HAL
open science

MISE EN ÉVIDENCE ET CARACTÉRISATION DU TRANSFERT DE PHOSPHOLIPIDES DES LIPOPROTÉINES DE TRÈS BASSE DENSITÉ AUX PLAQUETTES SANGUINES.INTÉRÊT PARTICULIER DANS LE DIABÈTE DE TYPE 2

Salam Ibrahim

To cite this version:

Salam Ibrahim. MISE EN ÉVIDENCE ET CARACTÉRISATION DU TRANSFERT DE PHOSPHOLIPIDES DES LIPOPROTÉINES DE TRÈS BASSE DENSITÉ AUX PLAQUETTES SANGUINES.INTÉRÊT PARTICULIER DANS LE DIABÈTE DE TYPE 2. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT : . tel-00267424

HAL Id: tel-00267424

https://theses.hal.science/tel-00267424v1

Submitted on 27 Mar 2008

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.

N° d'ordre Année 2007

THESE

Présentée

Devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

Pour l'obtention

Du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le

Par

M. Salam IBRAHIM

TITRE :

MISE EN ÉVIDENCE ET CARACTÉRISATION DU TRANSFERT DE PHOSPHOLIPIDES DES LIPOPROTÉINES DE TRÈS BASSE DENSITÉ AUX PLAQUETTES SANGUINES. INTÉRÊT PARTICULIER DANS LE DIABÈTE DE TYPE 2

Directeur de thèse :

Dr Gabriel PONSIN

JURY

Pr Michel LAGARDE, Président
Dr Denis BLACHE, Rapporteur
Dr Xavier COLLET, Rapporteur
Dr Gabriel PONSIN, Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université	**M. le Professeur L. COLLET**
Vice-Président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J.F. MORNEX
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. le Professeur R. GARRONE
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur G. ANNAT
Secrétaire Général	M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec	Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche	Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
UFR de Médecine Lyon-Nord	Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE
UFR de Médecine Lyon-Sud	Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
UFR d'Odontologie	Directeur : M. O. ROBIN
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. LOCHER
Institut Techniques de Réadaptation	Directeur : M. le Professeur MATILLON
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique	Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU
UFR de Biologie	Directeur : M. le Professeur H. PINON
UFR de Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
UFR de Génie Electrique et des Procédés	Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET
UFR Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
UFR de Mathématiques	Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE
UFR d'Informatique	Directeur : M. le Professeur M. EGEA
UFR de Chimie Biochimie	Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT
UFR STAPS	Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI
Observatoire de Lyon	Directeur : M. le Professeur R. BACON
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon	Directeur : M. le Professeur J. LIETO
IUT A	Directeur : M. le Professeur M. C. COULET
IUT B	Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

LISTE DES PUBLICATIONS **5**

CONGRES SCIENTIFIQUES **7**

ABREVIATIONS **9**

AVANT-PROPOS **13**

LES PLAQUETTES SANGUINES **16**

I – ORIGINE 17

II – STRUCTURE 17

III – SIGNALISATION 19

III.1 – Agonistes *21*

III.1.1 – vWF et Collagène 21

III.1.2 – Voie Gq 21

III.1.3 – Voie Gi 22

III.1.4 – Récepteurs de l'ADP 22

III.1.5 – La Thrombine 22

III.2 – Antagonistes *23*

IV- ACTIVATION PLAQUETTAIRE 25

IV.1- Changement de la forme *25*

IV.2- Sécrétion *25*

IV.3- Agrégation *26*

V- COAGULATION 26

VI – PRINCIPALES ENZYMES 27

VI.1 – La phospholipase C (PLC) *27*

VI.2 – La phospholipase A_2 (PLA_2) *29*

VI.3 – Cyclooxygénase *30*

VI.4 – Lipoxygénase (LOX) *33*

VII – REMODELAGE MEMBRANAIRE 36

VIII – COMPLICATIONS PATHOLOGIQUES : L'HYPERACTIVITE PLAQUETTAIRE 38

LES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES **40**

I – GENERALITES 41

II – CLASSES 41

III – LES APOLIPOPROTEINES 44

IV – DYNAMIQUE ET METABOLISME 46

V – TRANSPORT INVERSE DE CHOLESTEROL 48

VI – ENZYMES 50
VI.1 – La Lipoprotéine Lipase (LPL) *50*
VII – LES PROTEINES DE TRANSFERT 54
VII.1 – PLTP *54*
VII.2 – CETP *55*
VIII – COMPLICATIONS PATHOLOGIQUES: LES DYSLIPOPROTEINEMIES 57

TRANSFERT DES PHOSPHOLIPIDES DES LIPOPROTEINES AUX PLAQUETTES 58

CONCLUSION : BUT DU TRAVAIL 61

PARTIE EXPERIMENTALE 62

METHODOLOGIE 63
I- Préparation des Plaquettes *64*
II – Test d'agrégation *64*
III – Isolement des lipoprotéines *65*
IV – Préparation des lipoprotéines marquées *65*
V- Incubation et étude du transfert de PL *66*

1ERE PARTIE
LE TRANSFERT DE PHOSPHOLIPIDES ASSOCIES AUX LIPOPROTEINES DE TRES BASSE DENSITE VERS LES PLAQUETTES HUMAINES ACTIVEES 67

2EME PARTIE
LE TRANSFERT DE PHOSPHOLIPIDES ASSOCIES AUX LIPOPROTEINES DE TRES BASSE DENSITE VERS LES PLAQUETTES HUMAINES ACTIVEES DEPEND DE L'ACTIVITE DE LA PHOSPHOLIPASE A_2 CYTOSOLIQUE 82

3ÈME PARTIE
ALTERATIONS IN THE TRANSFER OF PHOSPHOLIPIDS FROM VERY LOW DENSITY LIPOPROTEINS TO ACTIVATED PLATELETS IN TYPE 2 DIABETES 95

DISCUSSION GENERALE 129

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 136

Liste Des Publications

1. **Transfer of very low density lipoprotein-associated phospholipids to activated human platelets.**
   IBRAHIM S, DJIMET-BABOUN A, PRUNETA-DELOCHE V, CALZADA C, LAGARDE M and PONSIN G.
   Journal of Lipid Research, 2006, 47, 341-8.

2. **The transfer of very low density lipoprotein-associated phospholipids to human platelets depends upon $cPLA_2$ activity.**
   IBRAHIM S, CALZADA C, PRUNETA-DELOCHE V, LAGARDE M and PONSIN G.
   Journal of Lipid Research, 2007, 48, 1533-1538.

3. **Alterations in the transfer of phospholipids from very low density lipoproteins to activated platelets in type 2 diabetes**
   IBRAHIM S, GUILLOT N, PRUNETA-DELOCHE V, CHARRIÈRE S, CALZADA C, GUICHARDANT M, MOULIN P, LAGARDE M and PONSIN G.
   Soumis pour publication.

Congrès Scientifiques

1. **Le transfert de phospholipides des lipoprotéines aux plaquettes sanguines dépend de l'activation plaquettaire.**
   IBRAHIM S, PRUNETA-DELOCHE V., CALZADA C, LAGARDE M., PONSIN G.
   2ème congrès annuel de la NSFA, Biarritz, France, 2005

2. **The transfer of phospholipids from very low density lipoprotein to platelets depends upon platelet activation**.
   IBRAHIM S, PRUNETA-DELOCHE V, CALZADA C, LAGARDE M, PONSIN G.
   46th Int. Conf. Biosci. Lipids, Ajaccio, France, 2005

3. **The transfer of phospholipids from very low density lipoproteins to activated platelets likely results from a $cPLA_2$-dependent process.**
   IBRAHIM S, CALZADA C, PRUNETA-DELOCHE V, LAGARDE M, PONSIN G.
   3rd GERLI Lipidomics Meeting, Marseille, France, 2006

Abréviations

5-HT: 5-hydroxytryptamine.

AA: acide arachidonique.

ABCA1: ATP-binding cassette.

ADP: adénosine diphosphate.

AGEs: advanced glycation end products.

AL: acide linoléique.

ALA: acide alpha-linolénique.

ARNm: acide ribonucléique messager.

ATP: adénosine triphosphate.

BAPTA-AM: 1,2-Bis (2-aminophenoxy) ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethyl) ester.

BEL: bromoenol lactone.

CE: cholesteryl ester.

CETP: cholesteryl ester transfer protein.

CL: cholestérol libre.

COX: cyclooxygénase.

$cPLA_2$: PLA_2 cytosolique.

DAG: diacylglycérol.

DPPC: 1,2-dipalmitoyl-phosphatidylcholine.

EPA:eicosapentaenoic acid.

FAF: fatty acid-free.

FPLC: fast protein liquid chromatography.

HDL: high density lipoprotein.

HETE: acide hydroxy-eicosatetraénoïque.

HpETE: acide hydroperoxy-eicosatetraénoïque.

HpODE: acide hydroperoxy-octadecadiénoïque.

IDL: intermediate density lipoprotein.

IP_3: inositol 1,4,5-triphosphate.

$iPLA_2$: PLA_2 indépendante du calcium.

LCAT: lécithine-cholestérol acyl transférase.

LDL: low density lipoprotein.

LDL-R: LDL receptor.

LOX: lipoxygénase.

LPDS: Lipoprotein Depleted Serum.

LPL: lipoprotéine lipase.

LT: leukotriène.

LVTH: lipoprotein lipase-dependent very low density lipoprotein-triglyceride hydrolysis.

MAFP: methyl arachidonyl fluorophosphonate.

MAP: mitogen activated protein.

MDA: malonedialdéhyde.

MTP: microsomal triglyceride transfer protein.

NEFA: non-esterified fatty acids.

NSAIDs: non-steroidal anti-inflammatory drugs.

PA: phosphatidic acid; acide phosphatidique.

PAF: platelet activating facteur.

PAF-AH: PAF-acétylhydrolase.

PAPC: 1-palmitoyl-2-arachidonyl-phosphatidylcholine.

PAPE: 1-palmitoyl-2-arachidonyl-phosphatidylcholine.

PAR: protease-activated receptor.

PC: phosphatidylcholine.

PE: phosphatidyléthanolamine.

PG: prostaglandine.

PGHS: prostaglandine H synthase.

PI: phosphatidylinositol.

PIP_2: phosphatidyl inositol 4,5-diphosphate.

PKC: protéine kinase C.

PL: phospholipide(s).

PLA_2: phospholipase A_2.

PLC: phospholipase C.

PLD: phospholipase D.

PLTP: phospholipid transfer protein.

PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor.

PPP: plasma pauvre en plaquettes.

PRP: plasma riche en plaquettes.

PS: phosphatidylsérine.

SCO: système canaliculaire ouvert.

SM: sphingomyéline.

$sPLA_2$: PLA_2 sécrétoire.

TF: tissu factor.

TG: triglycérides.

TH: thyrode-hépès.

THE: TH-EDTA.

THL: tétrahydrolipstatine.

TXA_2/B_2: thromboxane A_2 ou B_2.

U73122: 1-[6-[[17ß-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl-]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione.

VLDL: very low density lipoprotein.

vWF: van Willebrand Factor.

AVANT-PROPOS

Parmi les grandes pathologies de l'espèce humaine, les maladies cardiovasculaires ont une prévalence majeure dans les pays développés. Elles résultent principalement de la conjonction de deux processus physiopathologiques : l'athérome et la thrombose. La formation des plaques d'athérome dans les artères est un processus complexe et multifactoriel. Il apparaît cependant qu'une de ses causes principales est la constitution progressive de dépôts lipidiques résultant de l'infiltration pariétale de lipoprotéines athérogènes, en particulier les lipoprotéines de basse densité (LDL). La thrombose résulte du recrutement et de l'agrégation de plaquettes sanguines, processus régis par les mécanismes complexes de la coagulation. Les phénomènes thrombotiques peuvent intervenir à deux niveaux : la formation de microthrombus accompagne le développement des plaques d'athérome et en devient de ce fait un élément constitutif. Enfin, la formation d'un thrombus important peut obstruer totalement une artère dont la lumière a été progressivement rétrécie par le développement athéromateux. Dans les cas les plus graves, ce processus peut conduire à l'infarctus du myocarde ou à un accident vasculaire cérébral. La coexistence fréquente entre le développement athéromateux et les phénomènes thrombotiques ont conduit à les associer sous le terme d'athéro-thrombose.

Dans le cadre de l'athéro-thrombose, les processus liés respectivement aux lipoprotéines et aux plaquettes sanguines ne sont pas simplement additifs. Il existe en effet de fortes interactions entre ces deux entités. Deux d'entr'elles sont particulièrement à souligner. D'une part, les lipoprotéines participent à la régulation de l'activation plaquettaire, les LDL étant stimulantes et les HDL (lipoprotéines de haute densité) protectrices. D'autre part, les lipoprotéines peuvent fournir aux plaquettes une partie des PL qu'elles consomment dans le cadre de leurs voies métaboliques d'activation. De précédents travaux ont montré que les LDL et les HDL étaient capables de transférer des PL aux plaquettes sanguines. Cependant, la possibilité que les VLDL (lipoprotéines de très basse densité) soient des donneurs de PL pour les plaquettes n'a jamais été étudiée. Bien que les VLDL constituent une fraction lipoprotéique quantitativement mineure à jeun, leur concentration peut être élevée en phase postprandiale. De plus, au cours de la lipolyse qu'elles subissent dans le plasma, l'hydrolyse des triglycérides (TG) du noyau s'accompagne d'une expulsion d'une fraction importante des PL de la surface des particules. De ce point de vue, il est envisageable que les VLDL pourraient être d'importants donneurs de PL, en particulier pour les plaquettes sanguines. L'étude de cette hypothèse a constitué la base du présent travail.

Nos travaux se sont développés selon trois étapes successives. La première a consisté à mettre en évidence et à caractériser le transfert des PL des VLDL aux plaquettes sanguines. La seconde nous a permis d'en préciser certains aspects mécanistiques. Enfin, une troisième partie a été consacrée à l'étude du transfert des PL des VLDL aux plaquettes dans le cas particulier du diabète de type 2. Le diabète de type 2 est une situation à haut risque athéromateux dans laquelle le transfert des PL des VLDL aux plaquettes pourrait être perturbé. En effet, dans cette pathologie les lipoprotéines ont des compositions et des concentrations anormales et les plaquettes sanguines sont hyperactives. De plus, l'état de stress oxydant associé au diabète de type 2 induit la formation d'espèces lipidiques oxydées.

Dans la partie "Exposé des travaux" de notre thèse, les résultats correspondants aux trois étapes de notre travail seront décrits sous la forme de trois articles. Cette partie sera précédée d'une analyse bibliographique en trois chapitres. Le premier décrira le métabolisme des plaquettes sanguines et les anomalies associées au diabète de type 2. Le deuxième décrira le métabolisme des lipoprotéines ainsi que les complications qui leur accompagnent dans le diabète de type 2. Enfin, dans Le troisième, nous rapporterons les principales connaissances issues de précédents travaux, concernant les transferts de PL des lipoprotéines aux plaquettes sanguines.

Les Plaquettes Sanguines

Les plaquettes sanguines tirent leur importance du rôle essentiel qu'elles jouent dans l'hémostase et en particulier dans le processus de thrombose. En effet, elles ont la propriété naturelle d'adhérer aux constituants de la matrice extracellulaire lorsque ceux-ci sont exposés suite à une lésion vasculaire, conduisant ainsi à une série de cascades enzymatiques et de signalisations cellulaires dont la conséquence est la coagulation. Les plaquettes n'ont pas la propriété d'adhérer à l'endothélium sain, limitant ainsi les possibilités d'agrégation ou de coagulation intempestives. En cas de développement de plaques d'athérome, les lésions de la paroi artérielle entraînent la formation de microthrombus. De plus, l'épaississement de la paroi s'accompagne d'un rétrécissement de la lumière vasculaire et celle-ci peut s'obstruer totalement en cas de formation d'un thrombus. Selon sa localisation, ce processus athéro-thrombotique peut conduire à des évènements majeurs tels qu'un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral.

I – Origine

Les plaquettes, qui constituent les plus petits éléments figurés du sang (2 à 3 µm de diamètre), sont issues de la fragmentation des mégacaryocytes médullaires. Le nombre de plaquettes produites est de l'ordre de 2000 par cellule. Les mégacaryocytes ont une taille de 30 µm et proviennent des cellules pluripotentes qui, par ailleurs, donnent aussi naissance aux érythrocytes et aux leucocytes. La durée de vie des plaquettes humaines est de 8-10 jours et dans des conditions physiologiques normales on en décompte 130.000 à 400.000 /µl. Les deux tiers de la masse plaquettaire circulent dans le sang et le reste se trouve séquestré dans la rate. Les plaquettes présentent à l'état de repos une forme discoïde avec un volume d'environ 6-8 μm^3.

II – Structure

Les plaquettes dépourvues de noyau ne contiennent pas d'ADN, mais contiennent quelques traces d'ARN. Elles renferment différents types d'organelles subcellulaires et de granules. On trouve ainsi des mitochondries, des peroxisomes et des particules de glycogène. Trois sortes de granules peuvent être observées :

- Les granules denses contenant de l'ADP, de l'ATP, de la sérotonine, des catécholamines et des cations (Ca^{2+} et Mg^{2+}).

- Les granules alpha contenant du fibrinogène, de la bêta-thromboglobuline, de la thrombospondine, un facteur de croissance, le platelet-derived growth factor (PDGF), un facteur plaquettaire neutralisant l'héparine, et le platelet factor 4 (PF4).

- Les lysosomes contenant des hydrolases acides (β-glucoronidase) et des cathepsines.

Le contenu de ces granules joue un rôle crucial au niveau de la physiologie plaquettaire. On trouve également deux systèmes membranaires, l'un connecté au milieu extracellulaire, le système canaliculaire ouvert (SCO), et l'autre strictement intracellulaire, le système tubulaire dense (STD). (Blache; 1992).

La membrane plaquettaire est, comme toutes les membranes cellulaires, formée d'une bicouche lipidique de PL contenant du cholestérol et dans laquelle sont insérées ou ancrées des protéines. Deux classes de PL sont majoritaires: i) les PL dont la tête polaire est la choline: la phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline (SM) et ii) les aminoPL dont la tête polaire est une amine primaire: la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE), (Martinez et al ; 2004). Parmi les protéines on trouve des enzymes nécessaires au maintien de la structure membranaire: la flippase, qui assure la translocation des PL (aminoPL essentiellement) vers le feuillet interne de la bicouche (Zwaal el al; 1997), la floppase, qui agit en sens inverse (Gaffet et al; 1995), et la scramblase, qui agit d'une manière bidirectionnelle (Zhou et al; 1997).

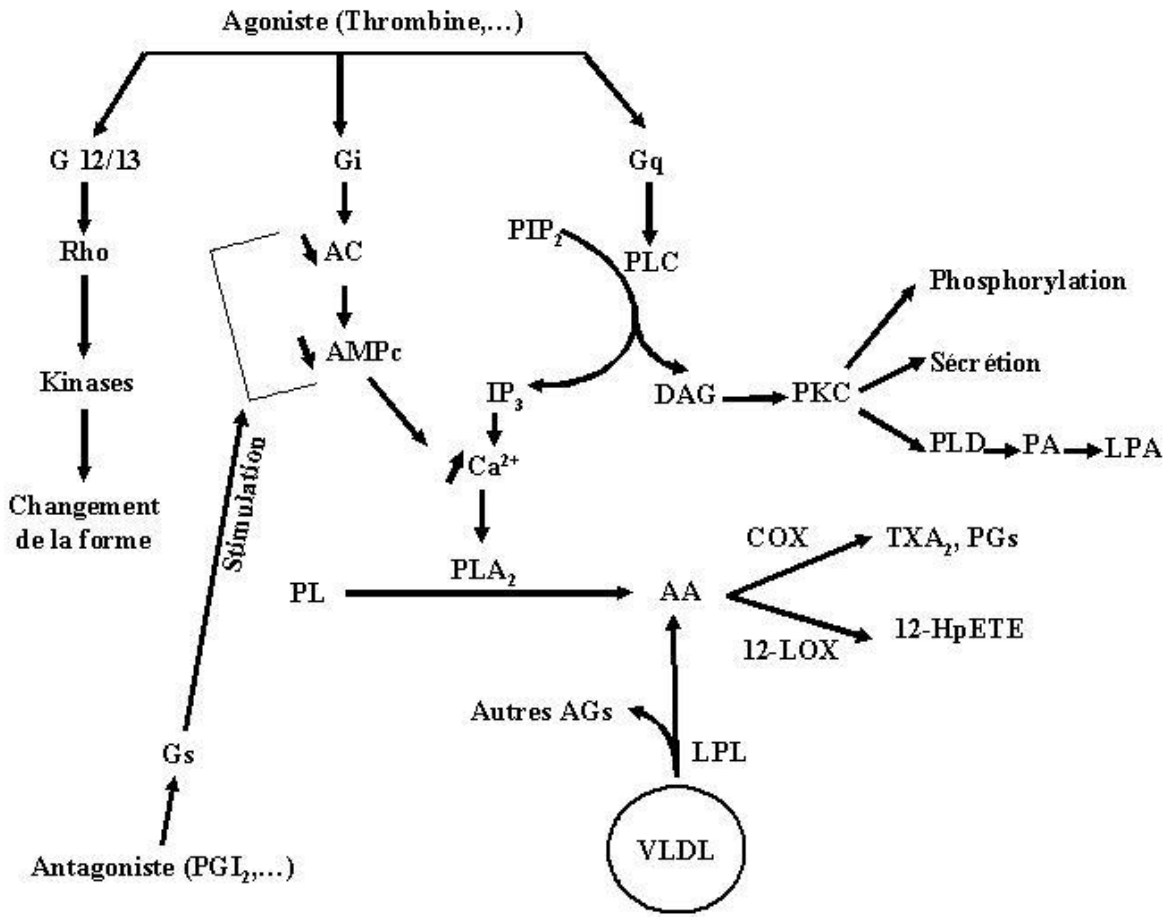
De plus, la membrane plaquettaire contient différents récepteurs glycoprotéiques qui assurent l'adhésion des plaquettes au tissu sous-endothélial ou qui interagissent avec des ligands spécifiques (agonistes ou antagonistes) (George; 2000). Ainsi la glycoprotéine GP Ib-V-IX est un récepteur pour le "van Willebrand factor" (vWF) (Lopez; 1998), la glycoprotéine GP Ia-IIa est un récepteur pour le collagène (Santoro; 1995) (Santoso; 1999), la glycoprotéine GP IIb-IIIa est un récepteur pour le fibrinogène (Shattil; 1998).

