2004). Je *et al.*, rapportent, sur ce même modèle, une activation de NF κ B par le 4-HHE (30 μ M) associée à une augmentation du stress oxydant dans les cellules endothéliales (Je *et al.*, 2004). Long *et al.*, rapportent également une augmentation du contenu en espèces oxygénées réactives dans des neurones de rat exposés au 4-HHE (50 μ M) (Long *et al.*, 2008). Awada *et al.*, sur cellules épithéliales d'adénocarcinome colorectal (Caco-2/TC7) ont rapporté une augmentation du stress oxydant associé au 4-HHE (100 μ M) (Awada *et al.*, 2012). L'ensemble de ces études font état de la toxicité du 4-HHE. Néanmoins, il faut souligner que les fortes doses de 4-HHE utilisées dans ces études (de 30 à 100 μ M) sont peu réalistes si on considère que la teneur plasmatique en 4-HHE est de 1 ng/mL (Guichardant *et al.*, 2006) que les teneurs en adduits 4-HHE-protéines dans le foie d'animaux supplémentés en DHA s'élèvent à 8,25 pmol/mg de protéines (Gladine *et al.*, PlosOne, en révision).

D'autres études utilisant des doses beaucoup plus faibles ou des modèles cellulaires différents concluent à un effet bénéfique du 4-HHE. C'est le cas d'une étude réalisée sur des cellules endothéliales humaines (HUVEC) exposées à de faibles doses de 4-HHE (1 à 10 μ M) qui a mis en évidence une **augmentation dose-dépendante de l'expression de l'hème oxygénase 1 (HO-1)**. L'activation de cette enzyme anti-oxydante, semble être médiée par l'activation du facteur de transcription Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) et suggère un effet anti-oxydant du 4-HHE (Ishikado *et al.*, 2013; Ishikado *et al.*, 2010) (**Figure 48**). Sur un autre modèle cellulaire, des adipocytes (3T3-L1), cette même équipe a également rapporté une augmentation de la HO-1 dépendante de l'activation de Nrf2 par le 4-HHE avec des doses de 4-HHE plus importantes (50 μ M) (Kusunoki *et al.*, 2013) qui pourraient se justifier par la teneur en acides gras, et donc probablement en leur métabolites peroxydés, dans les adipocytes.

V-2-3- Les Isoprostanes

Comparativement aux isoprostanes issus de l'acide arachidonique, la bioactivité des isoprostanes issus de l'EPA et du DHA a été peu étudiée, probablement en raison de l'absence de molécules purifiées disponibles dans le commerce et de leur moindre abondance *in vivo*.

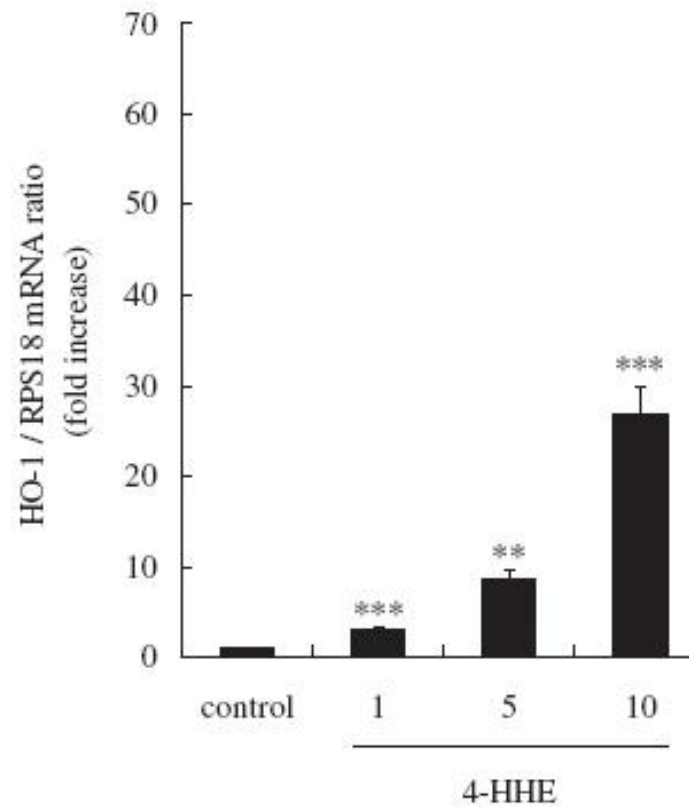


Figure 48 : Effet du 4-HHE sur l'expression de l'HO-1 dans des cellules endothéliales HUVEC incubées pendant 2 h en présence de 1, 5 ou 10 μ M de 4-HHE
(Ishikado et al., 2010)

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en comparaison avec le contrôle

Concernant les isoprostanes dérivés de l'EPA, les F₃-IsoP, une étude a mis en évidence que, contrairement au 15-F_{2t}-IsoP dérivé de l'acide arachidonique, le 15-F_{3t}-IsoP n'active pas l'agrégation plaquettaire (Pratico *et al.*, 1996). Cette activité réduite des isoprostanes dérivés de l'EPA suggère que, comme pour les eicosanoïdes décrits plus haut, il existe des différences notables d'activité entre les dérivés peroxydés issus des AGPI ω 6 et AGPI ω 3 probablement liées à leurs différences structurelles (Milne *et al.*, 2011). Deux autres études portant sur les A₃/J₃-IsoP issus aussi de l'EPA, ont mis en évidence **un effet anti-inflammatoire et anti-oxydant** de ces dérivés. En effet, le 15-A_{3t}-IsoP inhibe de manière dose-dépendante et significative aux concentrations 5, 10 et 25 μ M l'expression et l'activité de la iNOS et de COX-2 dans les macrophages murins prétraités pendant 30 minutes avec ce composé. Ce composé exerce son effet anti-inflammatoire *via* l'inhibition de NF κ B en bloquant la dégradation d'I κ B α . Ceci serait lié à la formation d'un adduit protéique entre l'A₃/J₃-IsoP et le résidu Cystéine 179 de la sous-unité β de la kinase IKK (Brooks *et al.*, 2011) (**Figure 49**). Une seconde étude réalisée dans les cellules HepG2 (carcinome de foie) a rapporté que les composés J₃-IsoP, isomères des A₃-IsoP, formés pendant la peroxydation de l'EPA peuvent activer Nrf2, et donc la réponse anti-oxydante (Gao *et al.*, 2007).

Concernant la bioactivité des isoprostanes issus du DHA, les données de la littérature sont encore très limitées (Galano *et al.*, 2013). En 2008, le groupe de Morrow s'est intéressé aux A₄/J₄-NeuroP et a mis en évidence que la 14-A₄-NeuroP (10 μ M) **réduisait l'expression de médiateurs pro-inflammatoires** (COX-2, iNOS) dans des macrophages murins prétraités pendant 30 minutes. La 14-A₄-NeuroP exercerait son effet anti-inflammatoire *via* l'inhibition de la voie de signalisation NF κ B par inhibition de la phosphorylation et donc de la dégradation d'I κ B α . De plus il a été mis en évidence qu'une mutation de la Cystéine 179 sur la sous unité β de la kinase IKK diminue l'effet de la 14-A₄-NeuroP suggérant que ce composé agit *via* une modification thiol de ce résidu (Musiek *et al.*, 2008) (**Figure 50**). D'autres travaux en cours dans l'équipe de Le Guennec s'intéressent **aux propriétés anti-arythmiques** des F₄-NeuroP et ont fait l'objet d'un dépôt de brevet (Le Guennec *et al.*, Methods and pharmaceutical composition for the treatment and prevention of cardiac arrhythmias European patent 5-EP12306519.3, December 2012).

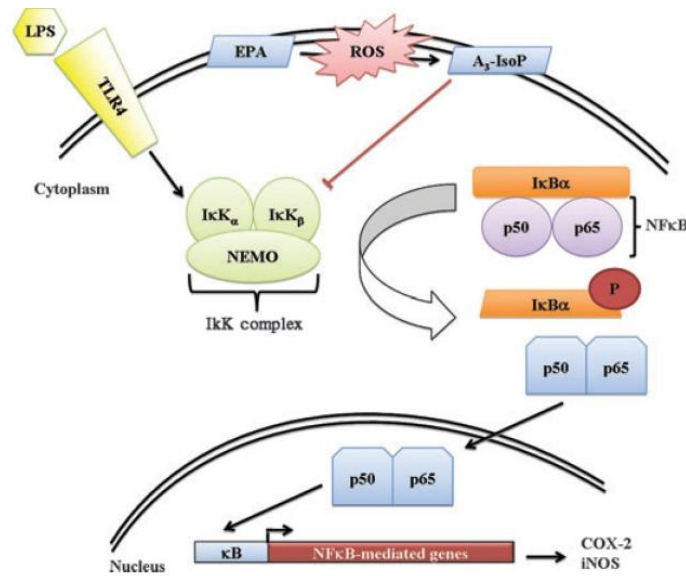


Figure 49 : Schéma représentant l'inhibition de la voie de signalisation de NFκB par les isoprostanes cyclopentenones dérivés de l'EPA
(Brooks et al., 2011)

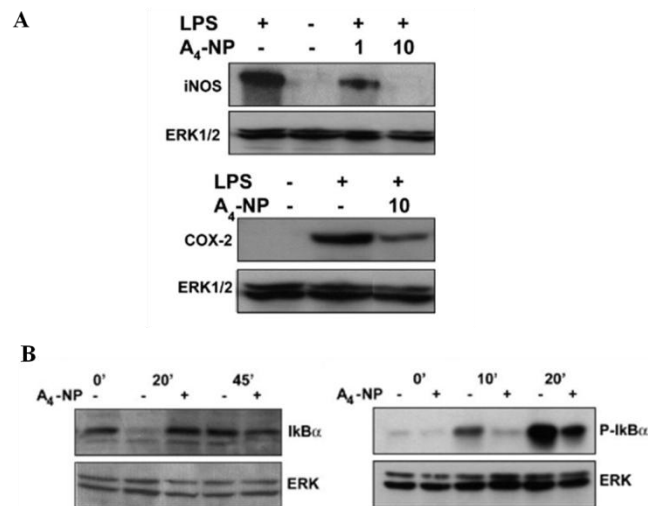


Figure 50 : 14-A₄-NeuroP inhibe l'expression d'iNOS et COX-2 via l'inactivation de la voie de signalisation de NFκB dans les macrophages
(Musiek et al., 2008)

(A) Des macrophages RAW sont traités 30 min avec la 14-A₄-NeuroP à 1 ou 10 μM puis stimulés 6h au LPS (1 μg/mL) avant d'analyser l'expression d'iNOS et de COX-2 par western blot. ERK1/2 sert de contrôle de dépôt (B) Des macrophages RAW sont traités 30 min avec la 14-A₄-NeuroP à 10 μM puis stimulés 0, 20 ou 45 min au LPS (1 μg/mL) avant d'analyser l'expression d'IκBα (forme totale et phosphorylée) par western blot. ERK sert de contrôle de dépôt.

La bioactivité des métabolites oxygénés issus des AGPI ω 3-LC est majoritairement représentée par une activité anti-inflammatoire. Celle-ci à longtemps été attribuée à la réduction de production des eicosanoïdes pro-inflammatoires issus de l'acide arachidonique mais il est évident aujourd'hui que les métabolites oxygénés issus des AGPI ω 3-LC possèdent aussi une activité propre. Ceci a été clairement mis en évidence pour les résolvines, protectines et marésines et commence à être abordé en ce qui concerne les dérivés non-enzymatiques. En effet, même si les données restent relativement peu abondantes et éparses, plusieurs études montrent que les métabolites non-enzymatiques tels que les iso/neuroprostanes sont de nouveaux acteurs à prendre en considération. Ainsi, la compréhension des mécanismes d'action des AGPI ω 3-LC devra intégrer le rôle probable des métabolites oxygénés notamment les non-enzymatiques qui sont produits en abondance au cours de l'athérogenèse (Gladine et al., PlosOne, en révision)

OBJECTIFS
&
STRATEGIE

Objectifs & Stratégie

De nombreuses études épidémiologiques font état du rôle des acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne (AGPI ω 3-LC), principalement l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), dans la prévention nutritionnelle des maladies cardiovasculaires et en particulier de l'athérosclérose. Comme nous l'avons discuté dans la partie III de l'étude bibliographique, les AGPI ω 3-LC exercent leurs fonctions athéroprotectrices en agissant sur de multiples cibles moléculaires. Les AGPI ω 3-LC sont également très sensibles à la peroxydation lipidique entraînant la production de nombreux métabolites potentiellement bioactifs pouvant contribuer à leur action. A ce jour, l'étude des effets athéroprotecteurs du DHA révèle que les cibles moléculaires au niveau vasculaire restent encore mal définies et que le rôle potentiel des métabolites issus de la peroxydation lipidique du DHA n'a pas été étudié. De ce fait, dans le cadre de ce travail de thèse, mes objectifs ont été :

- 1. d'étudier l'impact du DHA au niveau vasculaire**
- 2. d'évaluer spécifiquement la bioactivité de certains métabolites issus de la peroxydation du DHA**

Afin d'obtenir une vision globale et intégrée du spectre d'action du DHA au niveau vasculaire, les effets du DHA ont été étudiés par une approche nutriginomique, permettant une investigation ouverte et non biaisée. Pour cela, des souris déficientes en récepteur aux LDL (LDLR^{-/-}) développant l'athérosclérose ont été nourries avec un régime enrichi en saindoux (10% p/p) et cholestérol (0,045% p/p) et ont reçu quotidiennement, par gavage, une huile de tournesol riche en acide oléique (Groupe Contrôle), ou un mélange d'huiles fournissant 2% des apports énergétiques sous forme de DHA (Groupe DHA). Après 20 semaines de régime, les aortes ont été collectées et l'expression globale des protéines et gènes a été étudiée. Pour comparer les profils d'expression protéique, nous avons réalisé une analyse protéomique basée sur l'électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse dont les résultats sont présentés dans la **Publication n°1**. Les profils d'expressions géniques ont été étudiés par une analyse transcriptomique sur puces à ADN pangénomique dont les résultats sont présentés dans la **Publication n°2**.

Dans un second temps, sur la base des résultats de transcriptomique mettant en exergue une modulation de l'inflammation en réponse au DHA, nous avons entrepris une étude *in vitro* afin de préciser le rôle des neuroprostanes, métabolites spécifiques dérivés de la

peroxydation lipidique du DHA. Une précédente analyse ayant révélé que la teneur hépatique en F₄-Neuroprostanes (F₄-NeuroP) était la variable la plus prédictive de la réduction de l'athérosclérose, nous avons choisi d'étudier l'impact de cette classe de molécules sur la réponse inflammatoire des macrophages. Plus précisément, nous avons étudié deux neuroprostanes spécifiques, la 4-F_{4t} et la 14-A₄-NeuroP, sur la base de leur abondance et stabilité *in vivo* et de données préliminaires de la littérature. Des monocytes primaires humains issus de donneurs sains ont été isolés et différenciés en macrophages. Après 6 jours de différenciation, les macrophages ont été prétraités durant 30 minutes avec les deux types de neuroprostanes (4-F_{4t} et 14-A₄-NeuroP, 10μM) puis exposés au LPS (100 ng/mL) pendant 6 heures pour stimuler une réponse inflammatoire. Cette réponse et sa modulation par ces molécules ont été évaluées par mesure de l'expression et de la sécrétion de plusieurs marqueurs de l'inflammation (**Publication n°3**).

RESULTATS

Résultats

Première partie

Etude de l'impact du DHA au niveau vasculaire

Publication n°1

Proteomic analysis of aorta of LDLR^{-/-} mice given omega-3 fatty acids reveals modulation of energy metabolism and oxidative stress pathway

Laurie Joumard-Cubizolles^{1, 2}, Cécile Gladine^{1, 2*}, Nicolas Gérard^{1, 2}, Christophe Chambon³, Patrick Brachet^{1, 2}, Blandine Comte^{1, 2}, Andrzej Mazur^{1, 2}

Running Title: Nutrigenomic effects of omega-3 fatty acid

Affiliation:

(1) INRA, UMR1019, UNH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France

(2) Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France

(3) INRA, Qualité des Produits Animaux, UR 370, PFEMcp, Clermont-Ferrand/Theix, St Genès Champanelle, France

***Corresponding author:**

Dr Cécile Gladine

UMR 1019 INRA / Clermont Université

Centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix

63 122 Saint Genès Champanelle

Phone: +33 4 73 62 42 30, Fax: +33 4 73 62 46 38

Email: cecile.gladine@clermont.inra.fr

European Journal of Lipid Science and Technology 2013

Graphical Abstract (will be published online)

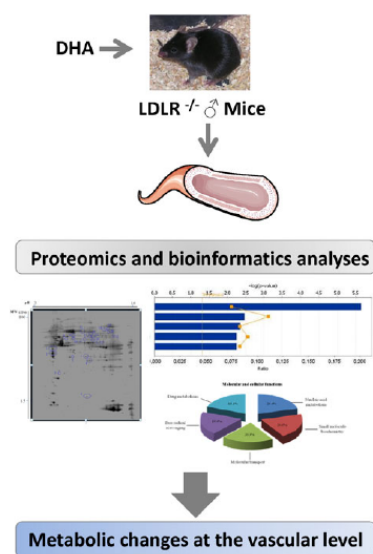
Short Communication

Proteomic analysis of aorta of LDLR^{-/-} mice given omega-3 fatty acids reveals modulation of energy metabolism and oxidative stress pathway

L. Joumard-Cubizolles, C. Gladine*, N. Gérard, C. Chambon, P. Brachet, B. Comte, A. Mazur

DOI: 10.1002/ejlt.201300310

■ Please Provide TOC Text ■



Short Communication

Proteomic analysis of aorta of LDLR^{-/-} mice given omega-3 fatty acids reveals modulation of energy metabolism and oxidative stress pathway

Laurie Joumard-Cubizolles^{1,2}, Cécile Gladine^{1,2}, Nicolas Gérard^{1,2}, Christophe Chambon³, Patrick Brachet^{1,2}, Blandine Comte^{1,2} and Andrzej Mazur^{1,2}

¹ INRA, UMR1019, UNH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France

² Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France

³ INRA, Qualité des Produits Animaux, UR 370, PFEMcp, Clermont-Ferrand/Theix, St. Genès Champanelle, France

Long chain omega 3 polyunsaturated fatty acids (LC-*n*-3PUFAs) exert potent anti-atherosclerotic action but the mechanisms of action at the vascular level remain unclear. The present study used a non-targeted nutrigenomic approach to investigate the modulations of the aortic proteome in atherosclerotic prone mice following DHA supplementation. LDLR^{-/-} male mice received an atherogenic diet (20 weeks) in parallel with daily oral gavages with either oleic acid-rich oil (Control) or a mixture of oils providing 2% of energy as DHA. The overall protein expression was determined by a proteomic approach followed by bioinformatics analysis. In addition, protein oxidative modifications, namely 4-hydroxynonenal (4-HNE) protein adducts, were detected with a specific antibody followed by MS analysis of the identified spots. Nineteen differentially expressed proteins have been identified in the aorta of the DHA group. The top 5 canonical pathway analysis associated all proteins to metabolic pathways and showed that most of them were related to glucose or lipid metabolism. Up-regulation of superoxide dismutase also suggests an impact of DHA supplementation on vascular antioxidant defenses. The analysis of 4-HNE-protein adducts indicated that DHA supplementation did not enhance oxidative modification of proteins with 4-HNE. This study also identified some new proteins with 4-HNE adducts at the aortic level. In summary, DHA supplementation induces significant modifications of aorta proteome which point out the importance of metabolic changes occurring in the vascular tissue in the presence of LC-*n*-3PUFAs.

Keywords: aorta / atherosclerosis / docosahexaenoic acid / lipid peroxidation / omega-3 fatty acids / proteomic

Received: August 19, 2013 / Revised: September 17, 2013 / Accepted: September 25, 2013

DOI: 10.1002/ejlt.201300310

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Correspondence: Cécile Gladine, UMR 1019, INRA/Clermont Université, Centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix, 63 122 Saint Genès Champanelle, France

E-mail: cecile.gladine@clermont.inra.fr

Fax: +33 4 73 62 46 38

Abbreviations: 2-DE, two dimensional electrophoresis; 4-HNE, 4-hydroxynonenal; ApoE^{-/-}, apolipoprotein E-deficient; ApoE*3, apolipoprotein E*3 Leiden transgenic mice; CHAPS, 3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio)1-propanesulfonic acid; ChREBP, carbohydrate regulatory element binding protein; DTT, dithiothreitol; EPA, eicosapentaenoic acid; HSP, heat shock protein; IPA, ingenuity pathway analysis; LC-MS/MS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; LC-*n*-3PUFAs, long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids; LDLR^{-/-}, low density lipoprotein receptor deficient; LXRs, liver X receptors; MALDI-ToF, matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight; MLX, max-like factor X; PPARs, peroxisome proliferator activated receptors; SOD1, superoxide dismutase 1; TBST, tris-buffered saline-tween-20

1 Introduction

Epidemiological and experimental data indicate the benefits of long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (LC-*n*-3PUFAs) towards atherosclerosis and the associated cardiovascular diseases [1]. Indeed, LC-*n*-3PUFAs, namely eicosapentaenoic acid (EPA) and DHA, modulate numerous biological processes involved in atherogenesis such as lipid metabolism, platelet aggregation, or inflammation [2]. The mechanisms of action of LC-*n*-3PUFAs are diverse and involve notably the modulation of the expression of a large number of genes. This can be achieved by their binding to several transcription factors such as peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) or liver X receptors (LXRs). Accordingly, several genome wide transcriptome studies reported that LC-*n*-3PUFAs modulate metabolic and

1 inflammation pathways in the liver and colon in experimental
 2 models [3–5]. However, although the action of LC-*n*-
 3 3PUFAs at the vascular level is recognized [1], no
 4 nutrigenomic study has been performed so far on the aorta.
 5 With regard to the complexity of LC-*n*-3PUFAs action,
 6 nutrigenomics could certainly contribute at identifying
 7 molecular events involved in their atheroprotective prop-
 8 erties. In the present study, we investigated the modulation
 9 of aorta proteome induced by DHA supplementation in
 10 atherosclerotic LDLR^{-/-} mice. Moreover, LC-PUFAs being
 11 highly prone to lipid peroxidation, we identified the formation
 12 of 4-hydroxynonenal (4-HNE) protein adducts, 4-HNE
 13 being the most abundant reactive aldehyde formed *in vivo*
 14 through lipid peroxidation [6].

15 **2 Materials and methods**

16 **2.1 Mice, diets and study outline**

17 LDLR^{-/-} male mice, a well-known model of atherosclerosis,
 18 were chosen for their sensitivity to LC-*n*-3PUFAs supple-
 19 mentation [7, 8]. Animals, were purchased from Jackson
 20 Laboratories (Bar Harbor, Maine), housed in a temperature
 21 controlled environment (22 ± 0.8°C) with a 12 h light–dark
 22 cycle, and allowed free access to food and water. All animals
 23 were maintained and handled according to the recommen-

1 dations of the Institutional Ethics Committee of the INRA, in
 2 accordance with decree No. 87–848, protocol agreement
 3 CE29-10. At 8 weeks of age, mice received an atherogenic
 4 diet (Supporting Information Table S1). In parallel to the
 5 diet, mice received by daily oral gavages (50 µL, 5 days/week)
 6 either 100% oleic-rich sunflower oil (Lesieur, Asnières-
 7 sur-Seine, France; Control group) or a mixture of 5% oleic-
 8 rich sunflower oil and 95% DHA-enriched tuna oil
 9 (OMEGAVIE® DHA 90 TG, Polaris Nutritional Lipids,
 10 France; DHA group) providing 2% of energy as DHA (i.e.,
 11 35.5 mg/day/mice or 0.18% in mass). The weight of animals
 12 was recorded every week and the end at experiments (control
 13 group 27 g ± 0.5; DHA group 25 g ± 0.4). After 20 weeks,
 14 mice were anaesthetized (40 mg pentobarbital/kg by weight)
 15 and killed by exsanguination. After rinsing with sterilized
 16 PBS, aortas were collected, immediately frozen into liquid
 17 nitrogen and stored at –80°C. A reduction of 35% of
 18 atherosclerotic plaque extent induced by DHA supplemen-
 19 tation was shown by histometry of the aortic cross (Gladi-
 20 ne C. *et al.*, Submitted for publication).

21 **2.2 Aorta proteomic analysis**

22 Frozen samples of aorta were grinded and homogenized in
 23 extraction buffer as previously described [9]. After homoge-
 24 nate centrifugation (18 000g, 4°C, 15 min) and measurement
 25 of the supernatant protein concentration (RC DC™ protein

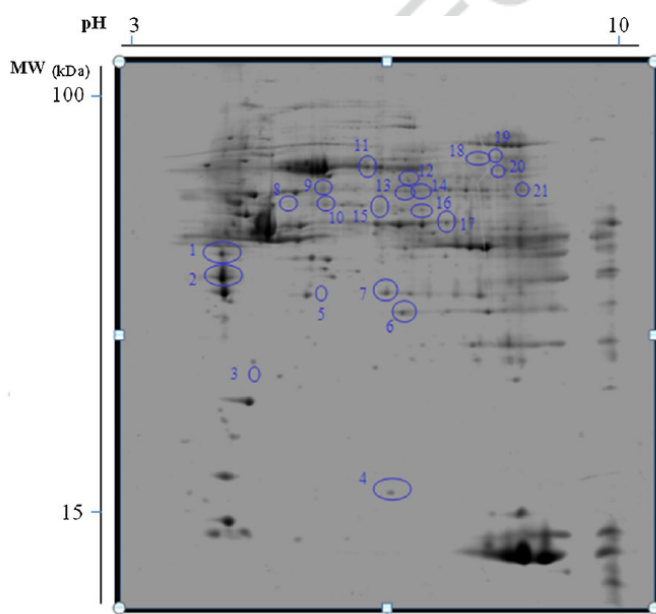


Figure 1. Representative colloidal Coomassie blue-stained 2-DE preparative gel of aorta total proteins from LDLR^{-/-} mouse. X-axis: isoelectric point (pI) from 3 to 10. Y-axis: molecular weight (MW). The circle areas mark protein spots with significantly ($P \leq 0.05$, using ANOVA test integrated to the Progenesis SameSpots® software) altered levels upon intervention with DHA compared to control diet. The numbers correspond to the index assigned to the proteins in the gel corresponding to the spots identified in Table 1.

1 assay kit, Bio-Rad), supernatant proteins were separated by
 2 two-dimension gel electrophoresis (2-DE, 12%). For the first
 3 dimension of analytical or preparative gels, 150 or 900 µg
 4 of proteins were loaded onto 7- or 17-cm, respectively, pH
 5 3–10 nonlinear, Bio-Rad ReadyStrips by inclusion of an
 6 adequate volume of extract in rehydration buffer (7 M urea,
 7 2 M thiourea, 4% w/v CHAPS, 1% w/v DTT, 0.2%
 8 biolytes pH 3–10, 0.0002% w/v bromophenol blue). For
 9 the second dimension, the migration is performed at 50 V
 10 during 20 min and then migration continues at 120 V until the
 11 migration front has the bottom of the gel. The migration
 12 was realized in a migration buffer (25 mM Tris, 192 mM
 13 glycine, SDS 0.1% w/v and H₂O). Following the second
 14 dimension, protein spots were visualized by 0.02% colloidal
 15 Coomassie blue staining and images were captured on an
 16 image scanner (Amersham ImageScanner, GE Healthcare,
 17 Orsay, France). Quantification of protein abundance from
 18 Control or DHA group (four animals/group) was performed
 19 on captured images via image alignment and analysis, and

integrated analysis of expression profiles using the Progenesis
 SameSpots® software (Nonlinear Dynamics, Newcastle
 upon Tyne UK). Statistical analysis incorporated into the
 Progenesis SameSpots® software was used for image analysis.
 Spots showing a significant change in abundance between
 the two conditions were subsequently analyzed by MS (LC-
 MS/MS) to identify the proteins differentially expressed
 between Control and DHA groups. Briefly, peptides mixtures
 were analyzed using the Ultimate 3000 RSLC (Dionex,
 Voisins Le Bretonneux, France) coupled with LTQ-VELOS
 mass spectrometer (Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf,
 France) (more details in Supplementary materials and
 methods).

2.3 4-HNE protein adducts analysis

The 2-DE gel was electrotransferred on PVDF membrane
 over 1 h at 90 V. Membrane was blocked using 5% Bovine
 Serum Albumin in Tris-buffered saline-Tween-20 (TBST)

Table 1. Proteomic analyses of aortic proteins with significantly altered levels following DHA supplementation in LDLR^{-/-} mice

| Identified proteins with modulated spot volume | Index number of spots | UniProt accession number ^{a)} | Score Mascot | % Coverage of matched peptides | Number of matched peptides | Theoretical MW (kDa)/pI ^{b)} | ANOVA (P-value) ^{c)} | Fold change (FC) |
|---|-----------------------|--|--------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|------------------|
| Proteins with greater spot volumes | | | | | | | | |
| Tropomyosin β chain | 1, 2 | P58774 | 4299 | 56 | 21 | 32.8/4.7 | 0.0169 | 1.05 |
| Desmin | 8 | P31001 | 798 | 42 | 15 | 53.5/5.3 | 0.000711 | 1.13 |
| Heat shock protein 60 kDa | 9 | P63038 | 3744 | 65 | 28 | 60.9/6.2 | 0.0475 | 1.05 |
| Pyruvate dehydrogenase protein X component | 10 | Q8BKZ9 | 1006 | 28 | 9 | 54/7.8 | 0.0268 | 1.05 |
| TNF receptor-associated protein 1 (HSP75) | 11 | Q9CQN1 | 1082 | 30 | 14 | 80.2/6.7 | 0.0319 | 1.10 |
| Phosphoglucomutase-1 | 12 | Q9D0F9 | 2584 | 52 | 20 | 61.4/6.6 | 0.0287 | 1.11 |
| Propionyl-CoA carboxylase β chain | 14 | Q99MN9 | 1747 | 45 | 17 | 58.4/7.7 | 0.00197 | 1.14 |
| Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase X | 13 | Q00612 | 1396 | 40 | 14 | 59.2/6.5 | 0.0263 | 1.11 |
| α-Enolase | 16 | P17182 | 1412 | 45 | 12 | 47.1/6.8 | 0.0464 | 1.07 |
| β-Enolase | 17 | P21550 | 4178 | 51 | 16 | 47/7.2 | 0.0464 | 1.04 |
| Superoxide dismutase 1 [Cu-Zn] | 4 | P08228 | 1125 | 32 | 5 | 15.9/6.5 | 0.00585 | 1.29 |
| Tri-functional enzyme subunit α | 18 | Q8BMS1 | 3320 | 40 | 21 | 82.6/9.1 | 0.0369 | 1.10 |
| Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase | 19, 20 | P50544 | 1658 | 47 | 22 | 70.8/8.8 | 0.0154 | 1.07 |
| Pyruvate kinase isozymes M1/M2 | 21 | P52480 | 1665 | 48 | 18 | 57.8/7.5 | 0.0466 | 1.11 |
| Proteins with lower spot volumes | | | | | | | | |
| NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8 | 3 | Q8K3J1 | 261 | 29 | 4 | 24/6.2 | 0.0573 | 1.25 |
| Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit β | 5 | Q9D051 | 1747 | 48 | 11 | 38.9/6.9 | 0.00665 | 1.19 |
| Isoform 2 of sarcalumenin | 15 | Q7TQ48 | 1118 | 40 | 14 | 54.3/6.6 | 0.0455 | 1.11 |
| Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] | 7 | P13707 | 991 | 41 | 10 | 35.2/7.6 | 0.002 | 1.36 |
| Delta (3,5)-Delta (2,4)-dienoyl-CoA isomerase | 6 | O35459 | 7072 | 62 | 14 | 36.1/7.7 | 0.00151 | 1.69 |

^{a)}The proteins are designated with their accession number in the UniProtKB/Swiss-Prot database.