III – Signalisation

Suite à l'interaction d'un ligand avec son récepteur, une ou différentes voie(s) métabolique(s) est (sont) mise(s) en jeu. Ce ligand peut être un agoniste comme il peut être un antagoniste. Les agonistes, en stimulant leurs récepteurs, activent une ou plusieurs protéine(s) G (Gi, Gq, G12/13), chaque protéine G réagit avec son effecteur pour donner la réponse appropriée. La protéine Gi inhibe l'adénylate cyclase (AC) ce qui inhibe l'AMPc favorisant l'augmentation des taux de calcium intracellulaire (Ca^{2+}i) grâce à une diminution de l'effet de compétition de l'AMPc avec l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) activateur des canaux calciques et stimulateur de la mobilisation du Ca^{2+} dans le cytosol. La protéine Gq active la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le phosphatidyl inositol 4,5-diphosphate (PIP_2) en diacylglycérol (DAG) et IP_3 ce qui active la protéine kinase C (PKC) et la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire respectivement.

Les protéines Gi et Gq ont pour effet final la sécrétion et l'agrégation. Ainsi, suite à l'augmentation des taux du Ca^{2+} intracellulaire, la phospholipase A_2 (PLA_2) subit une translocation vers la membrane plasmique. Sa phosphorylation par des kinases entraîne son activation, et par la suite les PL sont hydrolysés, et l'acide arachidonique (AA) de la position sn_2 est libéré et constitue un substrat pour deux enzymes plaquettaires. Grâce à la cyclooxygénase (COX), l'AA est transformé en prostaglandines (PGs) et par la suite en plusieurs molécules d'importance biochimique dont le thromboxane A_2 (TXA_2), et sous l'effet de la 12-lipoxygénase (12-LOX) l'AA est transformé en acide 12-hydroperoxy-eicosatetraénoique (12-HpETE). Les PGs, le TXA_2 et le 12-HpETE sont des régulateurs majeurs de l'activité plaquettaire. Les protéines G12/13 interagissent avec des petites protéines G (Small G protein) ce qui a pour conséquence le changement de la forme des plaquettes. Par contre, les antagonistes provoquent une interaction avec une protéine Gs qui a l'effet inverse de la protéine Gi. La signalisation plaquettaire peut être résumée dans le (schéma 1).

Schéma 1 : Représentation schématique de la signalisation plaquettaire



III.1 – Agonistes

Les activateurs physiologiques des plaquettes sont variés, allant des substances stockées dans les granules (ADP), passant par des produits et métabolites plaquettaires (TXA_2), jusqu'à des molécules appartenant aux différents tissus (collagène). On pourrait classer ces activateurs selon la voie de signalisation qu'ils stimulent.

III.1.1 – vWF et Collagène

L'activation plaquettaire commence par le contact avec le tissu sous-endothélial exposé dans les vaisseaux endommagés.

Le facteur de van Willebrand (vWF) synthétisé dans les mégacaryocytes et les cellules endothéliales, lié au collagène et exposé à partir du tissu sous-endothélial des vaisseaux endommagés, active son récepteur (GP Ib/IX) couplé à une signalisation tyrosine kinase avec la contribution de plusieurs messagers, ce qui conduit à une activation d'intégrines et notamment l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou glycoprotéine GP IIbIIIa qui peut interagir ensuite avec le vWF, le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine et la thrombospondine. Un rôle important est joué par la PI3K et la PLC à ce niveau.

Le collagène pourrait interagir avec les glycoprotéines GP IaIIa (intégrine $\alpha_2\beta_1$), GP IV, GP VI. Ainsi, l'interaction du collagène avec son récepteur GP VI conduit à l'activation d'une voie tyrosine kinase impliquant de nombreux messagers, la voie de la PLC est ainsi mise en jeu, ce qui active d'une manière Inside-Out l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ capable de fixer ensuite le collagène. La stimulation par le collagène résulte en un changement de la forme, et une sécrétion granulaire. L'agrégation dépend plutôt de la sécrétion de TXA_2 et de prostaglandines H_2 (PGH_2) (Gibbins; 2004).

III.1.2 – Voie Gq

La Sérotonine ou 5-Hydroxytryptamine (5-HT) via son récepteur spécifique, le TXA_2 et le PGH_2 via le récepteur TXA_2/PGH_2, le PAF (platelet aggregating factor) via son propre

récepteur activent la voie PLC grâce à leurs récepteurs couplés à la protéine Gq. La conséquence est une augmentation des taux du Ca^{2+} intracellulaire, une agrégation plaquettaire, un changement de la forme et une sécrétion du contenu des granules (Saltzman; 1995) (Takahara; 1990) (Hourani; 1991) (Blockmans; 1995).

III.1.3 – Voie Gi

L'épinéphrine (adrénaline) provoque une agrégation via le récepteur α_2 adrénergique couplé à la protéine Gi (Steen; 1993).

III.1.4 – Récepteurs de l'ADP

La stimulation par l'ADP provoque un changement de la forme, une agrégation et une sécrétion via ses récepteurs de type P2. Toutefois, l'ADP agit par l'intermédiaire de deux récepteurs différents, on distingue le récepteur P2Y1 couplé à Gq et le récepteur P2Y12 couplé à Gi (Oury; 2006).

III.1.5 – La Thrombine

La thrombine est une sérine – protéase qui joue un rôle crucial dans le processus de la coagulation, et qui stimule les plaquettes par l'intermédiaire des récepteurs appartenant à la famille des PARs (Protease activated receptors) ou récepteurs activés par une protéase. Les PAR, sont des récepteurs non classiques qui possèdent aussi un ligand ou bien un agoniste non classique et non circulant dans le plasma. En fait, l'agoniste est constitué par une "séquence cachée" N – terminale et qui s'expose suite au clivage par la protéase. Tous les PARs ne sont pas stimulés par la thrombine. Les PARs 1, 3 et 4 sont exprimés au niveau des plaquettes et stimulés par la thrombine, ils sont connus d'ailleurs comme récepteurs pour la thrombine. Quant au PAR2, il est stimulé par la trypsine (Hollenberg; 2002). La thrombine est la protéase principale dans la cascade de la coagulation, transformant ainsi le fibrinogène en fibrine. Elle a des effets remarquables au niveau des plaquettes, des lymphocytes, des cellules endothéliales et des monocytes. Le PAR1, principal représentant de sa famille, est activé suite

au clivage d'une partie de son extrémité N – terminale extracellulaire, ce qui démasque une nouvelle extrémité N – terminale capable de lier le domaine actif du récepteur déclenchant ainsi une signalisation intracellulaire. Le PAR1 peut être couplé à plusieurs protéines G (Gq, Gi, G12/13) constituant ainsi l'agoniste type des plaquettes, provoquant par différents signaux une agrégation, une sécrétion et un changement de forme des plaquettes (Coughlin; 2000). Plusieurs études ont en outre montré que la thrombine peut stimuler les plaquettes par l'intermédiaire d'une voie dépendante de la GP Ib. Cette voie a été révélée suite à la persistance d'une activité résiduelle de la thrombine après inhibition de PAR1 et de GP IIbIIIa (Soslau; 2001).

III.2 – Antagonistes

L'adénosine, la prostaglandine D_2 (PGD_2) via leurs propres récepteurs, ainsi que les prostaglandines I_2 (PGI_2) et E_1 (PGE_1) par l'intermédiaire des récepteurs PGI_2/PGE_1, tous couplés à la protéine Gs inhibent l'agrégation, le changement de la forme et la sécrétion induits par les agonistes. (Marcus; 1993)

Enfin, la prostaglandine E_2 (PGE_2) possède deux effets différents selon les conditions: inhibition (via le récepteur PGI_2/PGE_1) ou activation (via le récepteur PGE_2) (Blockmans; 1995).

Les récepteurs ainsi que les ligands (agonistes et antagonistes) correspondants sont classés dans le (tableau 1).

Tableau 1: Principaux Récepteurs Plaquettaires (Blockmans et al; 1995)

Activation: Récepteurs couplés à la protéine G		
Récepteur	***Agoniste(s)***	***Poids Mol. (kDa)***
PAR	Thrombine	47
R. α_2	Épinéphrine	64
R. $5HT_2$	Sérotonine	232
R. TXA_2	TXA_2, PGH_2, PGG_2	37
R. PAF	PAF	220
R. V_1A	Vasopressine	125
Inhibition: Récepteurs couplés à la protéine G		
Récepteur	***Agoniste(s)***	***Poids Mol. (kDa)***
R. A_2	Adénosine	45
R. PGI_2	PGI_2, PGE_1	180
R. PGD_2	PGD_2	40
Glycoprotéines		
Récepteur	***Agoniste(s)***	***Poids Mol. (kDa)***
GP Ib/IX	vWF	143α-22β/22
GP IaIIa ($\alpha_2\beta_1$)	Collagène	153/130
GP Ic/IIa ($\alpha_5\beta_1$)	Fibronectine	160/130
GP Ic'/IIa ($\alpha_6\beta_1$)	Laminine	160/130
GP IIbIIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)	Fibrinogène, vWF	125α-22β/95
($\alpha_V\beta_3$)	Vitronectine	195/95
GP IV (ou IIb)	Thrombospondine	88
GP VI	Collagène	62

IV- Activation plaquettaire

L'activation plaquettaire implique plusieurs cascades métaboliques complexes. Elle se traduit par la sécrétion de différentes substances stockées et de métabolites provenant des réactions intra-plaquettaires ainsi que par un changement de la forme plaquettaire et par l'agrégation.

Les plaquettes répondent en deux étapes à la stimulation. Suite au contact avec le collagène et le vWF exposés au sein de l'endothélium, les plaquettes adhèrent au tissu sous-endothélial et les unes aux autres, et leur forme change. Cette agrégation primaire, formant un "thrombus blanc" qui couvre la brèche vasculaire est une réponse réversible. Cette étape sera stabilisée par des réponses irréversibles comportant la sécrétion et l'agrégation secondaire (Blockmans; 1995).

IV.1- Changement de la forme

C'est la première réponse à la stimulation. Les plaquettes subissent ce qu'on appelle une sphération qui s'observe 2-3 sec avant la formation des pseudopodes. Les deux phénomènes sont facilités par l'action du cytosquelette, et sont nécessaires à l'agrégation (Siess; 1989).

IV.2- Sécrétion

Suite à la stimulation des plaquettes et de la voie PLC, et grâce à un rôle probable des DAG et de l'acide phosphatidique (PA) produit grâce à l'action de le phospholipase D (PLD), des vésicules sont fusionnées à la membrane plasmique ce qui permet la sécrétion du contenu des granules (fibrinogène, fibronectine, ADP, Ca^{2+}, sérotonine,…), mais aussi d'autres produits et métabolites par le système canaliculaire ouvert (SCO). Le cytosquelette est fortement impliqué dans ce processus (Flaumenhaft; 2003).

IV.3- Agrégation

L'agrégation plaquettaire résulte de la libération du fibrinogène qui se fixe sur son récepteur et crée un pont inter-plaquettaire. Deux types d'agrégation plaquettaire sont rencontrés chez les plaquettes activées. L'agrégation primaire réversible qui se déroule en présence de faible concentration d'agoniste et en présence de Ca^{2+} et Mg^{2+}, et l'agrégation secondaire irréversible qui nécessite une forte concentration d'agoniste et un phénomène d'amplification de l'activation suite à la sécrétion de TXA_2 et d'épinéphrine qui stimulent à leur tour leurs propres récepteurs. Le fibrinogène est hydrolysé ainsi en fibrine par la thrombine générée à partir de la prothrombine grâce à une prothrombinase dont l'activation dépend de l'externalisation de PS par les plaquettes activées (Siess; 1989).

V- Coagulation

La coagulation sanguine résulte de la convergence de deux voies, l'une intrinsèque et l'autre extrinsèque. L'initiation commence par un dommage endothélial et l'exposition des constituants sous – endothéliaux, dont le facteur tissulaire (TF, tissu factor). La voie extrinsèque est la plus importante, elle est initiée par la liaison du TF avec le facteur VII et la formation d'un complexe TF-VIIa ce qui provoque la conversion du facteur X en Xa en présence du facteur VIIIa, constituant l'étape commune avec la voie intrinsèque. Cette dernière implique l'activation du facteur XII qui à son tour active le facteur XI. Le complexe TF-VIIa et le facteur XIa activent le facteur IX qui contribue à l'activation du facteur X. La prothrombine est ainsi convertie en thrombine sous l'action du facteur Xa, et en présence du facteur Va.

Dans ce processus, l'activation plaquettaire joue un rôle central. L'exposition de PL chargés négativement (PS) sur le feuillet externe des plaquettes, provoquée par l'activation plaquettaire induite par le contact avec les constituants sous – endothéliaux (collagène, VWF), facilite le rassemblement des facteurs de coagulation sur la surface des plaquettes activées et permet ainsi la formation de thrombine.

La formation de la thrombine constitue l'étape clé de la série de réactions enzymatiques aboutissant à la formation de la fibrine. Ainsi la thrombine est le responsable de la conversion du fibrinogène en fibrine. Le fibrinogène appartient à une famille incluant les facteurs V, VIII et XIII. Les membres de cette famille sont des substrats pour la thrombine. La stabilisation du caillot sanguin dépend de la capacité de la thrombine à transformer le fibrinogène en fibrine, mais aussi et simultanément à l'activation du facteur XIII qui stabilise le caillot.

Dans le plasma, on trouve des inhibiteurs physiologiques qui servent à maintenir une coagulation locale dans le site du dommage vasculaire ainsi qu'une balance hémostatique. L'anti – thrombine est le principal inhibiteur. Il inactive la thrombine, le facteur Xa et les facteurs VIIa, IXa, XIa et XIIa qui sont tous des sérines protéases. Il forme un complexe avec la thrombine, ce qui facilite son élimination de la circulation. La présence d'héparine active ce processus (Triplett; 2000).

VI – Principales Enzymes

VI.1 – La phospholipase C (PLC)

La PLC fait partie des enzymes qui se trouvent en amont des voies de signalisation plaquettaires, elle se trouve sous la forme de plusieurs isoenzymes, de localisation cytosolique ou membranaire. Plusieurs familles de PLC ont été découvertes (voir tableau). Pourtant, les isoformes présentes dans les plaquettes sont essentiellement la PLCβ et la PLCγ.

La PLC des eucaryotes est constituée par une série de domaines de régulations situés de part et d'autre d'un domaine catalytique caractérisé par les boîtes X et Y. Les domaines de régulations comprennent les domaines PH (pleckstrin homology), EF et C2 qui côtoient la boîte Y du domaine catalytique (Williams et Katan; 1996).

Les isoenzymes présentent une homologie et notamment au niveau de deux régions du domaine catalytique désignées par X et Y de 60 et 40 % respectivement. Parmi les principales isoenzymes, la PLCβ1 est également repartie entre le cytosol et la membrane, tandis que la PLCγ1 est principalement cytosolique (Cockcroft; 1992).

Les PLC se trouvent quasiment dans tous les tissus, leur répartition étant variable. Elles sont régulées différemment selon la famille d'origine. Ainsi, la PLCβ interagit avec les protéines G, alors que la PLCγ est une enzyme tyrosine kinase dépendante. La PLCγ, en synergie avec divers facteurs de croissance (PDGF, EGF,…), est impliquée dans la prolifération cellulaire (Balla; 2006).

Le mécanisme par lequel la PLCδ est couplé aux récepteurs membranaires n'est toujours pas clair. Selon ses isoenzymes, la localisation subcellulaire de la PLCδ peut varier (Ochocka et Pawelczyk; 2003).

PLC spécifique dusperme, la PLCζ (zeta) est connue comme un "sperm factor" qui activerait le développement de l'œuf fécondé. Elle présente plusieurs caractéristiques qui la distinguent des formes somatiques de la PLC (Swann; 2006).

La PLCε (epsilon) est régulée par les petites GTPases (small G proteins) de la superfamille des Ras (Bunney et Kattan; 2006).

La PLCη (eta) est essentiellement exprimée dans le système nerveux (Hwang; 2005).

Suite à l'activation de la PLC soit par une protéine G, soit par une voie tyrosine kinase – dépendante, le PIP2 est hydrolysé en IP_3 et DAG. L'IP_3, grâce à ses propres récepteurs dans les compartiments intracellulaires de stockage du Ca^{2+} (système tubulaire dense dans le cas des plaquettes), stimule la mobilisation de ce dernier qui joue un rôle important dans l'activation plaquettaire et même dans l'activation de la PLC contribuant alors à l'amplification de sa voie métabolique. Les DAG provoquent l'activation de la protéine kinase C et d'autres kinases ayant des rôles important dans les cellules, avant d'être transformé par la DAG kinase en PA qui active d'autres effecteurs et d'autres voies (Cockcroft; 1992) (Balla; 2006).

VI.2 – La phospholipase A_2 (PLA_2)

Les PLA_2 constituent une superfamille d'enzymes lipolytiques qui catalysent l'hydrolyse des PL en clivant les acides gras de la position sn2. Les acides gras libérés (en particulier l'AA) et les lysophospholipides formés suite à cette hydrolyse exercent diverses fonctions biologiques importantes (Balsinde; 2002).

Ainsi l'AA libéré est impliqué dans la régulation du flux du Ca^{2+}, des facteurs de transcription, du couplage excitation-contraction cardiaque, du transporteur de glutamate, de la conductance H^+, et des protéines G. Il peut être métabolisé par la COX et la LOX en éicosanoïdes (voir plus loin) régulateurs importants du processus hémostatique normal de même que pour les inflammations aigues. Les lysophospholipides sont des détergents forts et provoquent des réponses cellulaires même à faibles doses. L'acide lysophosphatidique est reconnu comme un médiateur important capable d'interagir avec des récepteurs spécifiques couplés aux protéines G provoquant des changements au niveau du cytosquelette ainsi que des mutagenèses. Le 1-O-alkyl lysoPC est le précurseur du PAF (platelet-activating factor) (Gijón; 1999).

La superfamille des PLA_2 comprend un grand nombre de protéines différentes qui peuvent être divisées en cinq familles principales: les PLA_2 sécrétoires ($sPLA_2$s), les PLA_2 cytosoliques ($cPLA_2$s), les PLA_2 Ca^{2+}-independantes ($iPLA_2$s), la PAF acetylhydrolase (PAF-AH), et la PLA_2 lysosomale (Schaloske; 2006).

Les $sPLA_2$s sont pour la majorité des petites protéines secrétées (14-18 kDa), avec une structure comprenant 5 à 8 ponts di-sulfure. Tous les membres de la famille ne se trouvent pas chez les humains. Ainsi, les $sPLA_2$s IB, II (A, D, E, F), III (55 kDa), V, X, XII sont des $sPLA_2$s humaines. Cette famille d'enzymes est dotée d'un site actif d'histidine et requiert généralement du Ca^{2+} pour son activité catalytique. Les $sPLA_2$s des mammifères ne présentent pas une préférence donnée pour un acide gras particulier, alors qu'elles ont une certaine spécificité pour certaines des têtes polaires des PLs. Ainsi, généralement les $sPLA_2$s présentent une forte activité pour les PLs anioniques, bien que le GV et GX hydrolysent aussi les vésicules de PC (Singer et al; 2002).

Les $sPLA_2$s agissent par effet paracrine, mais aussi par effet autocrine en clivant l'acide gras sn2. Ainsi, les $sPLA_2$s GIIA et X peuvent être sécrétées et agir dans la cellule d'origine (Mounier et al; 2004). Enfin, les $sPLA_2$s sont connues pour leur rôle essentiel dans les processus inflammatoires. Elles pourraient contribuer à l'hydrolyse des LDL, intervenant ainsi dans l'athérosclérose (Pruzanski et al; 2005).

Les $cPLA_2$s (GIV) sont des protéines cytosoliques caractérisées par différentes masses moléculaires (61-114 kDa), et utilisant un site actif sérine. La $cPLA_2$ GIV est régulée par le Ca^{2+} intracellulaire qui, à la différence des $sPLA_2$s, n'est pas essentiel pour la catalyse mais plutôt pour la translocation de l'enzyme vers la membrane plasmatique suite à une liaison à un domaine C2 de l'enzyme (Evans et al; 2001). Toutefois, bien que la translocation des $cPLA_2$s grâce au Ca^{2+} est nécessaire, elle reste insuffisante pour son action d'hydrolyse des PLs et la mobilisation des acides gras en sn2. Pour une action complète, il est absolument essentiel que l'enzyme soit phosphorylée sur des résidus sérine éventuellement par l'intermédiaire de MAP Kinases (McNicol et al; 1998). A la différence des $sPLA_2$s, les $cPLA_2$s hydrolysent préférentiellement l'AA de la position sn2 des PL (Clark et al; 1995). Parmi les $cPLA_2$s, la $cPLA_2$ GIVA est une enzyme présente au niveau des plaquettes. La stimulation des plaquettes par la thrombine ou le collagène provoque la translocation et la phosphorylation de la $cPLA_2$ (Börsch-Haubold et al; 1995).

Les $iPLA_2$s classifiées en GVI A et B sont des enzymes de 85-88 kDa, leur activité catalytique étant indépendante de la présence du Ca^{2+}. Il est possible que la $iPLA_2$ forme un complexe avec la calmoduline, et que la diminution du Ca^{2+} provoque la dissociation de ce complexe, ce qui aboutirait à l'augmentation de la mobilisation de l'acide gras de la position sn2. En outre, l'activité $iPLA_2$ pourrait être dépendante de sa phosphorylation par des MAP Kinases. Enfin, les $iPLA_2$s pourraient participer au remodelage des PL cellulaires (Akiba et Sato; 2004).