^{b)}Theoretical MW and pI obtained from database without any processing.

^{c)} $P \leq 0.05$ using ANOVA test integrated to the Progenesis SameSpots® software.

The theoretical MW and pI corresponding to the identified protein are consistent with the MW and pI estimated for each spot of interest on 2-DE gels.

1 (20 mM Tris–HCl, 137 mM NaCl and 0.05% by volume
 2 Tween 20) for 1 h, and then incubated with rabbit anti-4-
 3 HNE His-Michael adducts polyclonal antibody (Calbio-
 4 chem®, 1:2000, overnight, 4°C). Subsequently, membrane
 5 was incubated with goat anti-rabbit antibody conjugated to
 6 horseradish peroxidase (Millipore, Billerica, USA) (1:2000,
 7 1 h, RT). Membrane was washed with TBST and antibody
 8 labeling was detected by chemiluminescence using Amer-
 9 sham ECF Western blotting kit (GE Healthcare). Western
 10 blot X-ray films were scanned and images were analyzed.
 11 Quantification of 4-HNE adducts of each protein sample
 12 from Control or DHA group ($n = 9$ /condition) was captured
 13 via image alignment and analysis, and integrated analysis
 14 of expression profiles using the Progenesis SameSpots®
 15 software. Statistical analysis incorporated into the Progenesis
 16 SameSpots® software was used for image analysis. Proteins
 17 identified in western blot with 4-HNE adducts were excised
 18 on 2-DE analytical gel stained colloidal Coomassie blue
 19 and analyzed by MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/
 20 Ionization–Time-of-Flight, MALDI-ToF).

21 **2.4 Bioinformatic analysis of pathways and biological**
 22 **functions**

23 The analyses of canonical pathways and biological
 24 functions were performed by the software INGENUITY

Pathway Analysis (IPA) (INGENUITY System, <http://www.INGENUITY.com>).

25 **2.5 Statistics**

Statistical differences were determined using ANOVA test
 integrated to the Progenesis SameSpots® software ($P < 0.05$
 considered significant).

26 **3 Results and discussion**

27 Proteomic analysis of aorta revealed 21 spots with signifi-
 28 cantly different abundance in DHA supplemented mice as
 29 compared to Controls (Fig. 1). From these spots, 19 proteins
 30 were identified (Table 1), 14 being more, and 5 being
 31 less abundant in the DHA group. Despite the significance of
 32 these results, their biological interpretation must take into
 33 account is the low fold changes and the supranutritional dose
 34 of DHA used. The top five canonical pathways showing
 35 significant alteration in protein expression (Fig. 2) were
 36 all related to metabolic pathways and most of them were
 37 directly or indirectly associated with an activation of
 38 glucose metabolism (i.e., glycolysis, pentose phosphate
 39 pathways). For instance, DHA supplementation up-regulated
 40 enolase (α - and β -isoforms), pyruvate kinase and glucose-6-
 41

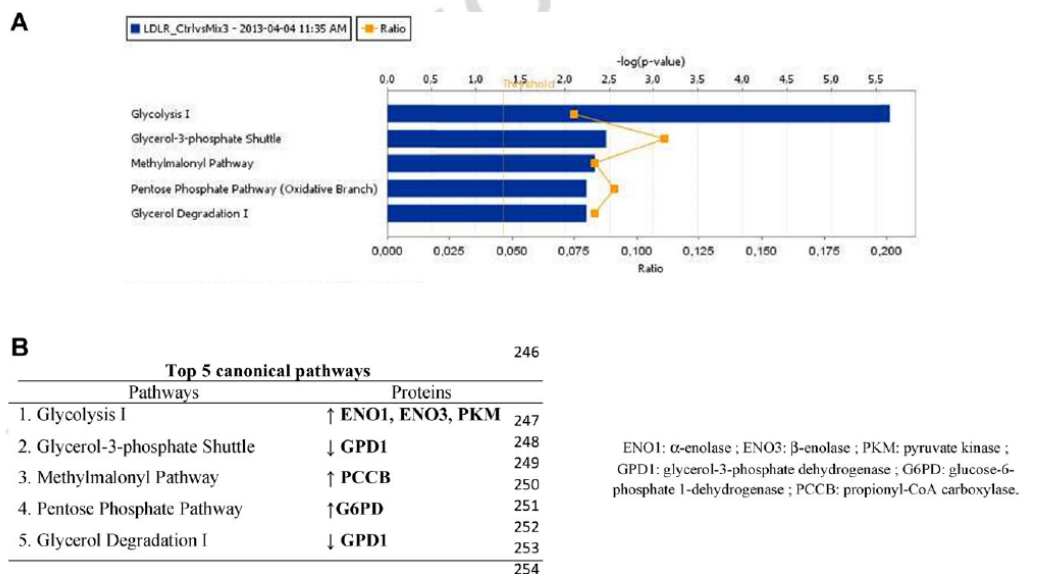


Figure 2. Top five canonical pathways generated by IPA illustrating modulation of protein expression upon DHA intervention. “Ratio” indicates the number of molecules in a given pathway that meet cut-off criteria, divided by the total number of molecules that make up that pathway. P -value is calculated using the right-tailed Fisher’s exact test (A). (B) Proteins involved in each pathway. ↑ increased and ↓ decreased abundance.

1 phosphate-1-dehydrogenase. Moreover, the up-regulation of
 2 propionyl-CoA carboxylase involved in the methylmalonyl
 3 pathway, together with the up-regulation of tri-functional
 4 enzyme subunit α and very long-chain specific acyl-CoA
 5 dehydrogenase, also suggests an impact of DHA supplementa-
 6 tion on lipid metabolism. These results suggest a putatively
 7 activation of β -oxidation, whereas the down-regulation of
 8 dienoyl-CoA isomerase does not support this hypothesis.
 9 Regarding the functional classification (Fig. 3), it should be
 10 noticed that “Free radical scavenging” is part of the top 5
 11 “Molecular and cellular function” (Fig. 3A). This was related
 12 to the up-regulation of the superoxide dismutase 1 (SOD1)
 13 and the heat shock protein 75kDa (HSP 75) and this may
 14 suggest an enhancement of antioxidant defenses.
 15 Concerning the “Physiological functions” (Fig. 3B), the

“Cardiovascular system development and function” is the
 best represented function in this category. It should be noted
 that the modulation of glycerol-3-phosphate dehydrogenase,
 SOD1, and HSP 60 was confirmed by Western Blot
 (Supporting Information Fig. S3). To the best of our
 knowledge, no study has reported so far the modulation of
 aorta proteome by LC-*n*-3PUFAs. The effects of LC-*n*-
 3PUFAs have been investigated on hepatic proteome in
 different murine models of atherosclerosis (ApoE³ and
 ApoE^{-/-} mice) [10, 11]. Interestingly, these studies revealed
 that LC-*n*-3PUFAs supplementation modulated the expres-
 sion of proteins involved in the same pathways than those
 presently identified (i.e., glucose metabolism, β -oxidation,
 oxidative stress) whereas the direction of changes were not
 always identical. For example, Mavrommatis et al. showed

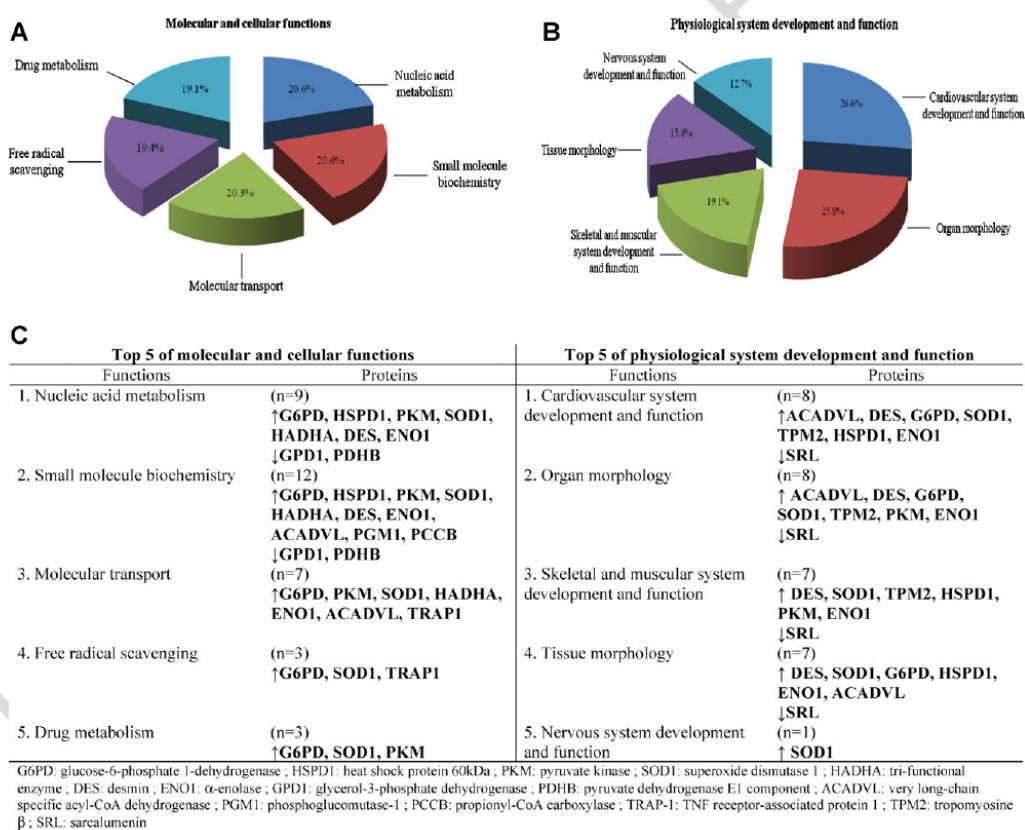


Figure 3. Distribution of identified aorta proteins differentially expressed in the DHA group in comparison with the control group among the top five of molecular and cellular functions (A) and top five of physiological system development and function (B). (C) Proteins involved in each function. \uparrow increased and \downarrow decreased abundance. These data were generated by IPA. The values shown in the pies are the percent (obtained by values of $-\log(P\text{-value})$) of these focus proteins ascribed to the indicated “molecular and cellular” or “physiological functions.”

1 a decreased abundance of several proteins involved in
 2 glycolysis but it should be noticed that study design was
 3 different from our notably regarding the type of tissue
 4 analyzed (i.e., liver vs. aorta). All together, our results are
 5 consistent with well-known LC-*n*-3PUFAs interaction with
 6 several transcription factors involved in these metabolic
 7 pathways [12]. For instance, activation of PPARs by LC-*n*-
 8 3PUFAs is known to induce the expression of several proteins
 9 of β -oxidation and, two key transcription factors controlling
 10 glycolysis [i.e., carbohydrate regulatory element binding
 11 protein (ChREBP) and max-like factor X (MLX)] are also
 12 targeted by LC-*n*-3PUFAs [13]. Interestingly, our analysis
 13 revealed an up-regulation of tri-functional enzyme subunit α
 14 and very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, two
 15 enzymes regulated by PPARs. The inflammation pathways
 16 have been reported to be modulated by LC-*n*-3PUFAs
 17 in transcriptomic studies in liver and colon [3–5]. Our
 18 proteomic study did not reveal differentially expressed
 19 inflammatory proteins. This does not exclude the action of
 20 DHA on aortic inflammation pathways but probably results
 21 from the limitations of 2-DE electrophoresis not allowing
 22 the identification of low molecular weight proteins such as
 23 several pro-inflammatory cytokines.

24 Moreover, LC-PUFAs are highly susceptible to per-
 25 oxidation leading to production of reactive molecules such as
 26 4-HNE, recognized as the most abundant aldehyde formed in

1 vivo. This lipid peroxidation metabolite reacts with proteins
 2 and cause their oxidative damage [14]. The analysis of 4-
 3 HNE protein adducts in the aorta revealed the same spots in
 4 Control and DHA groups with no significant variation in their
 5 abundance (Fig. 4) suggesting that oxidative modification of
 6 proteins with 4-HNE was not enhanced in the DHA group.
 7 Eleven spots with 4-HNE adducts were found and 8 proteins
 8 were identified (Table 2). The identified proteins are mainly
 9 mitochondrial and involved in energy metabolism pathways
 10 (Supporting Information Table S2). Interestingly, this
 11 specific proteomic analysis allowed the identification of
 12 new 4-HNE targets at the vascular level. These include acetyl-
 13 coenzyme A acyltransferase 2, medium-chain specific acyl-
 14 CoA dehydrogenase and fumarate hydratase, three mito-
 15 chondrial enzymes involved in β -oxidation and the Krebs
 16 cycle. Identification of the other proteins (i.e., actins,
 17 cytochrome b-c1, Uqcrc1, dihydrolipoyllysine-residue succi-
 18 nyltransferase, and creatine kinase M-type) is consistent with
 19 previous studies [15, 16], most of them being also
 20 mitochondrial. In fact, it is well recognized that mitochondria
 21 is a main source of ROS and consequently of lipid
 22 peroxidation metabolites. Mitochondrial proteins might
 23 therefore be particularly exposed to modification by 4-HNE.

24 In conclusion, we demonstrated that DHA supplementa-
 25 tion induces significant modifications of aorta proteome
 26 which point out the importance of metabolic changes

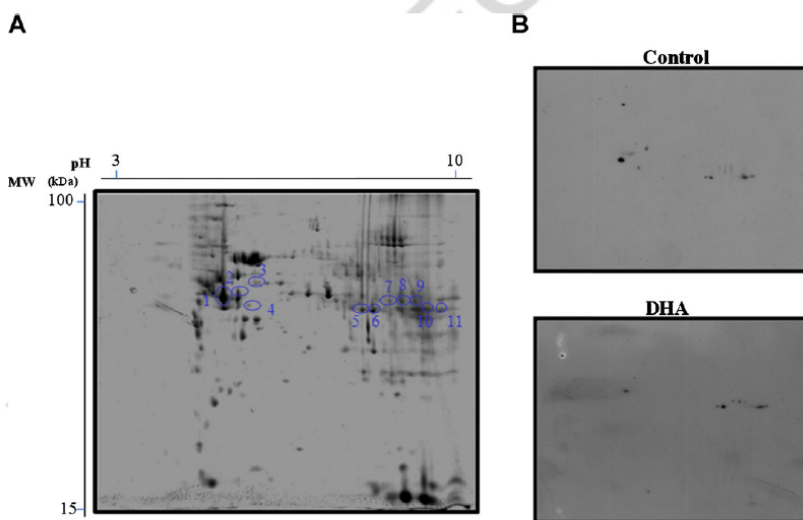


Figure 4. 4-HNE protein adducts in the aorta proteins in DHA supplemented compared to control LDLR^{-/-} mice. Representative colloidal Coomassie blue-stained 2-DE gel of aorta total proteins from LDLR^{-/-} mouse (A) and 2-DE western blot of aorta proteins with 4-HNE adducts from Control and DHA supplemented LDLR^{-/-} mouse (B). X-axis: pI from 3 to 10. Y-axis: molecular weight MW. The circle areas mark protein spots exhibiting 4-HNE adducts. The index number assigned to the proteins in the gel corresponding to the spots identified in (B).

Table 2. Proteomic analyses of aortic 4-HNE protein adducts identified from Control and DHA supplemented LDLR^{-/-} mice

| Identified proteins with 4-HNE adducts | Index number of spots | UniProt accession number ^{a)} | Score Mascot ^{b)} | Expect value | % Coverage of matched peptides | Number of matched peptides | Theoretical MW (kDa)/pI ^{c)} | ANOVA (P-value) ^{d)} |
|--|-----------------------|--|----------------------------|--------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| α-Cardiac actin | 1 | P68033 | 111 | 3.3E-006 | 36 | 12 | 41.8/5.2 | 0.4 |
| Actin, aortic smooth muscle | 1 | P62737 | 111 | 3.3E-006 | 35 | 12 | 42/5.2 | 0.4 |
| β-Actin | 1 | P60710 | 96 | 9.2E-005 | 32 | 10 | 39.2/5.8 | 0.4 |
| γ-Actin | 1 | P63260 | 95 | 0.00014 | 33 | 10 | 41/5.6 | 0.4 |
| Cytochrome b-c1 complex subunit 1 | 2 | Q9CZ13 | 169 | 5.2E-012 | 47 | 21 | 52.8/5.8 | 0.755 |
| Uqcrc1 protein | 2 | Q8K2S8 | 80 | 0.0042 | 48 | 10 | 28.7/6.1 | 0.755 |
| Dihydropolyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex | 3 | Q9D2G2 | 71 | 0.03 | 64 | 8 | 16.1/4.8 | 0.564 |
| Creatine kinase M-type | 5 | P07310 | 166 | 1E-011 | 47 | 18 | 43/6.6 | 0.465 |
| Creatine kinase M-type | 6 | P07310 | 88 | 0.00073 | 33 | 12 | 43/6.6 | 0.663 |
| Fumarate hydratase | 8 | P97807 | 77 | 0.0082 | 18 | 8 | 54.3/9.1 | 0.993 |
| Isoform CRA_d of acetyl-coenzyme A acyltransferase 2 | 9 | Q8BWT1 | 78 | 0.0058 | 24 | 8 | 36.2/8.4 | 0.767 |
| Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase | 9 | P45952 | 70 | 0.037 | 25 | 8 | 46.5/8.6 | 0.767 |
| Isoform CRA_b of acetyl-coenzyme A acyltransferase 2 | 10 | Q8BWT1 | 81 | 0.0033 | 36 | 10 | 38.3/8.6 | 0.84 |

^{a)}The proteins are designated with their accession number in the UniProtKB/Swiss-Prot database.

^{b)}Protein identification was validated from one protein showed significant Mascot™ score (≥70).

^{c)}Theoretical MW and pI obtained from database without any processing.

^{d)}ANOVA test integrated to the Progenesis SameSpots® software.

1 occurring in the vascular tissue in the presence of LC-*n*-
2 3PUFAs. Future research should be strengthened in order
3 to determine the specific impact of LC-*n*-3PUFAs on these
4 pathways at the vascular level and more specifically in
5 atherosclerosis.

6 *The authors acknowledge Catherine Besson and Jean-Paul*
7 *Rigaudière for monitoring of the animal experimentation. We*
8 *also thank Didier Viala for performing the mass spectrometry*
9 *analyses at the INRA Clermont-Ferrand/Theix Research Center*
10 *“Metabolism Exploration Platform: PFEM” and Laetitia Theron*
11 *for its contribution during mass spectrometry analyses. We*
12 *acknowledge the Servier library providing pictures for graphical*
13 *abstract. The project was supported by intramural French National*
14 *Institute for Agricultural Research (INRA). All authors were*
15 *involved in the project and participated either to the design of the*
16 *study, the analysis of the biological samples or the interpretation of*
17 *the results. Laurie Journard-Cubizolles, Cécile Gladine, and*
18 *Andrzej Mazur were involved in the writing of the manuscript with*
19 *the assistance of Blandine Comte and Patrick^{O1} Brachet.*

20 *The authors have declared no conflict of interest.*

21 **References**

22 [1] Calder, P. C., The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in
23 inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability.
24 *Mol. Nutr. Food. Res.* 2012, 56, 1073–1080.

[2] Adkins, Y., Kelley, D. S., Mechanisms underlying the 1
2 cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty
3 acids. *J. Nutr. Biochem.* 2010, 21, 781–792.
[3] Knoch, B., Barnett, M. P., Zhu, S., Park, Z. A. et al., 4
5 Genome-wide analysis of dietary eicosapentaenoic acid- and
6 oleic acid-induced modulation of colon inflammation in
7 interleukin-10 gene-deficient mice. *J. Nutrigenet. Nutrige-*
8 *nomics.* 2009, 2, 9–28.
[4] Kramer, J. A., LeDeaux, J., Butteiger, D., Young, T. et al., 9
10 Transcription profiling in rat liver in response to dietary
11 docosahexaenoic acid implicates stearyl-coenzyme a desaturase
12 as a nutritional target for lipid lowering. *J. Nutr.* 2003, 133,
13 57–66.
[5] Gladine, C., Roy, N. C., Rigaudière, J. P., Laillet, B. 14
15 et al., Increasing intake of long-chain n-3 PUFA enhances
16 lipoperoxidation and modulates hepatic gene expression in
17 a dose-dependent manner. *Br. J. Nutr.* 2011, 1–20.
[6] Leonarduzzi, G., Chiarotto, E., Biasi, F., Poli, G., 4-Hydroxy- 17
18 nonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis.
19 *Mol. Nutr. Food. Res.* 2005, 49, 1044–1049.
[7] Ishibashi, S., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Herz, J., Burns, 19
20 D. K., Massive xanthomatosis and atherosclerosis in
21 cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative
22 mice. *J. Clin. Invest.* 1994, 93, 1885–1893.
[8] Zampolli, A., Bysted, A., Leth, T., Mortensen, A. et al., 23
24 Contrasting effect of fish oil supplementation on the
25 development of atherosclerosis in murine models. *Atheroscle-*
26 *rosis* 2006, 184, 78–85.
[9] Martinez, E., Gerard, N., Garcia, M. M., Mazur, A. et al., 27
28 *Myocardium^{O2}* proteome remodelling after nutritional
29 deprivation of methyl donors. *J. Nutr. Biochem.* 2013.

- 1 [10] de Roos, B., Duivenvoorden, I., Rucklidge, G., Reid, M. et al., Response of apolipoprotein E*3-Leiden transgenic
2 mice to dietary fatty acids: Combining liver proteomics
3 with physiological data. *FASEB J.* 2005, 19, 813–815.
- 4 [11] Mavrommatis, Y., Ross, K., Rucklidge, G., Reid, M. et al.,
5 Intervention with fish oil, but not with docosahexaenoic
6 acid, results in lower levels of hepatic soluble epoxide
7 hydrolase with time in apoE knockout mice. *Br. J. Nutr.*
2010, 103, 16–24.
- 8 [12] Jump, D. B., N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic
9 gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* 2008, 19, 242–247.
- 10 [13] Jump, D. B., Botolin, D., Wang, Y., Xu, J. et al., Docosa-
hexaenoic acid (DHA) and hepatic gene transcription. *Chem.*
Phys. Lipids. 2008, 153, 3–13.
- [14] Poli, G., Schaur, R. J., Siems, W. G., Leonarduzzi, G.,
4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation
product of medicinal interest. *Med. Res. Rev.* 2008, 28,
569–631.
- [15] Choksi, K. B., Boylston, W. H., Rabek, J. P., Widger, W. R.,
Papaconstantinou, J., Oxidatively damaged proteins of heart
mitochondrial electron transport complexes. *Biochim. Bio-*
phys. Acta 2004, 1688, 95–101.
- [16] Moreau, R., Heath, S. H., Doneanu, C. E., Lindsay,
J. G., Hagen, T. M., Age-related increase in 4-hydroxynonenal
adduction to rat heart alpha-ketoglutarate dehydroge-
nase does not cause loss of its catalytic activity. *Antioxid.*
Redox. Signal. 2003, 5, 517–527.

Q1: Author: Please check the presentation and insertion of Acknowledgment

Q2: Author: Please provide the volume and page numbers.

Supplementary data**Table S1:** Diet composition

| Ingredient | g/kg | % (w/w) |
|---------------------|-------------|----------------|
| Casein | 200 | 20 |
| L-Cystine | 3 | 0.3 |
| Cornstarch | 366 | 36.6 |
| Sucrose | 230 | 23 |
| Cellulose | 54 | 5.4 |
| Mineral Mix, AIN-93 | 35 | 3.5 |
| Vitamin Mix, AIN-93 | 10 | 1 |
| Lard | 101.5 | 10.15 |
| Cholesterol | 0.45 | 0.045 |

Table S2: Location and biological function of mouse LDLR^{-/-} aortic proteins identified with 4-HNE adducts by proteomics

| Identified proteins with 4-HNE adducts | Location | Biological Function |
|--|------------------------------|---|
| Actin | Cytoplasm Cytoskeleton | Highly conserved proteins involved in various types of cell motility and ubiquitously expressed in eukaryotic cells. |
| Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial precursor | Mitochondrial inner membrane | Component of the ubiquinol-cytochrome c reductase complex (complex III or cytochrome b-c1 complex), and part of the mitochondrial respiratory chain for electron and proton transport. |
| Uqcrc1 protein | Mitochondrial inner membrane | Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1, is one of the two core proteins of cytochrome b-c1 complex. |
| Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial | Mitochondrial | Enzyme E2 of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. This complex catalyzes the conversion of 2-oxoglutarate to succinyl-CoA in the Krebs cycle. |
| Creatine kinase M-type | Cytoplasm | Catalyzes the reversible transfer of phosphate between ATP and various phosphogens (e.g. creatine phosphate). Creatine kinase isoenzymes play a central role in energy transduction in tissues with large, fluctuating energy demands, such as skeletal muscle, heart, brain and spermatozoa. |
| Fumarate hydratase, mitochondrial precursor | Mitochondrial | Fumarate hydratase or fumarase catalyzes the reversible hydration/dehydration of fumarate to malate in Krebs cycle. |
| Acetyl-coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase) | Mitochondrial | Mitochondrial enzyme that catalyzes the final step of the β -oxidation of fatty acids and which relaxes the acetyl-CoA for the Krebs cycle. |
| Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial | Mitochondrial | Oxido-reductase enzyme of the mitochondrial β -oxidation of fatty acids specific acyl chain length of 4 to 16. |

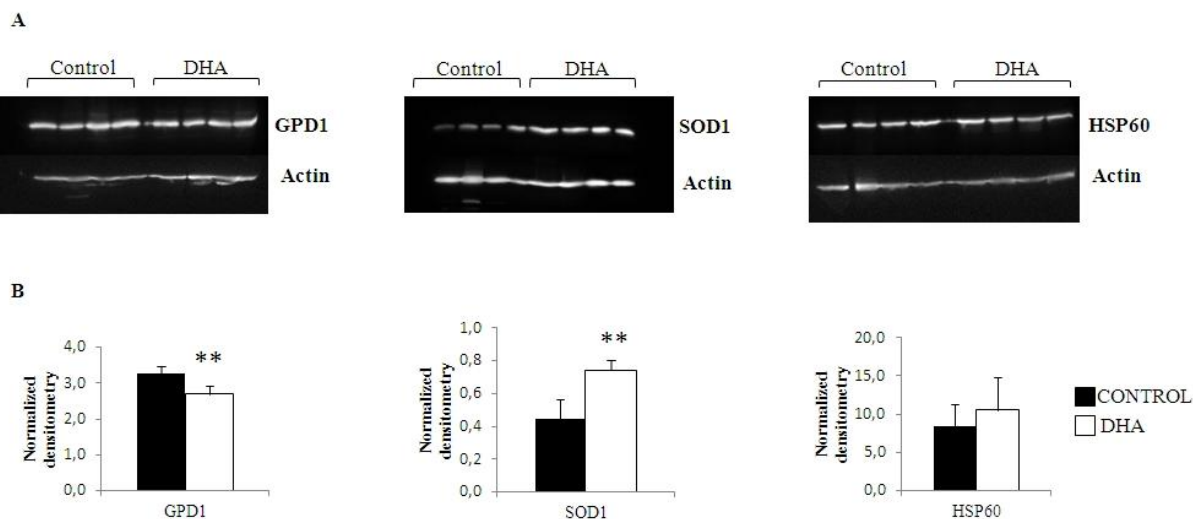


Figure S3: Western Blot verification of changes in abundance of GPD1, SOD1 and HSP60 in mouse aorta after DHA supplementation. Representative Western blots (A) and quantification of band intensity by densitometry analysis (B). The proteins bands were quantified using Quantity One software and normalization for loading differences was achieved by dividing the densitometry values for individual bands by those for actin in the same band. Differences between CONTROL and DHA were analyzed by Student t test (** $p < 0.01$). Values are means (\pm Standard Deviation) of protein extracts from 4 different mouse aortas.

GPD1 = glycerol-3-phosphate dehydrogenase, SOD1 = superoxide dismutase 1, HSP60 = heat shock protein 60 kDa.

Supplementary materials and methods

LC-MS/MS analysis. After tryptic digestion of proteins, peptides mixtures were analysed by online nanoflow liquid chromatography using the Ultimate 3000 RSLC (Dionex, Voisins Le Bretonneux, France) with nanocapillary columns of 15 cm length x 75 μm I.D., 3 μm , 100 Å (Acclaim PepMap100 C18, Dionex). The solvent gradient increased linearly from 4% to 50% acetonitrile in 0.5% formic acid at a flow rate of 300 nL/min for 35 min. The elute was then electrosprayed in positive-ion mode at 27 kV in a LTQ-VELOS mass spectrometer (Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf, France) through a nanoelectrospray ion source operated in a CID top10 mode (1 full scan MS and the 10 major peaks in the full scan were selected for MS/MS). Full-enhanced-scan MS spectra were acquired with 1 microscan (m/z 400-1400). Dynamic exclusion was used with 2 repeats counts, 15 repeats durations and 20 s exclusions durations. For MS/MS, isolation width for ion precursor was fixed at 2 m/z , single charged species were rejected, fragmentation used 35% normalized collision energy as the default activation q of 0.25.

Western blot analysis. Protein extracts were subjected to electrophoresis in 12% SDS-PAGE and electrotransferred on PVDF membrane over 1h at 90 V. Membrane was blocked using 5% Bovine Serum Albumin (BSA) in Tris-buffered saline-Tween-20 (TBST) (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl and 0.05% (v/v) Tween 20) for 1h, and then incubated with rabbit anti-SOD1, anti-GPD1 or anti-HSP60 diluted 1/5000, 1/2000 and 1/5000 respectively. Subsequently, membrane was incubated with goat anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:2000, 1h, room temperature). Membrane was washed with TBST and antibody labeling was detected by chemiluminescence using a CCD camera (GBOX, SYNGENE). Bands intensities were evaluated by densitometry analysis performed with Quantity One software and statistical differences were determined using Student t test ($p < 0.05$ considered significant).