VI.3 – Cyclooxygénase

L'acide arachidonique, comme d'autres acides gras, une fois libéré des PL suite à l'action des PLA_2, peut être métabolisé en prostanoïdes. Cette transformation implique une oxygénation

en deux étapes par ajout de deux molécules d'O_2 (Lagarde; 1988). La première étape est catalysée par une activité COX produisant ainsi la prostaglandine G_2 (PGG_2), un intermédiaire instable qui se transforme en PGH_2 suite à l'action d'une activité peroxydase, une étape clé dans la synthèse des PGs et du TXA_2 sous l'effet des PG synthases et de la thromboxane synthase respectivement. Le TXA_2 étant un métabolite instable à faible durée de vie, est transformé ensuite en TXB_2 plus stable. Les deux activités enzymatiques, COX et péroxydase, sont portées par une seule enzyme, la prostaglandine endoperoxyde H synthase (PGHS). Les deux réactions procèdent de deux sites différents de l'enzyme. En fait, la réaction catalysée par la COX se produit dans un canal hydrophobe au sein de l'enzyme. Quant à celle de la peroxydase, elle se produit dans un site actif contenant un groupe hème. L'activité COX de la PGHS est inhibée par l'aspirine et d'autres médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs) (Seibold et al; 2000).

L'activité COX nécessite l'oxydation préalable du groupe hème du site actif de la peroxydase alors que l'activité de la peroxydase est indépendante de celle de la COX (Landino et al; 1997).

La COX existe sous une forme constitutive (COX-1) dans la plupart des tissus et cellules, et sous une forme inductive (COX-2) exprimée dans un contexte inflammatoire dans les cellules proinflammatoires (macrophages, plaquettes,…) et régulée par les glucocorticoïdes. Dans les conditions physiologiques normales, les glucocorticoïdes assurent une inhibition continue de la forme inductive. L'absence des glucocorticoïdes ou bien l'apparition d'un stimulus inflammatoire (endotoxines par exemple) provoquent une induction rapide de cette forme, menant à une réponse inflammatoire excessive et même létale parfois (Masferrer et al; 1992).
Une troisième forme a été récemment décrite, elle a été nommée COX-3 ou bien COX-1b. Cette forme provient du même gène COX-1, mais au cours de l'épissage de l'ARNm correspondant, ce dernier a retenu un intron (intron 1) qui provoque une perte de l'activité enzymatique COX (Snipes et al; 2005).

Le site actif de la COX-2 est plus grand de 20% à peu près que celui de la COX-1 et possède une forme légèrement différente. Cette différence dans la taille du site actif ainsi que dans sa forme est due à une différence de trois acides aminés au niveau du site actif, ce qui influence la fixation des inhibiteurs et offre une meilleure flexibilité pour le substrat au niveau de la

COX-2. cette propriété a permis le développement d' inhibiteurs NSAIDs spécifiques de COX-2 (Luong et al; 1996).
D'autre part, on a remarqué une allostérie négative chez la PGHS-1, qui lui est particulière. En fait, à faible concentration de substrat (AA), la PGHS-1 présente une faible affinité, ce qui provoque une déviation du métabolisme de l'AA vers la voie PGHS-2. Cette propriété est importante dans un contexte inflammatoire (Shitashige et al; 1998).

Effet biologique

Les cellules du système immunitaire produisent des cytokines en réponse à une attaque virale ou bactérienne. Ces cytokines sécrétées dans la circulation atteignent le cerveau où elles franchissent la barrière sang-cerveau. A l'interface et en réponse à la stimulation par les cytokines, les cellules vasculaires produisent des prostaglandines (PGE_2) par la voie COX-2 dont l'expression augmente en cas d'inflammation. Cette production de PG est à l'origine d'un groupe complexe de réactions rencontrées au cours de la réponse inflammatoire englobant la fièvre, l'inactivité, l'anorexie, hyperalgésie ... (Engblom et al; 2002). Quant au TXA_2, et dans le cas particulier des plaquettes, il exerce un effet autocrine via son récepteur aboutissant à l'activation plaquettaire.
Les fonctions de la COX et la place qu'elle occupe dans l'inflammation a poussé l'industrie pharmaceutique à la considérer comme une cible contre laquelle il est important de développer des inhibiteurs.

Parmi ceux-ci, il existe des inhibiteurs non spécifiques qui inhibent aussi bien la COX-1 que la COX-2. Cependant, l'inhibition simultanée de la COX-1 et 2 a entraîné des problèmes gastro-intestinaux, les deux formes de l'enzyme étant exprimées dans le tractus digestif (Wallace et al; 2000). Ces effets secondaires ont été fortement atténués grâce au développement d'inhibiteurs sélectifs pour la COX-2, forme induite par l'inflammation (Flower; 2003). Cependant, il semble que les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 soient à l'origine de problèmes cardio-vasculaires, peut-être en créant une perturbation de l'équilibre entre la production de thromboxane pro-thrombotique et la prostacycline (PGI_2) anti-thrombotique (McAdam et al; 1999).

Dans les plaquettes sanguines, on décrit essentiellement la prédominance de la forme COX-1 de la COX, bien que certaines études montrent la présence de la forme COX-2 (Weber et al;

2001). L'aspirine, inhibiteur non sélectif, est un inhibiteur irréversible de la COX. L'administration de faible doses d'aspirine (30-150 mg/jour) pourrait avoir un rôle protecteur contre les accidents thrombotiques en diminuant la production de TXA_2 plaquettaire malgré une inhibition partielle concomitante de la production endothéliale de prostacycline (Patrono; 2001).

VI.4 – Lipoxygénase (LOX)

L'AA libéré par la PLA_2 peut être recruté par une autre voie métabolique que celle de la COX, notamment il peut être métabolisé par la LOX.

Les LOXs ont été longtemps considérées comme des enzymes végétales. Cependant, en 1974 on a décrit la formation d'acide (12S,5Z,8Z,10E,14Z)-12 hydroxyeicosa-5,8,10,14-tetraénoïque (12-HETE) par des plaquettes humaines incubées avec de l'AA exogène (Hamberg et al; 1974). Cette découverte a introduit les LOXs dans le monde animal.

On pensait initialement que la LOX catalysait la formation de produits de configuration *S*. Le terme *R*-LOX – LOX qui catalyse la formation de produits de configuration *R* – a émergé dans les années 1980s au moment où on a découvert des enzymes LOX capable de convertir l'AA en acide hydroperoxy-eicosatetraénoïque (HpETE) de configuration *R* (Hawkins et al; 1987) (Bundy et al; 1986).

La réaction catalysée par la LOX menant à la formation des hydroperoxydes d'acides gras consiste en trois étapes consécutives : i) l'abstraction d'un hydrogène d'un groupe méthylène doublement allèlique, ii) un réarrangement radicalaire accompagné par une conjugaison Z,E-diène et enfin iii) l'insertion stéréospécifique *S* ou *R* du dioxygène et la réduction du radical hydroperoxy intermédiaire en l'anion correspondant (Khun et al; 1999).

Le métabolisme de l'AA par la LOX induit la formation de différents produits. L'HpETE peut être transformé sous l'action de la glutathion peroxydase en sa forme hydroxy (HETE). En outre, une autre famille moléculaire importante sur le plan inflammatoire est produite : les

leukotriènes (LT). On distingue la LTB_4 et son intermédiaire époxyde la LTA_4, ainsi que d'autres types de leukotriènes (Samuelsson; 2000) (Bryant et al; 1982).

Les différentes familles de LOX sont classées en fonction de la position du carbone sur lequel l'enzyme catalyse l'insertion de l'oxygène. On distingue les 5, 8, 12, 15-LOX qui insèrent le dioxygène sur les carbones 5, 8, 12 et 15 de l'AA respectivement, afin de produire l'HpETE correspondant.

5-LOX

La 5-LOX se trouve au niveau des leucocytes et neutrophiles, elle possède une masse moléculaire qui varie de 72 à 80 kDa. La 5-LOX catalyse la transformation de l'AA en acide 5(*S*)-hydroperoxy-6-*trans*-8,11,14-*cis*-eicosatetraénoïque (5-HpETE), grâce à son activité oxygénase, puis en acide 5(*S*)-*trans*-7,9-*trans*-11,14-*cis*-eicosatetraénoïque (leukotrièneA$_4$, LTA_4) grâce à une activité LTA_4-synthase. Les activités oxygénase et LTA_4-synthase sont toutes les deux stimulées par le Ca^{2+}, l'ATP, et les hydroperoxydes lipidiques. L'activité de la 5-LOX est favorisée par sa liaison aux membranes (nucléaire et endoplasmique) grâce à la présence d'une protéine membranaire connue sous le nom de 5-LOX-Activating Protein FLAP. L'activation de la 5-LOX semble impliquer une translocation vers la membrane nucléaire et une phosphorylation via les MAP kinases, ce qui souligne des points communs entre la 5-LOX et la phospholipase A_2.

D'autres substrats de la 5-LOX ont été identifiés, parmi lesquels on distingue l'acide 5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque (EPA), l'acide 5,8,11-eicosatriénoïque, l'acide 5,8-eicosadiénoïque, le 12-HpETE et le 15-HpETE (Radmark; 2002).

8-LOX

Bien qu'on ait pu identifier un acide 8-hydroxy-5,9,11,14-eicosatetraénoïque (8-HETE) chez l'homme, la 8-LOX n'y a pas été décrite. En fait, ce produit pourrait résulter d'une réaction non–enzymatique ou d'une réaction catalysée par la P450 monooxygénase. La 8-LOX récemment décrite chez la souris est une enzyme de 76 kDa et dont la séquence d'acides

aminés présente plus de 75% d'identité avec la 15-LOX humaine considérée comme son homologue humain. Elle métabolise l'AA et l'acide linoléique (AL) en 8(S)-HpETE et en acide 9(S)-hydroperoxy-octadeca-10,12-diénoïque [9(S)-HpODE] respectivement. Elle pourrait jouer un rôle dans la différenciation cellulaire et le développement de tumeurs chez les souris (Fürstenberger; 2002).

12-LOX

La 12-LOX est rencontrée dans les plaquettes, les leucocytes et l'épiderme. Elle présente une identité proche de 40% avec la 5-LOX. La 12-LOX leucocytaire présente une identité supérieure à 80% avec la 15-LOX réticulocytaire, d'où le terme 12/15-LOX utilisé.
La 12-LOX est une enzyme de 75 kDa. Elle métabolise l'AA en acide 12(*S/R*)-hydroperoxy-5,8,10,14-eicosatetraénoïque (12*S/R*-HpETE).

Les LOX sont des enzymes contenant du fer dans leurs sites actifs situés au niveau de l'extrémité C-terminal. Le site actif de la 12-LOX est légèrement (6%) plus grand que celui de la 15-LOX. Des mutations dans le site actif peuvent donner à l'enzyme les propriétés catalytiques d'une autre isoforme (on l'a vu notamment entre la 12 et la 15-LOX).

La 12-LOX plaquettaire – à la différence de la 12-LOX leucocytaire qui est capable d'oxygéner différents substrats allant des acides gras de 18 et 20 carbones jusqu'aux PL et les esters de cholestérol – présente une forme de spécificité envers l'AA. Quant à la 12-LOX épidermique, elle métabolise les dérivés méthyl-esters de l'AA et de l'AL.

La réaction enzymatique catalysée par les 12-LOX plaquettaire et épidermique reste linéaire pour plus de 30 min, alors que celle de la 12-LOX leucocytaire dure quelques minutes à cause de l'inactivation suicidaire de l'enzyme (Yoshimoto; 2002).

15-LOX

C'est une enzyme de 75 kDa qui catalyse la formation du 15-HpETE à partir de différents substrats représentés par l'AA, l'acide α-linolénique (ALA), l'AL, l'EPA, ainsi que les PL,

esters de cholestérol, mono, di et triglycérides, contenant des acides gras polyinsaturés. Son identité très proche de la 12-LOX reflète une origine commune des deux gènes correspondants, éventuellement par duplication du gène d'origine. L'enzyme présente aussi une inactivation suicidaire comparable à celle de la 12-LOX.

Les 12/15-LOX jouent un rôle dans la différenciation cellulaire, l'inflammation, l'asthme, la carcinogenèse et l'athérogènèse (Khun et al; 2002).

Rôle biologique des produits des LOX

Les leukotriènes synthétisés par les leucocytes à partir de l'AA et suite à l'action de la 5-LOX jouent un rôle important dans l'inflammation, ils agissent via leurs récepteurs membranaires. Le LTB4 est un le plus fort médiateur chémoattractant dans le processus imflammatoire. Les LTC4, D4, et E4 sont connus par leurs effets bronchoconstricteurs, jouant ainsi un rôle essentiel dans le développement de l'asthme (Sharma et al ; 2006).

D'autre part, le 12(S)-HpETE pourrait avoir un rôle important dans le contrôle des taux de l'AA libre dans certaines cellules. Des études ont montré que le 12(S)-HpETE favorise l'augmentation de la libération d'AA dans les plaquettes, probablement par stimulation de l'activité PLA_2, ce qui entraîne une augmentation de la formation de TXB_2 et d'autres métabolites plaquettaires (Calzada et al ; 2001).

Pour ces différentes raisons, la LOX constitue une vraie cible thérapeutique. Le développement d'inhibiteurs anti-LOX est d'une grande importance dans la lutte contre les maladies inflammatoires et cardiovasculaires.

VII – Remodelage membranaire

La membrane plasmique a longtemps été considérée comme une simple barrière biologique séparant le milieu intracellulaire du milieu externe. Cette vision est devenue caduque car il est maintenant admis que la membrane plasmique joue un rôle prépondérant dans un grand

nombre de processus physiologiques puisqu'elle comporte la plupart des éléments essentiels aux échanges entre la cellule et son environnement.

Sa composition lipidique révèle une asymétrie remarquable concernant la répartition des espèces moléculaires phospholipidiques, PC, PE, PS, PI et SM. A l'état basal, 65-75% de PC et plus que 85% de SM se trouvent dans le feuillet externe de la membrane plasmique, alors que 80 à 85% de PE et plus que 96% de PS sont localisées dans le feuillet interne. Récemment on a étudié la distribution des phosphoinositides dans la membrane. 100% de phosphatidyl inositol 4-phosphate et 80% de PI et de son dérivé 4,5-bisphosphate (PIP2) et PA sont localisés dans le feuillet interne.

Cette distribution est cohérente avec le fonctionnement biochimique des cellules. Les PC et les PI, étant localisés en majorité dans le feuillet interne, seront hydrolysés préférentiellement sous les actions respectives de la PLA_2 et la PLC, dans le cadre des processus de signalisation cellulaire correspondants.

Le maintien de cette distribution asymétrique est assuré par des protéines membranaires. Ainsi, la flippase est une aminoPL translocase qui assure l'internalisation continue des PS et PE alors que la scramblase fonctionne d'une façon bidirectionnelle aspécifique. Lors de l'activation cellulaire, les PS sont externalisées vers le feuillet externe sous l'effet d'un ensemble de phénomènes simultanés. L'activité de la flippase se trouve inhibée, ce qui empêche l'internalisation de PS. Or, cette inhibition ne peut pas expliquer à elle seule l'externalisation de PS, une activation du transport inverse doit être mise en oeuvre. Le mouvement unidirectionnel de PS vers l'extérieur pourrait être assuré par une floppase, qui possède une forte capacité de transport au niveau des plaquettes. Son activité dépend en outre de la présence de Ca^{2+} et d'ATP.

Dans les plaquettes, l'externalisation des PS exerce un rôle prépondérant dans le processus de coagulation sanguine. Elle constitue par ailleurs un marqueur de l'apoptose, et c'est grâce aux PS que les macrophages reconnaissent les cellules apoptotiques afin de les éliminer. Les PS contribuent à l'activation de plusieurs protéines. (Martinez; 2004) (yamaji-Hasegawa; 2006) (Zachowski; 1993) (Bevers; 1999)

Enfin, l'ensemble des phénomènes aboutissant à l'externalisation de PS crée une surcharge transitoire du flux de PL vers le feuillet externe, ce qui provoque, en synergie avec le cytosquelette, le bourgeonnement et l'émission de microparticules riches en PS, en antigènes spécifiques de la cellule d'origine et en autres composés reflétant la composition de la membrane cellulaire de la cellule d'origine. Ce phénomène est rencontré dans les plaquettes mais aussi dans d'autres cellules. Les microparticules pourraient avoir un rôle dans la coagulation, le fonctionnement cellulaire, l'inflammation et l'interaction cellulaire (Lynch; 2007).

VIII – Complications pathologiques : L'hyperactivité plaquettaire

Le diabète sucré est une maladie qui peut se définir par un excès de glucose dans le sang, entraînant une polyurie. En fait, on distingue deux types de diabètes sucrés. Le type 1 résulte d'une carence majeure de la production d'insuline par les cellules bêta des ilôts de Langerhans du pancréas. Le diabète de type 2 est caractérisé par une résistance à l'insuline (Rodger ; 1991). Il s'accompagne initialement d'une hyperinsulinémie plasmatique qui évolue progressivement vers une hypoinsulinémie par épuisement du pancréas.
Le diabète de type 2 est une maladie très répandue qui s'accompagne d'un risque cardiovasculaire élevé. C'est un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés. Bien que le haut risque cardiovasculaire associé au diabète de type 2 soit multifactoriel, trois causes essentielles peuvent être soulignées : les phénomènes de glycation et d'oxydation, les dyslipoprotéinémies et l'hyperactivité plaquettaire.

L'hyperglycémie entraîne une glucosylation non enzymatique (ou glycation) des protéines par condensation d'une molécule de glucose sur les fonctions amines libres des résidus d'acides aminés (amine N-terminale et amine epsilon des résidus lysine). Les bases de Schiff ainsi formées peuvent subir un réarrangement d'Amadori. Les produits résultants subissent alors de lentes recombinaisons chimiques aboutissant à la formation d'une grande variété de molécules appelées produits de glycation avancée (Advanced Glycation End-products, AGE), doués de différentes propriétés délétères. Les AGE sont en particulier capables de s'accumuler dans la paroi artérielle.

Le diabète de type 2 est aussi une situation de stress oxydant dans laquelle on observe une forte oxydation des acides gras polyinsaturés, libres ou estérifiés dans les CE, les TG et les PL. Cette oxydation aboutit à une scission des molécules et entr'autres à la production de malone dialdéhyde (MDA) qui peut former des bases de Schiff avec les résidus lysine des protéines selon une réaction similaire à celle décrite ci-dessus pour le glucose. On peut ainsi parler de phénomènes de glycoxydation. Le glucose lui-même peut d'ailleurs s'autoxyder en formant des entités carbonylées (glyoxal, methylglyoxal) capables de réagir avec les protéines, aboutissant ainsi directement à des produits glycoxidés (Jakuš et Rietbrock ; 2004).

Ces phénomènes de glycoxydation peuvent affecter directement les lipoprotéines et les plaquettes sanguines et ainsi modifier profondément leur métabolisme.

Chez les diabétiques de type 1 comme de type 2, les plaquettes sanguines présentent une hyperactivité chronique (production élevée de TXB_2), même en l'absence de complications cardiovasculaires. Cette hyperactivité est associée à un état de stress oxydant (élévation du MDA et diminution de la Vitamine E et de la Glutathion peroxydase), en particulier dans le diabète de type 2. De plus, les plaquettes présentent des défauts d'adhésion et d'agrégation, et une hypersensibilité aux agonistes. Les LDL glyquées sont capables de stimuler les voies d'activation plaquettaire (Véricel et al; 2004) (Watala et al; 2005) (Ferretti et al; 2002) (Takeda et al; 1992).

Les Lipoprotéines Plasmatiques

I – Généralités

Les lipides ne sont pas directement solubles dans l'eau. Pour circuler dans le plasma, qui est un milieu aqueux, ils doivent par conséquent former des complexes solubles. Alors que les acides gras sont transportés par l'albumine, les PL, le cholestérol libre (CL) les cholestéryl-esters (CE) et les TG s'associent avec des protéines au sein de structures appelées lipoprotéines.

Les lipoprotéines, isolées pour la première fois en 1929 par Michel Macheboeuf, sont des particules circulantes chez les animaux y compris les insectes, constituées d'un noyau hydrophobe et d'un manteau hydrophile (Olson; 1998). Le noyau hydrophobe est composé des TG et des CE, tandis que le manteau est composé de PL, de CL et d'apolipoprotéines (Schéma 2). Le caractère très structuré des lipoprotéines permet l'exposition à leur surface des groupements polaires des molécules du manteau, résultant en une très bonne solubilité des particules. Cette composition et la répartition des lipides au sein de ces particules facilitent le transport plasmatique de leurs constituants, qui sont, à l'exception des protéines, individuellement insolubles dans l'eau (Biggerstaff et al; 2004).

II – Classes

Plusieurs classes de lipoprotéines peuvent être identifiées en fonction de leur densité, celle-ci étant déterminée par leur contenu relatif en lipides et protéines. Outre leur densité, les lipoprotéines diffèrent par leur dimension, par leur composition lipidique (tableau 2) et par la nature des apolipoprotéines qu'elles contiennent (tableau 3).

Les chylomicrons et les VLDL sont riches en TG, alors que les LDL et les HDL, sont riches en cholestérol. Une forme intermédiaire est représentée par les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) résultant de l'hydrolyse partielle des TG des VLDL. Les lipoprotéines peuvent en outre être classées par leur mobilité éléctrophorétique sur gel d'agarose en α, préβ et β lipoprotéines, qui correspondent respectivement en première approximation aux HDL, VLDL et LDL, les chylomicrons ne migrant pas dans ces conditions (Vance; 2002).

Schéma 2 : Représentation schématique d'une Lipoprotéine

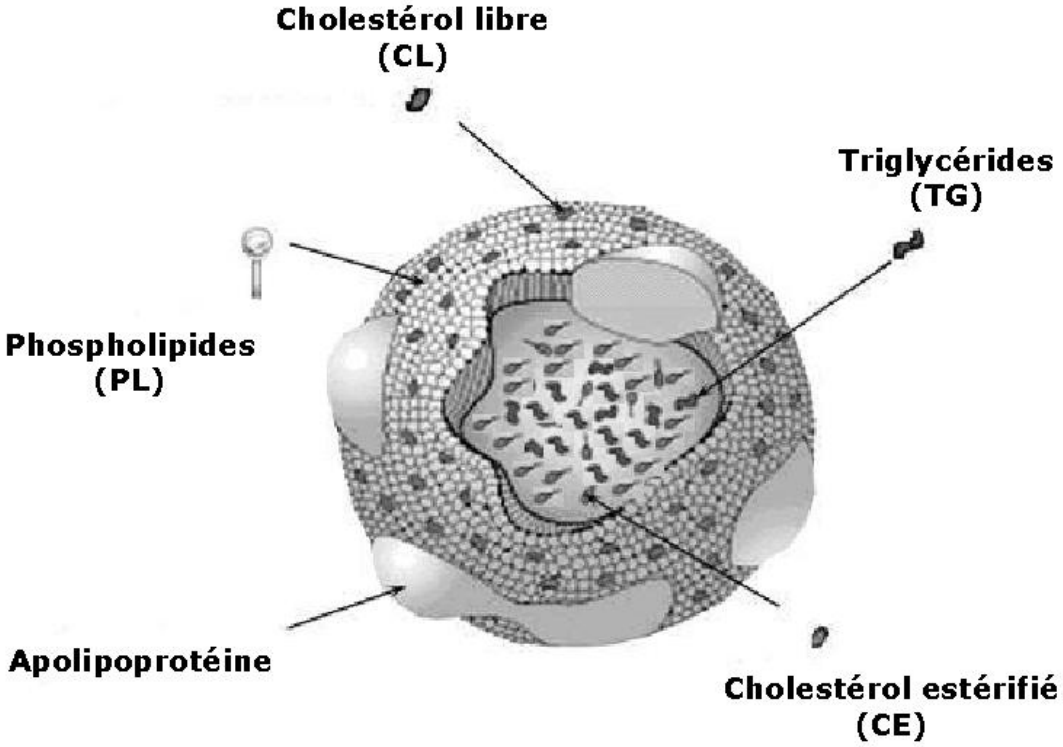


Tableau 2 : Propriétés physiques et composition des principales classes de lipoprotéines (Gotto et al; 1986)

Classification	Nom	Mobilité électroph -orétique	Densité (g/ml)	Diamètre (Å)	composition lipidique*				protéines*
					TG	CL	CE	PL	
Chylomicrons	-	-	<0,95	750-12000	80-95	1-3	2-4	3-6	1-2
Lipoprotéines de très basse densité	VLDL	Pré-beta (Pré-β)	0,95-1,006	300-700	45-65	4-8	16-22	15-20	6-10
Lipoprotéines de densité intermédiaire	IDL	Beta (β)	1,006-1,019	250-300	25-35	4-8	20-30	20-24	18-20
Lipoprotéines de basse densité	LDL	Beta (β)	1,019-1,063	180-250	4-8	6-8	45-50	18-24	18-22
Lipoprotéines de haute densité	HDL	Alpha (α)	1,063-1,21	50-120	2-7	3-5	15-20	26-32	45-55

* % de masse

Une autre classe de lipoprotéines, la lipoprotéine (a) [Lp(a)], a été découverte il y a environ 40 ans. Elle a été décrite chez les êtres humains, les primates non-humains de l'ancien monde et chez le hérisson européen. Elle est très proche en composition et en densité des LDL, mais elle s'en différencie par la présence de son apolipoprotéine spécifique, l'apo(a) (Berglund et al; 2004).

III – Les Apolipoprotéines

Les apolipoprotéines, protéines associées aux lipoprotéines, sont synthétisées dans les sites d'assemblage des lipoprotéines, le foie et l'intestin.

Certaines, très hydrosolubles, sont dites échangeables (apo As, apo Cs, apo E). Elles ont un faible poids moléculaire et peuvent être transférées entre les lipoprotéines à travers la phase aqueuse du plasma. D'autres, liposolubles, sont dites non échangeables (apo Bs). Elles ont un poids moléculaire très élevé et ne circulent pas en dehors de la particule lipoprotéique à laquelle elles ont été associées dès leur synthèse dans le foie ou l'intestin (Vance; 2002).

Les apolipoprotéines exercent plusieurs rôles : transport et distribution des lipoprotéines aux tissus grâce à leurs récepteurs spécifiques (apo B et E), maintien de la structure des lipoprotéines (apo B, A-I, A-II et E), et actions de cofacteurs (apo A-I, A-II, A-IV, A-V, C-I, C-II, C-III) des enzymes du métabolisme lipidique (Mahley et al; 1984).

Dans le cas particulier de la Lp(a), l'apo(a) spécifique de cette lipoprotéine est liée à une molécule apo B par un pont dissulfure (Berglund; 2004).

Tableau 3 : Caractéristiques des principales apolipoprotéines (Gotto et al; 1986)

	Masse Moléculaire (kDa)	sites de synthèse	fonctions connues	Distribution
ApoA-I	28	Foie, Intestin	Structure, activation de la LCAT	HDL
ApoA-II	18	Foie, Intestin	Structure	HDL
ApoA-IV	44	Foie, Intestin	Activation de la LCAT	HDL
ApoAV	39	Foie	Liaison aux récepteurs	VLDL
ApoB-48	264	Intestin	Structure, liaison aux récepteurs	Chylomicrons
ApoB-100	550	Foie	Structure, liaison aux récepteurs	VLDL, IDL, LDL
ApoC-I	6,6	Foie, Intestin	Activation de la LCAT et la LPL	VLDL, HDL
ApoC-II	8,9	Foie, Intestin	Activation de la LPL	Chylomicrons, VLDL, HDL
ApoC-III	8,8	Foie, Intestin	Inhibition de la LPL	Chylomicrons, VLDL, HDL
ApoD	22	Foie, Intestin		HDL
ApoE	34	Foie, Intestin	Liaison aux récepteurs	Chylomicrons, VLDL, HDL

IV – Dynamique et Métabolisme

Les lipoprotéines présentent une dynamique caractéristique dans la circulation. Celle-ci comprend la distribution de lipides et de vitamines liposolubles aux tissus, mais aussi la récupération ultérieure par le foie des lipides en excès. Ces fonctions s'accompagnent de profonds remodelages des particules lipoprotéiques.

Les chylomicrons sont assemblés par les entérocytes durant la période postprandiale à partir des lipides absorbés lors de la digestion. Cette synthèse requière l'expression de l'apo B-48. Cette dernière correspond à la partie N-terminale de l'apo B-100. Sa synthèse prend place à partir de l'ARNm de l'apo B-100 modifié de façon post-transcriptionnelle par une transformation C -> U introduisant un codon stop. Les constituants lipidiques se structurent en particules au contact de l'apo B-48 pendant la synthèse de cette dernière. Après glycosylation, les chylomicrons sont sécrétés dans l'espace extracellulaire et rejoignent le flux sanguin où ils subissent l'action lipolytique de la lipoprotéine lipase (LPL), se transformant ainsi en "remnants". Ces derniers, qui contiennent de l'apo E sont captés par le foie grâce aux récepteurs hépatocytaires de celle-ci (Hussain; 2000).

Le foie produit et sécrète les VLDL dans le sang. Les VLDL constituent la principale source de TG pendant le jeûne. Au contraire des chylomicrons, l'assemblage des VLDL nécessite la synthèse d'apo B-100 par les hépatocytes. Les TG du noyau des VLDL ont pour origine soit la réserve hépatique, soit une synthèse *de novo*, soit les TG provenant des lipoprotéines recaptées par le foie. Les VLDL présentent une hétérogénéité de taille dépendant essentiellement de la disponibilité de leurs constituants lipidiques. Leur diamètre s'étend de 25 à 75 nm (Gibbons; 1990).

L'assemblage des constituants lipidiques du noyau des chylomicrons et des VLDL avec l'apo B48 et l'apo B100 respectivement nécessite la présence d'une protéine spécifique : la « microsomal triglyceride transfer protein » (MTP) dans le réticulum endoplasmique (Hussain et al; 2003). Une addition d'éléments de surface aux particules préformées a probablement lieu au niveau de l'appareil de Golgi (Gibbons; 1990).

Les VLDL circulantes subissent une lipolyse et se transforment consécutivement en IDL et en LDL. Les TG du noyau sont d'abord hydrolysés sous l'action de la LPL. Les IDL résultant de cette première étape sont en partie recaptées par le foie et en partie hydrolysées en LDL par la lipase hépatique (Santamarina-Fojo et al; 2004). L'hydrolyse des TG du noyau n'est pas la seule modification résultant de la lipolyse des VLDL. Celle-ci s'accompagne d'une forte diminution de la taille des particules et donc d'un excès de composants de surface. Les apolipoprotéines hydrosolubles, les PL et le CL en excès sont progressivement expulsés du manteau des particules et peuvent être transférés à d'autres lipoprotéines (Havel; 1984). De plus, dans certaines espèces et en particulier chez l'homme, il existe un échange de lipides neutres entre les VLDL-IDL et les HDL, dépendant d'une protéine spécifique, la "Cholesteryl Ester Transfer Protein" (CETP). Ce processus engendre un enrichissement des HDL en TG et un enrichissement des VLDL-IDL en CE. Il explique que les LDL soient riches en CE alors que leurs précurseurs initiaux, les VLDL, sont riches en TG.

Les LDL sont hétérogènes en taille. On peut les classer en deux sous-fractions principales : les grandes LDL, moins denses et les petites LDL plus denses. Ces dernières sont particulièrement athérogènes (Rizzo et al; 2006). Les LDL transportent le cholestérol aux tissus ; elles sont internalisées dans les cellules cibles grâce aux récepteurs apo B/E qui ont pour ligands l'apo B-100 mais pas l'apo B-48, et l'apo E (Fielding;1992) (Brown et Goldstein; 1986).

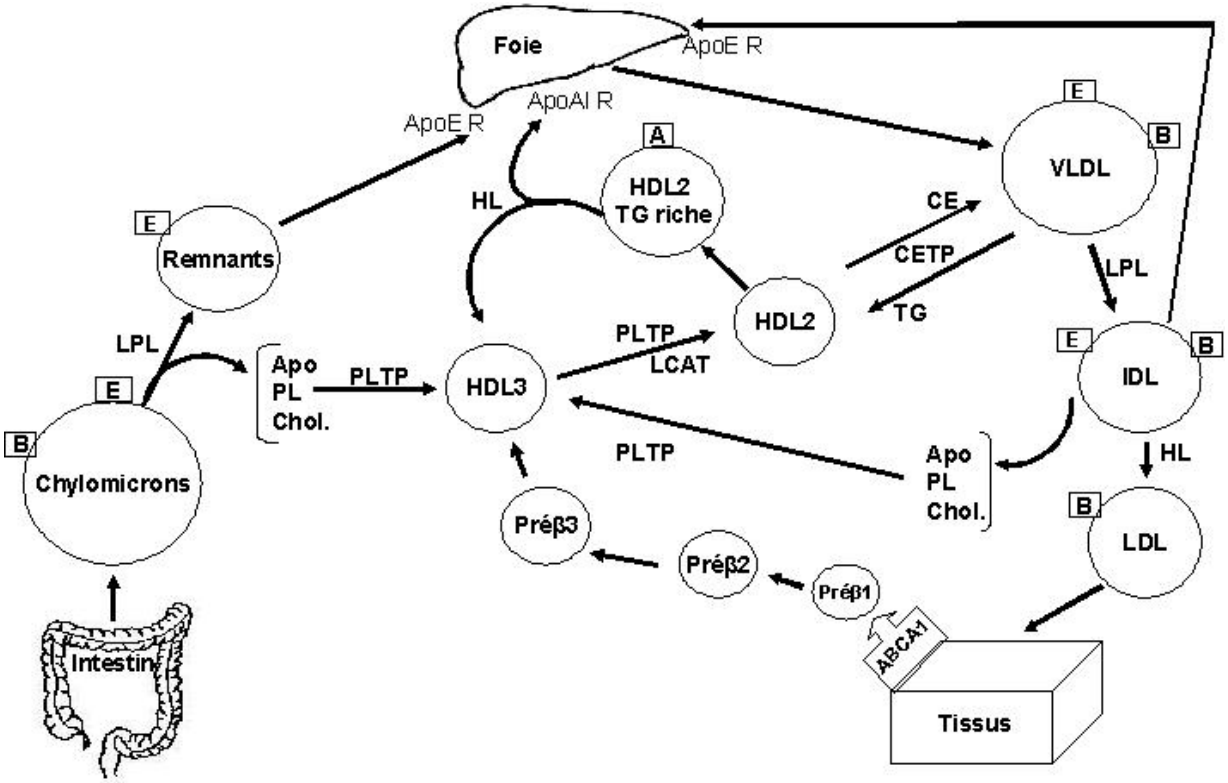
Les HDL sont des lipoprotéines à petit noyau. Le volume occupé par les éléments de surface constitue 80 % du volume total de la particule. Les HDL initiales ne possèdent pas de lipides neutres. Elles sont composées d'apo A-I ou d'apo E, de quelques molécules de PL et éventuellement de CL. Elles proviennent de l'un des mécanismes suivants : i) sécrétion directe par le foie et l'intestin (HDL naissantes), ii) formation secondaire à l'hydrolyse des lipoprotéines riches en TG, et iii) association extracellulaire de PL et d'apolipoprotéines (Rye et Barter; 2004).

V – Transport inverse de cholestérol

Les HDL sont connues pour leur rôle antiathérogène. Ce sont les récepteurs principaux des PL libérés au cours du processus de lipolyse, mais leur rôle antiathérogène est essentiellement attribué à leur capacité de captation du cholestérol en excès des cellules périphériques. Cette fonction constitue la première étape du transport inverse du cholestérol. C'est la voie par laquelle le cholestérol périphérique retourne au foie pour y être en partie éliminé sous forme de sels biliaires.

L'efflux cellulaire de cholestérol est régulé par une protéine membranaire, l'ABCA1 (ATP-Binding Cassette A1). L'ABCA1 assure la translocation de PL et de CL du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane à partir duquel ils sont captés par des HDL de type "apoA1 pauvres en lipides" qui se transforment ainsi en HDL discoïdales. Sous l'action de la lécithine : cholestérol acyltransférase (LCAT), le CL est estérifié en CE qui s'enfouit dans le noyau des particules (Lima et al; 2004). Les HDL deviennent ainsi sphériques (HDL_3) et augmentent progressivement de taille (HDL_2) au cours de leur métabolisme. Pour estérifier le cholestérol, la LCAT utilise comme substrats les groupes acyl de la position sn2 des PL. Le métabolisme des HDL implique donc un apport continu de PL. Ceux-ci proviennent essentiellement de la surface des VLDL-IDL d'où ils sont libérés au cours de la lipolyse (voir plus haut). Ce transfert de PL est facilité par une protéine spécifique, la "Phospholipid Transfer Protein" (PLTP). Finalement, le cholestérol des HDL peut être recapté par le foie par différents mécanismes : i) captation directe de CE au cours d'interactions HDL-hépatocytes ; ii) internalisation de particules résiduelles des HDL ; et iii) transfert de CE des HDL aux LDL par la CETP (voir ci dessus) et élimination des LDL par le foie via leurs récepteurs spécifiques (Fielding et Fielding; 1995) (Rye et Barter; 2004) (Barbaras et al; 1987). La dynamique des lipoprotéines et le transport inverse du cholestérol sont résumés dans le (schéma 3).

Schéma 3 : Représentation schématique de la dynamique lipoprotéique et du transport inverse du cholestérol



Les lipoprotéines sont loin d'être une entité figée, elles subissent des modifications au cours de leur circulation, elles subissent l'action des enzymes lipolytiques au cours de leur hydrolyse, des transférases, et des protéines de transfert non enzymatique au cours des échanges de lipides entre les différentes espèces lipoprotéiques.

VI – Enzymes

Les enzymes qui agissent sur les lipoprotéines sont essentiellement des lipases (LPL, ou lipase hépatiques) et des transférases (LCAT). On s'intéresse dans ce chapitre en particulier à la LPL.

VI.1 – La Lipoprotéine Lipase (LPL)

La LPL a été découverte en 1943 suite à une injection intraveineuse de l'héparine qui a provoqué une disparition spectaculaire de la lipémie associée à l'absorption d'un repas riche en lipides.

La LPL existe sous plusieurs formes. Elle est rencontrée au niveau du foie, du tissu adipeux, la glande mammaire, le cœur et autres. La forme tissulaire se trouve ancrée à l'endothélium grâce à une liaison non covalente avec des chaînes d'héparane sulfate. Elle est d'abord synthétisée au niveau des cellules parenchymales de l'organe concerné, ensuite elle est transportée vers la surface des cellules endothéliales (Schéma 4). La forme active de l'enzyme est une protéine dimérique qui perd son activité catalytique une fois dissociée en monomères.

Elle catalyse l'hydrolyse des TG des corps hydrophobes des lipoprotéines riches en TG (chylomicrons, VLDL et IDL), participant à leur métabolisme, et fournissant ainsi des acides gras et des 2-monoacylglycérols aux tissus en clivant les acides gras en position 1 et 1' des TG. Cette hydrolyse est connue sous le nom de lipolyse. De ce fait, la LPL joue un rôle crucial dans la clairance des lipoprotéines plasmatiques et dans le métabolisme lipidique au niveau des tissus périphériques, spécialement au niveau du tissu adipeux.

Plus tard on a découvert que la LPL se trouve sous une forme circulante lié aux lipoprotéines de différentes classes. Ainsi, elle colle aux lipoprotéines riches en TG et entame sa fonction d'hydrolyse en transformant ces lipoprotéines en remnants et LDL et participant éventuellement à la formation des HDL comme on l'a déjà vue, ce qui explique la présence de la LPL liée sur les lipoprotéines riches en cholestérol.

Plusieurs facteurs peuvent agir sur l'activité lipolytique de la LPL. Les apolipoprotéines apoCII et apoCIII représentent l'activateur et l'inhibiteur naturels en physiologie respectivement. La situation de l'une ou l'autre de ces deux apolipoprotéines pourrait avoir un impact direct sur l'activité lipolytique de l'enzyme.
La découverte de l'existence des anticorps circulants anti-LPL et la découverte de mutations au niveau du gène de la LPL ont ouvert de nouvelles voies dans la recherche médicale et ont donné beaucoup d'explications sur certaines hyperlipidémies inexplicables. La poursuite des études dans ce domaine pourrait trouver des solutions pour ce genre de maladies nutritionnelles et métaboliques.
En plus, un nouveau candidat dans la régulation métabolique de l'activité enzymatique de la LPL a été découvert. C'est la nouvelle apolipoprotéine apoAV récemment émergée dans la recherche médicale. Il parait que la surexpression de l'apoAV stimule la lipolyse et par la suite contribue à la chute des taux de TG plasmatiques, alors que l'absence ou bien une mutation au niveau de l'apoAV aurait l'effet inverse.

L'expression du gène de la LPL est régulée en fonction des besoins correspondants au niveau du tissu concerné. Par exemple, en cas de faim, l'expression est stimulée au niveau du cœur et inhibée au niveau du tissu adipeux, dans le but d'assurer la récompense des dépenses énergétiques et la limitation du stockage ; l'effet inverse est rencontré lors de la prise alimentaire. Il semble que cette expression est régulée par de différentes hormones comprenant l'insuline, les glucocorticoïdes, et autres. Des défauts au niveau de cette régulation peuvent mener à des formes d'obésité qui s'est trouvée accompagnée avec une augmentation de l'activité LPL au niveau du tissu adipeux.

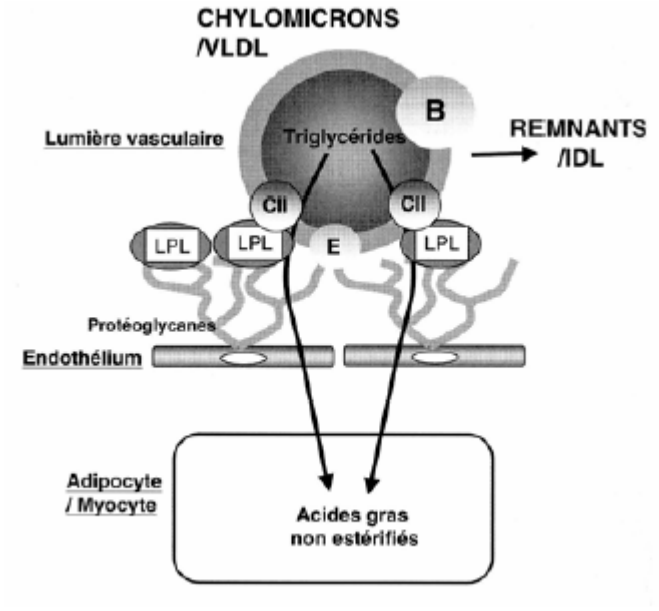
D'autres fonctions de la LPL ont été décrites. En d'autres termes, l'aptitude de la LPL à interagir simultanément avec les lipoprotéines d'une part et les protéines de surface cellulaire d'une autre part, a confié à la protéine un rôle dans l'augmentation de l'apport cellulaire en lipides et lipoprotéines, ce qui a été décrit de constituer un des facteurs de risque majeurs dans

le développement de l'athérosclérose. (Mead et al; 2002) (Vilella et al; 1993) (Zambon et al; 1996) (Pruneta-Deloche et al; 2005) (Marçais et al; 2005).