Publication n°2

The omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid favorably modulates the inflammatory pathways and macrophage polarization within aorta of LDLR^{-/-} mice

Cécile Gladine^{1*}, Monika Zmojdzian¹, Laurie Joumard-Cubizolles¹, Marie-Anne Verny¹, Blandine Comte¹, Andrzej Mazur¹

Affiliation:

(1) INRA, UMR1019, UNH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France

***Corresponding author:**

Dr Cécile Gladine

UMR 1019 INRA / Clermont Université

Centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix

63 122 Saint Genès Champanelle

Phone: +33 4 73 62 42 30, Fax: +33 4 73 62 46 38

Email: cecile.gladine@clermont.inra.fr

Article en préparation

Abstract

Long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (LC- ω 3PUFA) exert their athero-protective effects by a broad range of cellular and molecular mechanisms associated with a modulation of several genes expression. However, the molecular targets at the vascular level are poorly described. The present study aimed to investigate the effect of docosahexaenoic acid (DHA) supplementation on global gene expression at the aortic level. Atherosclerosis prone LDLR^{-/-} mice received (20 weeks) by daily oral gavage an atherogenic diet in parallel with either oleic acid-rich oil (Control group) or a mixture of oils providing 2% of energy as DHA (DHA group). The aortic transcriptional profile was determined by microarray analysis (Agilent 4X44K microarray) and data were analyzed by bioinformatics (Ingenuity Pathway Analysis). In addition, analysis of macrophage phenotype within atherosclerotic lesion was realized by immunohistochemistry. Functional enrichment and canonical pathway analysis revealed that DHA supplementation mainly affected inflammatory processes and innate immunity with a remarkable number of down-regulated genes associated with pro-inflammatory activity of immune cell immune (e.g. CCL5, CCR7), cell movement (e.g. ICAM-2, SELP, PECAM-1) and antigen presentation (e.g. HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-DQB1, H2-Q8). Interestingly, many significantly modulated genes were identified as biomarker of macrophage phenotype suggesting a preferential orientation of macrophage towards a M2 reparative phenotype. This was consistent with immunofluorescent analysis that revealed an increase abundance of arginase I, a specific functional biomarker of M2 reparative macrophages. In conclusion, this study shows that inflammation and innate immunity are the primary functional of DHA within aorta. Moreover, DHA could play a role in macrophage polarization by inducing a M2 reparative phenotype as shown by the identification of several specific biomarkers. This could represent a new mechanism of anti-atherosclerotic action of DHA.

Keywords: aorta / atherosclerosis / docosahexaenoic acid / whole gene expression / inflammation / macrophage polarization

Introduction

Long chain omega 3 polyunsaturated fatty acids (LC- ω 3PUFAs), namely eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids (EPA and DHA), have recognized anti-atherogenic properties [1]. These have been for a long time mainly attributed to their hypolipidemic effect but several lines of evidence show that LC- ω 3PUFAs can reduce atherosclerosis independently of the systemic risk factors suggesting direct anti-atherogenic action of LC- ω 3PUFAs at the vascular level [2]. However, the cellular and molecular targets of LC- ω 3PUFAs within aorta remain largely unexplored. In fact, investigations so far have exclusively used targeted approaches providing a partial view of their spectrum of action. Indeed, several *in vivo* and *in vitro* studies have shown that LC- ω 3PUFAs have a very large panel of cellular and molecular targets leading to the modulation of the expression of the huge number of genes [3].

Atherosclerotic plaque initiation and progression are strongly dependent on the recruitment and activity of innate immune cells, such as monocyte/macrophages, dendritic cells (DCs) and mast cells. Monocytes/macrophages came to the forefront of research owing to new awareness that they may represent a more heterogeneous and phenotypically plastic population than initially believed [4]. Indeed, macrophages are now described as a heterogeneous population of cells that adapt in response to a variety of micro-environmental signals and their phenotypic polarisation is believed to play a key role in the fate of atherosclerotic plaques [4]. Indeed, recent evidence suggests that various stages of atherogenesis are associated with distinct macrophage subtypes [5]. These mainly include the classically-activated (M1) macrophages which are abundant in advanced lesion and exhibit potent inflammatory properties and the alternatively-activated (M2) populations involved in early stages and having reparative properties [6]. Despite their well-known anti-inflammatory

properties (Calder, 2007), the ability of omega 3 to favorably modulate macrophage polarization within aortic lesion has never been examined. However, the recent study of Titos *et al.*, showing increased expression of M2 biomarkers within adipose tissue macrophages of DHA supplemented mice supports this hypothesis [7].

All together, the review of the literature reveals that the understanding of the integrated molecular events affected by DHA at the vascular level remains unachieved. With regard to the known actions of DHA, specific focus should be orientated on the modulation of the inflammation networks and of the macrophage phenotype, a major player in the plaque development. In this context, we investigated the impact of DHA supplementation on aortic whole-genome gene expression and macrophage phenotypes.

Materials & Methods

Ethics statements

This study was carried out in strict accordance with the Institutional Ethics Committee of the INRA. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Auvergne Region (Permit Number: CE-2910). All efforts were made to minimize suffering during the protocol and before the final experiment.

Mice, Diets and Study outline

LDLR^{-/-} mice (n=120) were purchased from Jackson Laboratories (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France), housed 10 per cage, in a temperature controlled environment ($22 \pm 0.8^\circ\text{C}$) with a 12-h light–dark cycle, and allowed free access to food and water. At 8 weeks of age, mice were given a diet enriched in animal fat (10% of lard) and low in cholesterol (0.045%, Sigma-Aldrich C75209), and were randomized into two different groups on the basis of body weight. In parallel to the diet, mice received by daily oral gavages (50 μL , 5 days/week) either oleic acid rich sunflower oil (Lesieur, Asnières-sur-Seine, France; Control group) or a mixture of oleic acid rich sunflower oil and DHA rich tuna oil (OMEGAVIE[®] DHA 90 TG, Polaris Nutritional Lipids, France containing 90% of DHA as TG) providing 2% (or 35.5 mg/d/mouse) of energy as DHA (DHA group). After 20 weeks of feeding, mice were anaesthetized (40 mg pentobarbital/kg body weight). After rapid washing with sterilized PBS, heart and aorta samples were immediately frozen into liquid nitrogen and stored at -80°C .

Immunohistology

Cryosections (10 μM , 4 sections/slides and 8 mice/group) were performed at the level of aortic root (i.e. the aortic valve from its position at the left ventricular outlet to its junction

with the ascending portion of the aorta). After drying for 15 min at room temperature, cryosections were fixed in 70% ethanol and cold acetone (4°C). After a rapid washing in PBS, sections were then incubated overnight with the primary antibodies: rat anti-mouse Mac3 monoclonal antibody (BD Biosciences), rabbit anti-mouse ArgI polyclonal antibody (GeneTex) and rabbit anti-oxLDL polyclonal antibody (Biorbyt). The staining was revealed by using fluorescent secondary antibodies: cyanine 3 goat anti-rat IgG (H+L) for Mac3 (Invitrogen) and Fluorescein isothiocyanate (FITC) goat anti-rabbit (GeneTex) for ArgI and oxLDL. Immunostained slides were cover-mounted with Fluoromont G (Southern Biotech). The fluorescence was detected with a Zeiss Axioplan 2^E microscope equipped with the AxioCam MRm camera and the AxioVisionRel.4.8 image capture software. Images were acquired using the EC “Plan-Neofluar” 40x/0,75 objective of the microscope. Three random fields were analyzed on each section and the surface of each lesion was delimited based on the staining of Mac3 using the ROI Manager tool in the ImageJ free software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The intensity of each staining (i.e. Mac3, ArgI and oxLDL) is relative to this delimited surface. Differences between the mean intensities of Control and DHA mice were analysed using a Student *t* test.

Microarray analysis

The entire aortas (i.e. thoracic and abdominal sections) were used for RNA extraction. RNA was extracted using the RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s instructions. The purity and yield of RNA was assessed using the NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Extracted RNA was then amplified and labeled using the Agilent Low Input QuickAmp labeling kit (5190-2306, Agilent technologies, Wilmington, DE, USA) according to the manufacturer’s instructions. The purity and fluorescent intensity of the amplified and labeled cRNA was assessed using the NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE,

USA) : all samples had a yield .825 ng cRNA and a specific activity .8·0 pmol Cy3 or Cy5 per mg cRNA. The fluorescently labelled cRNAs were hybridized using the Agilent gene expression hybridisation kit (5188-5242, Agilent technologies, Wilmington, DE, USA). Briefly, 825 ng cyanine 3-labelled, linearly amplified cRNA were mixed with 825 ng cyanine 5-labelled, linearly amplified cRNA. The mix was loaded onto the Agilent's Mouse GE 4x44K v2 Microarrays (Agilent Microarray Design ID 026655) following a reference design. Hybridisation proceeded in a hybridisation oven set to 65°C for 17 h. Then, the slides were washed in solutions I, II and III (Agilent technologies, Wilmington, DE, USA) and air-dried.

Slides were scanned immediately after washing using the Agilent Microarray Scanner (G2505 B, Agilent technologies, Wilmington, DE, USA) and spot identification and quantification were performed using Agilent Feature Extraction Software 10.7 (Agilent technologies, Wilmington, DE, USA).

Ratios were filtered in accordance with their variability among the four comparisons, and genes with high variability were removed from the analysis. Statistical analyses were performed using the free R 2.1 software (<http://www.r-project.org>). The log ratio between experimental and control samples was analyzed with Student's t test to detect differentially expressed genes and probability values were adjusted using the Bonferroni correction for multiple testing at 1% to eliminate false positives. Genes selected by these criteria are referred to as “differentially expressed genes”.

Functional enrichment analysis. To identify biological functions and/ or diseases that were most significant to our data sets functional analysis was done. Right-tailed Fisher's exact test was used to calculate a significant P-value for each functional category as referenced in Ingenuity ® Knowledge Base. Downstream Effects Analysis is based on expected causal effects between genes and functions; the expected causal effects are derived from the

literature compiled in the Ingenuity® Knowledge Base. The analysis examines genes in the dataset that are known to affect functions, compares the genes' direction of change to expectations derived from the literature, then issues a prediction for each function based on the direction of change. The direction of change is the gene expression in the DHA group relative to the Control group. IPA uses the regulation z-score algorithm to make predictions. The z-score algorithm is designed to reduce the chance that random data will generate significant predictions. When the z-score is positive, IPA predicts that the biological process or disease is trending towards an increase whereas when the z-score is negative, IPA predicts that the biological process or disease is trending towards a decrease. A z-score ≥ 2 or ≤ -2 indicates that the function is statistically significantly increased.

Canonical pathway analysis. Lists of mRNAs differentially expressed between the Control and the DHA groups were uploaded in the IPA tool (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com) and analysed based on the IPA library of canonical pathways. The significance of the association between each list and a canonical pathway was measured by Fisher's exact test. As a result, a P-value was obtained, determining the probability that the association between the genes in our data set and a canonical pathway can be explained by chance alone.

Upstream regulator analysis. The goal of the IPA Upstream Regulator analysis is to identify the cascade of upstream transcriptional regulators that can explain the observed gene expression changes in the dataset. The upstream regulator analysis is based on prior knowledge of expected effects between transcriptional regulators and their target genes stored in the Ingenuity® Knowledge Base. The analysis examines how many known targets of each transcription regulator are present in the user's dataset, and also compares their direction of change (i.e. expression in the DHA group relative to the Control group) to what is expected from the literature in order to predict likely relevant transcriptional regulators. If the observed

direction of change is mostly consistent with a particular activation state of the transcriptional regulator (“activated” or “inhibited”), then a prediction is made about that activation state. For each potential transcriptional regulator (“TR”) two statistical measures, an overlap p-value and an activation z-score are computed. The overlap p-value calls likely upstream regulators based on significant overlap between dataset genes and known targets regulated by a TR. The activation z-score is used to infer likely activation states of upstream regulators based on comparison with a model that assigns random regulation directions.

Results

Aorta Gene Expression by Microarray Analysis

Differentially expressed genes. Microarray analysis for overall gene expression profiling was carried out in aorta in order to determine the major functional targets of DHA at the vascular level and to gain insight into the mechanisms of action underlying anti-atherogenic effects of DHA. As shown in **Figure 1**, among the 24 241 genes (i.e. 39 429 transcripts) represented in the Mouse GR 4x44k v2 microarray, 532 genes (2%) were found to be differentially expressed ($p < 0.01$) between the Control and DHA groups with 58% of genes being up-regulated by DHA supplementation and 42% being down regulated.

Functional enrichment and canonical pathway analysis. To better understand which and how biological processes have been affected by differentially regulated mRNAs, functional annotations and canonical pathway analysis were performed in *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) systems (**Figure 2**). Functional annotations allowed determining the 5 biological functions that were most significant to our dataset (**Figure 2A**). Further enrichment analysis on defined (canonical) pathways of IPA Knowledge Base provided the list of the 5 most significant over-represented pathways (**Figure 2B**). Interestingly, both types of analysis (i.e. functional annotation and canonical pathways) highlighted the over-representation of inflammatory processes and innate immunity. Indeed, 2 of the top 5 biological functions were identified as *Hematological System Development and Function* and *Immune Cell Trafficking* and the top five canonical pathways were all directly or indirectly related to antigen presentation. The *Hematological System Development and Function* (70 sub-functions) and *Immune Cell Trafficking* (51 sub-functions) shared most of their sub-functions (i.e. 50 common sub-functions) and it should be noticed that the significantly altered sub-functions (**Table 1**) were mainly associated with immune cell movement and most importantly

exclusively decreased. The analysis of genes associated with these sub-functions (**Figure 3**) shows a remarkable number of down-regulated genes related to the inflammatory function of macrophages. These include the chemokines CCL5 (FC=-1.49), CXCL12 (FC=-1.29), CXCL11 (FC=1.49), PF4 (FC=1.65) and the chemokine receptor CCR7 (FC=-1.43) as well as the pro-inflammatory mediator FN1 (FC=-1.63). A second set of over-represented molecules are related to cell-to-cell interaction and include the adhesion molecules ICAM2 (FC=-1.34), SELP (FC=-1.30), PECAM1 (FC=-1.29), the transmembrane chemokine CX3CL1 (FC=-1.12) as well as the extracellular protein THBS2 (FC=-1.29). Interestingly, CCL5 and CCR7 together with the fatty acid transporter FABP4 (FC=+2.96) and the coagulation factor F13A1 (FC=+1.65) are recognized biomarkers of macrophage polarization. Moreover, the direction of changes suggests a preferential orientation towards the reparative M2 phenotype. The analysis of genes associated with the top five canonical pathways (**Table 2**) also supports this idea. Indeed, most genes identified belong to the major histocompatibility complex (i.e. B2M, CD74, HLA-B, HLA-C, HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-DQB1, H2-Q8) which is known to be up-regulated in pro-inflammatory M1 macrophages. These genes together with lipocalin 2 (LCN2, FC=-1.47), another biomarker of M1 macrophage, were also associated with the functional annotation analysis (see **Table I in the supplemental data**).

Upstream regulators analysis. The IPA Upstream Analysis was run to identify the cascade of upstream transcriptional regulators that can explain the observed gene expression changes. The upstream regulator analysis is based on prior knowledge of expected effects between transcriptional regulators and their target genes stored in the Ingenuity® Knowledge Base. The analysis examines how many known targets of each transcription regulator are present in the dataset, and also compares their direction of change to what is expected from the literature in order to predict likely relevant transcriptional regulators. As shown in **Table 3**, the analysis of our dataset revealed the significant modulation (activation z-score ≥ 2 or ≤ -2)

of 20 transcriptional regulators, 7 being activated (**Table 3A**) and 13 being inhibited (**Table 3B**). Interestingly, the activated transcriptional regulators were mostly related to the PPARs dependent signaling pathways with PPAR γ being the most significant activated upstream regulator associated with our dataset (z-score=2.367, p=1.50x10⁻¹³). Concerning the list of inhibited upstream regulators, it includes several members of the interferon family with INF γ being the most significant inhibited regulator (z-score=-2.797, p=2.81x10⁻¹⁴). The well-known inflammatory regulator NF κ B was also significantly associated with our dataset (z-score=-2.360, p=6.32x10⁻⁹). It should be noticed that PPAR γ , INF γ and NF κ B are three main transcriptional regulators involved in macrophage polarization. Moreover, the analysis of the targets of these 3 most significantly modulated upstream regulators (**Figure 4 and Table II in supplemental file**) reveals that almost all the macrophage polarization biomarkers (except F13A1) identified previously (i.e. CCL5, CCR7, FABP4, LCN2, B2M, CD74, HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-DQB1) are directly or indirectly regulated by PPAR γ , INF γ and/or NF κ B. Most genes involved in cell-to-cell interaction (i.e. PECAM1, SELP, CX3CL1, NCAM1) also belong to the list of target genes of INF γ and NF κ B.

Immunofluorescent analysis of atherosclerotic lesions

We previously showed that DHA supplementation reduces plaque extent (-35%, p<0.001) in aortic root cryosections from LDLR^{-/-} mice (Gladine *et al.*, under publication). This is consistent with the representations of plaque size reported in **Figure 5A (top 4 pictures)**. The present immunofluorescent analysis aimed to get further insights into the impact of DHA on plaque composition, notably regarding macrophage infiltration. Then, immunofluorescent analysis of several biomarkers, namely Mac3, ArgI and oxLDL, was used to identify respectively macrophages (Mac3⁺), reparative M2 macrophages (ArgI⁺) and

oxidized LDL (oxLDL⁺). Intensities of staining calculated for each marker (**Figures 5B, C and D**) was relative to the lesion surface as delimited by the Mac3 staining.

Concerning macrophages infiltration in the lesion (Mac3⁺ cells), the overall surface stained was as expected higher in Control mice (**Figure 5A, middle 4 pictures**) which had much larger lesions. However, when calculating the intensity of staining relative to the lesion surface (**Figure 5B**), it should be noticed that DHA supplementation was associated with a higher macrophage intensity of the lesion (+130%, p=0.01) in comparison with Control mice. Interestingly, when looking at the subtype of macrophage as determined by the distinct expression of arginase isoforms (**Figure 5A, pictures to the lower left**), lesions of DHA supplemented mice were characterized by a higher intensity of type M2 macrophages (ArgI⁺ cells, +175%, p=0.001) (**Figure 5C**). This suggests that macrophages were abundant in the lesion of DHA mice but mainly oriented towards a M2 reparative phenotype. Finally, the staining of oxidized LDL represented in **Figure 5A (pictures to the lower right)** revealed a preferential distribution near the lamina and a 76% increase of staining relative intensity in the DHA group (**Figure 5D**) whereas this was not significant (p=0.08).

Discussion

Using an untargeted transcriptomic approach, we showed that DHA supplementation in atherosclerosis-prone LDLR^{-/-} mice 1) principally affected inflammatory processes and innate immunity and 2) induced changes in the expression of several referenced biomarkers of macrophage polarization suggesting a preferential orientation of plaque macrophages towards a M2 reparative phenotype.

Anti-inflammatory properties of LCω3-PUFA at the vascular level mainly rely on the decreased macrophage infiltration within atherosclerotic lesion [8,9,10] and the reduced aortic expression of two matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 reported in ApoE^{-/-} mice [11]. The present study showed that pathways related to inflammation and innate immunity are the main *in vivo* targets of DHA at the vascular level. Most importantly, our study allowed the identification of several genomic targets underlying the vascular anti-inflammatory properties of DHA. These notably include CCL5, CCR7 and FN1, three mediators of inflammation promoting immune cells or fibroblasts recruitment to inflammatory sites including atherosclerotic plaques [12,13,14]. Indeed, CCL5, also known as RANTES, is a chemokine secreted by fibroblasts, platelets and monocytes/macrophages which triggers monocytes arrests in atherosclerotic arteries [14,15]. The role of CCR7 in atherogenesis is more controversial since CCR7 knock-out experiments both showed atherosclerosis regression [16] and progression [17]. Nevertheless, CCR7 is crucially involved in several fundamental processes shaping the structural and functional organization of the adaptive immune system [18]. Therefore, the decreased abundance of CCR7 mRNA induced by DHA supplementation may reflect a moderation of the adaptive immune system which could be beneficial in the condition of advanced atherosclerotic plaque. Fibronectin (FN1) is an extracellular matrix glycoproteins produced by different cell types including activated macrophages which play a role as a chemoattractant [19]. These three specific proteins (i.e.

CCL5, CCR7 and FN1) have never been identified before as targets gene of DHA. Our results are nevertheless in accordance and complementary with previous *in vitro* results showing that LC- ω 3PUFAs reduce production of chemoattractants by immune cells [20] which is probably one of the primary anti-atherosclerotic action of DHA at the vascular level. Another set of interesting genes related to cell-to-cell interaction were also associated with DHA supplementation in our model. These include the adhesion molecules ICAM2, SELP, PECAM1, the transmembrane chemokine CX3CL1 as well as the extracellular protein THBS2 which were all down-regulated in the aorta of DHA supplemented mice. These proteins are produced by endothelial cells, monocytes/macrophages and/or platelets [21] and contribute to monocyte adhesion to endothelial cell, a critical step in the initiation and progression of atherosclerosis [22,23]. Whereas these specific proteins have not been all identified previously, several *in vitro* and *ex-vivo* experiments have reported decreased expression of adhesion molecules on the surface of monocytes, macrophages or endothelial cells following exposure to LC- ω 3PUFAs [24,25,26,27,28]. Finally, another remarkable number of down-regulated genes over-represented in our dataset belong to the major histocompatibility complex class II (i.e. HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-DQB1). MHC-II molecules play a critical role in the induction of immune responses by presenting peptides of foreign antigens to CD4⁺ T lymphocytes, which results in their activation and proliferation [29]. A very tight regulation of MHC-II expression is thus crucial for the control of the immune response. This is particularly important in atherogenesis which is characterized by overreactive immune responses. Down-regulation of MHC II molecules by DHA has never been reported at the vascular level before but the group of Hughes reported similar effects in isolated human monocytes exposed to LC- ω 3PUFAs [30] and several animal studies have shown that LC- ω 3PUFAs can inhibit the expression of Ia molecules, the murine equivalent of human MHC class II molecules, at the surface of isolated macrophages [31,32,33]. The

inhibition of antigen presenting function is not expected in host defense but it could be beneficial during atherogenesis by contributing to the resolution of inflammation within the lesion.

Macrophages represent up to 60% of atheromata mass [5] and the importance of macrophage phenotypic modulation in atherosclerosis is now well recognized [34]. Indeed, functional heterogeneity and plasticity is a hallmark of macrophages which can have both pro- and anti-inflammatory properties, as they orchestrate the initiation but also the resolution phases of inflammation. Both M1-pro-inflammatory and M2-reparative macrophages have been identified within atherosclerotic lesion [35] whereas it is important to remind that this two extreme phenotypes as well as intermediate phenotypes and their associated biomarkers can be detected simultaneously *in vivo*. Interestingly, our transcriptomic analysis of aortic gene expression together with the immunofluorescent analysis of macrophage phenotype within aortic root, suggests that DHA supplementation induced a preferential orientation of plaque macrophage towards a M2-like reparative phenotype. Indeed, aorta of DHA supplemented mice showed a reduced mRNA abundance of several recognized biomarkers of M1 pro-inflammatory macrophage (i.e. CCL5, CCR7, molecules of the MHC II as well as LCN2) and a increased mRNA abundance of two M2 biomarkers FABP4 and F13A1 [36,37,38]. These genomic results are very consistent with the higher abundance of Arginase I protein isoform which is a specific biomarker of M2 murine macrophages [6]. Moreover, the upstream regulators the most significantly associated with our dataset included PPAR γ , INF γ as well as NF κ B which are three main transcriptional regulators of macrophage polarization [39] involved in the regulation of expression of most biomarkers reported above. Finally, our results obtained at the vascular level are very consistent with previous findings reported within adipose tissue macrophages showing a switch in macrophage polarization toward an M2-like phenotype in mice supplemented with DHA [7]. Interestingly, these latter study also

reported that resolvin D1, a lipid mediator arising from the LOX-dependent oxidation of DHA [40], could be a key player of this polarization switch.

In conclusion, the findings of the present study show that oral DHA supplementation is associated with substantial modulations of gene expression at the vascular level. These highlighted a main influence on the pathways related to inflammation and innate immunity which could be mediated by a preferential orientation of plaque macrophages toward a M2-like reparative phenotype. This provides a more thorough understanding of the mechanisms of action of DHA and could help to develop targeted strategies that afford even greater therapeutic potential for this LC ω 3-PUFA.

References

- [1] R, D. E. C., Zampolli, A.: Antiatherogenic effects of n-3 fatty acids - evidence and mechanisms, *Heart international*. 2006, 2, 141.
- [2] Ishikado, A., Morino, K., Nishio, Y., Nakagawa, F., Mukose, A., Sono, Y., Yoshioka, N., Kondo, K., Sekine, O., Yoshizaki, T., Ugi, S., Uzu, T., Kawai, H., Makino, T., Okamura, T., Yamamoto, M., Kashiwagi, A., Maegawa, H.: 4-Hydroxy hexenal derived from docosahexaenoic acid protects endothelial cells via Nrf2 activation, *PLoS one*. 2013, 8, e69415.
- [3] Jump, D. B., Depner, C. M., Tripathy, S.: Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease, *Journal of lipid research*. 2012, 53, 2525-2545.
- [4] Shalhoub, J., Falck-Hansen, M. A., Davies, A. H., Monaco, C.: Innate immunity and monocyte-macrophage activation in atherosclerosis, *Journal of inflammation*. 2011, 8, 9.
- [5] Pello, O. M., Silvestre, C., De Pizzol, M., Andres, V.: A glimpse on the phenomenon of macrophage polarization during atherosclerosis, *Immunobiology*. 2011, 216, 1172-1176.
- [6] Khallou-Laschet, J., Varthaman, A., Fornasa, G., Compain, C., Gaston, A. T., Clement, M., Dussiot, M., Levillain, O., Graff-Dubois, S., Nicoletti, A., Caligiuri, G.: Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis, *PLoS one*. 2010, 5, e8852.
- [7] Titos, E., Rius, B., Gonzalez-Periz, A., Lopez-Vicario, C., Moran-Salvador, E., Martinez-Clemente, M., Arroyo, V., Claria, J.: Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype, *Journal of immunology*. 2011, 187, 5408-5418.
- [8] Thies, F., Garry, J. M., Yaqoob, P., Rerkasem, K., Williams, J., Shearman, C. P., Gallagher, P. J., Calder, P. C., Grimble, R. F.: Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial, *Lancet*. 2003, 361, 477-485.
- [9] Wang, S., Wu, D., Matthan, N. R., Lamon-Fava, S., Lecker, J. L., Lichtenstein, A. H.: Reduction in dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid plus docosahexaenoic acid ratio minimizes atherosclerotic lesion formation and inflammatory response in the LDL receptor null mouse, *Atherosclerosis*. 2009, 204, 147-155.
- [10] Nakajima, K., Yamashita, T., Kita, T., Takeda, M., Sasaki, N., Kasahara, K., Shinohara, M., Rikitake, Y., Ishida, T., Yokoyama, M., Hirata, K.: Orally administered eicosapentaenoic acid induces rapid regression of atherosclerosis via modulating the phenotype of dendritic cells in LDL receptor-deficient mice, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011, 31, 1963-1972.
- [11] Matsumoto, M., Sata, M., Fukuda, D., Tanaka, K., Soma, M., Hirata, Y., Nagai, R.: Orally administered eicosapentaenoic acid reduces and stabilizes atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice, *Atherosclerosis*. 2008, 197, 524-533.
- [12] Keophiphath, M., Rouault, C., Divoux, A., Clement, K., Lacasa, D.: CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010, 30, 39-45.
- [13] Moore, K. J., Sheedy, F. J., Fisher, E. A.: Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance, *Nature reviews. Immunology*. 2013, 13, 709-721.
- [14] Eriksson, E. E.: Mechanisms of leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions: future prospects, *Current opinion in lipidology*. 2004, 15, 553-558.
- [15] Huo, Y., Hafezi-Moghadam, A., Ley, K.: Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions, *Circulation research*. 2000, 87, 153-159.
- [16] Luchtefeld, M., Grothusen, C., Gagalick, A., Jagavelu, K., Schuett, H., Tietge, U. J., Pabst, O., Grote, K., Drexler, H., Forster, R., Schieffer, B.: Chemokine receptor 7 knockout attenuates atherosclerotic plaque development, *Circulation*. 2010, 122, 1621-1628.

- [17] Wan, W., Lionakis, M. S., Liu, Q., Roffe, E., Murphy, P. M.: Genetic deletion of chemokine receptor Ccr7 exacerbates atherogenesis in ApoE-deficient mice, *Cardiovascular research*. 2013, *97*, 580-588.
- [18] Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., Lipp, M.: CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs, *Cell*. 1999, *99*, 23-33.
- [19] Tsukamoto, Y., Helsel, W. E., Wahl, S. M.: Macrophage production of fibronectin, a chemoattractant for fibroblasts, *Journal of immunology*. 1981, *127*, 673-678.
- [20] Calder, P. C.: Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?, *British journal of clinical pharmacology*. 2013, *75*, 645-662.
- [21] Jaffe, E. A., Ruggiero, J. T., Falcone, D. J.: Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin, *Blood*. 1985, *65*, 79-84.
- [22] Galkina, E., Ley, K.: Vascular adhesion molecules in atherosclerosis, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007, *27*, 2292-2301.
- [23] Zerneck, A., Shagdarsuren, E., Weber, C.: Chemokines in atherosclerosis: an update, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008, *28*, 1897-1908.
- [24] De Caterina, R., Cybulsky, M. I., Clinton, S. K., Gimbrone, M. A., Jr., Libby, P.: The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells, *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1994, *14*, 1829-1836.
- [25] Weber, C., Erl, W., Pietsch, A., Danesch, U., Weber, P. C.: Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1995, *15*, 622-628.
- [26] Collie-Duguid, E. S., Wahle, K. W.: Inhibitory effect of fish oil N-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of endothelial cell adhesion molecules, *Biochemical and biophysical research communications*. 1996, *220*, 969-974.
- [27] Hughes, D. A., Southon, S., Pinder, A. C.: (n-3) Polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes in vitro, *The Journal of nutrition*. 1996, *126*, 603-610.
- [28] Miles, E. A., Wallace, F. A., Calder, P. C.: Dietary fish oil reduces intercellular adhesion molecule 1 and scavenger receptor expression on murine macrophages, *Atherosclerosis*. 2000, *152*, 43-50.
- [29] Reith, W., Mach, B.: The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression, *Annual review of immunology*. 2001, *19*, 331-373.
- [30] Hughes, D. A., Pinder, A. C.: n-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the antigen-presenting function of human monocytes, *The American journal of clinical nutrition*. 2000, *71*, 357S-360S.
- [31] Kelley, V. E., Ferretti, A., Izui, S., Strom, T. B.: A fish oil diet rich in eicosapentaenoic acid reduces cyclooxygenase metabolites, and suppresses lupus in MRL-lpr mice, *Journal of immunology*. 1985, *134*, 1914-1919.
- [32] Mosquera, J., Rodriguez-Iturbe, B., Parra, G.: Fish oil dietary supplementation reduces la expression in rat and mouse peritoneal macrophages, *Clinical immunology and immunopathology*. 1990, *56*, 124-129.
- [33] Huang, S. C., Misfeldt, M. L., Fritsche, K. L.: Dietary fat influences la antigen expression and immune cell populations in the murine peritoneum and spleen, *The Journal of nutrition*. 1992, *122*, 1219-1231.
- [34] Mantovani, A., Garlanda, C., Locati, M.: Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009, *29*, 1419-1423.
- [35] Bouhrel, M. A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dievart, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., Staels, B., Chinetti-Gbaguidi, G.: PPARgamma activation primes

- human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties, *Cell metabolism*. 2007, *6*, 137-143.
- [36] Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M.: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, *Trends in immunology*. 2004, *25*, 677-686.
- [37] Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., Mantovani, A.: Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression, *Journal of immunology*. 2006, *177*, 7303-7311.
- [38] Benoit, M., Desnues, B., Mege, J. L.: Macrophage polarization in bacterial infections, *Journal of immunology*. 2008, *181*, 3733-3739.
- [39] Lawrence, T., Natoli, G.: Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity, *Nature reviews. Immunology*. 2011, *11*, 750-761.
- [40] Serhan, C. N., Chiang, N., Van Dyke, T. E.: Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators, *Nature reviews. Immunology*. 2008, *8*, 349-361.