LVTH

La présence de la LPL en circulation attachée aux lipoprotéines riches en TG a permis d'en profiter pour mesurer son activité enzymatique qui présente un intérêt sur le plan physiopathologique. Cette activité lipolytique pourrait refléter la lipolyse générale des TG plasmatiques due à la LPL. Ainsi, la lipolyse dépendante de la LPL des TG des VLDL appelée aussi LVTH (Lipoprotein Lipase-Dependent Very low density lipoprotein-Triglycerid Hydrolysis) a été mesurée par dosage des acides gras libres (NEFA) libérés suite à une incubation *in vitro* des VLDL issues d'une préparation en utilisant la technique de la FPLC (fast protein liquid chromatography) qui a l'avantage, à l'inverse de l'ultracentrifugation, de préserver la liaison VLDL-LPL (Pruneta et al; 2001).

Schéma 4 : Représentation schématique de l'action de la LPL



VII – Les Protéines de transfert

Parmi les protéines de transfert, on distingue essentiellement la PLTP transférant essentiellement des PL, et la CETP transférant principalement les TG et le cholestérol.

VII.1 – PLTP

La PLTP est une glycoprotéine plasmatique formée de 476 acides aminés et ayant un poids moléculaire de l'ordre de 81 kDa. Elle joue un rôle important dans le métabolisme lipoprotéique. Elle facilite le transfert de PL à partir des lipoprotéines riches en TG vers les HDL durant la lipolyse par les lipases. Ces PL rendus disponibles grâce à la lipolyse sont des précurseurs essentiels pour les HDL.
Des études montrent en plus que la PLTP participe au remodelage des HDL et la formation des HDL pauvres en lipides qui constituent des bons accepteurs pour le cholestérol des tissus périphériques. On constate de ce qui précède que la PLTP contribue au maintien des taux des HDL et de leur contenu lipidique (Van Tol; 2002).

Des études ont montré que la PLTP participe en plus au transfert de l'α-Tocophérol (Vitamine E) vers les tissus intéressés. En fait, (Desrumaux et al; 2005) ont montré que l'absence complète de la PLTP chez des souris knock-out homozygotes PLTP-/- est associée avec une chute du contenu du cerveau en Vitamine E produisant ainsi un stress oxydant chronique et modéré.

La PLTP contribue aussi à la régulation du transfert du cholestérol. (Lee-Rueckert et al; 2006) ont montré que la PLTP améliore le fonctionnement du transporteur membranaire ABCA1 concernant l'efflux du cholestérol. D'autre part, la présence de la PLTP stimule l'activité CETP et augmente le taux de transfert du cholestérol à partir des HDL vers les LDL (Lagrost et al; 1994). En fin, d'autres études ont montré un effet direct de la PLTP sur le transfert du cholestérol mais à partir de vésicules lipidiques vers les HDL (Nishida et al; 1997).

La PLTP existe sous deux formes dans le plasma. L'une majoritaire en masse (70%) mais inactive ou de faible activité et éluée avec des particules de taille supérieure à celle des HDL

en chromatographie d'exclusion de taille, et l'autre minoritaire en masse (30%) mais active et éluée avec des particules de la taille des HDL.
Ce qui vient d'être évoqué permet de penser que la forme active est plutôt liée aux HDL dont les protéines ou la composition lipidique contribuent à son activation, tandis que la forme inactive est liée à des lipoprotéines de plus grande taille dont le milieu n'est pas favorable pour une présence active (Oka et al; 2000).

L'expression de la PLTP est régulée au niveau transcriptionnel. Il parait que des facteurs nutritionnels agissent à ce niveau là. En fait, des études chez des souris ont montré qu'un régime en fenofibrates est accompagné d'une augmentation nette de l'activité PLTP. En plus, l'absence de PPAR-α (peroxisome proliferator-activated receptor) qui est un récepteur nucléaire entraîne la perte de l'effet fenofibrates sur l'activité PLTP, ce qui montre que l'effet nutritionnel passe plutôt par des récepteurs nucléaires comprenant les PPAR (Bouly et al; 2001).

Le mécanisme d'action de la PLTP a été étudié. Il s'est avéré que l'une de ses actions est de détacher les PL des surfaces des particules donneurs, ce qui facilite leur transfert vers les particules-accepteurs.
La PLTP est une protéine thermolabile, sa dénaturation se déroule à des températures supérieures à 37°C, elle suit une courbe sigmoïde entre 37 et 60°C, la température correspondante à la dénaturation moyenne est de l'ordre de 47°C (Lalanne et Ponsin; 2000).

VII.2 – CETP

Le transfert de cholestérol à partir des HDL vers les lipoprotéines riches en TG en échange avec les TG, et vers les LDL est assuré par une protéine plasmatique, la CETP qui participe aussi au remodelage des HDL.

La CETP humaine est une glycoprotéine très hydrophobe de 70 à 74 KDA et composée de 476 résidus d'acides aminés. Le gène de la CETP est localisé au niveau du chromosome 16 à côté de celui de la LCAT. Il présente une similarité remarquable avec celui de la PLTP qui possède une homologie de 20% avec la CETP. On signale que les gènes de la PLTP et la CETP appartiennent à la même famille. Elle est synthétisée par plusieurs tissus y compris le

foie et le tissu adipeux, ainsi que par une large gamme de types cellulaires (Yamashita et al; 2000).

Le transport du HDL-CE du plasma vers le foie s'effectue selon une voie directe qui implique un rôle des récepteurs SR-BI, ou par une voie indirecte impliquant un échange du HDL-CE avec des TG des lipoprotéines riches en TG par l'intermédiaire de la CETP. Chez l'homme, les deux voies sont actives, et pourraient agir d'une façon synergique pour augmenter le transport inverse de cholestérol (Collet et al; 1999).

D'autre part, (Gauthier et al; 2005) ont montré que la CETP joue un rôle dans la récupération des HDL-CE par les hépatocytes selon un mécanisme qui n'implique pas les récepteurs SR-B1 et qui nécessite pas le transfert préalable du CE aux lipoprotéines apoB, et donc une capture via les récepteurs LDL-R. Ainsi, la CETP contribue au remodelage des HDL et le transport inverse du cholestérol.

La CETP, à l'inverse de la PLTP qui est une protéine de transfert unidirectionnel des PL et plus particulièrement vers les HDL, pourrait jouer un rôle d'échangeur de PL entre les lipoprotéines (Lagrost et al; 1994).

On a remarqué que les sujets déficients en CETP présentent des taux élevés en HDL, c'est pourquoi on a pensé à développer des inhibiteurs pour cette protéine afin de tenter d'améliorer la HDLémie. Le torcetrapib, un nouvel inhibiteur qui a été développé, a eu comme effet l'augmentation des niveaux des HDL-C chez des sujets qui souffrent d'une hypoHDLémie, mais aussi chez des sujets traités à la statine. L'inhibition de la CETP a réduit tout de même les taux de LDL-C et apoB (Brousseau et al; 2004).

La régulation de l'expression de la CETP peut être due à des facteurs nutritionnels au niveau transcriptionnelle. Ainsi, le taux de cholestérol exogène est directement impliqué et une hypercholestérolémie exogène stimule l'expression du gène de la CETP au niveau du foie, avec une augmentation dans le taux des ARNm et une augmentation de l'activité plasmatique de la CETP (Jiang et al; 1992).

VIII – Complications pathologiques: Les dyslipoprotéinémies

Les dyslipoprotéinémies du diabète de type 2 sont à la fois qualitatives et quantitatives. De nombreuses études ont montré que la diminution de la capacité métabolique des TG en période postprandiale constitue un facteur de risque pour les maladies cardio-vasculaires. Ces dyslipoprotéinémies contribuent à l'angiopathie et au développement de l'athérome artériel qui lui sont associés. Le profil lipoprotéique est clairement athérogène. On observe une hypertriglycémie modérée résultant d'une l'augmentation de la sécrétion hépatique de VLDL de grande taille et d'une diminution de leur clairance. De plus, la concentration du HDL-cholestérol est diminuée alors que les LDL denses et de petite taille sont prédominantes.

Les lipoprotéines sont sensibles aux réactions de glycoxydation décrites ci-dessus (Witztum; 1993), (Ponsin et al; 1991). En particulier, la forte production d'AGEs (advanced glycation end products) dans les LDL augmente considérablement leur athérogènicité de deux façons. D'une part, les AGEs sont capables de s'accumuler directement dans la paroi artérielle et d'autre part la glucoxydation de l'apo B aboutit à de profondes modifications structurales de cette dernière. De ce fait, les LDL ne peuvent plus être reconnues par leurs récepteurs spécifiques. Elles sont alors captées par les macrophages de la paroi vasculaire par l'intermédiaire de récepteurs éboueurs. L'accumulation de LDL dans ces macrophages conduit à leur évolution en cellules spumeuses et au développement des plaques d'athérome. (Jenkins et al; 2004) (Krauss; 2004) (Young et al; 2004) (McEneny et al; 2000) (Durlach; 1995).

Transfert Des Phospholipides Des Lipoprotéines Aux Plaquettes

Les LDL et HDL sont des réserves et des transporteurs de cholestérol. Une grande attention a été portée sur leur rôle dans le transport et l'échange du cholestérol avec les tissus périphériques. Quant aux PL, constituants, avec les protéines, la surface des lipoprotéines, on connaissait très peu sur leur échange avec les cellules et la possibilité d'être délivrés aux tissus.

Pour leur métabolisme, les plaquettes sanguines ont un fort besoin de PL. En particulier, le mécanisme d'activation plaquettaire implique la consommation d'AA. Celui-ci est clivé des PL membranaires par action de la $cPLA_2$. Bien que les plaquettes soient capables de synthétiser des PL, différents travaux ont montré que les HDL et les LDL pouvaient leur transférer différentes espèces phospholipidiques telles que des SM, des PC, des PE et en particulier des plasmalogènes PE (Engelmann et al; 1996) (Dobner et Engelmann; 1998). De plus, des lysophospholipides et des hydroperoxydes lipidiques provenant des LDL ont été retrouvés associés aux plaquettes.

Ces transferts de PL semblent, au moins pour une large part, indépendants de la liaison et/ou de l'internalisation des lipoprotéines, malgré la présence du récepteur GP IIbIIIa capable de lier les LDL (Dobner et al; 1999). En fait, plusieurs mécanismes semblent impliqués. Après activation par la thrombine, la captation de PE serait augmentée (Engelmann et al; 1998). De plus, les plaquettes activées libèreraient une chemokine spécifique qui faciliterait les échanges de SM entre lipoprotéines et cellules (Stoeckelhuber et al; 2000). L'efficacité du transfert de PL aux plaquettes n'est pas indifférente à la nature de la lipoprotéine donneuse. Ainsi, l'incorporation de SM à partir des HDL était plus forte que celle de PC, alors qu'aucune différence n'était observée avec les LDL. De plus, le transfert de PC et de SM des LDL aux plaquettes était insensible à l'action des agonistes plaquettaires alors que celui de PE était augmenté par la thrombine et d'autres agonistes aussi bien à partir des LDL que des HDL (Engelmann et al; 1998).

L'étude de ces transferts de PL est d'autant plus importante que plusieurs effets d'espèces phospholipidiques sur les plaquettes ont été décrits. D'une part, la SM inhibe l'activité 12-LOX (Fujimoto et al; 1999), alors que d'autre part les céramides, qui résultent de l'action de la sphingomyélinase sur la SM, stimulent la translocation de la $cPLA_2$ du cytosol à la membrane plaquettaire, favorisant ainsi le processus d'activation (Kitatani et al; 2000). Bien que quantitativement mineure, la PE provenant des lipoprotéines a été impliquée dans

l'activation plaquettaire. Des études ont montré que les LDL augmentent l'activité procoagulante des plaquettes stimulées par la thrombine ou bien par la thrombine associée au collagène. Ces mêmes études ont montré que l'effet des LDL déjà décrit était lié à l'augmentation du transfert de PE par les LDL aux plaquettes (Engelmann et al; 1998). En plus, la PE modifiée des LDL oxydées peut favoriser la formation de thrombine par stimulation de la prothrombinase plaquettaire (Zieseniss et al; 2001). L'acide lyso-phosphatidique des LDL oxydées peut aussi agir comme un facteur d'activation plaquettaire (Siess et al; 1999).

Conclusion : but du travail

Les rappels bibliographiques mentionnés ci-dessus mettent en évidence notre manque de connaissance concernant les mécanismes et la régulation des transferts de PL des lipoprotéines aux plaquettes sanguines. En particulier, il apparaît qu'aucune étude n'a envisagé la possibilité de tels transferts à partir des VLDL. Ceci est d'autant plus surprenant que, parmi les lipoprotéines, les VLDL devraient être a priori les donneurs de PL les plus efficaces en raison de la déstabilisation de leur surface résultant de la lipolyse. Notre travail a donc consisté dans un premier temps à mettre en évidence et à caractériser le transfert de PL des VLDL aux plaquettes sanguines (article n°1). Dans un deuxième temps, nous en avons précisé certains aspects mécanistiques (article n°2). Et finalement, nous avons envisagé les anomalies possibles de ce transfert dans le cadre du diabète de type 2 (article n°3).

Partie Expérimentale

Méthodologie

I- Préparation des Plaquettes

Le sang total frais (environ 400 ml), obtenu le jour même auprès de l'Etablissement Français du Sang, est centrifugé pendant 17 mn à 200 g. Le surnageant constitué par le plasma riche en plaquettes (PRP) est récupéré et acidifié à pH 6,4 avec de l'acide citrique 0,15 M pour prévenir une éventuelle activation plaquettaire durant la préparation. Ensuite, le PRP est centrifugé pendant 12 mn à 900 g. Le surnageant (plasma pauvre en plaquettes, PPP) est conservé pour la préparation des lipoprotéines. Le culot plaquettaire est resuspendu dans du plasma délipidé (LPDS= Lipoprotein Depleted Serum) à pH 6,4 pour désorber les lipoprotéines endogènes adsorbées sur la surface plaquettaire. Après centrifugation pendant 11 mn à 900 g, le culot est resuspendu dans un tampon Tyrode Hepes-EDTA (THE) à pH 6,4 (NaCl 140 mM ; KCl 3 mM ; $NaHCO_3$ 12 mM ; $NaH_2PO_4.H_2O$ 0,4 mM ; $MgCl_2.6H_2O$ 1,5 mM ; Hepes 50 mM ; EDTA 5 mM). La présence d'EDTA, chélateur des ions Ca^{2+}, prévient une éventuelle activation plaquettaire. Après une dernière centrifugation pendant 11 mn à 900 g, le culot est finalement suspendu dans du tampon Tyrode Hepes (TH) sans EDTA à pH 7,35. Cette préparation est laissée au repos pendant une heure à température ambiante avant utilisation.

II – Test d'agrégation

Il nous est essentiel de vérifier la fonctionnalité des plaquettes avant de les utiliser. Pour cela, un test d'agrégation est effectué à l'aide d'un agrégomètre. Son principe est basé sur les propriétés optiques de la suspension. Celle-ci est turbide. Cependant, en présence d'un agoniste, les plaquettes s'agrègent en quelques minutes, entraînant une clarification du milieu. On peut donc suivre facilement le processus d'agrégation en mesurant en temps réel la transmission lumineuse de la préparation. En pratique, on compare l'évolution de la turbidité de 400 µl de suspension de plaquettes/TH à celle de 400 µl de TH (contrôle) à 37°C après ajout d'1 µl d'acide arachidonique 400 µM (1 µM finale).

III – Isolement des lipoprotéines

Les différentes fractions lipoprotéiques sont isolées par ultracentrifugations successives à densité croissante. Le plasma PPP est d'abord ultracentrifugé à 45000 rpm (180000 g) pendant 18 heures à 10°C à la densité spontanée du plasma (1,006). Dans ces conditions, les VLDL flottent et on les récupère par aspiration. Le sousnageant est ajusté à la densité de 1,063 par addition de KBr puis recentrifugé pendant 20 heures à 4°C, permettant l'obtention des LDL. Finalement, les HDL seront préparées de façon similaire après ajustement de la densité à 1,21 et ultracentrifugation pendant 48 heures à 4°C.

Les lipoprotéines et le plasma délipidé sont dialysés contre un tampon standard (Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, NaN_3 10 mM, EDTA 1 mM à pH 7,4) de façon extensive pour éliminer le KBr ajouté. Un dosage de PL dans les différentes fractions lipoprotéiques est effectué avec une trousse commerciale (Phospholipides Enzymatiques – Biomérieux, France).

IV – Préparation des lipoprotéines marquées

Pour étudier le transfert des PL des VLDL aux plaquettes, nous avons utilisé habituellement comme marqueur le ^{14}C-PAPC (1-Palmitoyl 2-^{14}C Arachidonyl Phosphatidylcholine, 50 mci/mmol, Perkin Elmer). Cependant, pour certaines expériences spécifiques nous avons procédé à un double marquage des VLDL avec du ^{14}C-PAPC et du ^{3}H-DPPC (Dipalmitoyl Phosphatidyl [N-methyl-^{3}H]-Choline 84 ci/mmol, Amersham). Le PL traceur, dissout dans le toluène, est séché sous flux d'azote, puis repris dans un microvolume d'éthanol et ajouté sous forte agitation aux VLDL que l'on souhaite marquer, à raison de 1 µci pour 10 µmoles de VLDL-PL. L'ensemble est incubé pendant 3 heures à 37°C. Les VLDL marquées sont finalement ré-isolées par ultracentrifugation pendant 3h30 à 12°C à une vitesse de 100000 rpm (541000 g) dans un microrotor, en utilisant une ultracentrifugeuse de table (Beckman table-top ultracentrifuge Optima TL-100). Cette procédure de marquage respecte deux conditions importantes : Tout d'abord le traceur est apporté dans un volume d'éthanol inférieur à 1% du volume de VLDL pour éviter une déstructuration de celles-ci. Ensuite, la masse de PL apportée par le traceur doit rester négligeable par rapport à celle des VLDL-PL (inférieure à 1/200ème). Dans ces conditions, la préparation de VLDL marquées est stable pendant quelques

jours à 4°C. Malgré les précautions prises, une petite partie des VLDL marquées subit une dénaturation qui peut la rendre capable d'une forte adsorption non spécifique vis-à-vis des plaquettes. Pour minimiser ce phénomène, les VLDL marquées sont soumises à une procédure d'épuration juste avant leur utilisation. La préparation est incubée avec quelques ml de suspension de plaquettes/TH à 0°C pendant 5 mn puis on centrifuge pendant 10 mn à 900 g et à une température de 4°C pour éliminer le culot plaquettaire. Le surnageant ainsi épuré contient les VLDL marquées « natives » qui vont être immédiatement utilisées pour l'étude des transferts de PL.

V- Incubation et étude du transfert de PL

Les plaquettes (1 ml à concentration physiologique) sont incubées dans un volume final de 1,5 ml à 37°C pendant 0 mn (blanc) ou 1 heure, sous légère agitation, avec des VLDL marquées (200 nmoles de PL/ml) dans différentes conditions expérimentales (cf Résultats).

En fin d'incubation, une séparation des plaquettes et du milieu est réalisée par une centrifugation de 11 mn à 900 g à température ambiante. Le culot plaquettaire est repris dans du plasma complet à pH 7,35 pendant 5 mn à température ambiante pour éliminer les VLDL marquées adsorbées sur la surface plaquettaire. Après centrifugation pendant 11 mn à 900 g à température ambiante, le culot est lavé une dernière fois dans du tampon TH.

Le culot plaquettaire est finalement repris dans 250 µl d'une solution aqueuse de Polyoxyethylene-9-lauryl ether POELE (Sigma) à une concentration finale de 0,4% et incubé pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, on compte la radioactivité transférée vers les plaquettes grâce à un compteur β.

1ère PARTIE

Le transfert de phospholipides associés aux lipoprotéines de très basse densité vers les plaquettes humaines activées

Salam IBRAHIM, Anaël DJIMET-BABOUN, Valérie PRUNETA-DELOCHE, Catherine CALZADA, Michel LAGARDE et Gabriel PONSIN

Laboratoire de Régulations Métaboliques, Nutrition et Diabètes (RMND)
UMR 870 INSERM, UCBL, INSA de Lyon, INRA, HCL
Villeurbanne, France

Journal of Lipid Research 2006, Volume 47: 341-348

Introduction

Les PL sont impliqués dans une variété de phénomènes cellulaires. Dans les plaquettes, ils jouent un rôle important dans les processus de transduction du signal qui résulte de l'activation cellulaire (Lagarde; 1988) (George; 2000).
La génération de DAG suite à l'action de la PLC active de nombreuses cascades métaboliques aboutissant à des effets divers incluant la phosphorylation de protéines, la sécrétion granulaire et la libération d'acides gras par les di- et monoacylglycérol lipases (Ha et al; 1993) (Hug et al; 1993). En plus, l'activation plaquettaire stimule l'activité des PLA_2s qui hydrolysent les acides gras en position *sn*2 des PL. En particulier, la réaction catalysée par la $cPLA_2$ entraîne principalement la libération d'AA qui est le précurseur des PGs et du 12-HpETE qui sont produits suite à l'action de la COX et la LOX respectivement (Samuelsson et al; 1978) (Clark et al; 1995). Dans les plaquettes activées, les PL membranaires pourraient donc être activement dégradés, ce qui nécessite leur régénération pour assurer leur fonction cellulaire.

Bien que les PL puissent être resynthétisés dans les plaquettes (Kent ; 1995), il a été montré qu'une partie considérable est importée à partir de sources extracellulaires (Engelmann et al ; 1996) (Dobner et al; 1999) (Urban et al; 2000). *In vivo*, les plaquettes sont en contact avec les lipoprotéines circulantes qui constituent une source majeure en PL. Des études réalisées *in vitro* ont montré que la PC, la PE et la SM peuvent être transférés à partir des LDL et HDL aux plaquettes humaines (Engelmann et al; 1996). Par contre, le mécanisme sous-jacent de ces transferts semble complexe.