Figure legends

Figure 1: Flow chart of the number of genes differentially expressed in the aorta of Control vs DHA mice.

Figure 2: Most significant biological processes affected by DHA supplementation. The list of genes differentially expressed between Control and DHA mice were uploaded in the IPA tool (Ingenuity ® System, www.ingenuity.com) and analyzed based on the Ingenuity Knowledge Base. The significance of the association between the genes list and the function or pathway (p-value) was measured using the right-tailed Fisher's exact test. "Ratio" indicates the number of genes in a given pathway divided by the total number of genes making up the pathway.

Figure 3: Network diagram showing the genes associated with the significantly altered sub-functions related to *Hematological system development and Immune cell trafficking functions*. Ingenuity systems found 55 genes of the dataset associated with the significantly decreased sub-functions.

Figure 4: Network diagram showing the genes of the dataset identified as target genes of PPAR γ , INF γ and/or NF κ B.

Figure 5: Composition of aortic lesions regarding inflammatory and oxidative stress components. A: Immunofluorescence of atherosclerotic lesions from Control and DHA mice ($\times 20$). M \emptyset were identified as Mac3⁺ (red) cells, Type M2 reparative macrophages were identified as Arginase 1⁺ (green) and level of LDL oxidation was identified as oxLDL⁺ (green). The up 4 images represent merge images overlaying either Arginase 1/Mac3/DAPI (left) or oxLDL/Mac3/DAPI (right). Lesion surface was delimited on each image based on the staining of Mac3 using the ROI Manager tool in the ImageJ free software

(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The intensity of each staining is relative to the lesion surface ; B: Intensity of staining of macrophages (Mac3) relative to lesion surface in Control and DHA supplemented mice ; C: Intensity of staining of type M2 macrophages (ArgI) relative to lesion surface in Control and DHA supplemented mice ; D: Intensity of staining of oxidized LDL (oxLDL) relative to lesion surface in Control and DHA supplemented mice. Student t test were performed to compare the intensity of staining relative to the lesion surface between the Control (n=8, 3 random fields/plaque) and the DHA mice (n=8, 3 random fields/section), ** p<0.01.

Table legends

Table 1: Significantly altered sub-functions. Ingenuity systems found 70 sub-functions in the *Hematological system development* function and 51 sub-functions in the *Immune cell trafficking* function. Fourteen sub-unctions were found to be significantly decreased (i.e. z-score ≤ -2). IPA Downstream Effects Analysis identifies functions that are expected to increase or decrease, given the observed gene expression changes the experimental dataset. Downstream Effects Analysis is based on expected causal effects between genes and functions; the expected causal effects are derived from the literature compiled in the Ingenuity® Knowledge Base. The analysis examines genes in the dataset that are known to affect functions, compares the genes' direction of change to expectations derived from the literature, then issues a prediction for each function based on the direction of change. IPA uses the regulation z-score algorithm to make predictions. The z-score algorithm is designed to reduce the chance that random data will generate significant predictions. A negative z-score ≤ -2 means that the sub-function is statistically significantly decreased.

Table 2: Genes associated with the top 5 canonical pathways.

Table 3: Most significant upstream regulators associated with the dataset

Supplemental table legends

Table I: List of genes involved in the 50 common sub-functions between *the Hematological system development* and *Immune cell trafficking* functions.

Table II: Genes associated with the activation of PPAR γ and the inhibition of INF γ and NF κ B

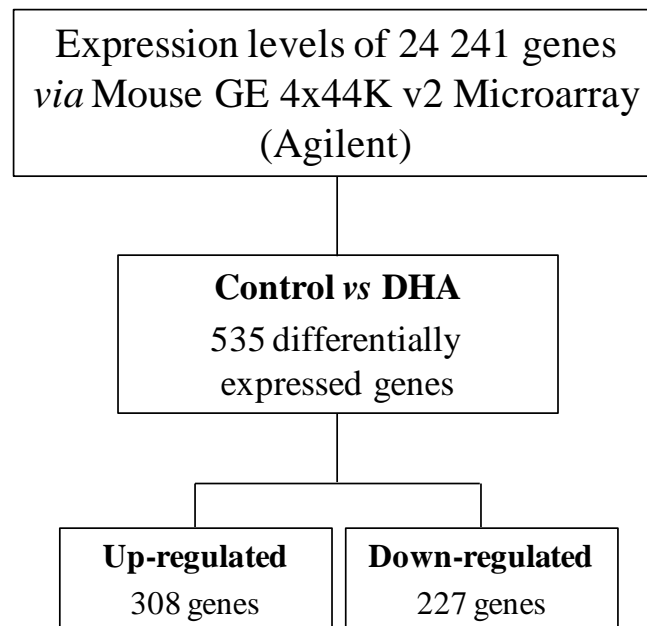
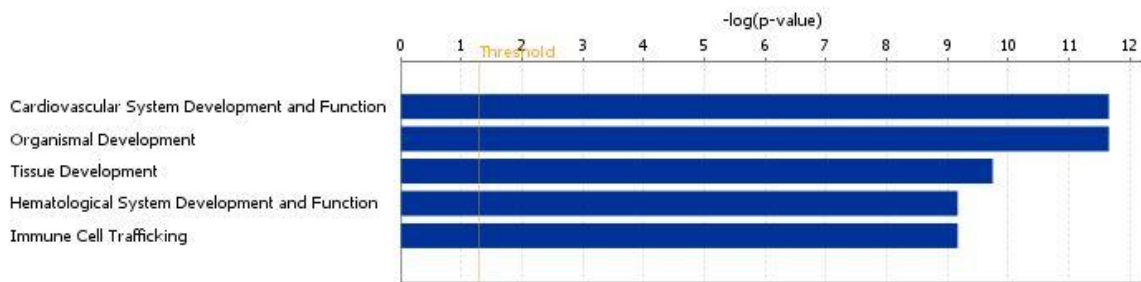
Figure 1

Figure 2

A. Top five biological functions



B. Top five canonical pathways

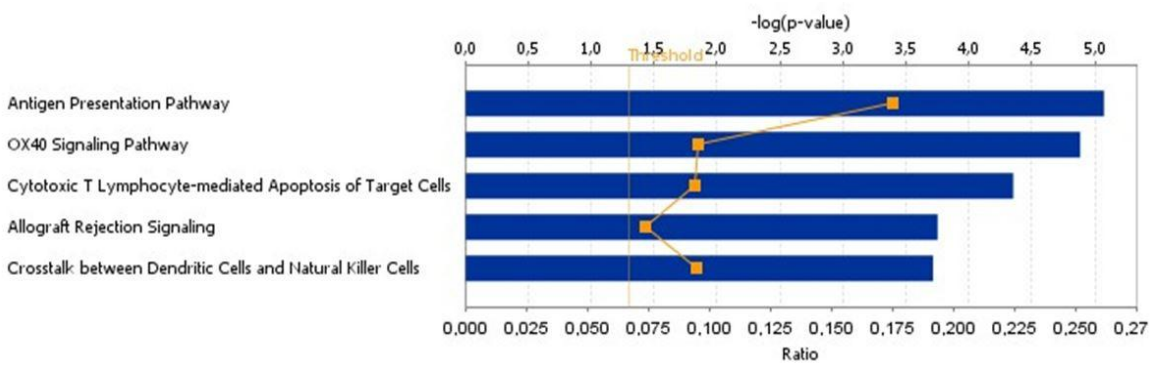


Figure 3

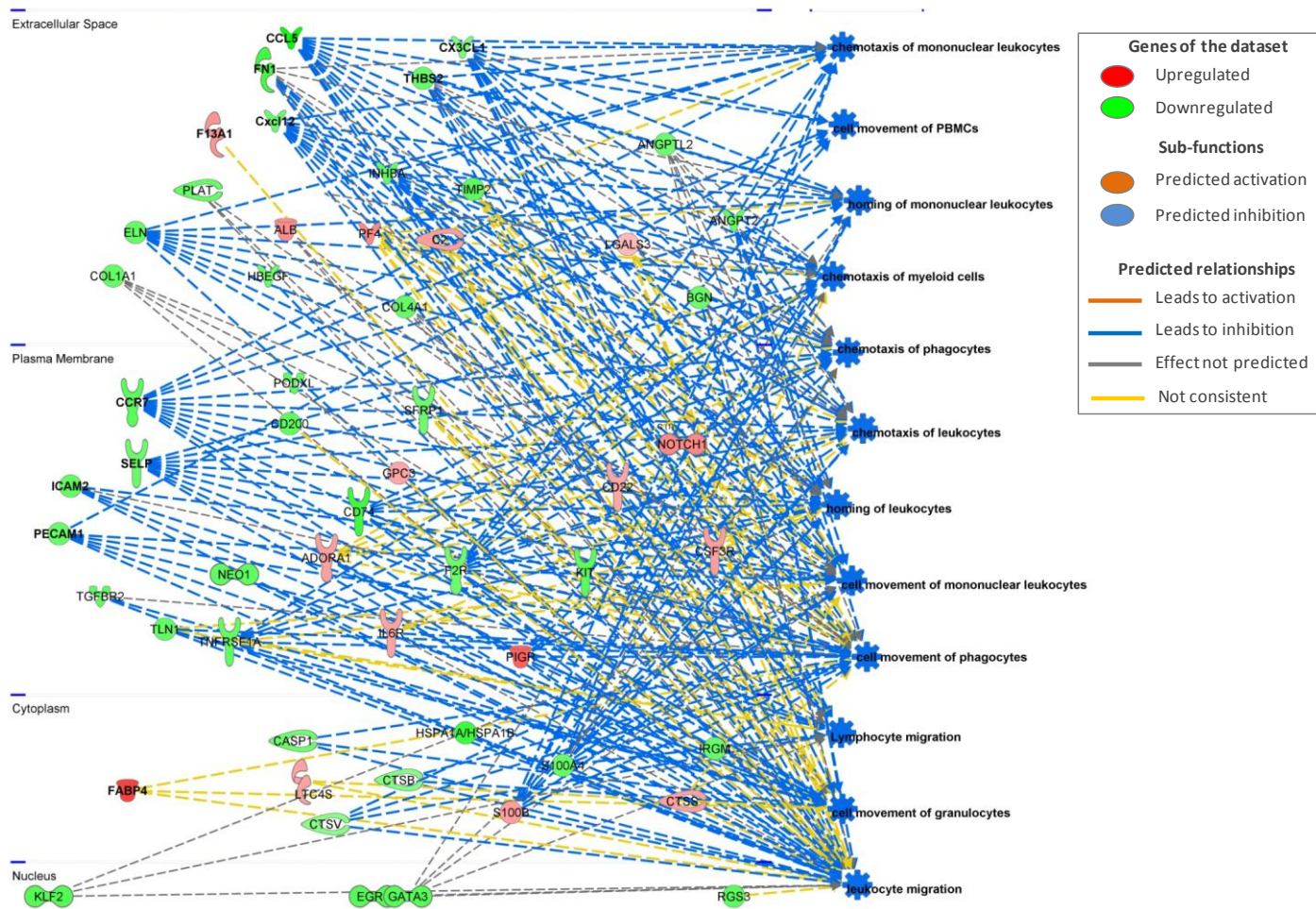


Figure 4

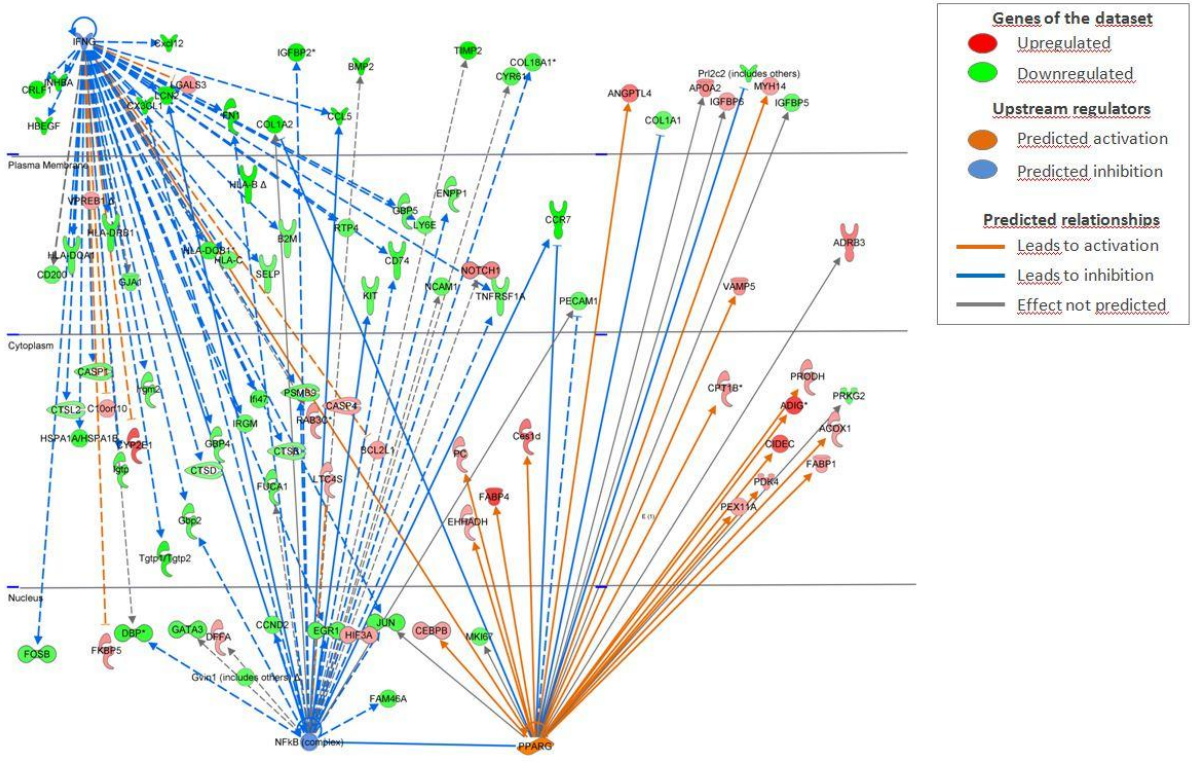
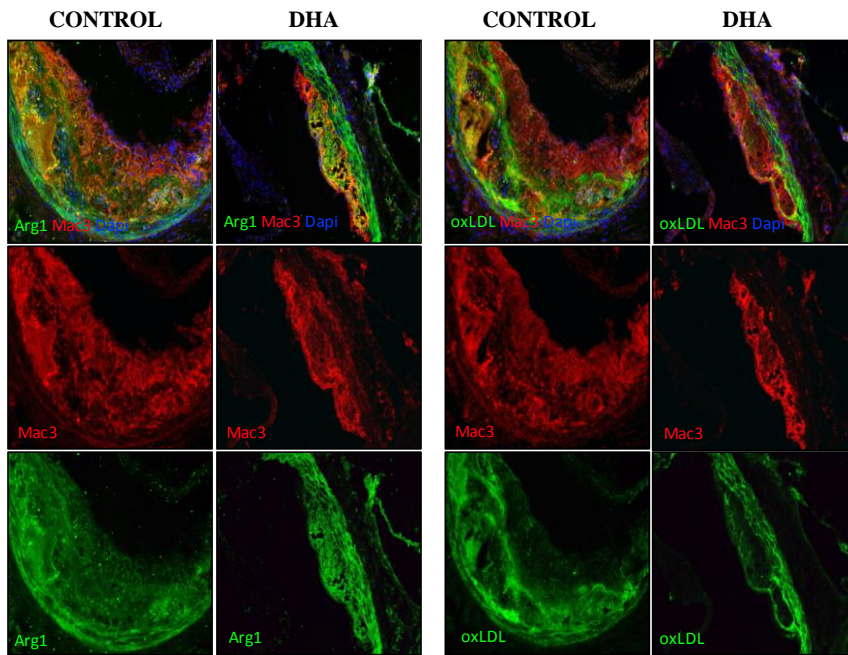
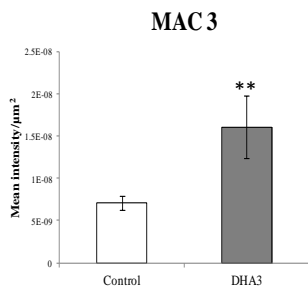


Figure 5

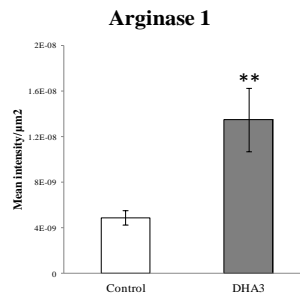
A



B



C



D

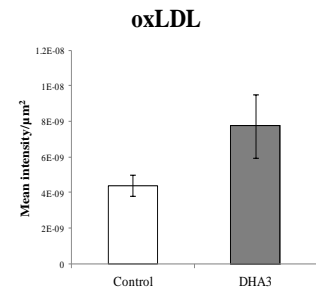


Table 1

| Sub-functions Annotation | Activation z-score |
|--|--------------------|
| cell movement of myeloid cells | -2.87 |
| cell movement of leukocytes | -2.58 |
| cell movement of peripheral blood leukocytes | -2.58 |
| cell movement of granulocytes | -2.54 |
| cell movement of PBMCs | -2.39 |
| cell movement of mononuclear leukocytes | -2.31 |
| cell movement of phagocytes | -2.26 |
| Lymphocyte migration | -2.24 |
| chemotaxis of mononuclear leukocytes | -2.22 |
| chemotaxis of phagocytes | -2.20 |
| homing of mononuclear leukocytes | -2.20 |
| chemotaxis of myeloid cells | -2.12 |
| chemotaxis of leukocytes | -2.02 |
| homing of leukocytes | -2.00 |

Table 2

| Gene Symbol | Gene Name | Entrez Gene | Fold Change | Type(s) |
|-------------------------------------|---|-------------|-------------|------------------------|
| Antigen presentation pathway | | | | |
| B2M | beta-2-microglobulin | 12010 | -1.301 | transmembrane receptor |
| CD74 | CD74 molecule. major histocompatibility complex. class II | 16149 | -1.671 | transmembrane receptor |
| HLA-B | -- | 15018 | -1.291 | transmembrane receptor |
| HLA-C | major histocompatibility complex. class I. C | 14972 | -1.240 | other |
| HLA-DQA1 | major histocompatibility complex. class II. DQ alpha 1 | 14960 | -1.499 | transmembrane receptor |
| HLA-DRB1 | major histocompatibility complex. class II. DR beta 1 | 14969 | -1.690 | transmembrane receptor |
| PSMB9 | proteasome (prosome. macropain) subunit. beta type. 9 | 16912 | -1.294 | peptidase |
| Ox40 Signaling pathway | | | | |
| B2M | beta-2-microglobulin | 12010 | -1.301 | transmembrane receptor |
| BCL2L1 | BCL2-like 1 | 12048 | 1.493 | other |
| H2-Q8 | histocompatibility 2. Q region locus 8 | 15019 | -1.431 | other |
| HLA-B | -- | 15018 | -1.291 | transmembrane receptor |
| HLA-C | major histocompatibility complex. class I. C | 14972 | -1.240 | other |
| HLA-DQA1 | major histocompatibility complex. class II. DQ alpha 1 | 14960 | -1.499 | transmembrane receptor |

| | | | | |
|----------|---|-------|--------|-------------------------|
| HLA-DQB1 | major histocompatibility complex. class II. DQ beta 1 | 14961 | -1.675 | other |
| HLA-DRB1 | major histocompatibility complex. class II. DR beta 1 | 14969 | -1.690 | transmembrane receptor |
| JUN | jun proto-oncogene | 16476 | -1.525 | transcription regulator |

Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target cells

| | | | | |
|----------|--|-------|--------|------------------------|
| B2M | beta-2-microglobulin | 12010 | -1.301 | transmembrane receptor |
| DFFA | DNA fragmentation factor. 45kDa. alpha polypeptide | 13347 | 1.461 | enzyme |
| H2-Q8 | histocompatibility 2. Q region locus 8 | 15019 | -1.431 | other |
| HLA-B | -- | 15018 | -1.291 | transmembrane receptor |
| HLA-C | major histocompatibility complex. class I. C | 14972 | -1.240 | other |
| HLA-DQA1 | major histocompatibility complex. class II. DQ alpha 1 | 14960 | -1.499 | transmembrane receptor |
| HLA-DQB1 | major histocompatibility complex. class II. DQ beta 1 | 14961 | -1.675 | other |
| HLA-DRB1 | major histocompatibility complex. class II. DR beta 1 | 14969 | -1.690 | transmembrane receptor |

Allograft Rejection Signaling

| | | | | |
|-------|--|-------|--------|------------------------|
| B2M | beta-2-microglobulin | 12010 | -1.301 | transmembrane receptor |
| H2-Q8 | histocompatibility 2. Q region locus 8 | 15019 | -1.431 | other |
| HLA-B | -- | 15018 | -1.291 | transmembrane receptor |
| HLA-C | major histocompatibility complex. class I. C | 14972 | -1.240 | other |

| | | | | |
|----------|--|-------|--------|------------------------|
| HLA-DQA1 | major histocompatibility complex. class II. DQ alpha 1 | 14960 | -1.499 | transmembrane receptor |
| HLA-DQB1 | major histocompatibility complex. class II. DQ beta 1 | 14961 | -1.675 | other |
| HLA-DRB1 | major histocompatibility complex. class II. DR beta 1 | 14969 | -1.690 | transmembrane receptor |

**Crosstalk between dendritic cells
and Natural killer cells**

| | | | | |
|----------|---|-------|--------|----------------------------|
| ACTA1 | actin. alpha 1. skeletal muscle | 11459 | -1.314 | other |
| ACTG1 | actin. gamma 1 | 11465 | -1.315 | other |
| ACTG2 | actin. gamma 2. smooth muscle. enteric | 11468 | -1.394 | other |
| CCR7 | chemokine (C-C motif) receptor 7 | 12775 | -1.425 | G-protein coupled receptor |
| HLA-B | -- | 15018 | -1.291 | transmembrane receptor |
| HLA-C | major histocompatibility complex. class I. C | 14972 | -1.240 | other |
| HLA-DRB1 | major histocompatibility complex. class II. DR beta 1 | 14969 | -1.690 | transmembrane receptor |
| IL2RG | interleukin 2 receptor. gamma | 16186 | -1.253 | transmembrane receptor |
| TLN1 | taln 1 | 21894 | -1.324 | other |

Table 3

A. List of the most significant activated upstream regulators

| Upstream Regulator | Activation z-score | p-value of overlap |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|
| PPARG | 2,367 | 1,50E-13 |
| PPARA | 2,384 | 6,45E-10 |
| PPARD | 3,160 | 1,56E-08 |
| estrogen receptor | 2,688 | 2,50E-07 |
| PPAR α -RXR α | 2,000 | 4,42E-04 |
| RXRA | 2,068 | 7,05E-03 |
| ESRRA | 2,414 | 8,68E-02 |

B. List of the most significant inhibited upstream regulators

| Upstream Regulator | Activation z-score | p-value of overlap |
|--------------------|--------------------|--------------------|
| IFNG | -2,797 | 2,81E-14 |
| NFkB (complex) | -2,360 | 6,32E-09 |
| PRL | -2,153 | 1,07E-08 |
| IL6 | -2,226 | 7,88E-07 |
| IL27 | -2,613 | 1,26E-06 |
| Pdgf (complex) | -2,574 | 4,99E-05 |
| PDGF BB | -2,009 | 1,40E-04 |
| TCR | -2,416 | 1,75E-04 |
| Interferon alpha | -2,771 | 4,23E-04 |
| IFN alpha/beta | -2,156 | 7,53E-04 |
| CCL13 | -2,425 | 2,30E-03 |
| EBI3 | -2,177 | 3,55E-03 |
| EDN1 | -2,672 | 3,74E-03 |

SUPPLEMENTAL FILE

Table I

| Symbol | Entrez Gene Name | Entrez Gene ID | Fold Change | Type(s) |
|---------------|---|-----------------------|--------------------|-----------------------------------|
| HLA-DRB1 | major histocompatibility complex. class II. DR beta 1 | 14969 | -1.69 | transmembrane receptor |
| HLA-DQB1 | major histocompatibility complex. class II. DQ beta 1 | 14961 | -1.675 | other |
| CD74 | CD74 molecule. major histocompatibility complex. class II invariant chain | 16149 | -1.671 | transmembrane receptor |
| HSPA1A/HSPA1B | heat shock 70kDa protein 1A | 193740 | -1.664 | other |
| FN1 | fibronectin 1 | 14268 | -1.634 | enzyme |
| NR4A1 | nuclear receptor subfamily 4. group A. member 1 | 15370 | -1.544 | ligand-dependent nuclear receptor |
| COL18A1 | collagen. type XVIII. alpha 1 | 12822 | -1.526 | other |
| HLA-DQA1 | major histocompatibility complex. class II. DQ alpha 1 | 14960 | -1.499 | transmembrane receptor |
| CCL5 | chemokine (C-C motif) ligand 5 | 20304 | -1.489 | cytokine |
| LCN2 | lipocalin 2 | 16819 | -1.47 | transporter |
| KLF2 | Kruppel-like factor 2 (lung) | 16598 | -1.449 | transcription regulator |
| GATA3 | GATA binding protein 3 | 14462 | -1.442 | transcription regulator |
| EGR1 | early growth response 1 | 13653 | -1.439 | transcription regulator |

| | | | | |
|----------|--|--------|--------|----------------------------|
| CCR7 | chemokine (C-C motif) receptor 7 | 12775 | -1.425 | G-protein coupled receptor |
| RGS3 | regulator of G-protein signaling 3 | 50780 | -1.398 | other |
| KIT | v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog | 16590 | -1.392 | kinase |
| TIMP2 | TIMP metalloproteinase inhibitor 2 | 21858 | -1.388 | other |
| TGFBR2 | transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) | 21813 | -1.38 | kinase |
| NOTCH2 | notch 2 | 18129 | -1.366 | transcription regulator |
| INHBA | inhibin, beta A | 16323 | -1.351 | growth factor |
| NEO1 | neogenin 1 | 18007 | -1.349 | transcription regulator |
| PODXL | podocalyxin-like | 27205 | -1.347 | kinase |
| ICAM2 | intercellular adhesion molecule 2 | 15896 | -1.343 | other |
| CD200 | CD200 molecule | 17470 | -1.342 | other |
| CARD11 | -- | 108723 | -1.337 | kinase |
| TNFRSF1A | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A | 21937 | -1.337 | transmembrane receptor |
| ANGPT2 | angiopoietin 2 | 11601 | -1.332 | growth factor |
| GZMA | granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3) | 14938 | -1.325 | peptidase |
| TLN1 | talin 1 | 21894 | -1.324 | other |
| CLEC7A | C-type lectin domain family 7, member A | 56644 | -1.322 | transmembrane receptor |
| PLAT | plasminogen activator, tissue | 18791 | -1.316 | peptidase |

| | | | | |
|---------|--|--------|--------|----------------------------|
| COL1A1 | collagen. type I. alpha 1 | 12842 | -1.306 | other |
| ELN | elastin | 13717 | -1.301 | other |
| B2M | beta-2-microglobulin | 12010 | -1.301 | transmembrane receptor |
| S100A4 | S100 calcium binding protein A4 | 20198 | -1.298 | other |
| LTBP1 | latent transforming growth factor beta binding protein 1 | 268977 | -1.297 | other |
| SELP | selectin P (granule membrane protein 140kDa. antigen CD62) | 20344 | -1.297 | other |
| COL4A1 | collagen. type IV. alpha 1 | 12826 | -1.294 | other |
| PSMB9 | proteasome (prosome. macropain) subunit. beta type. 9 | 16912 | -1.294 | peptidase |
| THBS2 | thrombospondin 2 | 21826 | -1.287 | other |
| Cxcl12 | chemokine (C-X-C motif) ligand 12 | 20315 | -1.286 | cytokine |
| PECAM1 | platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 | 18613 | -1.284 | other |
| IRGM | immunity-related GTPase family. M | 15944 | -1.283 | other |
| POSTN | periostin. osteoblast specific factor | 50706 | -1.275 | other |
| F2R | coagulation factor II (thrombin) receptor | 14062 | -1.263 | G-protein coupled receptor |
| ANGPTL2 | angiopoietin-like 2 | 26360 | -1.256 | other |
| BGN | biglycan | 12111 | -1.255 | other |
| IL2RG | interleukin 2 receptor. gamma | 16186 | -1.253 | transmembrane receptor |
| SFRP1 | secreted frizzled-related protein 1 | 20377 | -1.253 | transmembrane receptor |

| | | | | |
|--------|---|-------|--------|----------------------------|
| CASP1 | caspase 1. apoptosis-related cysteine peptidase | 12362 | -1.246 | peptidase |
| HLA-C | major histocompatibility complex. class I. C | 14972 | -1.24 | other |
| CX3CL1 | chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 | 20312 | -1.121 | cytokine |
| CTSB | cathepsin B | 13030 | -1.063 | peptidase |
| CTSL2 | cathepsin L2 | 13039 | -1.01 | peptidase |
| LGALS3 | lectin. galactoside-binding. soluble. 3 | 16854 | 1.063 | other |
| APOA1 | -- | 11806 | 1.37 | transporter |
| GPC3 | glypican 3 | 14734 | 1.373 | other |
| CD22 | CD22 molecule | 12483 | 1.382 | transmembrane receptor |
| LIF | leukemia inhibitory factor | 16878 | 1.409 | cytokine |
| LTC4S | leukotriene C4 synthase | 17001 | 1.435 | enzyme |
| IL6R | interleukin 6 receptor | 16194 | 1.437 | transmembrane receptor |
| CTSS | cathepsin S | 13040 | 1.461 | peptidase |
| CXCL11 | -- | 56066 | 1.486 | cytokine |
| ADORA1 | adenosine A1 receptor | 11539 | 1.486 | G-protein coupled receptor |
| BCL2L1 | BCL2-like 1 | 12048 | 1.493 | other |
| S100B | S100 calcium binding protein B | 20203 | 1.503 | other |
| C2 | complement component 2 | 12263 | 1.511 | peptidase |

| | | | | |
|---------|--|--------|-------|-------------------------|
| CSF3R | colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte) | 12986 | 1.511 | transmembrane receptor |
| APOC3 | -- | 11814 | 1.608 | transporter |
| CD244 | CD244 molecule. natural killer cell receptor 2B4 | 18106 | 1.618 | transmembrane receptor |
| TRIO | -- | 223435 | 1.634 | kinase |
| F13A1 | coagulation factor XIII. A1 polypeptide | 74145 | 1.649 | enzyme |
| BLOC1S3 | biogenesis of lysosomal organelles complex-1. subunit 3 | 232946 | 1.689 | other |
| SNCA | synuclein. alpha (non A4 component of amyloid precursor) | 20617 | 1.741 | other |
| GC | group-specific component (vitamin D binding protein) | 14473 | 1.764 | transporter |
| ALB | albumin | 11657 | 1.78 | transporter |
| NOTCH1 | notch 1 | 18128 | 1.849 | transcription regulator |
| PF4 | platelet factor 4 | 56744 | 1.858 | cytokine |
| KNG1 | -- | 16644 | 2.038 | other |
| PIGR | polymeric immunoglobulin receptor | 18703 | 2.488 | transporter |
| LGALS4 | lectin. galactoside-binding. soluble. 4 | 16855 | 2.535 | other |
| Klra4 | -- | 16627 | 2.863 | transmembrane receptor |
| FABP4 | fatty acid binding protein 4. adipocyte | 11770 | 2.963 | transporter |