Bien que les plaquettes possèdent des sites de fixation de forte affinité pour les LDL, le transfert des PL était indépendant de l'internalisation ou de la fixation de ces lipoprotéines (Dobner et al; 1999). Dans le même contexte, le récepteur scavenger de la classe B et de type I (SR-B1) qui est capable de médier le transfert de PL vers de nombreuses cellules a été montré d'être absent au niveau des plaquettes (Urban et al; 2000). De plus, la captation des PC et PE par les plaquettes est régulée par différents mécanismes. Ainsi, le transfert de PE des LDL ou HDL aux plaquettes, à l'inverse de celui de PC et SM, est stimulé par les activateurs des plaquettes tels que la thrombine, l'ADP et le collagène et dépend de la sécrétion d'un facteur cellulaire protéique non identifié (Engelmann et al; 1998).
Bien que les LDL et HDL constituent les principales réserves de PL parmi les lipoprotéines, elles ne représentent pas forcément la seule source de PL transférés aux plaquettes. En effet, un rôle des VLDL à ce niveau pourrait être considéré.

Les VLDL sont des lipoprotéines sécrétées par le foie dans la circulation où elles subissent l'hydrolyse de leur TG du noyau suite à l'action de la LPL et la lipase hépatique, ce qui entraîne la formation des LDL (Jackson et al; 1987) (Deckelbaum et al; 1979). Durant ce processus, les composants de surface en excès, comprenant les apolipoprotéines, le cholestérol et les PL, sont libérés dans la circulation. Une partie majeure de cholestérol et de PL est transférée aux HDL, pour servir de substrats pour la LCAT produisant ainsi le cholestérol estérifié (Golmest; 1968) (Patsch et al; 1978).

D'un point de vue mécanistique, de nombreuses études ont mis en évidence le transfert de PL des VLDL aux HDL et montré que ce transfert se produit spontanément à travers la phase aqueuse (Massey et al; 1984), mais qu'il est facilité par la PLTP (Tall et al; 1985) (Lalanne et Ponsin; 2000). En se basant sur ces mécanismes, il est clair que tous les PL des VLDL ne sont pas transférés nécessairement aux HDL, et qu'une partie pourrait être transférée à d'autres structures. Jusqu'à présent, la possibilité du transfert des PL des VLDL aux plaquettes n'a jamais été considérée. Dans le présent travail, nous avons mis en évidence et caractérisé un transfert de PL des VLDL aux plaquettes sanguines.

Conclusion

La recherche sur le transfert de PL aux plaquettes qui a été réalisée dans le passé avait uniquement considéré les LDL et HDL comme donneurs potentiels (Engelmann et al; 1996) (Dobner et al; 1999). Dans ce travail, nous avons étudié le rôle des VLDL.
Le transfert a été étudié principalement en incubant les plaquettes sanguines avec les lipoprotéines marquées au [^{14}C]PAPC à 37°C pendant 1h. Nos travaux ont montré la réalité du transfert des PL des VLDL aux plaquettes et que à égale concentration en PL, le transfert basal des PL des VLDL marquées au [^{14}C]PAPC était identique à ceux des LDL, alors que celui des PL des HDL était largement plus faible. Ce transfert dépend de la température d'incubation et de la concentration des VLDL dans le milieu.

L'idée que les VLDL pourraient être des donneurs de PL pour les plaquettes résulte du fait qu'elles sont déstabilisées par le phénomène de lipolyse qu'elles subissent dans le plasma sous l'effet de la LPL. Cette enzyme a montré un rôle stimulateur du transfert des PL quand elle est ajoutée au système d'incubation, avec un effet dose-dépendant en utilisant deux concentrations 100 et 500 ng/ml qui correspondent aux concentrations basales et posthépariniques de la LPL respectivement (Tornwall et al; 1995). En plus, l'effet de la LPL était bien dû à son rôle catalytique comme l'a démontré l'inhibition du transfert en présence de la LPL par la THL, connue pour son rôle d'inhibiteur de l'activité lipolytique de la LPL (Lookene et al; 1994).

La stimulation du transfert par la LPL pourrait avoir deux explications. D'une part, l'hydrolyse des TG du noyau hydrophobes des VLDL provoque la déstabilisation physique de leur surface, ce qui facilite la libération des PL dans le milieu. D'autre part, les acides gras – parmi lesquels l'acide arachidonique – libérés durant la lipolyse sont capables de stimuler les plaquettes sanguines (Potter et al; 1989) (Spector et al; 1970), et donc augmenter leur besoin en PL.
Le lien entre l'activation des plaquettes et le transfert de PL a été démontré par i) la stimulation de l'activation plaquettaire en présence de la LPL et ii) l'inhibition du transfert de PL et de l'activité plaquettaire en présence d'albumine délipidée qui est capable de capter les acides gras libres du milieu et enfin iii) la stimulation du transfert en présence de thrombine qui est un activateur des plaquettes. L'activité plaquettaire entraîne donc le transfert de PL. Par contre, l'inhibition du transfert des PL aux plaquettes en présence des HDL n'a aucun effet sur l'activité plaquettaire, montrant que l'apport des PL n'est pas indispensable pour l'activité plaquettaire à court terme.

Toutefois le transfert de PL à partir des VLDL est non spécifique par rapport aux espèces de PL, ce qui est en contraste avec des travaux précédents montrant qu'à partir des LDL, seul le transfert de PE, mais pas de PC et de SM, était stimulé par la thrombine (Engelmann et al; 1998).

Dans nos conditions d'incubation, les concentrations en VLDL et HDL étaient des concentrations physiologiques. Pour simuler des conditions pathologiques dans lesquelles on peut observer une hypertriglycéridémie (hyperVLDLémie et hyperChylomicronémie) accompagnée d'une hypoHDLémie, nous avons réalisé une série d'expérience en présence de concentrations élevées de VLDL et de concentrations décroissantes de HDL. Dans ces conditions, nous avons observé des transferts non négligeables, même à la plus forte concentration de HDL, ce qui suggère que le transfert des PL des VLDL aux plaquettes pourrait constitué un phénomène pertinent d'un point de vue physiopathologique.

2ème PARTIE

Le transfert de phospholipides associés aux lipoprotéines de très basse densité vers les plaquettes humaines activées dépend de l'activité de la phospholipase A_2 cytosolique

Salam IBRAHIM, Catherine CALZADA, Valérie PRUNETA-DELOCHE, Michel LAGARDE et Gabriel PONSIN

Laboratoire de Régulations Métaboliques, Nutrition et Diabètes (RMND)
UMR 870 INSERM, UCBL, INSA de Lyon, INRA, HCL
Villeurbanne, France

Journal of Lipid Research 2007, volume 48: 1533-1538

Introduction

Dans les plaquettes, les PL sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation, parmi lesquelles celles qui dépendent des activités de la PLA_2 et la PLC (Samuelsson et al; 1978) (Clark et al; 1995) (Ha et al; 1993) (Hug et al; 1993). L'activation plaquettaire stimule l'activité de la PLA_2 qui hydrolyse les acides gras en position sn2 des PL. En particulier, la $cPLA_2$ catalyse la libération de l'AA qui est le précurseur des PGs et du 12-HpETE produits suite à l'action de la COX et la LOX respectivement (Samuelsson et al; 1978) (Clark et al; 1995). En plus, dans les plaquettes activées la formation du DAG résultant de l'action de la PLC stimule de nombreuses cascades métaboliques aboutissant à des effets divers incluant la phosphorylation de protéines, la sécrétion granulaire et la libération d'acides gras par les di- et monoacylglycérol lipases (Ha et al; 1993) (Hug et al; 1993). La dégradation des PL durant le métabolisme plaquettaire nécessite leur régénération.

Bien que les PL puissent être resynthétisés dans les plaquettes (Kent; 1995), il a été montré qu'une partie considérable est importée à partir de lipoprotéines circulantes. Des études réalisées *in vitro* ont montré que la PC, la PE et la SM peuvent être transférés à partir des LDL et HDL aux plaquettes humaines (Engelmann et al; 1996) (Dobner et al; 1999) (Urban et al; 2000). Plus récemment, nous avons considéré la possibilité que les PL associés aux VLDL pourraient être transférés aux plaquettes (Ibrahim et al; 2006).

Nos travaux ont effectivement montré que les PL associés aux VLDL peuvent être aussi transférés aux plaquettes, et que ces transferts sont stimulés par l'action de la LPL et par l'activation plaquettaire (Ibrahim et al; 2006). Cet effet de la LPL résulte de deux actions différentes. D'une part, la lipolyse des VLDL catalysée par la LPL déstabilise la surface des particules, facilitant de ce fait la libération des PL. D'autre part, les acides gras libérés durant la lipolyse stimulent l'activité plaquettaire comme l'indique l'augmentation de la production de thromboxane. La dépendance du transfert des PL vis-à-vis de l'activation plaquettaire a été confirmée par notre observation que la thrombine stimulait à la fois la production de thromboxane et le transfert des PL.

Contrairement au transfert de PL issus des LDL (Engelmann et al; 1998), il n'y avait pas de spécificité apparente pour les espèces de PL transférés des VLDL aux plaquettes (Ibrahim et al; 2006). La thrombine et la LPL stimulaient toutes les deux le transfert du PAPC, PAPE et DPPC dérivés des VLDL à des degrés comparables. Ainsi, il semble que la régulation du

transfert des PL aux plaquettes dépend de l'espèce lipoprotéique utilisée comme donneur. Alors que les LDL pourraient transférer préférentiellement certaines espèces de PL, comme la PE par exemple, par un mécanisme spécifique, les VLDL pourraient fournir toutes les espèces de PL aux plaquettes sans considération pour leur nature. Ce concept nous a incité à caractériser les voies métaboliques qui contrôlent le transfert des PL des VLDL aux plaquettes. Dans le présent travail, en utilisant différents inhibiteurs métaboliques, nous avons cherché à comprendre le mécanisme précis de ce transfert, ainsi que les voies métaboliques impliquées.

Conclusion

Dans un précédent article nous avons montré que les VLDL sont capables de fournir des PL aux plaquettes sanguines et que ce transfert est stimulé par l'activité plaquettaire ainsi que sous l'action de la LPL (Ibrahim et al; 2006). Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à explorer le mécanisme qui gouverne ce transfert ainsi que les voies métaboliques impliquées.

Dans ce but on a utilisé des inhibiteurs enzymatiques afin de discriminer entre les voies métaboliques. Le transfert de PL a été étudié lors d'incubations des plaquettes avec des VLDL marquées au [^{14}C]PAPC pendant 1h à 37°C. La COX et la LOX sont des enzymes qui jouent un rôle essentiel au niveau de l'activité plaquettaire. Toutefois, leur inhibition par l'aspirine et l'esculétine respectivement n'a montré aucun effet sur le transfert de PL, stimulé par la thrombine et la LPL, qui apparaît indépendant de l'activité de ces deux enzymes.

Par contre, en inhibant la PLA_2 d'une manière non spécifique par le MAFP, on a observé une inhibition du transfert stimulé aussi bien par la thrombine et la LPL. Dans les plaquettes, la PLA_2 existe principalement sous deux formes, la $cPLA_2$ dont l'activité dépend du Ca^{2+} et la $iPLA_2$ qui est indépendante du Ca^{2+}. Dans les mêmes conditions, le BAPTA-AM, chélateur de Ca^{2+} intracellulaire, ainsi que l'U73122 inhibant la PLC qui stimule la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire, ont eu comme effet l'inhibition du transfert de PL, montrant que celui-ci dépend de la voie dépendante du Ca^{2+} et par la suite de l'activité de la $cPLA_2$. Ces résultats ont été confirmés par l'absence d'effet du BEL, inhibiteur de la $iPLA_2$.
L'apport de PL est donc stimulé lors de l'activation plaquettaire suite à l'augmentation de l'hydrolyse des PL membranaires par la $cPLA_2$.

Parallèlement aux transferts de PL, nous avons estimé l'importance de l'activité $cPLA_2$ dans le métabolisme plaquettaire en mesurant le contenu en AA des PL et la production de TXB_2. Nous avons observé une forte hydrolyse des PL dans les plaquettes activées, en partie dépendante de l'activité $cPLA_2$.

La production plaquettaire de TXB_2 était stimulée à la fois par la thrombine et la LPL. L'effet stimulant de la thrombine a été totalement inhibé par le BAPTA-AM et l'U73122, mais celui de la LPL n'a été que partiellement diminué. Ce dernier effet était attendu puisque nous avons précédemment montré que la stimulation de l'activité plaquettaire par la LPL était

initialement due à la captation des acides gras libérés lors de la lipolyse des VLDL (Ibrahim et al; 2006).

3ème PARTIE

Alterations in the transfer of phospholipids from very low density lipoproteins to activated platelets in type 2 diabetes

IBRAHIM S, GUILLOT N, PRUNETA-DELOCHE V, CHARRIÈRE S, CALZADA C, GUICHARDANT M, MOULIN P, LAGARDE M and PONSIN G.

Laboratoire de Régulations Métaboliques, Nutrition et Diabètes (RMND)
UMR 870 INSERM, UCBL, INSA de Lyon, INRA, HCL
Villeurbanne, France

Soumis pour publication

Introduction

Le diabète de type 2 constitue une situation à haut risque pour les maladies cardiovasculaires avec l'augmentation de risque d'athérosclérose et de thrombose (Bierman; 1992). Ce risque provient en partie de différentes anomalies lipidiques comprenant une augmentation de la concentration des VLDL riches en TG, une diminution du HDL-C, et une prédominance des LDL denses et de petite taille (Krauss; 2004). De plus, le diabète de type 2 est caractérisé par une hyperactivité plaquettaire (De Cristofaro et al; 2003), même en absence de toute complication vasculaire (Véricel et al; 2004). Les dyslipoprotéinémies et l'hyperactivité plaquettaire s'accompagnent d'un état de stress oxydant résultant de l'hyperglycémie qui génère des radicaux libres et des phénomènes de glycation (Salvemini et al; 1993) (Ceriello A; 1999) (Wright et al; 2006). Alors que le stress oxydant participe directement à l'activation des plaquettes, il génère différents produits d'oxydation au niveau des lipoprotéines. L'oxydation des lipides provoque principalement la formation d'hydroperoxydes dans les CE et les PL (Watson et al; 1997). L'athérogénicité des LDL augmente avec leur degré d'oxydation. Celle-ci a lieu surtout au niveau de la paroi artérielle (Jenkins et al; 2004). L'oxydation des HDL diminue leur capacité à participer au transport inverse du cholestérol et à protéger les LDL contre l'oxydation (Francis; 2000). En raison de leur taille, la pénétration des VLDL dans la paroi artérielle est relativement difficile. Elles sont pour cela moins susceptibles à l'oxydation (McEneny et al; 2000). Par contre, dans le cas de diabète de type 2, en raison de leur fort teneur en acides gras polyinsaturés, les grandes VLDL contiennent une réserve importante de peroxydes lipidiques par comparaison avec les VLDL plus petites (Young et al; 2003).

Les anomalies du métabolisme des lipoprotéines et des plaquettes dans le diabète de type 2 sont d'autant plus intéressantes à considérer que les lipoprotéines peuvent participer à la régulation de l'activité plaquettaire (Hackeng et al; 1999) (Relou et al; 2003) (Englyst et al; 2003). En particulier, on a montré que les lipoprotéines constituent une source importante de PL pour les plaquettes. Les PL sont impliqués dans plusieurs phénomènes cellulaires. Dans les plaquettes, ils jouent un rôle important dans les processus de transduction de signal (Lagarde; 1988) (George; 2000). La génération de DAG suite à l'action de la PLC active de nombreuses cascades métaboliques aboutissant à des effets divers incluant la phosphorylation de protéines, la sécrétion granulaire et la libération d'acides gras par des di- et monoacylglycérol lipases (Ha et al; 1993) (Hug et al; 1993). De plus, l'activation plaquettaire stimule l'activité de la $cPLA_2$ qui entraîne la libération de l'AA des PL membranaires. Une fois libéré, l'AA peut être transformé en 12-HpETE ou en PGs sous l'action de la 12-LOX et

de la COX respectivement (Samuelsson et al; 1978) (Clark et al; 1995). Dans les plaquettes activées, les PL membranaires sont donc activement dégradés, ce qui nécessite leur régénération pour assurer leur fonction cellulaire. Une partie importante peut provenir des lipoprotéines circulantes. Des études réalisées *in vitro* ont montré que les PC, les PE et les SM peuvent être transférés à partir des LDL et des HDL aux plaquettes humaines (Engelmann et al; 1996) (Engelmann et al; 1998) (Dobner et al; 1999).

Récemment, nous avons montré que les VLDL peuvent aussi transférer des PL aux plaquettes (Ibrahim et al; 2006) (Ibrahim et al; 2007). Ces transferts sont stimulés par la LPL et par l'activation plaquettaire (Ibrahim et al; 2006). De plus, nous avons montré qu'ils sont dépendants de l'activité $cPLA_2$ (Ibrahim et al; 2007). Comme rappelé ci-dessus, dans le diabète de type 2, les plaquettes sont hyperactivées alors que les VLDL présentent des anomalies physicochimiques et qu'elles pourraient transporter des PL oxydés. Dans le présent travail, nous avons étudié les conséquences de ces anomalies sur le transfert de PL des VLDL aux plaquettes.

Alterations in the transfer of phospholipids from very low density lipoproteins to activated platelets in type 2 diabetes

Salam Ibrahim, Nicolas Guillot, Valérie Pruneta-Deloche, Sybil Charrière, Catherine Calzada, Michel Guichardant, Philippe Moulin, Michel Lagarde and Gabriel Ponsin

INSERM, U870, IFR62, Lyon, F-69008 ; INRA, UMR1235, Lyon, F-69008 ; INSA-Lyon, RMND, Villeurbanne, F-69621 ; Université Lyon 1, Lyon, F-69003 ; Hospices Civils de Lyon, Lyon, F-69008, France.

Abbreviated title : VLDL phospholipids transfer to platelets in diabetes

Abbreviations : PL, phospholipid; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; [^{14}C]PAPC, 1-palmitoyl-2-[1-^{14}C]arachidonyl-PC; cPLA$_2$, cytosolic phospholipase A$_2$; TG, triglyceride; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; VLDL, very low density lipoprotein; LPL, lipoprotein lipase.

Corresponding author :

Gabriel Ponsin

UMR 870 INSERM/INSA-Lyon, RMND

Bâtiment Louis Pasteur – 20 Avenue A. Einstein

69621 Villeurbanne, France

Phone : 33 4 72 43 81 13

Fax : 33 4 72 43 85 24

Email : gabriel.ponsin@insa-lyon.fr

Abstract

Type 2 diabetes is a situation at high cardiovascular risk, characterized by platelet hyperactivation, oxidative stress, elevated very-low density lipoprotein (VLDL) and low high-density lipoprotein concentrations. In the present report, we describe the effects of these alterations on the transfers of phospholipids (PL) from VLDL to platelets in basal conditions or after thrombin (0.1 U/ml) or lipoprotein lipase (LPL, 500 ng/ml)- mediated platelet activation. In vitro transfer of radiolabelled PL from VLDL (200 μM PL) to platelets (2×10^8/ml) was measured after incubations of 1 h at 37°C in a series of recombination experiments using control or diabetic platelets and VLDL, as well as normal or oxidized PL. Basal and thrombin- stimulated transfers from diabetic VLDL were similar to those from control VLDL. However, LPL-stimulated transfer was decreased when using diabetic VLDL. This was likely due to their lowered ability to be lipolyzed. When we compared the platelets from either diabetic patients or control subjects, we observed that the transfers of PL from control VLDL to diabetic platelets were 20-30 % higher than those to control platelets, whether in basal conditions or under LPL or thrombin stimulations. Finally, we observed that, in all conditions tested, the rate of transfers of oxidized PL was 2-3 times more elevated than that of non oxidized PL. Collective consideration of these data suggests that the transfer of PL from VLDL to platelets might be elevated in type 2 diabetes, favoring oxidative stress-mediated platelet hyperactivation.

Type 2 diabetes is a situation at elevated risk for cardiovascular disease with accelerated rates of atherosclerosis and thrombosis (1). This may result in part from various lipid disorders including elevated concentrations of triglyceride (TG)- rich very low-density lipoproteins, reduced high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and a predominance of small dense low-density lipoprotein (LDL) particles (2). In addition, type 2 diabetes is characterized by platelet hyperactivation (3), even in the absence of any vascular complications (4). Both dyslipoproteinemia and platelet hyperactivation are likely related to the oxidative stress resulting from hyperglycemia that generates free radicals, glycation and advanced glycation end products (5-7). While oxidative stress directly contributes to platelet activation, it generates various oxidation products in lipoproteins. Oxidation of lipids mainly result in the formation of hydroperoxides in cholesterol esters (CE) and phospholipids (PL) (8). The atherogenicity of LDL is increased by oxidative modification, occuring predominantly within the arterial wall (9). Oxidation of HDL decreased their ability to promote the reverse cholesterol transport and to protect LDL against oxidation (10). Due to their size, VLDL particles penetrate the arterial wall relatively poorly and are thus less susceptible to oxidation (11). However, due to their elevated proportion of polyinsaturated fatty acids in type 2 diabetes, large VLDL particles contain an increased lipid peroxide load compared with smaller VLDL (12).

The concommitant alterations of lipoprotein and platelet metabolisms in type 2 diabetes are of specific interest inasmuch as lipoproteins may participate to the regulation of platelet activity (13-15). In particular, lipoproteins have been shown to constitute an important source of PL for platelets. PL are involved in a variety of cellular events. In platelets, they play important roles in various signal transduction processes (16-17). Diacylglycerols generated through the action of phospholipase C activate several metabolic cascades resulting in protein phosphorylation, granule secretion and release of fatty acids by di- and monoacylglycerol lipases (18-19). In addition, platelet activation stimulates the activity of

cytosolic phospholipase A_2 ($cPLA_2$), resulting in the release of arachidonic acid from membrane PL. Once released, arachidonic acid can be oxygenated into 12-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid (12-HpETE) or prostaglandins through the actions of lipoxygenase and cyclooxygenase, respectively (20-21). Thus, platelets actively degrade PL that must be regenerated. A substantial part may be imported from circulating lipoproteins. In vitro works have shown that phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) and sphingomyeline can be transferred from HDL and LDL to human platelets (22-24).