Table II

| Symbol | Entrez Gene Name | Entrez Gene ID | Fold Change | Family |
|--------------------------|---|---------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| IGFBP2 | insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa | 16008 | -2.01 | other |
| Tgtp1/Tgtp2 | T cell specific GTPase 1 | 100039796 | -1.89 | enzyme |
| HLA-DRB1 | major histocompatibility complex, class II, DR beta 1 | 14969 | -1.69 | transmembrane receptor |
| HLA-DQB1 | major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1 | 14961 | -1.67 | other |
| DBP | D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein | 13170 | -1.67 | transcription regulator |
| CD74 | CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain | 16149 | -1.67 | transmembrane receptor |
| HSPA1A/HSPA1B | heat shock 70kDa protein 1A | 193740 | -1.66 | other |
| FN1 | fibronectin 1 | 14268 | -1.63 | enzyme |
| FAM46A | family with sequence similarity 46, member A | 212943 | -1.57 | other |
| CRLF1 | cytokine receptor-like factor 1 | 12931 | -1.56 | other |
| NR4A1 | nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 | 15370 | -1.54 | ligand-dependent nuclear receptor |
| Prl2c2 (includes others) | prolactin family 2, subfamily c, member 2 | 666317 | -1.53 | growth factor |
| COL18A1 | collagen, type XVIII, alpha 1 | 12822 | -1.53 | other |
| CYR61 | cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 | 16007 | -1.53 | other |
| JUN | jun proto-oncogene | 16476 | -1.52 | transcription regulator |
| Igtp | interferon gamma induced GTPase | 16145 | -1.52 | enzyme |

| | | | | |
|----------|---|--------|-------|----------------------------|
| HLA-DQA1 | major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1 | 14960 | -1.50 | transmembrane receptor |
| CCL5 | chemokine (C-C motif) ligand 5 | 20304 | -1.49 | cytokine |
| LCN2 | lipocalin 2 | 16819 | -1.47 | transporter |
| CDKN1C | cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2) | 12577 | -1.46 | other |
| Ifi47 | interferon gamma inducible protein 47 | 15953 | -1.46 | other |
| Gbp2 | guanylate binding protein 2 | 14469 | -1.45 | enzyme |
| ARC | activity-regulated cytoskeleton-associated protein | 11838 | -1.44 | other |
| GATA3 | GATA binding protein 3 | 14462 | -1.44 | transcription regulator |
| EGR1 | early growth response 1 | 13653 | -1.44 | transcription regulator |
| FOSB | FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B | 14282 | -1.43 | transcription regulator |
| CCR7 | chemokine (C-C motif) receptor 7 | 12775 | -1.42 | G-protein coupled receptor |
| IRS1 | insulin receptor substrate 1 | 16367 | -1.40 | enzyme |
| GBP5 | guanylate binding protein 5 | 229898 | -1.40 | enzyme |
| KIT | v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog | 16590 | -1.39 | transmembrane receptor |
| TIMP2 | TIMP metalloproteinase inhibitor 2 | 21858 | -1.39 | other |
| FUCA1 | fucosidase, alpha-L- 1, tissue | 71665 | -1.38 | enzyme |
| COL1A2 | collagen, type I, alpha 2 | 12843 | -1.37 | other |
| Irgm2 | immunity-related GTPase family M member 2 | 54396 | -1.36 | enzyme |
| INHBA | inhibin, beta A | 16323 | -1.35 | growth factor |

| | | | | |
|----------|--|-------|-------|------------------------|
| CCND2 | cyclin D2 | 12444 | -1.35 | other |
| NCAM1 | neural cell adhesion molecule 1 | 17967 | -1.35 | other |
| GBP4 | guanylate binding protein 4 | 55932 | -1.34 | enzyme |
| CD200 | CD200 molecule | 17470 | -1.34 | other |
| ENPP1 | ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 | 18605 | -1.34 | enzyme |
| TNFRSF1A | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A | 21937 | -1.34 | transmembrane receptor |
| GJA1 | gap junction protein, alpha 1, 43kDa | 14609 | -1.33 | transporter |
| LY6E | lymphocyte antigen 6 complex, locus E | 17069 | -1.32 | other |
| RTP4 | receptor (chemosensory) transporter protein 4 | 67775 | -1.32 | other |
| COL1A1 | collagen, type I, alpha 1 | 12842 | -1.31 | other |
| TPM2 | tropomyosin 2 (beta) | 22004 | -1.30 | other |
| B2M | beta-2-microglobulin | 12010 | -1.30 | transmembrane receptor |
| SELP | selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62) | 20344 | -1.30 | transmembrane receptor |
| MKI67 | antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 | 17345 | -1.29 | other |
| PSMB9 | proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 | 16912 | -1.29 | peptidase |
| HBEGF | heparin-binding EGF-like growth factor | 15200 | -1.29 | growth factor |
| Cxcl12 | chemokine (C-X-C motif) ligand 12 | 20315 | -1.29 | cytokine |
| PECAM1 | platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 | 18613 | -1.28 | other |
| CDH13 | cadherin 13, H-cadherin (heart) | 12554 | -1.28 | other |

| | | | | |
|----------|--|--------|-------|-------------------------|
| IRGM | immunity-related GTPase family, M | 15944 | -1.28 | other |
| BMP2 | bone morphogenetic protein 2 | 12156 | -1.28 | growth factor |
| PRKG2 | protein kinase, cGMP-dependent, type II | 19092 | -1.27 | kinase |
| IGFBP5 | insulin-like growth factor binding protein 5 | 16011 | -1.26 | other |
| CASP1 | caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase | 12362 | -1.25 | peptidase |
| HLA-C | major histocompatibility complex, class I, C | 14972 | -1.24 | other |
| CX3CL1 | chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 | 20312 | -1.12 | cytokine |
| CTSB | cathepsin B | 13030 | -1.06 | peptidase |
| CTSD | cathepsin D | 13033 | -1.04 | peptidase |
| CTSL2 | cathepsin L2 | 13039 | -1.01 | peptidase |
| LGALS3 | lectin, galactoside-binding, soluble, 3 | 16854 | 1.06 | other |
| PEX11A | peroxisomal biogenesis factor 11 alpha | 18631 | 1.37 | other |
| EHHADH | enoyl-CoA, hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase | 74147 | 1.37 | enzyme |
| CHAC1 | ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli) | 69065 | 1.38 | other |
| CLEC2D | C-type lectin domain family 2, member D | 93694 | 1.40 | transmembrane receptor |
| C10orf10 | chromosome 10 open reading frame 10 | 213393 | 1.41 | other |
| CEBPB | CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta | 12608 | 1.41 | transcription regulator |
| HIF3A | hypoxia inducible factor 3, alpha subunit | 53417 | 1.42 | transcription regulator |
| LTC4S | leukotriene C4 synthase | 17001 | 1.43 | enzyme |

| | | | | |
|---------|--|-------|------|-------------------------|
| IL6R | interleukin 6 receptor | 16194 | 1.44 | transmembrane receptor |
| CASP4 | caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase | 12363 | 1.44 | peptidase |
| CTSS | cathepsin S | 13040 | 1.46 | peptidase |
| DFFA | DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide | 13347 | 1.46 | enzyme |
| FABP1 | fatty acid binding protein 1, liver | 14080 | 1.47 | transporter |
| IGFBP6 | insulin-like growth factor binding protein 6 | 16012 | 1.49 | other |
| BCL2L1 | BCL2-like 1 | 12048 | 1.49 | other |
| MYH14 | myosin, heavy chain 14, non-muscle | 71960 | 1.50 | other |
| ACOX1 | acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl | 11430 | 1.50 | enzyme |
| TSC22D3 | TSC22 domain family, member 3 | 14605 | 1.51 | transcription regulator |
| DDX5 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 5 | 13207 | 1.54 | enzyme |
| PC | pyruvate carboxylase | 18563 | 1.56 | enzyme |
| PDK4 | pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4 | 27273 | 1.60 | kinase |
| PRODH | proline dehydrogenase (oxidase) 1 | 19125 | 1.62 | enzyme |
| RAB3C | RAB3C, member RAS oncogene family | 67295 | 1.64 | enzyme |
| CPT1B | carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle) | 12895 | 1.67 | enzyme |
| VAMP5 | vesicle-associated membrane protein 5 | 53620 | 1.76 | transporter |
| FKBP5 | FK506 binding protein 5 | 14229 | 1.77 | enzyme |
| APOA2 | apolipoprotein A-II | 11807 | 1.77 | transporter |

| | | | | |
|------------------------|---|--------|------|----------------------------|
| NOTCH1 | notch 1 | 18128 | 1.85 | transcription regulator |
| PF4 | platelet factor 4 | 56744 | 1.86 | cytokine |
| ADRB3 | adrenoceptor beta 3 | 11556 | 2.04 | G-protein coupled receptor |
| ANGPTL4 | angiopoietin-like 4 | 57875 | 2.11 | other |
| Ces1d | carboxylesterase 1D | 104158 | 2.19 | enzyme |
| PIGR | polymeric immunoglobulin receptor | 18703 | 2.49 | transporter |
| CIDEC | cell death-inducing DFFA-like effector c | 14311 | 2.54 | other |
| CYP2E1 | cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1 | 13106 | 2.68 | enzyme |
| Gbp6 (includes others) | guanylate binding protein 6 | 100702 | 2.69 | enzyme |
| ADIG | adipogenin | 246747 | 2.88 | other |
| FABP4 | fatty acid binding protein 4, adipocyte | 11770 | 2.96 | transporter |

Résultats

Deuxième Partie

**Evaluer spécifiquement la bioactivité de certains métabolites issus
de la peroxydation du DHA**

Publication n°3

Neuroprostanes derived from the docosahexaenoic acid peroxidation exert an anti-inflammatory action on human macrophages

Laurie Joumard-Cubizolles¹, Cécile Gladine¹, Dominique Bayle¹, Nathalie Hennuyer², Giuseppe Zanoni³, Giulia Chinetti², Andrzej Mazur¹

Affiliation:

(1) INRA, UMR1019, UNH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France

(2) INSERM U1011, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

(3) Department of Organic Chemistry, University of Pavia, Viale Taramelli, 10-27100 Pavia, Italy

***Corresponding author:**

Dr Cécile Gladine

UMR 1019 INRA / Clermont Université

Centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix

63 122 Saint Genès Champanelle

Phone: +33 4 73 62 42 30, Fax: +33 4 73 62 46 38

Email: cecile.gladine@clermont.inra.fr

Article en préparation

Abbreviations

14-A₄-NeuroP: 14-A₄-Neuroprostane, **BSA**: bovine serum albumin, **CCL-3**: chemokine (C-C motif) ligand 3, **COX-2**: cyclooxygenase-2, **CuSO₄**: cupric sulfate, ΔC_t : delta threshold cycle, **DHA**: docosahexaenoic acid, **DMEM**: dulbecco's modified eagle medium, **DMSO**: dimethyl sulfoxide, **ELISA**: enzyme linked immunosorbent assay, **EPA**: eicosapentaenoic acid, **F₄-NeuroP**: F₄-Neuroprostane, **FCS**: fetal calf serum, **HUVEC**: human umbilical vein endothelial cells, **IL-1 β** : interleukin 1-beta, **IL-6**: interleukin-6, **iNOS**: inducible nitric oxide synthase, **I κ B α** : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha, **IKK**: I κ B kinase, **LC- ω 3-PUFA**: long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids, **LDLR^{-/-}**: low density lipoprotein receptor deficient, **LPS**: lipopolysaccharide, **MCP-1**: monocyte chemotactic protein-1, **NF κ B**: nuclear factor kappa B, **PBS**: phosphate-buffered saline, **PBMC**: peripheral blood mononuclear cells, **PPAR α / γ** : peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma, **qRT-PCR**: quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, **RM**: resting macrophages, **RPMI**: roswell park memorial institute medium, **SAEC**: swine aortic endothelial cells, **SD**: standard deviation, **TBST**: tris-buffered saline-tween-20, **TNF α** : tumor necrosis factor alpha.

Abstract

The long chain omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) exerts potent anti-inflammatory effects but the molecular mechanisms responsible of these effects remain unclear. DHA is highly prone to lipid peroxidation leading to production of several potentially bioactive metabolites which could contribute to the anti-inflammatory properties of DHA. The neuroprostanes, are a class of metabolites previously identified as the major products of DHA lipid peroxidation. The present study was designed to investigate anti-inflammatory properties of neuroprostanes in human macrophages *in vitro*.

Primary human macrophages, before their LPS-stimulation aiming to induce inflammatory response, were pretreated with 10 μ M 14-A₄-Neuroprostane or 4-F_{4t}-Neuroprostane, specific peroxidation products of DHA. The pro-inflammatory mediators' expression and secretion were determined by qRT-PCR and ELISA test. In addition, molecular mechanisms of their action were examined at the PPAR α and γ and NF κ B level.

The results indicate that both 14-A₄ and 4-F_{4t}-Neuroprostanes decreased LPS-induced pro-inflammatory cytokines and chemokines mRNA levels and secretion. Their anti-inflammatory action appears independent of PPAR α and γ but is related to the NF κ B signaling pathway.

In summary, we have demonstrated, for the first time, that 4-F_{4t}-Neuroprostane could contribute partly to the anti-inflammatory effect of DHA. DHA could exert its anti-inflammatory effects *via* its metabolites derived from lipid peroxidation.

Keywords: omega-3 fatty acids / docosahexaenoic acid / lipid peroxidation /neuroprostane/ anti-inflammatory

Introduction

The long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (LC- ω 3PUFAs), including eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids (EPA and DHA), exert potent anti-inflammatory effects [1]. These effects are attributable to the regulation of immune cell chemotaxis and to the moderation of their pro-inflammatory activity. For instance, several *in vitro* experiments involving treatment of immune cell with LC- ω 3PUFAs showed significant reduction of chemoattractant production, such as leukotriene B4 [2,3]. Treatment with LC- ω 3PUFAs have also been associated with reduced levels of several pro-inflammatory cytokines and chemokines including TNF α , IL-1 β , IL-6 or MCP-1 [4,5,6,7]. The molecular mechanisms responsible for these effects are not completely elucidated but several lines of evidence suggest that LC- ω 3PUFAs are probably not the major bioactive molecules and their oxygenated metabolites could play a significant role in the anti-inflammatory actions of LC- ω 3PUFAs [8]. We have focused on DHA non-enzymatic oxidation or peroxidation products because DHA is the most peroxidizable PUFA. Indeed, its chemical structure strongly predisposes this fatty acid to free radical attacks [9]. In addition, DHA is a poor substrate for cyclooxygenases and lipoxygenases to generate enzymatic metabolites [10] suggesting that peroxidation could be a mandatory for makes it bioactive. Furthermore, Sethi *et al.*, demonstrated that oxidized DHA (by CuSO₄/ascorbate), but not native DHA, led to the reduction of the adhesion of monocytes U937 to endothelial human cells [8]. Later, Musiek *et al.*, have shown that, another metabolite generated by DHA, 14-A₄-Neuroprostane (14-A₄-NeuroP) exerts an anti-inflammatory effects by a reduction of expression of pro-inflammatory mediators at post-transcriptional level (COX-2, iNOS) on murine RAW macrophages pretreated with this compound [11]. Currently, this study represents the base of knowledge of 14-A₄-NeuroP bioactivity. Sethi *et al.*, and Musiek *et al.*, have clearly highlighted that

oxidized DHA or 14-A₄-Neuroprostane exert their anti-inflammatory effects through inhibition of NFκB pathway caused by PPARα activation in endothelial cells [12]. Finally we have recently shown that other DHA metabolites, the F₄-Neuroprostanes (F₄-NeuroP), are the most predictive negative variable of atherosclerosis in the LDLR^{-/-} mice supplemented with DHA (Gladine *et al.*, under publication). In this context, the present work was focused on anti-inflammatory action of 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP in primary human macrophages.

Materials & Methods

Reagents. 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP were synthesized and obtained generously by a gift of Dr. G. Zanoni [13] and Dr. T. Durand [14]. These compounds were stored, in ethyl acetate for the 14-A₄-NeuroP and in methanol for the 4-F_{4t}-NeuroP, at – 80°C until immediately before use at which time they were dried under nitrogen and suspended in ethanol. 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP were added to the culture medium at the final desired concentration. The serum-free medium was used because these compounds react with albumin. Lipopolysaccharide (LPS, from *Escherichia coli* 026:B6) was purchased from Sigma.

Cell culture. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from healthy donors. After Ficoll (GE Healthcare, Orsay, France) density gradient centrifugation, the isolated monocytes were suspended in RPMI 1640 medium (Gibco) containing gentamycin (0.1 mg/mL, Gibco) and glutamine (2 mM, Gibco). Monocytes were seeded at density of 2.10⁶ cells/well in 6-well plastic culture dishes (Primaria, BD Falcon™) and incubated for 2 hours at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. After this period non-adherent cells were removed by phosphate-buffered saline (PBS) washes and RPMI 1640 medium supplemented with 10% of decompemented human serum (Dutscher), gentamycin (0.1 mg/mL) and glutamine (2 mM) was added in culture dishes. Differentiation of monocytes into resting macrophages (RM) occurred spontaneously by adhesion of cells to the culture dishes after 6 days of culture, at 37°C, 5% CO₂.

Treatment of cells with 14-A₄ or 4-F_{4t}-NeuroP and LPS. On day 6, differentiated RM were washed with PBS and incubated with serum-free medium containing either 14-A₄-NeuroP (10

μM), 4-F₄₁-NeuroP (10 μM) or ethanol (vehicle 0.15%) during 30 min at 37°C, 5% CO₂. After 30 min, LPS (100 ng/mL) was added to the same medium, and incubation was continued during 6 hours at 37°C, 5% CO₂.

RNA extraction and analysis. Total cellular RNA was extracted from macrophages using Trizol reagent (Invitrogen). For qRT-PCR analysis of TNF α , IL-6, COX-2, MCP-1 and CCL-3 expression, total RNAs were reverse transcribed (RT) and subsequently amplified by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) on a AB 7900 (Applied Biosystems) apparatus using specific primers (**Table 1**). The relative expression of each gene was normalized to the expression level of cyclophilin and calculated by the ΔC_t method. The ΔC_t is expressed as the difference between the C_t (threshold cycle) of the indicated/target gene and the C_t of cyclophilin. The amount of target gene relative to the cyclophilin was expressed as $2^{-(\Delta C_t)}$.

ELISA test. MCP-1 and TNF α secreted in cell culture supernatants were quantified using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) purchased from R&D Systems according to the instructions of the manufacturer.

Transfection experiment. Cos-7 cells were seeded in a 60 mm dishes at a density of $5.5 \cdot 10^5$ cells/dish in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 16h prior to transfection. Cells were transfected in DMEM medium, using jetPEI, with reporter (pG5-TK-pGL3) and expression plasmids pGal4-hPPAR α or pGal4-hPPAR γ . The pCMV- β -galactosidase expression plasmid was co-transfected as a control for transfection efficiency. After 16h, transfection was stopped by addition of DMEM medium supplemented with 10% FCS and cells were then trypsinized and seeded in 96 wells plates

and incubated for 4-5h in DMEM medium without FCS. Cells were then incubated overnight in DMEM medium without FCS and increasing concentrations (0.1-20 μ M) of 14-A₄-NeuroP or 4-F_{4t}-NeuroP or vehicle (DMSO). Pirinixic acid (WY 14.643) and rosiglitazone were used, respectively, as positive control of PPAR α and PPAR γ activation. At the end of the experiment, cells were washed once with ice-cold PBS, lysed and luciferase and β -galactosidase assays were performed.

Western blot analysis. Cell proteins were subjected to electrophoresis in 12% SDS-PAGE and electrotransferred on PVDF membranes over 1h at 90 V. Membranes were blocked using 5% Bovine Serum Albumin (BSA) in Tris-buffered saline-Tween-20 (TBST) (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl and 0.05% (v/v) Tween 20) for 1h, and then incubated with rabbit anti-I κ B α or anti-P-I κ B α antibodies diluted 1/1000. Subsequently, membranes were incubated with goat anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase (1/2000, 1h, room temperature). Then, they were washed with TBST and antibody labeling was detected by chemiluminescence using a CCD camera (GBOX, SYNGENE). Bands intensities were evaluated by densitometry analysis performed with Quantity One software.

Statistical analysis. Data are presented as means \pm standard deviation (SD). Comparisons between groups were analyzed using Student *t* tests and statistical significance was established at $p < 0.05$.

Results

14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP reduce LPS-induced pro-inflammatory mediators' expression

To investigate the anti-inflammatory effect of 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP, the expression and secretion of several LPS-induced pro-inflammatory mediators were analyzed. 14-A₄-NeuroP caused a significant decrease of TNF α (-44%, p<0.001), IL-6 (-49%, p<0.001), COX-2 (-27%, p<0.001), MCP-1 (-55%, p<0.001) and CCL-3 (-26%, p<0.001) mRNA level (**Figure 1**). Pretreatment with 4-F_{4t}-NeuroP also decreased IL-6 (-26%, p<0.001) and MCP-1 (-24%, p<0.05) mRNA level but this effect was less pronounced (**Figure 1B and 1D**).

We have used ELISA technique to determine the effect of 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP on LPS-induced macrophages secretion of TNF α and MCP-1. Pretreatment of human resting macrophages with 4-F_{4t}-NeuroP for 30 minutes led to modest but significant decrease of LPS-induced secretion of TNF α (-12%, p<0.01) whereas incubation with 14-A₄-NeuroP had a smaller effect (-9%, NS) (**Figure 2A**). Concerning the MCP-1 secretion, 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP both caused a reduction of the level of this chemokine, but this was only significant for 14-A₄-NeuroP (-34%, p<0.05) (**Figure 2B**).

Ability of 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP to activate the PPAR α and PPAR γ

To assess whether 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP could act through PPAR α and/or PPAR γ , transfection of luciferase reporter vector with hPPAR α or hPPAR γ expression vector was performed on Cos-7 cells. Treatment with 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP did not affect PPAR α activation (**Figure 3A**). Concerning PPAR γ , treatment with 14-A₄-NeuroP led to a

slight induction of the transcriptional activity of luciferase reporter vector in Cos-7 cells (**Figure 3B**). This effect was significant at 5, 10 and 20 μ M. A slight induction was obtained when Cos-7 cells were treated with 4-F_{4t}-NeuroP but the effect was lower and not significant (**Figure 3B**). All together, these results suggest that the anti-inflammatory properties of 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP are mostly independent of PPAR α and PPAR γ .

4-F_{4t}-NeuroP reduces the activation of NF κ B signaling pathway

We determined the effect of 4-F_{4t}-NeuroP on NF κ B signaling pathway by studying the expression of I κ B α protein and its phosphorylation. Western blot analysis revealed that 4-F_{4t}-NeuroP pretreatment tended to increase the expression of I κ B α protein suggesting less degradation of this protein (**Figure 4A**). This increase was associated with a significant reduction of LPS-induced phosphorylation of I κ B α (**Figure 4B**). This suggests that 4-F_{4t}-NeuroP could prevent the degradation of I κ B α by inhibiting its phosphorylation and thus may inhibit NF κ B signaling pathway.

Discussion

Several lines suggest that DHA could exert its anti-inflammatory effects through the oxygenated metabolites [15,16,17]. In this present study, we have clearly demonstrated that, among these bioactive metabolites, the 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP, two specific compounds derived from the peroxidation of DHA have the anti-inflammatory properties. These two molecules exert their anti-inflammatory action by reduction of the synthesis of several cytokines and chemokines independently of PPAR α and γ . The 4-F_{4t}-NeuroP, appears to exert its anti-inflammatory action by interfering with the NF κ B signaling pathway.

To the best of our knowledge, our study is the first to have highlighted the anti-inflammatory effects of 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP on human macrophages as affecting TNF α , IL-6, MCP-1, CCL-3 and COX-2 synthesis. This work is consistent with a previous study conducted by Sethi *et al.*, which has reported anti-inflammatory effects associated to oxidized DHA rather than native DHA. In fact, in their study, Sethi *et al.*, have shown that opposite to native DHA, oxidized DHA is able to reduce the U937 monocyte adhesion to swine aortic endothelial cells (SAEC) [8]. Later, Musiek *et al.*, have identified a specific compound derived from DHA lipid peroxidation, the 14-A₄-NeuroP, as an inhibitor of the inflammatory response on murine macrophages RAW267.4. In this experiment RAW267.4 were pretreated with 14-A₄-NeuroP before the stimulation by LPS and 14-A₄-NeuroP induced a reduction of pro-inflammatory markers such as COX-2 and iNOS [11]. Despite another study model used and different markers studied, this study is consistent with our work and has reported anti-inflammatory effects of 14-A₄-NeuroP compound.

To get insight mechanisms of action of 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP compounds, we investigated the interaction of these two molecules with PPAR α and/or PPAR γ . Our results have shown that anti-inflammatory effects of these two metabolites were mostly

independent of PPAR α and PPAR γ . This is consistent with previous study by Musiek *et al.* on murine macrophages, which demonstrates that two PPAR γ antagonists failed to inhibit the anti-inflammatory effects of 14-A₄-NeuroP suggesting that PPAR γ is not crucially involved [11]. However, an interaction of these two neuroprostanes with PPARs could be possible because several studies have suggested implication of activation of PPAR α and PPAR γ in the anti-inflammatory effects of oxidized LC- ω 3PUFAs [12,18]. In the study conducted by Mishra *et al.*, oxidized EPA was involved in reduction of IL-8 and MCP-1 expression and secretion by human endothelial cells (HUVEC). Oxidized EPA exert its anti-inflammatory effects through inhibition of NF κ B signaling by promoting cytoplasmic retention of p50 and p65 subunits of NF κ B and these effects are PPAR α -dependent [12]. In another study by Itoh *et al.*, transient transfections and reporter assays performed on Cos-1 and Cos -7 cells have reported that 4-oxoDHA and 4-oxoEPA (synthetic oxidized compounds), have the ability to activate the transcription factor PPAR γ [18]. In their study, Mishra *et al.*, have reported an activation of PPAR α with oxidized EPA [12], however, it should not be excluded that the involvement of this transcription factor could be specific to the EPA fatty acid suggesting that DHA could exert these anti-inflammatory effects through another mechanism. Moreover, in their study Itoh *et al.*, used synthesized compounds whose structures were different from those metabolites generated *in vivo* [18].

Because NF κ B play a central role in the inflammatory process, we chose to examine the effects of 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP on this signaling pathway. At the inactive state, NF κ B is sequestered in the cytoplasm by the inhibitory protein I κ B. Phosphorylation of I κ B by IKK α/β in response to pro-inflammatory stimuli (cytokines, LPS, ...) causes its proteasomal degradation allowing nuclear translocation of NF κ B and activation of its target genes transcription [19]. For the first time, we have shown that 4-F_{4t}-NeuroP exerts its anti-

inflammatory effects by interacting with NF κ B by decreasing I κ B α phosphorylation. These results suggest that this compound could prevent the degradation of I κ B α by inhibiting its phosphorylation leading to NF κ B inhibition by its retention in cytoplasm. Our results are consistent with the previous study published by Musiek *et al.*, which have reported the similar effects to the 14-A₄-NeuroP. In this study performed on murine macrophages, the 14-A₄-NeuroP inhibits the inflammatory response by blocking NF κ B activation *via* inhibition of IKK-mediated phosphorylation of I κ B α . This compound, acts *via* adducts formation at cysteine 179 residue [11]. Similar effects were observed with 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP, suggesting that, despite their different structure, these two compounds exerts anti-inflammatory effects through common mechanisms of action.

In conclusion, we examined the anti-inflammatory effects on human macrophages of two neuroprostanes specifically derived from lipid peroxidation of DHA, and we have shown that 4-F_{4t}-NeuroP acts *via* reduction of NF κ B-mediated signaling. This study suggests that DHA could exert its protective effects *via* its oxygenated metabolites derived from lipid peroxidation. This process previously described as harmful could have a potential beneficial action.

Acknowledgements

The authors acknowledge Corinne Copin, Bruno Derudas from Pasteur Institute of Lille as well as Céline Boby from INRA Clermont-Ferrand/Theix Research Center “Metabolism Exploration Platform: PFEM” for their technical assistance.

References

- [1] Calder, P. C.: n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases, *The American journal of clinical nutrition*. 2006, 83, 1505S-1519S.
- [2] Lee, T. H., Hoover, R. L., Williams, J. D., Sperling, R. I., Ravalese, J., 3rd, Spur, B. W., Robinson, D. R., Corey, E. J., Lewis, R. A., Austen, K. F.: Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function, *The New England journal of medicine*. 1985, 312, 1217-1224.
- [3] Kelley, D. S., Taylor, P. C., Nelson, G. J., Schmidt, P. C., Ferretti, A., Erickson, K. L., Yu, R., Chandra, R. K., Mackey, B. E.: Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men, *Lipids*. 1999, 34, 317-324.
- [4] Meydani, S. N., Endres, S., Woods, M. M., Goldin, B. R., Soo, C., Morrill-Labrode, A., Dinarello, C. A., Gorbach, S. L.: Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women, *The Journal of nutrition*. 1991, 121, 547-555.
- [5] Yaqoob, P., Calder, P.: Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages, *Cellular immunology*. 1995, 163, 120-128.
- [6] Caughey, G. E., Mantzioris, E., Gibson, R. A., Cleland, L. G., James, M. J.: The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil, *The American journal of clinical nutrition*. 1996, 63, 116-122.
- [7] Baumann, K. H., Hessel, F., Larass, I., Muller, T., Angerer, P., Kiefl, R., von Schacky, C.: Dietary omega-3, omega-6, and omega-9 unsaturated fatty acids and growth factor and cytokine gene expression in unstimulated and stimulated monocytes. A randomized volunteer study, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1999, 19, 59-66.
- [8] Sethi, S., Eastman, A. Y., Eaton, J. W.: Inhibition of phagocyte-endothelium interactions by oxidized fatty acids: a natural anti-inflammatory mechanism?, *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1996, 128, 27-38.
- [9] Milne, G. L., Yin, H., Hardy, K. D., Davies, S. S., Roberts, L. J., 2nd: Isoprostane generation and function, *Chemical reviews*. 2011, 111, 5973-5996.
- [10] Mozaffarian, D., Wu, J. H.: Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events, *Journal of the American College of Cardiology*. 2011, 58, 2047-2067.
- [11] Musiek, E. S., Brooks, J. D., Joo, M., Brunoldi, E., Porta, A., Zanoni, G., Vidari, G., Blackwell, T. S., Montine, T. J., Milne, G. L., McLaughlin, B., Morrow, J. D.: Electrophilic cyclopentenone neuroprostanes are anti-inflammatory mediators formed from the

peroxidation of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid, *The Journal of biological chemistry*. 2008, 283, 19927-19935.

[12] Mishra, A., Chaudhary, A., Sethi, S.: Oxidized omega-3 fatty acids inhibit NF-kappaB activation via a PPARalpha-dependent pathway, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004, 24, 1621-1627.

[13] Zanoni, G., Brunoldi, E. M., Porta, A., Vidari, G.: Asymmetric synthesis of 14-A4t-neuroprostane: hunting for a suitable biomarker for neurodegenerative diseases, *The Journal of organic chemistry*. 2007, 72, 9698-9703.

[14] Durand, T., Guy, A., Henry, O., Roland, A., Bernad, S., El Fangour, S., Vidal, J. P., Rossi, J. C.: Total syntheses of iso-, neuro- and phytoprostanes: new insight in lipid chemistry, *Chemistry and physics of lipids*. 2004, 128, 15-33.

[15] Spite, M., Serhan, C. N.: Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins, *Circulation research*. 2010, 107, 1170-1184.

[16] Calder, P. C.: Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?, *British journal of clinical pharmacology*. 2013, 75, 645-662.

[17] Jump, D. B., Depner, C. M., Tripathy, S.: Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease, *Journal of lipid research*. 2012, 53, 2525-2545.

[18] Itoh, T., Fairall, L., Amin, K., Inaba, Y., Szanto, A., Balint, B. L., Nagy, L., Yamamoto, K., Schwabe, J. W.: Structural basis for the activation of PPARgamma by oxidized fatty acids, *Nature structural & molecular biology*. 2008, 15, 924-931.

[19] Calder, P. C.: Mechanisms of action of (n-3) fatty acids, *The Journal of nutrition*. 2012, 142, 592S-599S.

Table and figures legends

Table 1 : Sequences of primers used

Figure 1: Effect of 14-A₄-NeuroP and 4-F₄₁-NeuroP on TNF α , IL-6, COX-2, MCP-1 and CCL-3 expression in human macrophages. Human macrophages were pretreated with 14-A₄-NeuroP (10 μ M), 4-F₄₁-NeuroP (10 μ M) or vehicle (ethanol 0.15%) for 30 min and then stimulated with LPS (100 ng/mL) for 6 h, at which time total RNA were extracted. (A-E) The relative mRNA expressions of TNF α , IL-6, COX-2, MCP-1 and CCL-3 were analyzed quantitatively using real-time RT-qPCR. The results were normalized to cyclophilin and expressed as percentage over Control Ethanol + LPS. Values represent the means \pm SD of expression of each gene studied in seven independent patients. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, compared with each corresponding Control Ethanol + LPS. A negative control was performed with only Ethanol.

Figure 2: Effect of 14-A₄-NeuroP and 4-F₄₁-NeuroP on TNF α and MCP-1 secretion in human macrophages. Human macrophages were pretreated with 14-A₄-NeuroP (10 μ M), 4-F₄₁-NeuroP (10 μ M) or vehicle (ethanol 0.15%) for 30 min and then stimulated with LPS (100 ng/mL) for 6 h, at which time supernatants were harvested. (A-B) The quantification of TNF α and MCP-1 secretions were analyzed by ELISA techniques. The results were expressed as percentage over Control Ethanol + LPS. Values represent the means \pm SD of TNF α and MCP-1 secretions studied in seven independent patients. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, compared with each corresponding Control Ethanol + LPS. A negative control was performed with only Ethanol.

Figure 3: Effect of 14-A₄-NeuroP and 4-F_{4t}-NeuroP on PPAR α and PPAR γ transactivation. Cos-7 cells were transfected with the reporter construct (pG5-TK-pGL3) in the presence of pGal4-hPPAR α vector (A) or pGal4-hPPAR γ (B) vector. Cells were treated with DMSO (negative control), pirinixic acid (10 μ M, PPAR α agonist), rosiglitazone (1 μ M, PPAR γ agonist), 14-A₄-NeuroP or 4-F_{4t}-NeuroP overnight. After this period, luciferase activity was measured and normalized to activity of a co-transfected β -galactosidase expression vector. Differences between DMSO and each 14-A₄-NeuroP or 4-F_{4t}-NeuroP concentration were analyzed by Student *t* test (* p <0.05). Values are means (\pm SD) of two independent experiments.

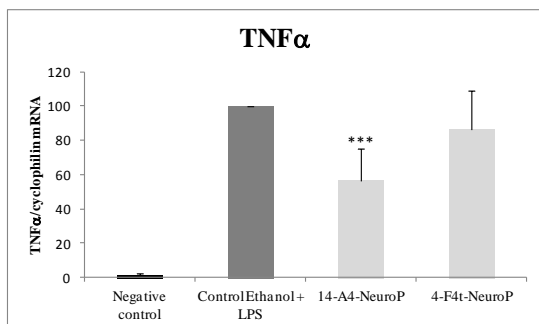
Figure 4: Effect of 4-F_{4t}-NeuroP on NF κ B signaling in human macrophages. (A) Human macrophages were pretreated with 4-F_{4t}-NeuroP (10 μ M) or vehicle (ethanol 0.15%) for 30 min and then stimulated with LPS (100 ng/mL) for 6 h, at which time proteins were extracted and subjected to Western blot analysis with anti-I κ B α or anti-P-I κ B α antibody. (B) Quantification of band intensity by densitometry analysis. The proteins bands were quantified using Quantity One software and normalization for loading differences was achieved by dividing the densitometry values for individual bands by those for actin in the same band. Differences between Control Ethanol + LPS and 4-F_{4t}-NeuroP were analyzed by Student *t* test (* p ≤0.05). Values are means (\pm SD) of each treatment realized in duplicate. A negative control was performed with only Ethanol.

Table 1

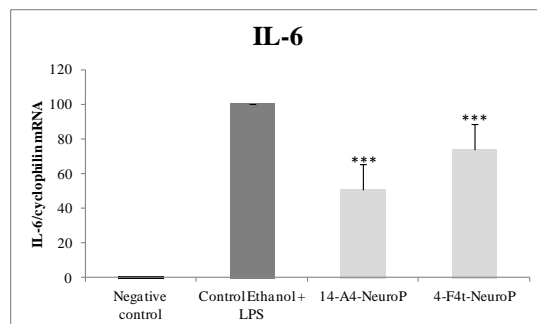
| | | |
|--------------|---------|---|
| Cyclophilin | Forward | 5'-GCA TAC GGG TCC TGG CAT CTT GTC C-3' |
| | Reverse | 5'-ATG GTG ATC TTC TTG CTG GTC TTG C-3' |
| TNF α | Forward | 5'-CAG AGG GCC TGT ACC TCA TC-3' |
| | Reverse | 5'-GGA AGA CCC CTC CCA GAT AG-3' |
| IL-6 | Forward | 5'-AAG TCC TGA TCC AGT TCC TG-3' |
| | Reverse | 5'-GAT GAG TTG TCA TGT CCT GC-3' |
| COX-2 | Forward | 5'-TGA GCA TCT ACG GTT TGC TG-3' |
| | Reverse | 5'-TGC TTG TCT GGA ACA ACT GC-3' |
| MCP-1 | Forward | 5'-TCA TAG CAG CCA CCT TCA TTC C-3' |
| | Reverse | 5'-GGA CAC TTG CTG CTG GTG ATT C -3' |
| CCL-3 | Forward | 5'-TGC AAC CAG TTC TCT GCA TC-3' |
| | Reverse | 5'-TTT CTG GAC CCA CTC CTC AC-3' |

Figure 1

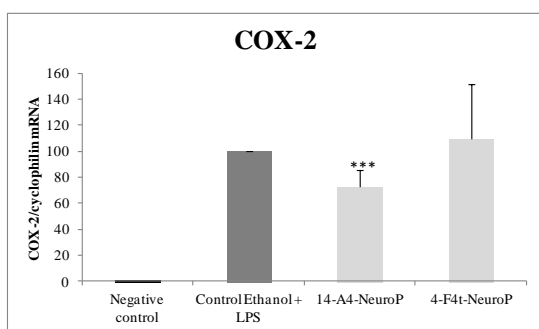
A



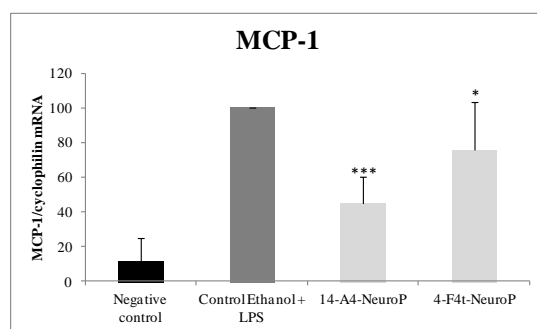
B



C



D



E

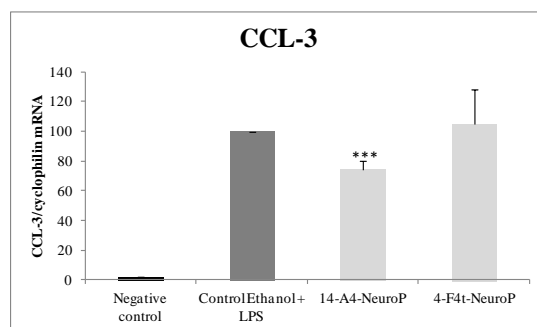
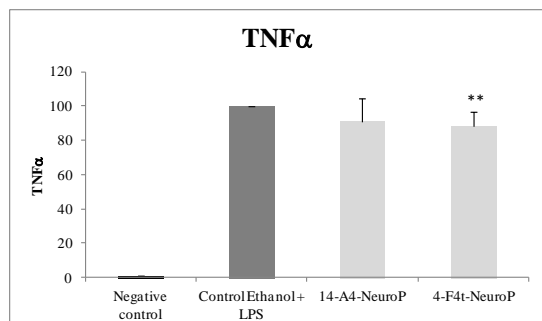


Figure 2

A



B

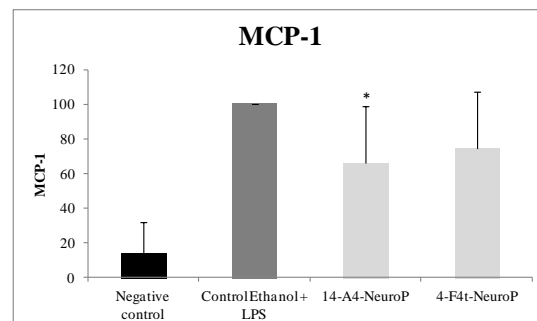
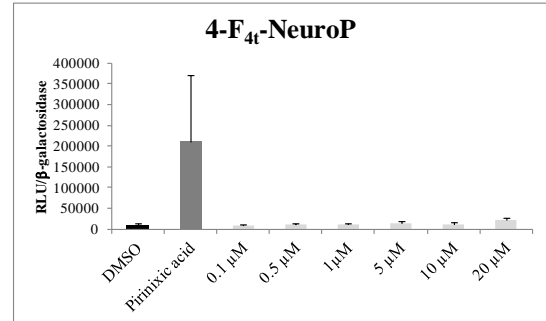
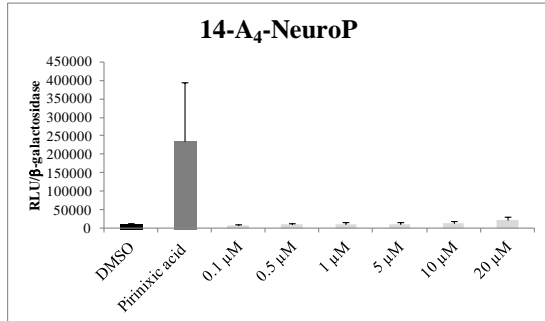


Figure 3

A



B

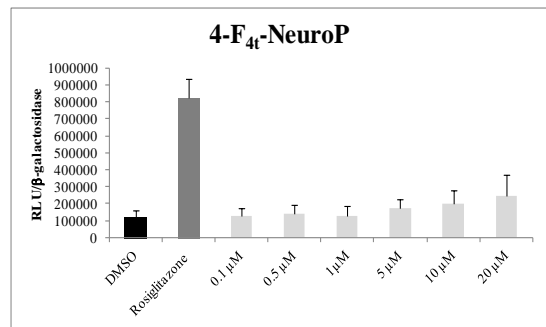
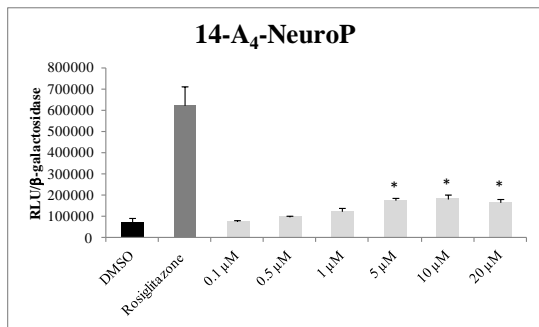
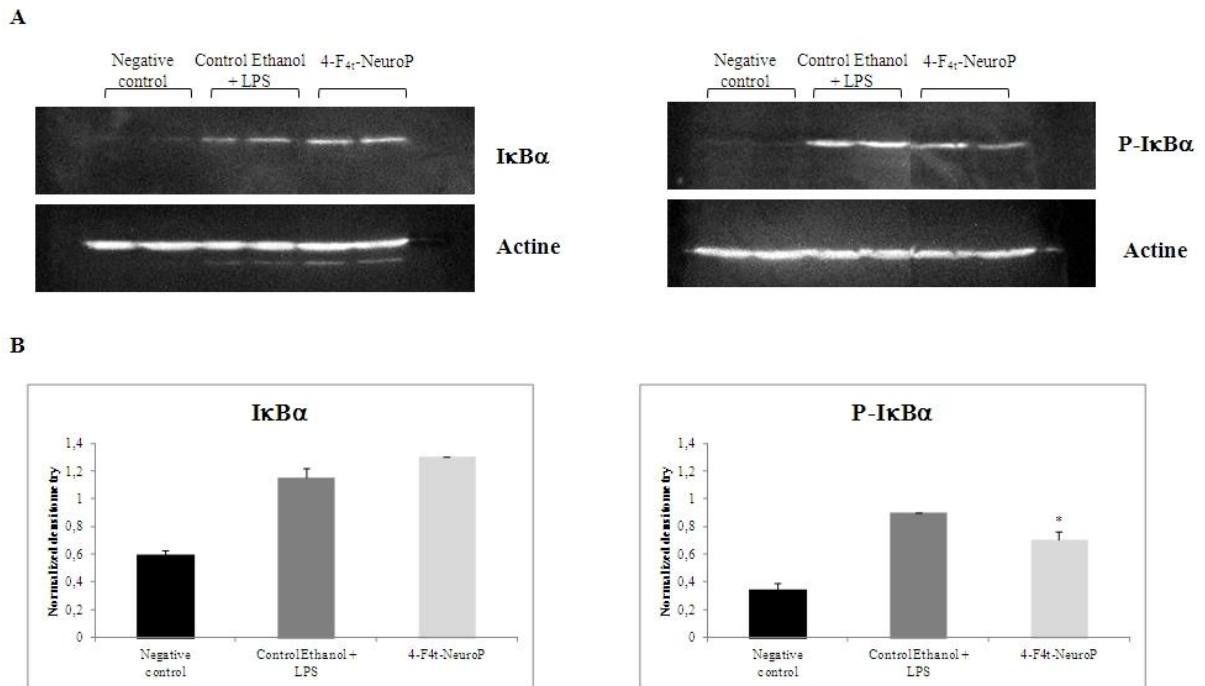


Figure 4



*DISCUSSION
GENERALE*

Discussion Générale

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action à l'origine des effets anti-athérogènes des AGPI ω 3-LC, les objectifs de mon travail de thèse ont été 1) d'étudier l'impact du DHA au niveau vasculaire et 2) d'évaluer la bioactivité de certains métabolites issus de la peroxydation lipidique du DHA. Pour répondre à ces questions, nous avons choisi d'utiliser dans un premier temps une **approche ouverte** incluant une **étude *in vivo*** et l'utilisation de **l'outil nutriginomique** pour explorer l'ensemble des modifications induites par le DHA au niveau vasculaire. Cette approche nutriginomique *in vivo* a révélé que la supplémentation en DHA induirait, au sein de l'aorte, 1) des changements métaboliques en relation avec les **métabolismes glucidique et énergétique** et les **défenses anti-oxydantes** et 2) une forte modulation de la **composante inflammatoire** dans le sens d'une diminution de la migration et de l'activité des cellules immunitaires. Par ailleurs, l'analyse bioinformatique plus précise de nos données transcriptomiques a révélé que les **biomarqueurs de la polarisation des macrophages** étaient particulièrement affectés par la supplémentation en DHA dans le sens d'une orientation vers un phénotype de type M2 dit réparateur. Ce travail exploratoire a été complété par **une étude plus ciblée** conduite ***in vitro*** sur un modèle de **macrophages primaires humains** dans laquelle nous avons pu aborder plus précisément les propriétés anti-inflammatoires des **neuroprostanes** qui sont des métabolites peroxydés spécifiques du DHA. Cette deuxième approche *in vitro* nous a permis de démontrer que les 14-A₄ et les 4-F_{4t}-Neuroprostanes étaient capables de réduire l'expression et la sécrétion de plusieurs **médiateurs pro-inflammatoires** par un mécanisme probablement dépendant de la voie **NF κ B** et indépendant de **PPAR γ** .

I- Impacts de la supplémentation en DHA sur les modulations globales d'expression génique et protéique au niveau aortique

I-1- Choix expérimentaux

Comme rapporté dans le chapitre II de l'étude bibliographique, il existe différents **modèles animaux** permettant d'étudier les mécanismes d'athérogenèse et les facteurs, entre autres nutritionnels, modulant l'évolution de la plaque d'athérome. Parmi ceux-ci, les souris transgéniques telles que les souris ApoE^{-/-} ou LDLR^{-/-} sont les modèles les plus couramment utilisés du fait de leur facilité de manipulation et de l'induction rapide de l'athérosclérose. Il

faut cependant rappeler que, contrairement aux souris ApoE^{-/-}, le **modèle de souris LDLR^{-/-}** est sensible aux AGPI ω 3-LC (Zampolli *et al.*, 2006) ce qui a motivé notre choix. Par ailleurs, contrairement aux souris ApoE^{-/-} qui développent l'athérosclérose de manière spontanée, les souris LDLR^{-/-} requièrent un régime de type occidental, riche en graisses, et le processus d'athérogenèse se met en place d'une manière comparable à l'Homme (Ishibashi *et al.*, 1993). Ces caractéristiques propres au modèle LDLR^{-/-} nous ont également paru pertinentes étant donné l'objectif à visée nutritionnelle de notre étude.

Tout au long de l'étude bibliographique, nous nous sommes intéressés aux AGPI ω 3-LC mais notre choix final s'est finalement porté sur l'étude du **DHA**. Plusieurs éléments nous ont conduit à faire ce choix. Une des hypothèses de travail étant que les métabolites peroxydés pourraient contribuer aux effets anti-athérogènes des AGPI ω 3-LC, il nous a semblé logique d'utiliser le DHA qui est l'AGPI ω 3-LC le plus peroxydable (Milne *et al.*, 2011). Par ailleurs, contrairement à l'EPA, le DHA n'est pas métabolisé par la voie des COX (Jump *et al.*, 2012) ce qui en fait un candidat encore plus probable pour la voie de la peroxydation lipidique. Enfin, le DHA est naturellement plus abondant que l'EPA *in vivo* et sa bioactivité au niveau vasculaire est supérieure (Massaro *et al.*, 2008) ce qui a aussi orienter notre choix de travailler spécifiquement avec le DHA dans la cadre de ce projet.

La **dose** et la **durée** de supplémentation sont des éléments primordiaux à prendre en considération dans le cadre d'études d'intervention nutritionnelles. En ce qui concerne la dose, nous avons choisi de travailler avec une dose de DHA représentant **2% de l'apport énergétique quotidien** (soit 35,5 mg/jour/souris). Ce choix est prioritairement basé sur les données de la littérature (Brown *et al.*, 2012; Saraswathi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Zampolli *et al.*, 2006) et sur les recommandations du groupe de De Caterina qui préconise un apport énergétique total sous forme d'AGPI ω 3-LC n'excédant pas 1 à 2% de l'apport énergétique total chez l'animal (De Caterina & Zampolli 2001). Il faut néanmoins noter que la dose de DHA utilisée dans le cadre de notre étude ne peut pas être considérée comme nutritionnelle car elle correspond à 20 fois les apports nutritionnels recommandés (ANC) chez l'Homme. En ce qui concerne la durée d'intervention, ayant un objectif de prévention nutritionnelle, nous avons choisi de nous placer dans des conditions permettant de mettre en évidence un effet préventif du DHA. Pour cela, nous avons non seulement choisi d'utiliser un régime peu athérogène (10% saindoux, 0,045 % cholestérol) comparativement à ce qui est habituellement pratiqué (Saraswathi *et al.*, 2007), mais aussi une durée de supplémentation en DHA longue (**20 semaines**) en accord avec une étude précédente (Zampolli *et al.*, 2006).

I-2- Enseignements tirés de l'approche nutriginomique

Compte tenu de manque de vision intégrée de l'action de DHA au niveau vasculaire, l'approche nutriginomique nous a paru être une approche pertinente et originale afin d'étudier de façon ouverte et non biaisée l'ensemble des cibles moléculaires du DHA. Par ailleurs, nous avons choisi d'utiliser deux outils complémentaires, la protéomique et la transcriptomique, qui nous ont permis de collecter des informations à deux niveaux de régulation cellulaire.

L'analyse protéomique réalisée sur les aortes des animaux du groupe DHA comparativement aux animaux du groupe Contrôle a révélé l'existence possible d'**altérations métaboliques** en relation avec les **métabolismes glucidique et énergétique** et les **défenses anti-oxydantes**. En effet, comme rapporté dans la **Publication n°1**, la supplémentation en DHA a modifié l'abondance de plusieurs protéines directement ou indirectement associées à une activation des métabolismes glucidique et lipidique *via* notamment une augmentation de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphates ainsi qu'une augmentation putative de la β -oxydation. Deux études précédentes réalisées sur des souris athérosclérotiques montrent des effets du DHA sur le protéome hépatique et en particulier sur les protéines impliquées dans différentes voies métaboliques et dans les processus de défenses anti-oxydantes (de Roos *et al.*, 2005; Mavrommatis *et al.*, 2010). Ainsi, ces résultats sont en faveur d'une action notable du DHA sur différentes voies métaboliques au sein de différents tissus. Ces effets sont aussi cohérents avec le fait que le DHA est un ligand des facteurs de transcription PPARs contrôlant le métabolisme lipidique, et également de deux facteurs de transcription ChREBP (carbohydrate regulatory element binding protein) et MLX (max-like factor X) contrôlant la glycolyse (Jump 2008). En complément de ces effets sur le métabolisme énergétique, la supplémentation en DHA a aussi induit une plus grande abondance de la SOD1 (superoxyde dismutase 1) suggérant une activation des défenses anti-oxydantes. Ce résultat est cohérent avec une étude précédente réalisée chez des sujets recevant 2,4 g par jour d'EPA+DHA sous forme de capsule et présentant une augmentation de l'expression et de l'activité de la SOD1 (Carrepeiro *et al.*, 2011). Ceci pourrait être le résultat indirect d'une production accrue de métabolites peroxydés issus du DHA comme cela a été observé chez les mêmes animaux au niveau hépatique (Gladine *et al.*, PlosOne, en révision). En relation avec la peroxydation lipidique et la capacité des dérivés peroxydés à former des adduits sur les protéines (Riahi *et al.*, 2010), nous avons cherché à déterminer l'impact de la supplémentation en DHA sur les modifications oxydatives des protéines. Pour cela, nous avons complété l'analyse

protéomique globale par une **analyse protéomique plus ciblée** visant à quantifier et à identifier les **protéines portant des adduits 4-HNE**. Même si cette molécule n'est pas un marqueur spécifique de la peroxydation des AGPI ω 3, c'est un marqueur reconnu de la peroxydation lipidique produit en abondance dans des situations de stress oxydant (Leonarduzzi *et al.*, 2005). Comme rapporté dans la **Publication n°1**, le premier résultat de cette analyse complémentaire est **l'absence d'effet de la supplémentation en DHA sur le nombre et le type de protéines portant des adduits 4-HNE**. Ceci ne reflète pas pour autant une absence d'impact de la supplémentation en DHA sur les taux de peroxydation lipidique puisqu'il est fort probable que les niveaux de 4-HNE, qui est l'aldéhyde spécifique des AGPI ω 3, étaient plus élevés dans le groupe DHA comme cela a été observé au niveau hépatique (Gladine *et al.*, PlosOne, en révision). On peut simplement conclure que la supplémentation en DHA n'a pas modifié le niveau de modifications oxydatives des protéines par le 4-HNE. Il faut noter que nous avons cherché à identifier les adduits 4-HNE mais les essais n'ont pas été poursuivis du fait que le seul anticorps disponible dans le commerce (produit chez la souris) est incompatible avec des analyses sur tissus murins. Par ailleurs, la détection des adduits 4-HNE-protéines est probablement difficile du fait d'une faible abondance de cet aldéhyde *in vivo*. Même si la supplémentation en DHA n'a pas modifié ni la quantité d'adduits 4-HNE ni le type de protéines modifiées, notre analyse a permis **d'identifier les cibles protéiques du 4-HNE au niveau aortique**. Les protéines ainsi identifiées étaient pour la plupart mitochondriales et impliquées dans le métabolisme énergétique ce qui est cohérent avec le fait que la mitochondrie est la principale source de ROS (Cadenas & Davies 2000). Plus précisément, trois nouvelles cibles protéiques du 4-HNE (acetyl-coenzyme A acyltransferase 2, medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase et fumarate hydratase) ont pu être identifiées. Celles-ci sont impliquées dans la β -oxydation et le cycle de Krebs.

Concernant les résultats de **l'analyse transcriptomique** rapportés dans la **Publication n°2**, ils reflètent nettement l'impact positif de la supplémentation en DHA sur **la composante inflammatoire**. En effet, l'analyse bioinformatique des données d'expression génique obtenues au niveau aortique chez les animaux du groupe DHA comparativement au groupe Contrôle montrent une **forte représentation des fonctions et voies relatives à l'inflammation et à l'immunité innée**. Ces résultats sont cohérents avec les propriétés anti-inflammatoires reconnues du DHA (Calder 2013). Plus précisément, la supplémentation en DHA a été associée à une moindre abondance de transcrits des gènes impliqués dans les

interactions entre cellules (molécules d'adhésion, protéines de la matrice extracellulaire), **des chimiokines et autres médiateurs pro-inflammatoires** ainsi que des molécules du **complexe majeur d'histocompatibilité**. Le recoupement de ces données avec les données de la littérature a permis de mettre en exergue un impact probable du DHA sur la polarisation des macrophages. En effet, plusieurs des cibles identifiées se sont avérées être des biomarqueurs phénotypiques des macrophages (Mantovani *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2006) et leur sens d'expression indiquerait que le DHA pourrait induire une orientation préférentielle des macrophages de la plaque vers un phénotype réparateur de type M2 comme cela a été observé précédemment dans le tissu adipeux (Titos *et al.*, 2011). Cette hypothèse est confortée par l'analyse des régulateurs transcriptionnels qui a révélé une implication probable de PPAR γ , INF γ et NF κ B, trois facteurs de transcription fortement impliqués dans la régulation transcriptionnelle de la polarisation des macrophages (Lawrence & Natoli 2011). Enfin, une analyse histologique réalisée au niveau de la valve mitrale a montré que les animaux du groupe DHA présentaient une plus forte abondance de la protéine arginase I qui est un marqueur spécifique des macrophages de type M2.