More recently, we have reported that VLDL could also transfer PL to platelets (25-26). These transfers were favored by platelet activation and by the lipoprotein lipase (LPL)-mediated lipolysis of VLDL (25). In addition, they were shown to result from a $cPLA_2$–dependent process (26). In type 2 diabetes, as mentionned above, platelets are hyperactivated while VLDL have altered physicochemical characteristics and may contain oxidized PL. In the present report, we describe the effects of these alterations on the transfers of PL from VLDL to platelets. To this aim, we measured the in vitro transfer of radiolabelled PL from VLDL to platelets in a series of recombination experiments using control or diabetic platelets and VLDL as well as normal or oxidized PL.

Subjects and Methods

Materials

1-palmitoyl-2-[1-^{14}C]arachidonyl-phosphatidylcholine ([^{14}C]PAPC, 40-60mCi/mmol) was purchased from Perkin Elmer (Boston, MA). Thrombin, bovine milk lipoprotein lipase (LPL, EC 3.1.1.34), bovine serum albumin, fraction V, essentially fatty acid-free (FAF-alb), polyoxyethylen-9-laurylether and soybean 15- lipoxigenase were obtained from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). A commercial kit from Oxoid (Dardilly, France) was used to measure non esterified fatty acid (NEFA)

concentrations. Phospholipids and free cholesterol were assayed using enzymatic kits from Wako chemicals GmbH (Neuss, Germany). Total cholesterol and triglycerides were assayed using enzymatic kits from Biomérieux (Marcy l'Etoile, France). SepPak C 18 columns were from Waters corporation (Milford, MA).

Diabetic and control subjects

VLDL were isolated from 25 controls and 17 diabetics from the Department of Endocrinology and Metabolic Diseases. Written informed consent was obtained from all participants. Exclusion criteria for diabetic patients were smoking, antioxidant/vitamin supplementation, antiaggregating drugs and insulin treatment. All received metformin or sulfamides and 7 took lipid-lowering drugs (statins). The clinical characteristics of control subjects and diabetic patients are presented in Table 1. Blood samples were drawn after fasting overnight and plasma was immediately separated by low-speed centrifugation and kept at 4°C.

Phospholipid oxidation

[^{14}C]PAPC was oxidized into PL hydroperoxide according to Roveri et al (27), using soybean 15-lipoxygenase which catalyzes the oxidation of arachidonic acid into 15- HpETE. Briefly, 1 µmole of [^{14}C]PAPC was dissolved in 1 mL of 12 mM sodium deoxycholate and added with 2.5 mL of 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 8.8, containing lipoxygenase (20000 U/mL). After incubation under oxygen at room temperature for 30 min, oxidized products were separated from native [^{14}C]PAPC using a SepPak C18 cartridge. They were then analyzed by HPLC using a Agilent 1100 system equipped with a Xbridge^{TM} C18 3.5 µm 4.6 x 250 mm column. The mobile phase eluents were (A) acetonitrile/water pH 3 (HCl 3N) (10:90, v/v) and (B) 100 % acetonitrile. The elution gradient was developed at 40°C from 0 to 60% of (B) in 50 min and then to 100% of (B) at 60 min, at a flow rateof 1 mL/min. Monohydroxylated fatty acids were detected at λ =235 nm using a diode array detector. As expected, oxidized [^{14}C]PAPC (Ox-[^{14}C]PAPC) contained almost exclusively 15- HpETE.

Isolation and labelling of lipoproteins

VLDL (d < 1.006 g/mL) from diabetic or control subjects were isolated from human plasma by sequential preparative ultracentrifugation (28). Depending upon the volume of plasma, the ultracentrifugations were performed either in a Beckman LE 80K using a 50.2 fixed-angle rotor or in a Beckman TL-100 table-top ultracentrifuge using a TLA 100.3 fixed-angle rotor. The resulting preparations were then extensively dialyzed against a buffer containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl and 10 mM NaN_3, pH 7.4. VLDL were labelled as needed with either [^{14}C]PAPC or Ox-[^{14}C]PAPC (1 µCi per 10 µmoles of lipoprotein PL) as previously reported (29). The desired amount of radioactive label was dried under nitrogen, solubilized in ethanol and added to VLDL under vortexing. To avoid destruction of the lipoprotein structure, the final proportion of ethanol in the samples was maintained to less than 1% (V/V). The samples were then incubated for three hours at 37°C and finally the labelled VLDL were re-isolated by ultracentrifugation and dialyzed.

Platelet isolation

Fresh blood was collected at the local blood bank (Etablissement Français du Sang) from healthy volunteers or at the Department of Endocrinology and Metabolic Diseases from diabetic patients. Blood was drawn into a one-seventh volume of a solution containing 19.6 mM citric acid, 89.4 mM sodium citrate, 16.1 mM NaH_2PO_4, 128.7 mM dextrose, pH 5.6. The platelet isolation procedure was essentially based on that previously described (30). Briefly, platelet-rich plasma was obtained after blood centrifugation at 200 *g* for 17 min at 20°C and acidified to pH 6.4 with 0.15 M citric acid. Platelets were immediately pelleted by centrifugation at 900 *g* for 12 min and washed in acidified lipoprotein-deprived plasma. After re-pelleting, the platelets were finally washed and resuspended in a Tyrode-HEPES buffer solution containing 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.41 mM NaH_2PO_4, 11.9 mM $NaHCO_3$, 1 mM $MgCl_2$, 5.5 mM glucose, 5 mM HEPES, pH 7.35. Platelet suspensions were left for 1 h at room temperature before experiments were started.

Platelet aggregation

To avoid abnormal experimental data that could result from unknown medical treatment taken by blood donors, each platelet preparation was controlled for its functional ability to aggregate before being used in our studies. Aggregations were induced by arachidonic acid and performed in a Chronolog dual-channel aggregometer (Coulter, Margency, France) according to the turbidimetric method of Born (31).

Transfers of labelled phospholipids from VLDL to platelets

Labelled VLDL (200 nmol/ml PL) were incubated with platelets (3 x 10^8 cells) in a final volume of 1.5 ml at 37°C for 1 h (25). At the end of the incubations, platelets were separated from the medium by centrifugation. The pelleted platelets were first washed in plasma to remove non-specifically adsorbed labelled VLDL and then in Tyrode-HEPES buffer. The final pellets were dissolved by overnight incubation in 0.25 ml of 0.4% polyoxyethylen-9-laurylether and counted for radioactivity. The results were finally corrected for non-specifically adsorbed radioactivity at time zero (non-incubated platelets). When platelet activation was desired, LPL (500 ng/ml) or thrombin (0.1 U/ml) were added at the beginning of the incubations.

To study the relative pathophysiological importance of VLDL, platelets and PL species with respect to the magnitude of PL transfers from VLDL to platelets, we performed three different types of recombination experiments. In the first, control VLDL was substituted for diabetic VLDL. In the second, control platelets were substituted for platelets from diabetic subjects. In the third, VLDL were labelled with Ox-[^{14}C]PAPC instead of [^{14}C]PAPC. All these recombination conditions were compared to the control condition where the transfer of [^{14}C]PAPC from control VLDL to control platelets was measured. Because of the interexperimental variability, all experiments were performed in a way where each parameter of interest could be directly compared. For example, to study the role of platelets, one preparation of control platelets and one preparation of diabetic platelets were made the same day and incubated with the same sample of [^{14}C]PAPC- labelled control VLDL. The same approach was used to directly compare control to diabetic VLDL or Ox-[^{14}C]PAPC to [^{14}C]PAPC.

LPL-mediated triglyceride hydrolysis

The LPL-mediated hydrolysis of control and diabetic VLDL TG was monitored as described previously (32). VLDL (1 mM of TG) preparations were incubated for 30 min at 37°C in the presence of LPL (1 µg/mL) in tris buffer. The amounts of released NEFA were then measured and the results were expressed as percent of initial TG fatty acid content.

Results

As usually observed, the analysis of plasma lipids of type 2 diabetic partients revealed a moderate increase of their TG concentration associated with a lowering of HDL-cholesterol (Table 2). Plasma and LDL-cholesterol concentrations were not statistically different from those of control subjects. Analysis of VLDL lipid composition showed a decrease of the CE/TG in the core of diabetic particles by comparison with control VLDL (0.26 $\pm$ 0.02 vs 0.32 $\pm$ 0.03, $P<0.05$) (Table 3).

In a first series of experiments, we compared the ability of VLDL from either diabetic patients or control subjects to transfer [^{14}C]PAPC to normal platelets during incubations of 1 h at 37°C (Fig.1). No difference was observed in basal conditions. Thrombin (0.1 U/ml) stimulated the transfers from both groups of VLDL with a similar magnitude (268 $\pm$ 39 % of basal in diabetic group vs 260 $\pm$ 34 % in control group). Although LPL (500 ng/ml) stimulated the transfers of [^{14}C]PAPC from the two VLDL groups, the magnitude of the stimulation was lowered in diabetic VLDL group (128 + 13 % of basal in diabetic group vs 204 + 29 % in control group, $p<0.01$). In both groups, we observed clear correlations between LPL- and thrombin- stimulated transfers of [^{14}C]PAPC to platelets (Fig.2). The mean ratio of LPL- to thrombin- stimulation was lower in diabetic than in control group (0.56 $\pm$ 0.05 vs 0.85 $\pm$ 0.08, $P<0.001$). To compare the ability of LPL to hydrolyse TG from the two VLDL groups, we performed incubations of VLDL (1 mM of TG) from diabetic patients and control subjects with LPL (1 µg/ml) during 30 min at 37°C. As judged from the release of NEFA, TG from diabetic VLDL appeared to be about 20% less hydrolysable than those from control VLDL (Fig.3).

In the second series of transfer experiments, we compare the transfers of [^{14}C]PAPC from control VLDL to platelets from either diabetic patients or control subjects (Fig.4). Whether in basal conditions or under LPL or thrombin stimulations, the transfers of [^{14}C]PAPC to diabetic platelets were 20-30 % higher than those to control platelets.

Finally, the last series of experiments was aimed to study the effect of oxidation of [^{14}C]PAPC on its ability to be transferred from control or diabetic VLDL to normal platelets. Whether in basal conditions or under LPL or thrombin stimulations, the rate of transfers of Ox-[^{14}C]PAPC to control platelets was 2-3 times more elevated than that of [^{14}C]PAPC (Fig.5). When the same experiments were performed using diabetic rather than control platelets, similar results were obtained, although the rate of transfers of Ox-[^{14}C]PAPC was less than 2 times more elevated than that of [^{14}C]PAPC in all tested conditions.

Discussion

Membrane PL may be actively degraded during platelet activation, which necessitates their regeneration. Although PL may be resynthetized in platelets (33), a substantial part is imported from circulating lipoproteins. LDL and HDL have long been reported to transfer PL to platelets (22-24), but we have recently shown that VLDL might constitute the most important donnor of PL since the latter are released from the surface of VLDL particles during lipolysis (25). In addition to LPL, the transfer of PL from VLDL to platelets was stimulated by platelet activation and appeared to be a $cPLA_2$- dependent process (26).

In the present work, we have studied the putative alterations in the transfer of PL from VLDL to platelets that could occur in type 2 diabetes, a situation at high risk for atherosclerosis and thrombosis. The possibility of such modifications was hypothetized on the basis of three considerations showing that all the parameters involved in the transfer of PL from VLDL to platelets could be altered. Firstly, in this pathology, platelets are hyperactivated (3-4). Secondly, type 2 diabetic patients are characterized by abnormal VLDL, both from quantitative and qualitative viewpoints (2,34). Quantitatively, their plasma VLDL concentration is moderately elevated, while qualitatively, diabetic

VLDL particles are large and their core TG/CE ratio is higher than in control VLDL. Thirdly, type 2 diabetes is accompanied by an oxidative stress that results in the oxidation of various molecular species (3-4). In particular, oxidation of fatty acids leads to the formation of lipid hydroperoxides in CE and PL that can be transported by lipoproteins, and several works have reported the occurence of oxidized VLDL in addition to that of oxidized LDL (11-12).

Since platelets from diabetic patients are hyperactivated, their PL turnover must be elevated. Consistent with this idea, our in vitro experiments clearly indicate that diabetic platelets imported more PL from VLDL than control platelets, whether stimulated or not. When we compared the ability of control and diabetic VLDL to transfer PL to platelets, we did not observe any differences in basal or thrombin- stimulated conditions. However, LPL-stimulated PL transfer from diabetic VLDL was about 40 % lowered as compared to that from control VLDL. In a previous work we have shown that LPL stimulated the transfer of PL from VLDL to platelets through two different mechanisms resulting from LPL-mediated VLDL TG hydrolysis (25). Firstly, this process directly facilitates the release of PL molecules from the particle surface, and secondly it leads to the liberation of NEFA that activate platelets. Thus, the lowered LPL-stimulated transfer observed with diabetic VLDL might result from a lipolysis defect. To test this possibility, we performed measurements of VLDL lipolysability in the presence of LPL. Diabetic VLDL were approximately two-times less hydrolysable than control VLDL. Since these assays were carried out at constant VLDL and LPL concentrations, the results necessarily reflect the intrinsic properties of the particles with respect to lipolysis. The decreased lipolysability of VLDL does not mean that the overall transfer of PL from VLDL to platelets is decreased in type 2 diabetes. As judged from pasma TG, VLDL concentration was doubled in diabetic patients, which likely compensates at least in part the lowered efficiency of VLDL with respect to PL transfer. In addition, platelets are not the only acceptor of PL from VLDL. An important proportion of VLDL PL is transferred to HDL to serve as substrate for the lecithin cholesterol acyl transferase reaction (35-36). Interestingly, in type 2 diabetes not only HDL concentration is lowered, but HDL particles have been shown to be very poor acceptors of PL because of their physicochemical characteristics (29). Thus, diabetic HDL appear to be very weak competitors for PL uptake, thereby leaving them available for hyperactivated platelets.

In the last part of this work, we compared the transfer of oxidized PL to that of normal PL. In vivo, PL hydroperoxide constitutes a major form of oxidized PL. We therefore prepared an hydroperoxide form of [^{14}C]PAPC that we used to label control VLDL for comparison with non oxidized [^{14}C]PAPC. Whether in basal conditions or after LPL or thrombin stimulations, the transfers of oxidized [^{14}C]PAPC from control VLDL to control platelets were 2-3 times more elevated than those of [^{14}C]PAPC. The reason for this increase remains unclear. It might be due to differences in the physico-chemical properties of the two labels. Alternatively, the import of VLDL-bound oxidized PL might involve a specific mechanism. For example, CD 36 has been shown to be the main receptor responsible for binding of oxidized lipoproteins (15,37-38). When control VLDL were sustituted for diabetic VLDL, the results obtained were similar although the magnitude of the difference between the transfer of [^{14}C]PAPC and that of oxidized [^{14}C]PAPC was slightly lowered. This could appear logical if one considers that native PL hydroperoxides, naturally present at the diabetic VLDL surface, might act as competitors of [^{14}C]PAPC with respect to the transfer process. In any case, our observation that PL hydroperoxides can be imported by platelets at an accelerated rate is of great interest since these lipid species have been demonstrated to stimulate platelet activation (39-40). Thus, this process likely participates to the oxidative stress that results in the enhanced basal platelet activation occuring in type 2 diabetes (4).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Salam Ibrahim was a recipient for a grant from the French Ministry of Education and Research.

References

1. **Bierman EL** 1992 George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. Arterioscler Thromb 12:647-656

2. **Krauss RM** 2004 Lipids and Lipoproteins in Patients With Type 2 Diabetes. Diabetes Care 27:1496–1504

3. **De Cristofaro R, Rocca B, Vitacolonna E, Falco A, Marchesani P, Ciabattoni G, Landolfi R, Patrono C, Davì G** 2003 Lipid and protein oxidation contribute to a prothrombotic state in patients with type 2 diabetes mellitus. J Thromb Haemost 1:250-256

4. **Véricel E, Januel C, Carreras M, Moulin P, Lagarde M** 2004 Diabetic Patients Without Vascular Complications Display Enhanced Basal Platelet Activation and Decreased Antioxidant Status. Diabetes 53:1046–1051

5. **Salvemini D, Botting R** 1993 Modulation of platelet function by free radicals and free-radical scavengers. Trends Pharmacol Sci 14:36-42

6. **Ceriello A** 1999 Hyperglycaemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications. Diabetes Nutr Metab 12:42-46

7. **Wright EJ, Scism-Bacon JL, Glass LC** 2006 Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. Int J Clin Pract 60:308-314

8. **Watson AD, Leitinger N, Navab M, Faull KF, Hörkkö S, Witztum JL, Palinski W, Schwenke D, Salomon RG, Sha W, Subbanagounder G, Fogelman AM, Berliner JA** 1997 Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. J Biol Chem 272:13597-13607

9. **Jenkins AJ, Best JD, Klein RL, Lyons TJ** 2004 Lipoproteins, glycoxidation and diabetic angiopathy. Diabetes Metab Res Rev 20:349–368

10. **Francis GA** 2000 High density lipoprotein oxidation: in vitro susceptibility and potential in vivo consequences. Biochim Biophys Acta 1483:217-235

11. **McEneny J, O'Kane MJ, Young IS** 2000 Very low density lipoprotein subfractions in Type II diabetes mellitus: alterations in composition and susceptibility to oxidation. Diabetologia 43:485-493

12. **Young IS, McFarlane C, McEneny J** 2003 Oxidative modification of triacylglycerol-rich lipoproteins. Biochemical Society Transactions 31:1062-1065

13. **Hackeng C, Relou IA, Pladet MW, Gorter G, van Rijn HJ, Akkerman JW** 1999 Early platelet activation by low density lipoprotein via p38MAP kinase. Thromb Haemost 82:1749-1756

14. **Relou IA, Hackeng CM, Akkerman JW, Malle E** 2003 Low-density lipoprotein and its effect on human blood platelets. Cell Mol Life Sci 60:961-971

15. **Englyst NA, Taube JM, Aitman TJ, Baglin TP, Byrne CD** 2003 A novel role for CD36 in VLDL-enhanced platelet activation. Diabetes 52:1248-1255

16. **Lagarde M** 1988 Metabolism of fatty acids by platelets and the functions of various metabolites in mediating platelet function. Prog Lipid Res 27:137-152

17. **George JN** 2000 platelets. Lancet 355:1531-1539

18. **Ha KS, Exton JH** 1993 Differential translocation of protein kinase C isozymes by thrombin and platelet-derived growth factor. A possible function for phosphatidylcholine-derived diacylglycerol. J Biol Chem 268:10534-10539

19. **Hug H, Sarre TF** 1993 Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction. Biochem J 291:329-343

20. **Clark JD, Schievella AR, Nalefski EA, Lin LL** 1995 Cytosolic phospholipase A2. J Lipid Mediat Cell Signal 12:83-117

21. **Samuelsson B, Goldyne M, Granström E, Hamberg M, Hammarström S, Malmsten C** 1978 Prostaglandins and thromboxanes. Ann Rev Biochem 47:997-1029

22. **Engelmann B, Kögl C, Kulschar R, Schaipp B** 1996 Transfer of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin from low- and high-density lipoprotein to human platelets. Biochem J 315:781-789

23. **Dobner P, Koller E, Engelmann B** 1999 Platelet high affinity low density lipoprotein binding and import of lipoprotein derived phospholipids. FEBS Letters 444:270-274

24. **Engelmann B, Schaipp B, Dobner P, Stoeckelhuber M, Kögl C, Siess W, Hermetter A** 1998 Platelet agonists enhance the import of phosphatidylethanolamine into human platelets. J Biol Chem 273:27800-27808

25. **Ibrahim S, Djimet-Baboun A, Pruneta-Deloche V, Calzada C, Lagarde M, Ponsin G** 2006 Transfer of very low density lipoprotein-associated phospholipids to activated human platelets. J Lipid Res 47:341-348

26. **Ibrahim S, Calzada C, Pruneta-Deloche V, Lagarde M, Ponsin G** 2007 The transfer of VLDL-associated phospholipids to activated platelets depends upon cytosolic phospholipase A2 activity. J Lipid Res 48:1533-1538

27. **Roveri A, Maiorino M, Ursini F** 1994 Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Methods Enzymol 233:202-212

28. **Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH** 1955 The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J Clin Invest 34:1345-1354

29. **Elchebly M, Pulcini T, Porokhov B, Berthezène F, Ponsin G** 1996 Multiple abnormalities in the transfer of phospholipids from VLDL and LDL to HDL in non-insulin-dependent diabetes. Eur J Clin Invest 26:216-223

30. **Lagarde M, Bryon PA, Guichardant M, Dechavanne M** 1980 A simple and efficient method for platelet isolation from their plasma. Thromb Res 17:581-588

31. **Born GVR** 1962 Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature 194:927-929

32. **Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G** 1993 Lipoprotein lipase and hepatic lipase. Curr Opin Lipidol 4:187-196

33. **Kent C** 1995 Eukaryotic phospholipid biosynthesis. Annu Rev Biochem 64:315-343

34. **Pruneta-Deloche V, Sassolas A, Dallinga-Tie GM, Berthezène F, Ponsin G, Moulin P** 2004 Alteration in lipoprotein lipase activity bound to triglyceride-rich lipoproteins in the postprandial state in type 2 diabetes. J Lipid Res 45:859-865

35. **Glomset JA** 1968 The plasma lecithin: cholesterol acyl transferase reaction. J Lipid Res 9:155-167

36. **Patsch JM, Gotto AM Jr, Olivecrona T, Eisenberg S** 1978 Formation of high density lipoprotein 2- like particles during lipolysis of very low density lipoproteins in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 75:4519-4523

37. **Hartwich j, Dembinska-Kiec A, Gruca A, Motyka M, Partyka L, Skrzeczynska J, Bzowska M, Pryjma J, Huber J, Leitinger N, Schmitz G** 2002 Regulation of platelet adhesion by oxidized lipoproteins and oxidized phospholipids. Platelets 13:141-151

38. **Thorne RF, Mhaidat NM, Ralston KJ, Burns GF** 2007 CD36 is a receptor for oxidized high density lipoprotein: implications for the development of atherosclerosis. FEBS Lett 581:1227-1232

39. **Coulon L, Calzada C, Moulin P, Véricel E, Lagarde M** 2003 Activation of p38 mitogen-activated protein kinase / cytosolic phospholipase A2 cascade in hydroperoxide-stressed platelets. Free Radic Biol Med 35:616-625

40. **Calzada C, Véricel E, Mitel B, Coulon L, Lagarde M** 2001 12(S)-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid increases arachidonic acid availability in collagen-primed platelets. J lipid Res 42:1467-1473

Figure legends

Fig.1. Transfer of VLDL-associated [^{14}C] PAPC to platelets. VLDL were isolated either from healthy volunteers (grey bars) or from type 2 diabetic patients (black bars). The incubations of platelets (3 x 10^8) with [^{14}C] PAPC-labelled VLDL (200 nmoles PL / ml) were carried out for 1h at 37°C in the absence (basal) or presence of thrombin (0.1 U/ml) or LPL (500 ng/ml). Transfers are expressed as percentages of radioactivity incorporated by 3 x 10^8 platelets. Values are shown as means ± SEM from 25 controls and 17 diabetic subjects .