Il ressort de cette approche nutrigrénomique que, comme attendu, les cibles géniques et protéiques du DHA au niveau aortique sont multiples et variées. En effet, la supplémentation en DHA semble avoir un spectre d'action large au niveau aortique puisqu'elle a été associée à des modifications du métabolisme énergétique (lipidique et glucidique), des systèmes de défenses anti-oxydantes et à une inhibition des voies de l'inflammation et de l'immunité innée. La contribution des altérations métaboliques dans la prévention de l'athérosclérose induite par le DHA n'est pas forcément évidente à interpréter. En revanche, il est facile d'imaginer que l'activation des défenses anti-oxydantes et la régulation des processus inflammatoires, deux composantes majeures de l'athérosclérose (Hulsmans & Holvoet 2010; Lusis 2000), ont grandement contribué aux effets anti-athérosclérotiques observés (Gladine *et al.*, PlosOne, en révision). Il faut noter que les données obtenues au niveau protéique et génique sont relativement contrastées ce qui pourrait indiquer que les modifications post-transcriptionnelles jouent probablement un rôle important. Il faut aussi rappeler que l'approche protéomique offre une vision plus restreinte que la transcriptomique du fait de contraintes techniques. En effet, l'électrophorèse bi-dimensionnelle utilisée permet la séparation des protéines d'une part en fonction de leur point isoélectrique pour un pH compris entre 3 et 10 et d'autre part en fonction de leur poids moléculaire pour une masse protéique comprise entre environ 15 kDa et 100 kDa. On peut par conséquent imaginer que la composante inflammatoire qui n'apparaît pas dans notre analyse protéomique pourrait

ressortir dans une autre analyse incluant d'avantage de protéines inflammatoires telles que les cytokines qui ont un poids moléculaire moyen de 10-15 kDa. Inversement, l'analyse bioinformatique que nous avons réalisée sur les données de transcriptomique a été volontairement et nécessairement restreinte aux voies et fonctions les plus représentatives de notre jeu de données. Or, il faut noter que des altérations du métabolisme énergétique et notamment lipidique et des défenses anti-oxydantes ressortent également mais minoritairement des analyses d'expression génique. Pour finir, l'utilisation de cette approche nutriginomique associée à une expérimentation conduite *in vivo* nous a permis de constituer un jeu de données nouveau et spécifique du tissu vasculaire. Ceci ouvre de nouvelles pistes de recherche, notamment autour de la composante inflammatoire et la polarisation des macrophages qui pourrait être une cible du DHA au niveau vasculaire.

II- Propriétés anti-inflammatoires des neuroprostanes

II-1- Choix expérimentaux

Dans la première partie de notre travail, nous avons montré, par une approche nutriginomique ouverte, que la composante inflammatoire au niveau vasculaire était fortement affectée par le DHA. Ceci est en accord avec les données de la littérature obtenues *in vitro* (Calder 2013). Ceci a orienté notre choix de continuer notre travail ***in vitro* sur macrophages** qui constituent par ailleurs les leucocytes majoritaires au niveau de la plaque d'athérome (Pello *et al.*, 2011). Nous avons également choisi de travailler sur **macrophages primaires humains** pour éviter les biais liés aux altérations géniques souvent présentes dans les lignées cellulaires.

Des résultats obtenus *in vivo* sur les souris LDLR^{-/-} supplémentées en DHA ont révélé que le taux hépatique de F₄-Neuroprostanes était une variable prédictive majeure de la réduction de la plaque d'athérome (Gladine *et al.*, PlosOne, en révision). Ceci a conforté notre hypothèse selon laquelle les propriétés anti-athérosclérotiques du DHA pourraient en partie être médiées par ses métabolites peroxydés. Ces différents éléments nous ont amené à étudier les propriétés anti-inflammatoires des neuroprostanes qui sont, comme nous l'avons vu dans le chapitre IV de l'étude bibliographique, des métabolites spécifiques du DHA retrouvés en abondance *in vivo* dans des conditions de stress oxydant (Milne *et al.*, 2011). Nous avons en conséquence choisi la classe des F₄-Neuroprostanes en comparaison avec les A₄/J₄-

Neuroprostanes qui présentaient l'avantage d'être déjà référencées dans la littérature (Musiek *et al.*, 2008).

Les autres choix expérimentaux relatifs à la concentration de neuroprostanes et la durée d'incubation des cellules ont été largement influencés par les seules données disponibles dans la littérature et relatives à l'étude de Musiek *et al.*, sur les A₄/J₄-Neuroprostanes. Nous avons également réalisés des études préalables pour tester différentes concentrations et différents temps d'incubation. Tout cela nous a amené à choisir d'exposer les macrophages à une concentration de 10 µM pendant 30 min ce qui est cohérent avec la stabilité des neuroprostanes en milieux aqueux qui est supposée d'assez courte durée (Musiek *et al.*, 2008).

II-2- Enseignements tirés de l'approche ciblée *in vitro* sur macrophages

Comme rapporté dans la **Publication n°3**, la 4-F_{4t} et la 14-A₄-NeuroP exercent leurs effets anti-inflammatoires *via* la réduction de l'expression et de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires. Cette étude est la première à avoir étudiée la bioactivité de ces molécules sur macrophages humains et est en accord avec l'étude précédente de Musiek qui a montré un effet anti-inflammatoire de la 14-A₄-NeuroP sur macrophages murins. De façon consistante avec les études précédentes ayant analysé la bioactivité de la 14-A₄-NeuroP (Musiek *et al.*, 2008) et des F₃-IsoP (Brooks *et al.*, 2011), la 4-F_{4t}-NeuroP semble exercer son action anti-inflammatoire *via* son interaction avec la voie de signalisation de NFκB, notamment en réduisant la phosphorylation d'IκBα. Malgré une structure différente, la 4-F_{4t}-NeuroP semble donc avoir un mode d'action semblable à celui de la 14-A₄-NeuroP, et, pourrait par la biais d'un adduit formé sur la protéine IKK, empêcher la phosphorylation d'IκBα.

Comme rapporté précédemment (Gladine *et al.*, PlosOne, en révision), les F₄-NeuroP sont la variable la plus négativement corrélée avec l'étendue de la plaque d'athérome. Ainsi, il est possible que suite à une supplémentation en DHA, les 4-F_{4t}-NeuroP issus de sa peroxydation lipidique, *via* leur effet anti-inflammatoire, soient à l'origine de la réduction de la plaque d'athérosclérose

L'étude immunohistochimique (**Publication n°2**) a mis en exergue une augmentation de l'arginase I au sein de la plaque d'athérosclérose des animaux supplémentés en DHA suggérant une orientation phénotypique des macrophages vers un phénotype réparateur

impliqué dans la résolution de l'inflammation. Ainsi, l'effet anti-inflammatoire des neuroprostanes bien décrit dans la **Publication n°3** pourrait être à l'origine de cette orientation préférentielle des macrophages. De plus, les macrophages représentant 60% de la masse athéromateuse (Pello *et al.*, 2011), leur « switch » phénotypique pourrait par conséquence entraîner la réduction de la plaque.

En conclusion, nos différentes études ont permis l'identification des cibles géniques et protéiques du DHA au niveau vasculaire contribuant à une meilleure compréhension des mécanismes d'action athéro-protectrice du DHA. De plus, l'étude *in vitro* de la bioactivité des neuroprostanes a permis de montrer pour la première fois l'implication de ces métabolites dans la régulation de l'activité inflammatoire des macrophages humains.

CONCLUSIONS
&
PERSPECTIVES

Conclusions & Perspectives

En conclusion, notre travail a apporté de nouvelles données contribuant à une meilleure compréhension des effets athéro-protecteurs du DHA au niveau vasculaire. L'approche nutriginomique a permis d'étudier l'impact du DHA, jusqu'alors peu exploré au niveau vasculaire, de façon ouverte et sans *a priori*. Les résultats majeurs ressortant de l'étude nutriginomique ont mis en évidence l'impact du DHA sur le métabolisme énergétique et les défenses anti-oxydantes, ainsi que sur la composante inflammatoire d'athérosclérose *via* une orientation des macrophages vers un phénotype réparateur de type M2. L'étude spécifique de la bioactivité de métabolites issus de la peroxydation lipidique du DHA, quasiment inconnue à l'heure actuelle, a été réalisée *in vitro* sur macrophages primaires humains. Les résultats obtenus montrent que certains métabolites peroxydés du DHA, les neuroprostanes, peuvent contribuer aux effets anti-inflammatoires du DHA.

Les perspectives qui découlent de notre travail sont, dans un premier temps, d'approfondir les résultats de l'analyse nutriginomique par l'étude spécifique des voies métaboliques (métabolisme lipidique, glucidique et les défenses anti-oxydantes) identifiées comme modulées par le DHA. Enfin, comme nous l'avons discuté, les modulations au niveau génique et protéique sont contrastées et suggèrent un rôle important des modifications post-transcriptionnelles. Dans ce contexte là, il serait tout à fait pertinent d'aborder la régulation post-transcriptionnelle des cibles identifiées par l'étude nutriginomique, par exemple par l'étude des micros ARN (miARN) pouvant être impliqués dans cette régulation.

Notre étude *in vivo* a mis à jour l'implication du DHA dans la polarisation des macrophages, au niveau des vaisseaux affectés par l'athérosclérose, vers un phénotype réparateur de type M2. En même temps, l'étude spécifique de la bioactivité des neuroprostanes sur macrophages primaires humains a révélé pour la première fois la contribution de ces molécules dans l'effet anti-inflammatoire du DHA. Ainsi, ces résultats ouvrent une perspective de recherche très intéressante sur le rôle respectif du DHA et de ses métabolites peroxydés sur la polarisation des macrophages. En fait, il est possible d'envisager qu'en condition de stress oxydant associé à la réponse inflammatoire, des cellules immunitaires vont produire des métabolites peroxydés du DHA susceptibles d'orienter les macrophages vers un phénotype favorisant la résolution de l'inflammation au niveau de la plaque d'athérome. Ainsi, en prolongement de nos études sur les effets anti-inflammatoires

des métabolites du DHA, leur capacité à moduler voire «réverser» le phénotype de macrophages vers un phénotype réparateur sera étudiée.

Comme le souligne notre étude bibliographique, l'équipe de Serhan conclut à un rôle anti-inflammatoire du DHA médié par ses métabolites enzymatiques générés par les LOX. Notre étude a quant à elle mit l'accent sur la contribution des métabolites peroxydés. Toutefois, à l'heure actuelle, les données disponibles ne permettent pas de conclure quant à la part relative du DHA natif, de ses métabolites enzymatiques et de ses dérivés peroxydés dans cette action anti-inflammatoire. Pour répondre à cette question des études avec des molécules marquées (DHA ou métabolites) ou des inhibiteurs (des voies enzymatiques par exemple) devront être mises en place. Ainsi, la question de l'importance de chacune de ces molécules, mais également de la concentration à laquelle elles exercent un effet optimal est primordiale d'un point de vue cognitif et afin de considérer d'éventuelles issues translationnelles de ces recherches.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

1999. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* 354(9177):447-455.

Abeywardena MY et Head RJ. 2001. Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. *Cardiovascular research* 52(3):361-371.

Adan Y, Shibata K, Ni W, Tsuda Y, Sato M, Ikeda I et Imaizumi K. 1999. Concentration of serum lipids and aortic lesion size in female and male apo E-deficient mice fed docosahexaenoic acid. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 63(2):309-313.

Adkins Y et Kelley DS. 2010. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *The Journal of nutritional biochemistry* 21(9):781-792.

Albert CM, Campos H, Stampfer MJ, Ridker PM, Manson JE, Willett WC et Ma J. 2002. Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *The New England journal of medicine* 346(15):1113-1118.

Albert CM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Ajani UA, Carey VJ, Willett WC, Ruskin JN et Manson JE. 1998. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 279(1):23-28.

Alessandri JM, Extier A, Astorg P, Laviolle M, Simon N et Guesnet A. 2009. Métabolisme des acides gras oméga-3: différences entre hommes et femmes. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 23:55-66.

Angerer P, Kothny W, Stork S et von Schacky C. 2002. Effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids on progression of atherosclerosis in carotid arteries. *Cardiovascular research* 54(1):183-190.

Araki Y, Matsumiya M, Matsuura T, Oishi M, Kaibori M, Okumura T, Nishizawa M, Takada H et Kwon AH. 2011. Peroxidation of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibits the Induction of iNOS Gene Expression in Proinflammatory Cytokine-Stimulated Hepatocytes. *Journal of nutrition and metabolism* 2011:374542.

Arita M, Clish CB et Serhan CN. 2005. The contributions of aspirin and microbial oxygenase to the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: novel oxygenase products from omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochemical and biophysical research communications* 338(1):149-157.

Arita M, Ohira T, Sun YP, Elangovan S, Chiang N et Serhan CN. 2007. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *Journal of immunology* 178(6):3912-3917.

- Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Giovannucci EL et Willett WC. 1995. Dietary intake of marine n-3 fatty acids, fish intake, and the risk of coronary disease among men. *The New England journal of medicine* 332(15):977-982.
- Awada M, Soulage CO, Meynier A, Debard C, Plaisancie P, Benoit B, Picard G, Loizon E, Chauvin MA, Estienne M, Peretti N, Guichardant M, Lagarde M, Genot C et Michalski MC. 2012. Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells. *Journal of lipid research* 53(10):2069-2080.
- Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA et Reddy ST. 2003. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(4):1751-1756.
- Balk EM, Lichtenstein AH, Chung M, Kupelnick B, Chew P et Lau J. 2006a. Effects of omega-3 fatty acids on coronary restenosis, intima-media thickness, and exercise tolerance: a systematic review. *Atherosclerosis* 184(2):237-246.
- Balk EM, Lichtenstein AH, Chung M, Kupelnick B, Chew P et Lau J. 2006b. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. *Atherosclerosis* 189(1):19-30.
- Bang HO, Dyerberg J et Sinclair HM. 1980. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *The American journal of clinical nutrition* 33(12):2657-2661.
- Baudin B & Cohen A. 2009. Données épidémiologiques des maladies cardiovasculaires et prise en charge des accidents cardiovasculaires. *Revue francophone des laboratoires*. 409:27-39.
- Baumann KH, Hessel F, Larass I, Muller T, Angerer P, Kiefl R et von Schacky C. 1999. Dietary omega-3, omega-6, and omega-9 unsaturated fatty acids and growth factor and cytokine gene expression in unstimulated and stimulated monocytes. A randomized volunteer study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19(1):59-66.
- Berdah J et Amah G. 2009. [Differences between women and men: even through cardiovascular risk factors... role of the gynecologist]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité* 37(2):186-193.
- Bernoud-Hubac N et Roberts LJ, 2nd. 2002. Identification of oxidized derivatives of neuroketals. *Biochemistry* 41(38):11466-11471.
- Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B et Chinetti-Gbaguidi G. 2007. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell metabolism* 6(2):137-143.
- Breslow JL. 1996. Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272(5262):685-688.

- Brooks JD, Milne GL, Yin H, Sanchez SC, Porter NA et Morrow JD. 2008. Formation of highly reactive cyclopentenone isoprostane compounds (A3/J3-isoprostanes) in vivo from eicosapentaenoic acid. *The Journal of biological chemistry* 283(18):12043-12055.
- Brooks JD, Musiek ES, Koestner TR, Stankowski JN, Howard JR, Brunoldi EM, Porta A, Zanoni G, Vidari G, Morrow JD, Milne GL et McLaughlin B. 2011. The fatty acid oxidation product 15-A3t-isoprostane is a potent inhibitor of NFkappaB transcription and macrophage transformation. *Journal of neurochemistry* 119(3):604-616.
- Brown AA et Hu FB. 2001. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition* 73(4):673-686.
- Brown AL, Zhu X, Rong S, Shewale S, Seo J, Boudyguina E, Gebre AK, Alexander-Miller MA et Parks JS. 2012. Omega-3 fatty acids ameliorate atherosclerosis by favorably altering monocyte subsets and limiting monocyte recruitment to aortic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32(9):2122-2130.
- Brown MS et Goldstein JL. 1976. Familial hypercholesterolemia: A genetic defect in the low-density lipoprotein receptor. *The New England journal of medicine* 294(25):1386-1390.
- Bucher HC, Hengstler P, Schindler C et Meier G. 2002. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American journal of medicine* 112(4):298-304.
- Burr ML. 2007. Secondary prevention of CHD in UK men: the Diet and Reinfarction Trial and its sequel. *The Proceedings of the Nutrition Society* 66(1):9-15.
- Burr ML, Ashfield-Watt PA, Dunstan FD, Fehily AM, Breay P, Ashton T, Zotos PC, Haboubi NA et Elwood PC. 2003. Lack of benefit of dietary advice to men with angina: results of a controlled trial. *European journal of clinical nutrition* 57(2):193-200.
- Burr ML, Dunstan FD et George CH. 2005. Is fish oil good or bad for heart disease? Two trials with apparently conflicting results. *The Journal of membrane biology* 206(2):155-163.
- Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, Elwood PC et Deadman NM. 1989. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 2(8666):757-761.
- Butovich IA. 2005. On the structure and synthesis of neuroprotectin D1, a novel anti-inflammatory compound of the docosahexaenoic acid family. *Journal of Lipid Research* 46:2311-2314.
- Cadenas E et Davies KJ. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology & medicine* 29(3-4):222-230.
- Calder PC. 2004. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clinical science* 107(1):1-11.

- Calder PC. 2006. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American journal of clinical nutrition* 83(6 Suppl):1505S-1519S.
- Calder PC. 2007. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 77(5-6):327-335.
- Calder PC. 2011. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *European journal of pharmacology* 668 Suppl 1:S50-58.
- Calder PC. 2012a. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *The Journal of nutrition* 142(3):592S-599S.
- Calder PC. 2012b. The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. *Molecular nutrition & food research* 56(7):1073-1080.
- Calder PC. 2013. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *British journal of clinical pharmacology* 75(3):645-662.
- Carrepeiro MM, Rogero MM, Bertolami MC, Botelho PB, Castro N et Castro IA. 2011. Effect of n-3 fatty acids and statins on oxidative stress in statin-treated hypercholesterolemic and normocholesterolemic women. *Atherosclerosis* 217(1):171-178.
- Catala A. 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and physics of lipids* 157(1):1-11.
- Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG et James MJ. 1996. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *The American journal of clinical nutrition* 63(1):116-122.
- Chapkin RS, Akoh CC et Miller CC. 1991. Influence of dietary n-3 fatty acids on macrophage glycerophospholipid molecular species and peptidoleukotriene synthesis. *Journal of lipid research* 32(7):1205-1213.
- Chen P, Vericel E, Lagarde M et Guichardant M. 2011. Poxytins, a class of oxygenated products from polyunsaturated fatty acids, potently inhibit blood platelet aggregation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25(1):382-388.
- Claudel T, Inoue Y, Barbier O, Duran-Sandoval D, Kosykh V, Fruchart J, Fruchart JC, Gonzalez FJ et Staels B. 2003. Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression. *Gastroenterology* 125(2):544-555.
- Dagnelie PC, Rietveld T, Swart GR, Stijnen T et van den Berg JW. 1994. Effect of dietary fish oil on blood levels of free fatty acids, ketone bodies and triacylglycerol in humans. *Lipids* 29(1):41-45.
- Das UN. 2000. Beneficial effect(s) of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: but, why and how? *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 63(6):351-362.

- Davidson MH. 2006. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *The American journal of cardiology* 98(4A):27i-33i.
- Daviglus ML, Stamler J, Orenca AJ, Dyer AR, Liu K, Greenland P, Walsh MK, Morris D et Shekelle RB. 1997. Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 336(15):1046-1053.
- Davis HR, Bridenstine RT, Vesselinovich D et Wissler RW. 1987. Fish oil inhibits development of atherosclerosis in rhesus monkeys. *Arteriosclerosis* 7(5):441-449.
- De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA, Jr. et Libby P. 1994. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 14(11):1829-1836.
- De Caterina R et Libby P. 1996. Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids. *Lipids* 31 Suppl:S57-63.
- De Caterina R et Zampolli A. 2001. n-3 fatty acids: antiatherosclerotic effects. *Lipids* 36 Suppl:S69-78.
- de Roos B, Duivenvoorden I, Rucklidge G, Reid M, Ross K, Lamers RJ, Voshol PJ, Havekes LM et Teusink B. 2005. Response of apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice to dietary fatty acids: combining liver proteomics with physiological data. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19(7):813-815.
- de Roos B, Mavrommatis Y et Brouwer IA. 2009. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: new insights into mechanisms relating to inflammation and coronary heart disease. *British journal of pharmacology* 158(2):413-428.
- Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC et Sedding DG. 2002. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nature medicine* 8(11):1249-1256.
- Erkkila AT, Lichtenstein AH, Mozaffarian D et Herrington DM. 2004. Fish intake is associated with a reduced progression of coronary artery atherosclerosis in postmenopausal women with coronary artery disease. *The American journal of clinical nutrition* 80(3):626-632.
- Eussen SR, Geleijnse JM, Giltay EJ, Rompelberg CJ, Klungel OH et Kromhout D. 2012. Effects of n-3 fatty acids on major cardiovascular events in statin users and non-users with a history of myocardial infarction. *European heart journal* 33(13):1582-1588.
- Fam SS, Murphey LJ, Terry ES, Zackert WE, Chen Y, Gao L, Pandalai S, Milne GL, Roberts LJ, Porter NA, Montine TJ et Morrow JD. 2002. Formation of highly reactive A-ring and J-ring isoprostane-like compounds (A4/J4-neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *The Journal of biological chemistry* 277(39):36076-36084.

- Fisher EA, Pan M, Chen X, Wu X, Wang H, Jamil H, Sparks JD et Williams KJ. 2001. The triple threat to nascent apolipoprotein B. Evidence for multiple, distinct degradative pathways. *The Journal of biological chemistry* 276(30):27855-27863.
- Freund KM, Belanger AJ, D'Agostino RB et Kannel WB. 1993. The health risks of smoking. The Framingham Study: 34 years of follow-up. *Annals of epidemiology* 3(4):417-424.
- Funk CD. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294(5548):1871-1875.
- Galan P, Kesse-Guyot E, Czernichow S, Briancon S, Blacher J, Hercberg S et Group SFOC. 2010. Effects of B vitamins and omega 3 fatty acids on cardiovascular diseases: a randomised placebo controlled trial. *Bmj* 341:c6273.
- Galano JM, Mas E, Barden A, Mori TA, Signorini C, De Felice C, Barrett A, Opere C, Pinot E, Schwedhelm E, Benndorf R, Roy J, Le Guennec JY, Oger C et Durand T. 2013. Isoprostanes and neuroprostanes: Total synthesis, biological activity and biomarkers of oxidative stress in humans. *Prostaglandins & other lipid mediators*.
- Gao L, Wang J, Sekhar KR, Yin H, Yared NF, Schneider SN, Sasi S, Dalton TP, Anderson ME, Chan JY, Morrow JD et Freeman ML. 2007. Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3. *The Journal of biological chemistry* 282(4):2529-2537.
- Gao L, Yin H, Milne GL, Porter NA et Morrow JD. 2006. Formation of F-ring isoprostane-like compounds (F3-isoprostanes) in vivo from eicosapentaenoic acid. *The Journal of biological chemistry* 281(20):14092-14099.
- Getz GS et Reardon CA. 2012. Animal models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32(5):1104-1115.
- Gladine C, Roy NC, Rigaudiere JP, Laillet B, Da Silva G, Joly C, Pujos-Guillot E, Morio B, Feillet-Coudray C, McNabb WC, Chardigny JM et Comte B. 2011. Increasing intake of long-chain n-3 PUFA enhances lipoperoxidation and modulates hepatic gene expression in a dose-dependent manner. *The British journal of nutrition*:1-20.
- Goldberg RJ et Katz J. 2007. A meta-analysis of the analgesic effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation for inflammatory joint pain. *Pain* 129(1-2):210-223.
- Goldman DW, Pickett WC et Goetzl EJ. 1983. Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B5 (LTB5) derived from eicosapentaenoic acid. *Biochemical and biophysical research communications* 117(1):282-288.
- Goodfellow J, Bellamy MF, Ramsey MW, Jones CJ et Lewis MJ. 2000. Dietary supplementation with marine omega-3 fatty acids improve systemic large artery endothelial function in subjects with hypercholesterolemia. *Journal of the American College of Cardiology* 35(2):265-270.

- Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology* 3(1):23-35.
- Gui T, Shimokado A, Sun Y, Akasaka T et Muragaki Y. 2012. Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators of inflammation* 2012:693083.
- Guichardant M, Bacot S, Moliere P et Lagarde M. 2006. Hydroxy-alkenals from the peroxidation of n-3 and n-6 fatty acids and urinary metabolites. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 75(3):179-182.
- Haberka M, Mizia-Stec K, Mizia M, Janowska J, Gieszczyk K, Chmiel A, Zahorska-Markiewicz B et Gasior Z. 2011. N-3 polyunsaturated fatty acids early supplementation improves ultrasound indices of endothelial function, but not through NO inhibitors in patients with acute myocardial infarction: N-3 PUFA supplementation in acute myocardial infarction. *Clinical nutrition* 30(1):79-85.
- Hansson GK et Libby P. 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature reviews Immunology* 6(7):508-519.
- Harris WS. 1997a. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: animal studies. *The American journal of clinical nutrition* 65(5 Suppl):1611S-1616S.
- Harris WS. 1997b. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *The American journal of clinical nutrition* 65(5 Suppl):1645S-1654S.
- Harris WS et Bulchandani D. 2006. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Current opinion in lipidology* 17(4):387-393.
- Harris WS, Ginsberg HN, Arunakul N, Shachter NS, Windsor SL, Adams M, Berglund L et Osmundsen K. 1997a. Safety and efficacy of Omacor in severe hypertriglyceridemia. *Journal of cardiovascular risk* 4(5-6):385-391.
- Harris WS, Miller M, Tighe AP, Davidson MH et Schaefer EJ. 2008. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis* 197(1):12-24.
- Harris WS, Rambjor GS, Windsor SL et Diederich D. 1997b. n-3 fatty acids and urinary excretion of nitric oxide metabolites in humans. *The American journal of clinical nutrition* 65(2):459-464.
- He K, Song Y, Daviglius ML, Liu K, Van Horn L, Dyer AR, Goldbourt U et Greenland P. 2004a. Fish consumption and incidence of stroke: a meta-analysis of cohort studies. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 35(7):1538-1542.
- He K, Song Y, Daviglius ML, Liu K, Van Horn L, Dyer AR et Greenland P. 2004b. Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Circulation* 109(22):2705-2711.

- Healy DA, Wallace FA, Miles EA, Calder PC et Newsholm P. 2000. Effect of low-to-moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids* 35(7):763-768.
- Hercule HC, Salanova B, Essin K, Honeck H, Falck JR, Sausbier M, Ruth P, Schunck WH, Luft FC et Gollasch M. 2007. The vasodilator 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid targets the pore-forming BK alpha channel subunit in rodents. *Experimental physiology* 92(6):1067-1076.
- Hirafuji M, Machida T, Hamaue N et Minami M. 2003. Cardiovascular protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids with special emphasis on docosahexaenoic acid. *Journal of pharmacological sciences* 92(4):308-316.
- Hirafuji M, Machida T, Tsunoda M, Miyamoto A et Minami M. 2002. Docosahexaenoic acid potentiates interleukin-1beta induction of nitric oxide synthase through mechanism involving p44/42 MAPK activation in rat vascular smooth muscle cells. *British journal of pharmacology* 136(4):613-619.
- Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL et Serhan CN. 2003. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *The Journal of biological chemistry* 278(17):14677-14687.
- Hu FB, Bronner L, Willett WC, Stampfer MJ, Rexrode KM, Albert CM, Hunter D et Manson JE. 2002. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 287(14):1815-1821.
- Hu FB et Manson JE. 2012. Omega-3 fatty acids and secondary prevention of cardiovascular disease-is it just a fish tale?: comment on "Efficacy of omega-3 fatty acid supplements (eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) in the secondary prevention of cardiovascular disease". *Archives of internal medicine* 172(9):694-696.
- Hughes DA, Southon S et Pinder AC. 1996. (n-3) Polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes in vitro. *The Journal of nutrition* 126(3):603-610.
- Hulsmans M et Holvoet P. 2010. The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. *Journal of cellular and molecular medicine* 14(1-2):70-78.
- Hunter DJ, Kazda I, Chockalingam A et Fodor JG. 1988. Fish consumption and cardiovascular mortality in Canada: an inter-regional comparison. *American journal of preventive medicine* 4(1):5-10.
- Huxley R, Barzi F et Woodward M. 2006. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *Bmj* 332(7533):73-78.

- Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE et Herz J. 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *The Journal of clinical investigation* 92(2):883-893.
- Ishikado A, Morino K, Nishio Y, Nakagawa F, Mukose A, Sono Y, Yoshioka N, Kondo K, Sekine O, Yoshizaki T, Ugi S, Uzu T, Kawai H, Makino T, Okamura T, Yamamoto M, Kashiwagi A et Maegawa H. 2013. 4-Hydroxy hexenal derived from docosahexaenoic acid protects endothelial cells via Nrf2 activation. *PloS one* 8(7):e69415.
- Ishikado A, Nishio Y, Morino K, Ugi S, Kondo H, Makino T, Kashiwagi A et Maegawa H. 2010. Low concentration of 4-hydroxy hexenal increases heme oxygenase-1 expression through activation of Nrf2 and antioxidative activity in vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 402(1):99-104.
- Jahn U, Galano JM, Durand T. 2008. Beyond prostaglandins--chemistry and biology of cyclic oxygenated metabolites formed by free-radical pathways from polyunsaturated fatty acids. *Angewandte Chemie International ed. in English*. 47(32):5894-955.
- Je JH, Lee JY, Jung KJ, Sung B, Go EK, Yu BP et Chung HY. 2004. NF-kappaB activation mechanism of 4-hydroxyhexenal via NIK/IKK and p38 MAPK pathway. *FEBS letters* 566(1-3):183-189.
- Jong MC, Hofker MH et Havekes LM. 1999. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19(3):472-484.
- Jude S, Bedut S, Roger S, Pinault M, Champeroux P, White E et Le Guennec JY. 2003. Peroxidation of docosahexaenoic acid is responsible for its effects on I TO and I SS in rat ventricular myocytes. *British journal of pharmacology* 139(4):816-822.
- Jump DB. 2002. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *The Journal of biological chemistry* 277(11):8755-8758.
- Jump DB. 2008. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Current opinion in lipidology* 19(3):242-247.
- Jump DB, Depner CM et Tripathy S. 2012. Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease. *Journal of lipid research* 53(12):2525-2545.
- Karanian JW, Kim HY et Salem N, Jr. 1996. The structure-activity relationship of lipoxygenase products of long-chain polyunsaturated fatty acids: effects on human platelet aggregation. *Lipids* 31 Suppl:S305-308.
- Kast HR, Nguyen CM, Sinal CJ, Jones SA, Laffitte BA, Reue K, Gonzalez FJ, Willson TM et Edwards PA. 2001. Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Molecular endocrinology* 15(10):1720-1728.

- Keil U. 2000. Coronary artery disease: the role of lipids, hypertension and smoking. *Basic research in cardiology* 95 Suppl 1:I52-58.
- Kelley DS, Siegel D, Vemuri M et Mackey BE. 2007. Docosahexaenoic acid supplementation improves fasting and postprandial lipid profiles in hypertriglyceridemic men. *The American journal of clinical nutrition* 86(2):324-333.
- Kelley DS, Taylor PC, Nelson GJ, Schmidt PC, Ferretti A, Erickson KL, Yu R, Chandra RK et Mackey BE. 1999. Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men. *Lipids* 34(4):317-324.
- Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston AT, Clement M, Dussiot M, Levillain O, Graff-Dubois S, Nicoletti A et Caligiuri G. 2010. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PloS one* 5(1):e8852.
- Khan S, Minihane AM, Talmud PJ, Wright JW, Murphy MC, Williams CM et Griffin BA. 2002. Dietary long-chain n-3 PUFAs increase LPL gene expression in adipose tissue of subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Journal of lipid research* 43(6):979-985.
- Kohli P et Levy BD. 2009. Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *British journal of pharmacology* 158(4):960-971.
- Kramer JA, LeDeaux J, Butteiger D, Young T, Crankshaw C, Harlow H, Kier L et Bhat BG. 2003. Transcription profiling in rat liver in response to dietary docosahexaenoic acid implicates stearyl-coenzyme a desaturase as a nutritional target for lipid lowering. *The Journal of nutrition* 133(1):57-66.
- Kromhout D. 2012. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease. The final verdict? *Current opinion in lipidology* 23(6):554-559.
- Kromhout D, Giltay EJ, Geleijnse JM et Alpha Omega Trial G. 2010. n-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 363(21):2015-2026.
- Kumar A, Takada Y, Boriek AM et Aggarwal BB. 2004. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *Journal of molecular medicine* 82(7):434-448.
- Kusunoki C, Yang L, Yoshizaki T, Nakagawa F, Ishikado A, Kondo M, Morino K, Sekine O, Ugi S, Nishio Y, Kashiwagi A et Maegawa H. 2013. Omega-3 polyunsaturated fatty acid has an anti-oxidant effect via the Nrf-2/HO-1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 430(1):225-230.
- Kuulasmaa K, Tunstall-Pedoe H, Dobson A, Fortmann S, Sans S, Tolonen H, Evans A, Ferrario M et Tuomilehto J. 2000. Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *Lancet* 355(9205):675-687.

- Kwak SM, Myung SK, Lee YJ, Seo HG et Korean Meta-analysis Study G. 2012. Efficacy of omega-3 fatty acid supplements (eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) in the secondary prevention of cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Archives of internal medicine* 172(9):686-694.
- Lagarde M. 2008. Docosahexaenoic acid: Nutrient and precursor of bioactive lipids. *Eur. J. Lipi. Sci. Technol.* 110:673:678.
- Lawrence T et Natoli G. 2011. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature reviews Immunology* 11(11):750-761.
- Le Jossic-Corcus C, Gonthier C, Zaghini I, Logette E, Shechter I et Bournot P. 2005. Hepatic farnesyl diphosphate synthase expression is suppressed by polyunsaturated fatty acids. *The Biochemical journal* 385(Pt 3):787-794.
- Lee JY, Je JH, Jung KJ, Yu BP et Chung HY. 2004. Induction of endothelial iNOS by 4-hydroxyhexenal through NF-kappaB activation. *Free radical biology & medicine* 37(4):539-548.
- Lee JY, Plakidas A, Lee WH, Heikkinen A, Chanmugam P, Bray G et Hwang DH. 2003. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of lipid research* 44(3):479-486.
- Lee JY, Sohn KH, Rhee SH et Hwang D. 2001. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *The Journal of biological chemistry* 276(20):16683-16689.
- Lee TH, Hoover RL, Williams JD, Sperling RI, Ravalese J, 3rd, Spur BW, Robinson DR, Corey EJ, Lewis RA et Austen KF. 1985. Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *The New England journal of medicine* 312(19):1217-1224.
- Lee TH, Menica-Huerta JM, Shih C, Corey EJ, Lewis RA et Austen KF. 1984. Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene B5 and the double lipoxygenase product. *The Journal of biological chemistry* 259(4):2383-2389.
- Lee TH, Sethi T, Crea AE, Peters W, Arm JP, Horton CE, Walport MJ et Spur BW. 1988. Characterization of leukotriene B3: comparison of its biological activities with leukotriene B4 and leukotriene B5 in complement receptor enhancement, lysozyme release and chemotaxis of human neutrophils. *Clinical science* 74(5):467-475.
- Leon H, Shibata MC, Sivakumaran S, Dorgan M, Chatterley T et Tsuyuki RT. 2008. Effect of fish oil on arrhythmias and mortality: systematic review. *Bmj* 337:a2931.
- Leonarduzzi G, Chiarotto E, Biasi F et Poli G. 2005. 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. *Molecular nutrition & food research* 49(11):1044-1049.

- Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R et Prospective Studies C. 2002. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 360(9349):1903-1913.
- Long EK, Murphy TC, Leiphon LJ, Watt J, Morrow JD, Milne GL, Howard JR et Picklo MJ, Sr. 2008. Trans-4-hydroxy-2-hexenal is a neurotoxic product of docosahexaenoic (22:6; n-3) acid oxidation. *Journal of neurochemistry* 105(3):714-724.
- Lusis AJ. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407(6801):233-241.
- Luu NT, Madden J, Calder PC, Grimble RF, Shearman CP, Chan T, Tull SP, Dastur N, Rainger GE et Nash GB. 2007. Comparison of the pro-inflammatory potential of monocytes from healthy adults and those with peripheral arterial disease using an in vitro culture model. *Atherosclerosis* 193(2):259-268.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A et Locati M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25(12):677-686.
- Marchioli R, Barzi F, Bomba E, Chieffo C, Di Gregorio D, Di Mascio R, Franzosi MG, Geraci E, Levantesi G, Maggioni AP, Mantini L, Marfisi RM, Mastrogiuseppe G, Mininni N, Nicolosi GL, Santini M, Schweiger C, Tavazzi L, Tognoni G, Tucci C, Valagussa F et Investigators GI-P. 2002. Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation* 105(16):1897-1903.
- Marik PE et Varon J. 2009. Omega-3 dietary supplements and the risk of cardiovascular events: a systematic review. *Clinical cardiology* 32(7):365-372.
- Martinez FO, Gordon S, Locati M et Mantovani A. 2006. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *Journal of immunology* 177(10):7303-7311.
- Maskrey BH, Megson IL, Rossi AG et Whitfield PD. 2013. Emerging importance of omega-3 fatty acids in the innate immune response: molecular mechanisms and lipidomic strategies for their analysis. *Molecular nutrition & food research* 57(8):1390-1400.
- Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, Montinari MR et De Caterina R. 2008. Omega-3 fatty acids, inflammation and angiogenesis: nutrigenomic effects as an explanation for anti-atherogenic and anti-inflammatory effects of fish and fish oils. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics* 1(1-2):4-23.
- Matsumoto M, Sata M, Fukuda D, Tanaka K, Soma M, Hirata Y et Nagai R. 2008. Orally administered eicosapentaenoic acid reduces and stabilizes atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 197(2):524-533.

Mavrommatis Y, Ross K, Rucklidge G, Reid M, Duncan G, Gordon MJ, Thies F, Sneddon A et de Roos B. 2010. Intervention with fish oil, but not with docosahexaenoic acid, results in lower levels of hepatic soluble epoxide hydrolase with time in apoE knockout mice. *The British journal of nutrition* 103(1):16-24.

Menotti A, Keys A, Kromhout D, Blackburn H, Aravanis C, Bloemberg B, Buzina R, Dontas A, Fidanza F, Giampaoli S et al. 1993. Inter-cohort differences in coronary heart disease mortality in the 25-year follow-up of the seven countries study. *European journal of epidemiology* 9(5):527-536.

Merched AJ, Ko K, Gotlinger KH, Serhan CN et Chan L. 2008. Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22(10):3595-3606.

Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, Dinarello CA et Gorbach SL. 1991. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *The Journal of nutrition* 121(4):547-555.

Miles EA, Thies F, Wallace FA, Powell JR, Hurst TL, Newsholme EA et Calder PC. 2001. Influence of age and dietary fish oil on plasma soluble adhesion molecule concentrations. *Clinical science* 100(1):91-100.

Miles EA, Wallace FA et Calder PC. 2000. Dietary fish oil reduces intercellular adhesion molecule 1 and scavenger receptor expression on murine macrophages. *Atherosclerosis* 152(1):43-50.

Miller M, Motevalli M, Westphal D et Kwiterovich PO, Jr. 1993. Incorporation of oleic acid and eicosapentaenoic acid into glycerolipids of cultured normal human fibroblasts. *Lipids* 28(1):1-5.

Milne GL, Yin H, Hardy KD, Davies SS et Roberts LJ, 2nd. 2011. Isoprostane generation and function. *Chemical reviews* 111(10):5973-5996.

Mishra A, Chaudhary A et Sethi S. 2004. Oxidized omega-3 fatty acids inhibit NF-kappaB activation via a PPARalpha-dependent pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24(9):1621-1627.

Morin C, Sirois M, Echave V, Albadine R et Rousseau E. 2010. 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid targets PPARgamma and p38 mitogen-activated protein kinase to mediate its anti-inflammatory effects in the lung: role of soluble epoxide hydrolase. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 43(5):564-575.

Morin C, Sirois M, Echave V, Rizcallah E et Rousseau E. 2009. Relaxing effects of 17(18)-EpETE on arterial and airway smooth muscles in human lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 296(1):L130-139.

Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ 2nd. 1990. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87(23):9383-7.

Mortensen A, Hansen BF, Hansen JF, Frandsen H, Bartnikowska E, Andersen PS et Bertelsen LS. 1998. Comparison of the effects of fish oil and olive oil on blood lipids and aortic atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidaemic rabbits. *The British journal of nutrition* 80(6):565-573.

Mozaffarian D, Lemaitre RN, Kuller LH, Burke GL, Tracy RP, Siscovick DS et Cardiovascular Health S. 2003. Cardiac benefits of fish consumption may depend on the type of fish meal consumed: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 107(10):1372-1377.

Mozaffarian D et Wu JH. 2011. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *Journal of the American College of Cardiology* 58(20):2047-2067.

Musaad S et Haynes EN. 2007. Biomarkers of obesity and subsequent cardiovascular events. *Epidemiologic reviews* 29:98-114.

Musiek ES, Brooks JD, Joo M, Brunoldi E, Porta A, Zanoni G, Vidari G, Blackwell TS, Montine TJ, Milne GL, McLaughlin B et Morrow JD. 2008. Electrophilic cyclopentenone neuroprostanes are anti-inflammatory mediators formed from the peroxidation of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *The Journal of biological chemistry* 283(29):19927-19935.

Myhrstad MC, Retterstol K, Telle-Hansen VH, Ottestad I, Halvorsen B, Holven KB et Ulven SM. 2011. Effect of marine n-3 fatty acids on circulating inflammatory markers in healthy subjects and subjects with cardiovascular risk factors. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 60(4):309-319.

Nabel EG. 2003. Cardiovascular disease. *The New England journal of medicine* 349(1):60-72.

Nakajima K, Yamashita T, Kita T, Takeda M, Sasaki N, Kasahara K, Shinohara M, Rikitake Y, Ishida T, Yokoyama M et Hirata K. 2011. Orally administered eicosapentaenoic acid induces rapid regression of atherosclerosis via modulating the phenotype of dendritic cells in LDL receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31(9):1963-1972.

Nakamura MT, Cheon Y, Li Y et Nara TY. 2004. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids* 39(11):1077-1083.

Ness AR, Ashfield-Watt PA, Whiting JM, Smith GD, Hughes J et Burr ML. 2004. The long-term effect of dietary advice on the diet of men with angina: the diet and angina randomized

trial. *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association* 17(2):117-119.

Newman WP, Middaugh JP, Propst MT et Rogers DR. 1993. Atherosclerosis in Alaska Natives and non-natives. *Lancet* 341(8852):1056-1057.

Nourooz-Zadeh J, Halliwell B, Anggard EE. 1997. Evidence for the formation of F3-isoprostanes during peroxidation of eicosapentaenoic acid. *Biochemical and biophysical research communications*. 236(2):467-72.

Nourooz-Zadeh J, Liu EH, Anggard EE, Halliwell B. 1998. F4-isoprostanes: a novel class of prostanoids formed during peroxidation of docosahexaenoic acid (DHA). *Biochemical and biophysical research communications*. 242(2):338-44.

Novak TE, Babcock TA, Jho DH, Helton WS et Espat NJ. 2003. NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 284(1):L84-89.

Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM et Olefsky JM. 2010. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142(5):687-698.

Okuda Y, Kawashima K, Sawada T, Tsurumaru K, Asano M, Suzuki S, Soma M, Nakajima T et Yamashita K. 1997. Eicosapentaenoic acid enhances nitric oxide production by cultured human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 232(2):487-491.

Omura M, Kobayashi S, Mizukami Y, Mogami K, Todoroki-Ikeda N, Miyake T et Matsuzaki M. 2001. Eicosapentaenoic acid (EPA) induces Ca(2+)-independent activation and translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelium-dependent vasorelaxation. *FEBS letters* 487(3):361-366.

Pan M, Cederbaum AI, Zhang YL, Ginsberg HN, Williams KJ et Fisher EA. 2004. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *The Journal of clinical investigation* 113(9):1277-1287.

Park Y et Harris WS. 2003. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *Journal of lipid research* 44(3):455-463.

Parks JS, Kaduck-Sawyer J, Bullock BC et Rudel LL. 1990. Effect of dietary fish oil on coronary artery and aortic atherosclerosis in African green monkeys. *Arteriosclerosis* 10(6):1102-1112.

Pello OM, Silvestre C, De Pizzol M et Andres V. 2011. A glimpse on the phenomenon of macrophage polarization during atherosclerosis. *Immunobiology* 216(11):1172-1176.

- Plourde M et Cunnane SC. 2007. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et métabolisme* 32(4):619-634.
- Pratico D, Smyth EM, Violi F et FitzGerald GA. 1996. Local amplification of platelet function by 8-Epi prostaglandin F2alpha is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *The Journal of biological chemistry* 271(25):14916-14924.
- Rader DJ, Cohen J et Hobbs HH. 2003. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *The Journal of clinical investigation* 111(12):1795-1803.
- Rall SC, Jr. et Mahley RW. 1992. The role of apolipoprotein E genetic variants in lipoprotein disorders. *Journal of internal medicine* 231(6):653-659.
- Rauch B, Schiele R, Schneider S, Diller F, Victor N, Gohlke H, Gottwik M, Steinbeck G, Del Castillo U, Sack R, Worth H, Katus H, Spitzer W, Sabin G, Senges J et Group OS. 2010. OMEGA, a randomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction. *Circulation* 122(21):2152-2159.
- Repetto M, Semprine J et Boveris A. 2012. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. INTECH open science/open minds. Chapter 1.
- Riahi Y, Cohen G, Shamni O et Sasson S. 2010. Signaling and cytotoxic functions of 4-hydroxyalkenals. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 299(6):E879-886.
- Rich S, Miller JF, Jr., Charous S, Davis HR, Shanks P, Glagov S et Lands WE. 1989. Development of atherosclerosis in genetically hyperlipidemic rabbits during chronic fish-oil ingestion. *Arteriosclerosis* 9(2):189-194.
- Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR et Miletich JP. 1995. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *The New England journal of medicine* 332(14):912-917.
- Rigamonti E, Chinetti-Gbaguidi G et Staels B. 2008. Regulation of macrophage functions by PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LXRs in mice and men. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28(6):1050-1059.
- Rissanen T, Voutilainen S, Nyyssonen K, Lakka TA et Salonen JT. 2000. Fish oil-derived fatty acids, docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, and the risk of acute coronary events: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *Circulation* 102(22):2677-2679.
- Rizos EC, Ntzani EE, Bika E, Kostapanos MS et Elisaf MS. 2012. Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a

systematic review and meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 308(10):1024-1033.

Roberts LJ, 2nd, Montine TJ, Markesbery WR, Tapper AR, Hardy P, Chemtob S, Dettbarn WD et Morrow JD. 1998. Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *The Journal of biological chemistry* 273(22):13605-13612.

Robertson TL, Kato H, Gordon T, Kagan A, Rhoads GG, Land CE, Worth RM, Belsky JL, Dock DS, Miyanishi M et Kawamoto S. 1977. Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California. Coronary heart disease risk factors in Japan and Hawaii. *The American journal of cardiology* 39(2):244-249.

Robinson JG et Stone NJ. 2006. Antiatherosclerotic and antithrombotic effects of omega-3 fatty acids. *The American journal of cardiology* 98(4A):39i-49i.

Sacks FM, Stone PH, Gibson CM, Silverman DI, Rosner B et Pasternak RC. 1995. Controlled trial of fish oil for regression of human coronary atherosclerosis. HARP Research Group. *Journal of the American College of Cardiology* 25(7):1492-1498.

Saraswathi V, Gao L, Morrow JD, Chait A, Niswender KD et Hasty AH. 2007. Fish oil increases cholesterol storage in white adipose tissue with concomitant decreases in inflammation, hepatic steatosis, and atherosclerosis in mice. *The Journal of nutrition* 137(7):1776-1782.

Schiano V, Laurenzano E, Brevetti G, De Maio JJ, Lanero S, Scopacasa F et Chiariello M. 2008. Omega-3 polyunsaturated fatty acid in peripheral arterial disease: effect on lipid pattern, disease severity, inflammation profile, and endothelial function. *Clinical nutrition* 27(2):241-247.

Schini VB, Durante W, Catovsky S et Vanhoutte PM. 1993. Eicosapentaenoic acid potentiates the production of nitric oxide evoked by interleukin-1 beta in cultured vascular smooth muscle cells. *Journal of vascular research* 30(4):209-217.

Schmidt EB, Pedersen JO, Ekelund S, Grunnet N, Jersild C et Dyerberg J. 1989. Cod liver oil inhibits neutrophil and monocyte chemotaxis in healthy males. *Atherosclerosis* 77(1):53-57.

Schmidt EB, Pedersen JO, Varming K, Ernst E, Jersild C, Grunnet N et Dyerberg J. 1991. n-3 fatty acids and leukocyte chemotaxis. Effects in hyperlipidemia and dose-response studies in healthy men. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 11(2):429-435.

Schmidt EB, Varming K, Pedersen JO, Lervang HH, Grunnet N, Jersild C et Dyerberg J. 1992. Long-term supplementation with n-3 fatty acids, II: Effect on neutrophil and monocyte chemotaxis. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 52(3):229-236.

Sekikawa A, Curb JD, Ueshima H, El-Saed A, Kadowaki T, Abbott RD, Evans RW, Rodriguez BL, Okamura T, Sutton-Tyrrell K, Nakamura Y, Masaki K, Edmundowicz D, Kashiwagi A, Willcox BJ, Takamiya T, Mitsunami K, Seto TB, Murata K, White RL, Kuller

- LH et Group EJS. 2008. Marine-derived n-3 fatty acids and atherosclerosis in Japanese, Japanese-American, and white men: a cross-sectional study. *Journal of the American College of Cardiology* 52(6):417-424.
- Serhan CN. 2009. Systems approach to inflammation resolution: identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7 Suppl 1:44-48.
- Serhan CN, Chiang N et Van Dyke TE. 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews Immunology* 8(5):349-361.
- Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N et Gronert K. 2000. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *The Journal of experimental medicine* 192(8):1197-1204.
- Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Lu Y, Siegelman J, Baer T, Yang R, Colgan SP et Petasis NA. 2006. Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *Journal of immunology* 176(3):1848-1859.
- Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G et Moussignac RL. 2002. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *The Journal of experimental medicine* 196(8):1025-1037.
- Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF, Oh SF et Spite M. 2009. Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *The Journal of experimental medicine* 206(1):15-23.
- Sethi S, Eastman AY et Eaton JW. 1996. Inhibition of phagocyte-endothelium interactions by oxidized fatty acids: A natural anti-inflammatory mechanism? *J. Lab. Clin. Med.* 128(1):27-38.
- Sethi S, Ziouzenkova O, Ni H, Wagner DD, Plutzky J et Mayadas TN. 2002. Oxidized omega-3 fatty acids in fish oil inhibit leukocyte-endothelial interactions through activation of PPAR alpha. *Blood* 100(4):1340-1346.
- Shachter NS. 2001. Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Current opinion in lipidology* 12(3):297-304.
- Shearer GC, Harris WS, Pedersen TL et Newman JW. 2010. Detection of omega-3 oxylipins in human plasma and response to treatment with omega-3 acid ethyl esters. *Journal of lipid research* 51(8):2074-2081.
- Shearer GC et Newman JW. 2009. Impact of circulating esterified eicosanoids and other oxylipins on endothelial function. *Current atherosclerosis reports* 11(6):403-410.

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzamelis I, Yin H et Flier JS. 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 116(11):3015-3025.

Silverstein RL. 2009. Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36. *Cleveland Clinic journal of medicine* 76 Suppl 2:S27-30.

Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G et Gonzalez FJ. 2000. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 102(6):731-744.

Siscovick DS, Raghunathan T, King I, Weinmann S, Bovbjerg VE, Kushi L, Cobb LA, Copass MK, Psaty BM, Lemaitre R, Retzlaff B et Knopp RH. 2000. Dietary intake of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *The American journal of clinical nutrition* 71(1 Suppl):208S-212S.

Song WL, Lawson JA, Reilly D, Rokach J, Chang CT, Giasson B et FitzGerald GA. 2008. Neurofurans, novel indices of oxidant stress derived from docosahexaenoic acid. *The Journal of biological chemistry* 283(1):6-16.

Sperling RI, Benincaso AI, Knoell CT, Larkin JK, Austen KF et Robinson DR. 1993. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *The Journal of clinical investigation* 91(2):651-660.

Spickett CM, Wiswedel I, Siems W, Zarkovic K et Zarkovic N. 2010. Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. *Free radical research* 44(10):1172-1202.

Spite M et Serhan CN. 2010. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. *Circulation research* 107(10):1170-1184.

Sprecher H. 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochimica et biophysica acta* 1486(2-3):219-231.

Stebbins CL, Stice JP, Hart CM, Mbai FN et Knowlton AA. 2008. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA) on eNOS in human coronary artery endothelial cells. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 13(4):261-268.

Strassburg K, Huijbrechts AM, Kortekaas KA, Lindeman JH, Pedersen TL, Dane A, Berger R, Brenkman A, Hankemeier T, van Duynhoven J, Kalkhoven E, Newman JW et Vreeken RJ. 2012. Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis: application in cardiac surgery. *Analytical and bioanalytical chemistry* 404(5):1413-1426.

Sun Y et Chen X. 2011. Ox-LDL-induced LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells: role of reactive oxygen species. *Fundamental & clinical pharmacology* 25(5):572-579.

Swirski FK et Nahrendorf M. 2013. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science* 339(6116):161-166.

- Takei H, Strong JP, Yutani C et Malcom GT. 2005. Comparison of coronary and aortic atherosclerosis in youth from Japan and the USA. *Atherosclerosis* 180(1):171-179.
- Tedgui A et Mallat Z. 2006. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiological reviews* 86(2):515-581.
- Thiery J et Seidel D. 1987. Fish oil feeding results in an enhancement of cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 63(1):53-56.
- Thies F, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, Gallagher PJ, Calder PC et Grimble RF. 2003. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet* 361(9356):477-485.
- Thies F, Miles EA, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Hurst TL, Newsholme EA et Calder PC. 2001. Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids* 36(11):1183-1193.
- Thomas WA, Kim DN et Schmee J. 1990. Retardation of atherogenesis and other effects of a fish oil additive to a hyperlipidemic diet for swine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 598:308-323.
- Titos E, Rius B, Gonzalez-Periz A, Lopez-Vicario C, Moran-Salvador E, Martinez-Clemente M, Arroyo V et Claria J. 2011. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *Journal of immunology* 187(10):5408-5418.
- Tjonahen E, Oh SF, Siegelman J, Elangovan S, Percarpio KB, Hong S, Arita M et Serhan CN. 2006. Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis. *Chemistry & biology* 13(11):1193-1202.
- Trikalinos TA, Lee J, Moorthy D, Yu WW, Lau J, Lichtenstein AH et Chung M. 2012. Effects of Eicosapentanoic Acid and Docosahexanoic Acid on Mortality Across Diverse Settings: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials and Prospective Cohorts: Nutritional Research Series, Vol 4. Rockville (MD).
- Tsitouras PD, Gucciardo F, Salbe AD, Heward C et Harman SM. 2008. High omega-3 fat intake improves insulin sensitivity and reduces CRP and IL6, but does not affect other endocrine axes in healthy older adults. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 40(3):199-205.
- Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E et Amouyel P. 1999. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet* 353(9164):1547-1557.
- Vila L. 2004. Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis. *Medicinal research reviews* 24(4):399-424.

Virmani R, Burke AP et Farb A. 1999. Plaque rupture and plaque erosion. *Thrombosis and haemostasis* 82 Suppl 1:1-3.

von Schacky C. 2008. Omega-3 fatty acids: antiarrhythmic, proarrhythmic or both? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 11(2):94-99.

von Schacky C, Angerer P, Kothny W, Theisen K et Mudra H. 1999. The effect of dietary omega-3 fatty acids on coronary atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals of internal medicine* 130(7):554-562.

Wang C, Harris WS, Chung M, Lichtenstein AH, Balk EM, Kupelnick B, Jordan HS et Lau J. 2006. n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *The American journal of clinical nutrition* 84(1):5-17.

Wang HH, Hung TM, Wei J et Chiang AN. 2004. Fish oil increases antioxidant enzyme activities in macrophages and reduces atherosclerotic lesions in apoE-knockout mice. *Cardiovascular research* 61(1):169-176.

Wang S, Wu D, Matthan NR, Lamon-Fava S, Lecker JL et Lichtenstein AH. 2009. Reduction in dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid plus docosahexaenoic acid ratio minimizes atherosclerotic lesion formation and inflammatory response in the LDL receptor null mouse. *Atherosclerosis* 204(1):147-155.

Weatherill AR, Lee JY, Zhao L, Lemay DG, Youn HS et Hwang DH. 2005. Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. *Journal of immunology* 174(9):5390-5397.

Weber C, Erl W, Pietsch A, Danesch U et Weber PC. 1995. Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 15(5):622-628.

Whelton SP, He J, Whelton PK et Muntner P. 2004. Meta-analysis of observational studies on fish intake and coronary heart disease. *The American journal of cardiology* 93(9):1119-1123.

Whitaker MO, Wyche A, Fitzpatrick F, Sprecher H et Needleman P. 1979. Triene prostaglandins: prostaglandin D3 and icosapentaenoic acid as potential antithrombotic substances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(11):5919-5923.

Wong SW, Kwon MJ, Choi AM, Kim HP, Nakahira K et Hwang DH. 2009. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 284(40):27384-27392.

- Xu Z, Riediger N, Innis S et Moghadasian MH. 2007. Fish oil significantly alters fatty acid profiles in various lipid fractions but not atherogenesis in apo E-KO mice. *European journal of nutrition* 46(2):103-110.
- Yang Y, Lu N, Chen D, Meng L, Zheng Y et Hui R. 2012. Effects of n-3 PUFA supplementation on plasma soluble adhesion molecules: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American journal of clinical nutrition* 95(4):972-980.
- Yano K, MacLean CJ, Reed DM, Shimizu Y, Sasaki H, Kodama K, Kato H et Kagan A. 1988. A comparison of the 12-year mortality and predictive factors of coronary heart disease among Japanese men in Japan and Hawaii. *American journal of epidemiology* 127(3):476-487.
- Yaqoob P et Calder P. 1995. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cellular immunology* 163(1):120-128.
- Yates CM, Tull SP, Madden J, Calder PC, Grimble RF, Nash GB et Rainger GE. 2011. Docosahexaenoic acid inhibits the adhesion of flowing neutrophils to cytokine stimulated human umbilical vein endothelial cells. *The Journal of nutrition* 141(7):1331-1334.
- Ye D, Zhang D, Oltman C, Dellsperger K, Lee HC et VanRollins M. 2002. Cytochrome p-450 epoxygenase metabolites of docosahexaenoate potently dilate coronary arterioles by activating large-conductance calcium-activated potassium channels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 303(2):768-776.
- Yin H, Musiek ES, Gao L, Porter NA, Morrow JD. 2005. Regiochemistry of neuroprostanes generated from the peroxidation of docosahexaenoic acid in vitro and in vivo. *The journal of biological chemistry*. 280(28):26600-11.
- Yokoyama M, Origasa H et Investigators J. 2003. Effects of eicosapentaenoic acid on cardiovascular events in Japanese patients with hypercholesterolemia: rationale, design, and baseline characteristics of the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). *American heart journal* 146(4):613-620.
- Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, Oikawa S, Sasaki J, Hishida H, Itakura H, Kita T, Kitabatake A, Nakaya N, Sakata T, Shimada K, Shirato K et Japan EPAI. 2007. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet* 369(9567):1090-1098.
- Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Nakakuki M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Takahashi A, Sone H, Osuga Ji J, Gotoda T, Ishibashi S et Yamada N. 2002. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor

- (LXR) binding to LXR response elements. *The Journal of biological chemistry* 277(3):1705-1711.
- Yuan JM, Ross RK, Gao YT et Yu MC. 2001. Fish and shellfish consumption in relation to death from myocardial infarction among men in Shanghai, China. *American journal of epidemiology* 154(9):809-816.
- Yusof HM, Miles EA et Calder P. 2008. Influence of very long-chain n-3 fatty acids on plasma markers of inflammation in middle-aged men. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 78(3):219-228.
- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanus F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L et Investigators IS. 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 364(9438):937-952.
- Zampolli A, Bysted A, Leth T, Mortensen A, De Caterina R et Falk E. 2006. Contrasting effect of fish oil supplementation on the development of atherosclerosis in murine models. *Atherosclerosis* 184(1):78-85.
- Zhang Y, Oltman CL, Lu T, Lee HC, Dellsperger KC et VanRollins M. 2001. EET homologs potently dilate coronary microvessels and activate BK(Ca) channels. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 280(6):H2430-2440.
- Zhao A, Yu J, Lew JL, Huang L, Wright SD et Cui J. 2004a. Polyunsaturated fatty acids are FXR ligands and differentially regulate expression of FXR targets. *DNA and cell biology* 23(8):519-526.
- Zhao Y, Joshi-Barve S, Barve S et Chen LH. 2004b. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. *Journal of the American College of Nutrition* 23(1):71-78.
- Zheng J, Huang T, Yu Y, Hu X, Yang B et Li D. 2012. Fish consumption and CHD mortality: an updated meta-analysis of seventeen cohort studies. *Public health nutrition* 15(4):725-737.
- Zhu BQ, Sievers RE, Isenberg WM, Smith DL et Parmley WW. 1990. Regression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: effects of fish oil and verapamil. *Journal of the American College of Cardiology* 15(1):231-237.