Fig.2. Correlations between LPL- and thrombin-stimulated transfers of [^{14}C] PAPC from control (open circles) or diabetic (black triangles) VLDL to platelets. The incubations of platelets (3 x 10^8) with [^{14}C] PAPC-labelled VLDL (200 nmoles PL / ml) were carried out for 1h at 37°C in the presence of thrombin (0.1 U/ml) or LPL (500 ng/ml). Transfers are expressed as percentages of radioactivity incorporated to 3 x 10^8 platelets. Correlation coefficients were 0.72 ($P<0.001$) and 0.80 ($P<0.001$) in control and diabetic groups, respectively.

Fig.3. Comparisons of LPL- mediated VLDL lipolysis in control subjects and diabetic patients. VLDL (1 mM TG) were incubated in the presence of LPL (1 µg/ml) for 30 min at 37°C. The NEFA released were then measured and the results were expressed as percentages of initial TG fatty acid concentration. *, $P<0.05$ vs controls.

Fig.4. Relative transfers of VLDL-associated [^{14}C] PAPC to diabetic platelets by comparison with those to control platelets. The incubations of platelets (3 x 10^8) with [^{14}C] PAPC-labelled VLDL (200 nmoles PL / ml) were carried out for 1h at 37°C in the absence (basal) or presence of thrombin (0.1 U/ml) or LPL (500 ng/ml). Transfers to diabetic platelets were expressed as percentages of those to control platelets obtained from the same VLDL samples. *, P<0.05 vs corresponding control platelets.

Fig.5. Relative transfers of oxidized [^{14}C] PAPC from control (grey bars) or diabetic (black bars) VLDL (200 nmoles PL / ml) to platelets (3 x 10^8) by comparison with those of non oxidized [^{14}C] PAPC. The incubations were carried out for 1h at 37°C in the absence (basal) or presence of thrombin (0.1 U/ml) or LPL (500 ng/ml). Transfers of oxidized [^{14}C] PAPC were expressed as percentages of those observed for non oxidized [^{14}C] PAPC, using the same VLDL samples. *, P<0.05, **, P<0.01 vs corresponding non oxidized [^{14}C] PAPC- labelled VLDL.

Table 1. Characteristics of diabetic and control subjects

	Controls (n=25)	NIDD (n=17)
Age (years)	52±1	58±2
Sex (F/M)	12/13	10/7
Weight (kg)	68±3	88±4
Height (m)	1.7±0.03	1.61±0.02
BMI ($kg.m^{-2}$)	23.24±0.8	32±1.3
Fasting glucose ($mmol.l^{-1}$)	5.3±0.1	8.5±0.64
Hb A1c (%)	ND	6.84+0.19

Value are given as means ± SEM; ND, not determined

Table 2. Plasma lipid and lipoprotein concentrations

	Controls (n=25)	NIDD (n=17)
Plasma cholesterol (mM)	4.54±0.2	4.76±0.27
Plasma triglycerides (mM)	0.89±0.13	1.86±0.12
LDL cholesterol (mM)	3.14±0.26	3.24±0.21
HDL cholesterol (mM)	1.2±0.1	0.98±0.11

Value are given as means ± SEM.

Table 3. Lipid analysis of VLDL from control subjects and diabetic patients

	Controls (n=25)	NIDD (n=17)
TG (moles %)	48.7±1.6	51.9±1.0
CE (moles %)	15.0±1.2	13.3±0.6
FC (moles %)	13.9±1.3	11.2±0.4
PL (moles %)	22.3±0.9	23.6±0.6

Value are given as means ± SEM.

TG, triglycerides; CE, cholesterol esters; FC, free cholesterol; PL, phospholipids

Fig.1

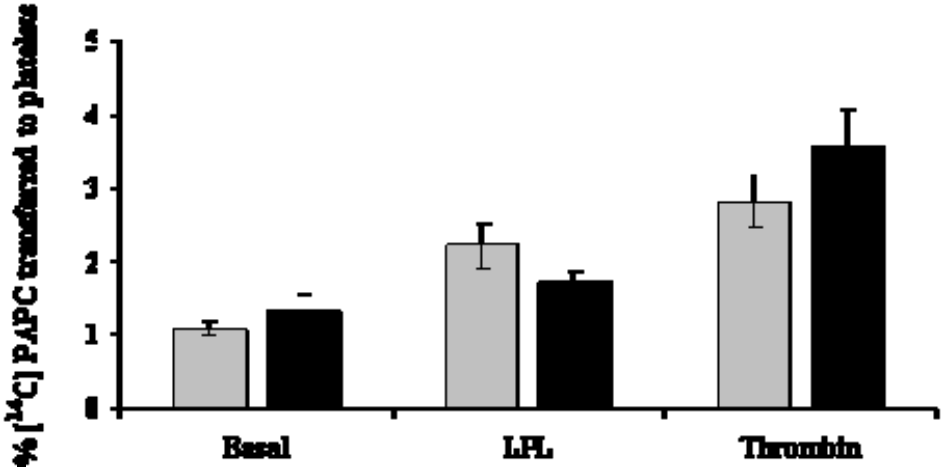

% [14C] PAPC transferred to platelets
5
4
3
2
1
0
Basal
LPL
Thrombin

Fig.2

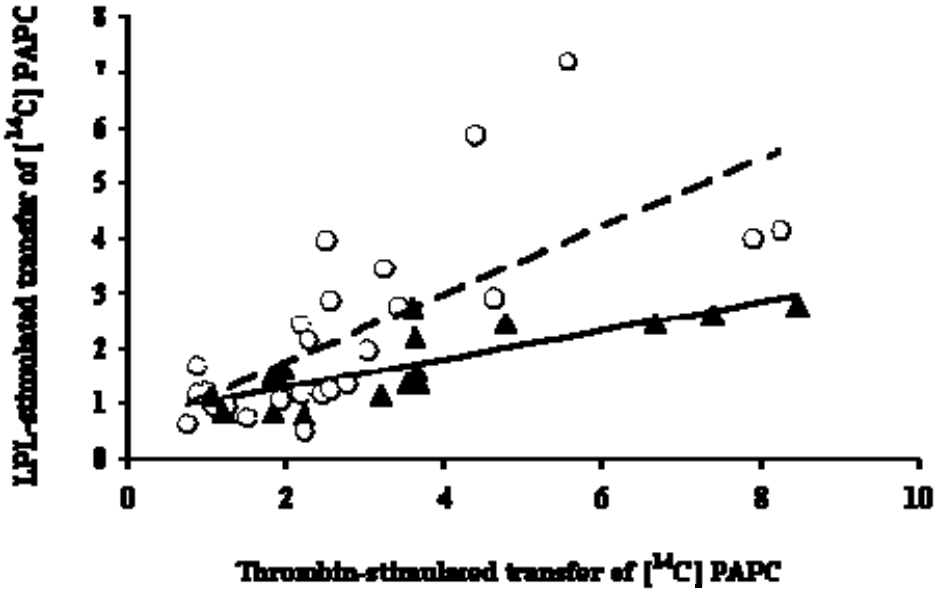

LPL-stimulated transfer of [14C] PAPC
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
2
4
6
8
10
Thrombin-stimulated transfer of [14C] PAPC

Fig.3

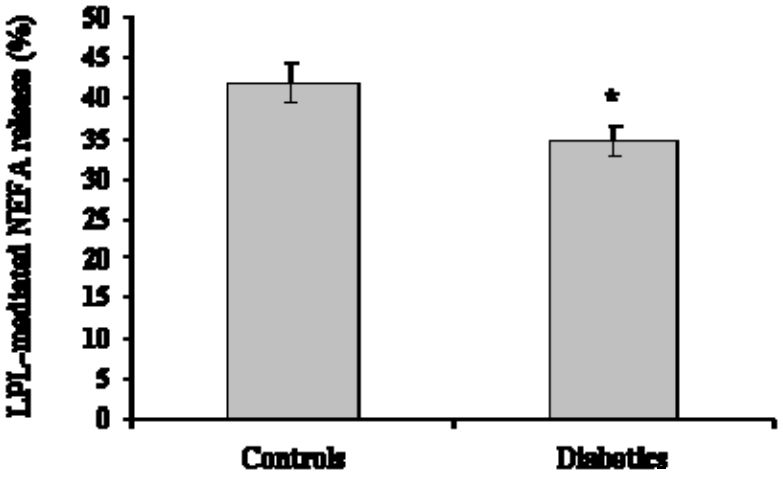

LPL-mediated NEFA release (%)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*
Controls
Diabetics

Fig.4

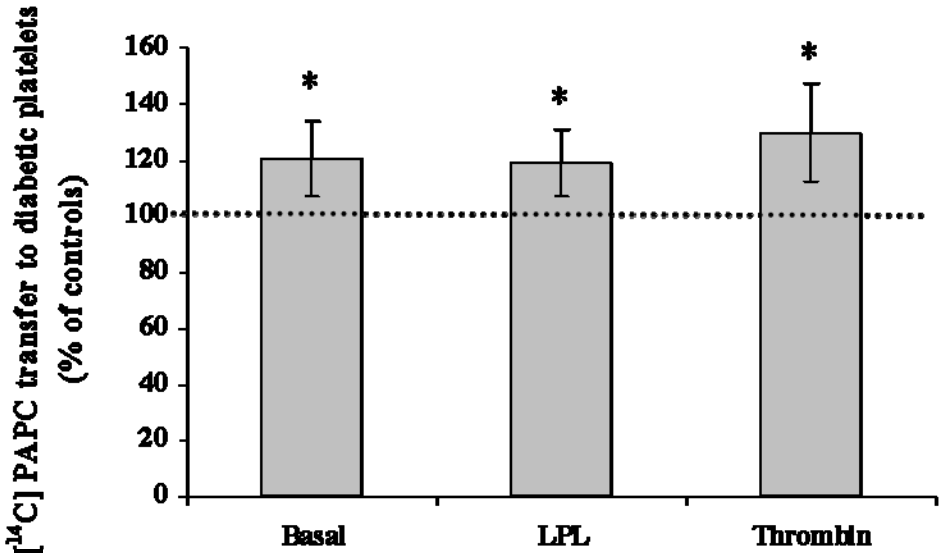
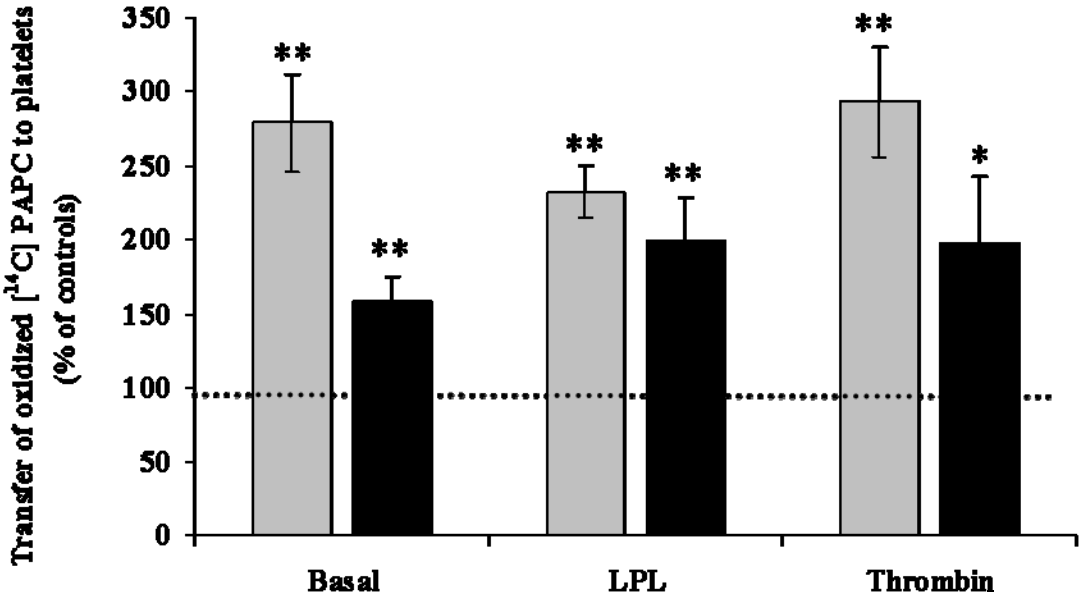

[14C] PAPC transfer to diabetic platelets
(% of controls)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
*
*
Basal
LPL
Thrombin

Fig.5


Transfer of oxidized [14C] PAPC to platelets
(% of controls)
350
300
250
200
150
100
50
0
**
**
**
**
**
*
Basal
LPL
Thrombin

Conclusion

Dans cette dernière partie, nous avons étudié le transfert de PL des VLDL aux plaquettes sanguines dans le cas particulier du diabète de type 2. En effet, dans cette pathologie, les trois partenaires de ce transfert peuvent présenter des anomalies : i) les plaquettes sanguines sont hyperactivées, ii) les VLDL ont une concentration plasmatique élevée et sont enrichies en TG et iii) le contexte de stress oxydant induit la formation de différents produits d'oxydation parmi lesquels on trouve des hydroperoxydes de PL.

Pour analyser l'incidence de ces anomalies, nous avons réalisé différentes expériences de recombinaison. Dans une premier temps, nous avons comparé le transfert de [^{14}C] PAPC de VLDL contrôles vers des plaquettes contrôles ou des plaquettes de diabétiques. Ces dernières importaient 20-30% de PL de plus que les plaquettes contrôles, aussi bien dans les conditions basales, que sous stimulation par la LPL ou la thrombine.

Dans une seconde série expérimentale, nous avons étudié le transfert du [^{14}C] PAPC des VLDL contrôles ou diabétiques à des plaquettes normales. Le transfert basal ainsi que celui stimulé par la thrombine étaient comparables pour les deux groupes de VLDL. Cependant, en présence de LPL, la stimulation observée à partir de VLDL diabétiques était inférieure à celle obtenue à partir de plaquettes contrôles. Cette observation apparaît logique au vu d'un travail précédent (cf article 1). En effet, l'effet stimulant de la LPL sur le transfert de PL des VLDL aux plaquettes est partiellement du aux acides gras libérés lors de la lipolyse des VLDL. Ces derniers sont en partie captés par les plaquettes, ce qui favorise leur activation. Or, dans le présent travail, nous avons observé que les VLDL des sujets diabétiques sont moins lipolysables que celles des sujets contrôles, ce qui explique l'affaiblissement de l'effet stimulant de la LPL sur le transfert des PL. On ne peut cependant pas conclure qu'*in vivo* le transfert des PL des VLDL aux plaquettes est diminué chez les diabétiques de type 2. En effet, deux autres paramètres sont à considérer. Tout d'abord, même si les VLDL sont médiocrement lipolysées dans cette pathologie, l'élévation de leur concentration devrait au moins partiellement contribuer à maintenir une disponibilité en PL proche de la normale. De plus, des travaux plus anciens ont montré que les HDL, qui sont normalement les principaux accepteurs de PL lors de la lipolyse des VLDL, n'exercent ce rôle que de façon limitée dans le diabète de type 2, augmentant ainsi leur disponibilité pour les plaquettes sanguines.

Enfin, nous avons étudié le transfert de PL oxydés de VLDL contrôles à des plaquettes sanguines contrôles. En conditions basales comme en présence de LPL ou de thrombine, le transfert de [^{14}C] PAPC oxydé était 2 à 3 fois plus grand que celui du [^{14}C] PAPC normal. Nous ne connaissons pas la raison précise de cette forte différence. Elle pourrait être simplement due aux modifications des propriétés physicochimiques du PL induites par son oxydation. Cependant, on peut envisager la possibilité d'un mécanisme plus spécifique. Par exemple, le récepteur CD36, qui est exprimé dans différents types cellulaires et en particulier dans les plaquettes, possède une forte affinité de liaison pour les lipoprotéines oxydées, ce qui pourrait favoriser leur captation. Quel qu'en soit le mécanisme précis, le fait que les plaquettes sanguines importent fortement les hydroperoxydes de PL est une observation importante dans le contexte du diabète de type 2 puisque ces dérivés stimulent fortement l'activation plaquettaire.

Discussion Générale

Pour leur métabolisme, les plaquettes sanguines doivent importer des PL, les lipoprotéines circulantes en constituant la principale réserve. De précédents travaux ont montré in vitro l'existence d'un transfert de PL à partir des LDL et des HDL vers les plaquettes (Engelmann et al; 1996) (Dobner et al; 1999). Par contre, aucun travail n'a envisagé la possibilité que les VLDL puissent, de la même façon, être des donneurs de PL pour les plaquettes. Cette lacune est étonnante dans la mesure où les VLDL étaient connues pour transférer des PL aux HDL pendant la lipolyse. En effet, le processus de lipolyse des TG par la LPL déstabilise la surface des VLDL et induit un transfert important de PL. Même si les HDL en sont les accepteurs principaux, il est clair qu'elles n'en sont pas nécessairement les seuls. Il était donc logique de considérer par hypothèse que les VLDL pouvaient transférer des PL aux plaquettes sanguines. La mise en évidence et l'analyse des caractéristiques de ce transfert a constitué le but du présent travail.

La première question qui se posait était de savoir si les VLDL étaient aussi efficaces que les LDL ou les HDL. Nos premiers résultats ont montré que le transfert basal des PL aux plaquettes était comparable que l'on utilise les LDL ou les VLDL comme donneurs, et qu'il était supérieur à celui observé à partir des HDL. De plus il a été important de constater que, comme attendu, le transfert des PL des VLDL aux plaquettes était stimulable par la LPL, à des concentrations. physiologiques normales en lipoprotéines et en plaquettes. La LPL, quant à elle, était utilisée soit à la concentration de 100 ng/ml soit à 500 ng/ml, ce qui correspond respectivement aux concentrations normale et post-héparinique.

L'effet stimulant de la LPL sur le transfert de PL à partir des VLDL était clairement du à son activité catalytique puisqu'il était aboli en présence de tétrahydrolipstatine, inhibiteur connu de l'activité lipolytique de la LPL (Lookene et al; 1994). En fait, l'hydrolyse des TG du noyau hydrophobe des VLDL par la LPL au cours de la lipolyse génère des acides gras comme l'AA, qui peuvent activer les plaquettes (Potter et al; 1989) (Spector et al; 1970). Dans notre travail, nous avons effectivement observé : i) une stimulation de la production de TXB_2, qui indique le degré de l'activité plaquettaire, par la LPL uniquement en présence des VLDL et ii) une inhibition de cette production de TXB_2 en présence d'albumine délipidée qui capte les acides gras libres et prévient ainsi leur pénétration dans les plaquettes. Cette inhibition était accompagnée d'une inhibition du transfert de PL. Parallèlement, nous avons montré que le transfert des PL des VLDL aux plaquettes était inhibé par compétition en présence de HDL sans que la production de TXB_2 soit affectée. L'ensemble de ces données indique que le

transfert de PL est stimulé par l'activation plaquettaire, mais qu'à l'inverse il n'est pas indispensable à celle-ci, au moins à court terme. Ces conclusions ont été confirmées par l'observation d'une stimulation du transfert par la thrombine qui est un agoniste plaquettaire puissant.

Sur un plan qualitatif, nos expériences ont montré que les VLDL transfèraient les PL sans aucune spécificité remarquable, ce qui les distinguait des LDL. Des travaux antérieurs avaient en effet montré que les LDL étaient capables de transférer des PL aux plaquettes avec une certaine spécificité puisque le transfert de PE était stimulé par des agonistes plaquettaires, mais pas celui de PC ni celui de SM (Engelmann et al; 1998).

Pour évaluer l'intérêt physiopathologique du transfert de PL des VLDL aux plaquettes, nous avons réalisé des expériences in vitro simulant des conditions pathologiques. Certaines pathologies sont en effet accompagnées d'une élévation de la concentration plasmatique des VLDL (hypertriglycéridémie) et d'une diminution de celle des HDL. Ce changement de la balance VLDL / HDL est bien sûr de nature à modifier considérablement les paramètres de la compétition entre HDL et plaquettes pour accepter les PL issus de la lipolyse des VLDL. Il était donc essentiel d'étudier le transfert dans des conditions semblables. Pour cela, on a réalisé une série d'expériences en présence de concentrations élevées de VLDL et de concentrations décroissantes de HDL. Les résultats ont clairement montré que l'intensité du transfert de PL vers les plaquettes était inversement proportionnelle à la concentration des HDL, et qu'il restait positif même à la plus forte concentration de ces dernières. Ces observations montraient donc que bien que réalisée in vitro, notre étude possédait une certaine pertinence physiopathologique.

D'un point de vue mécanistique, il était intéressant d'identifier le mécanisme contrôlant le transfert des PL, et plus précisément la relation entre l'activation plaquettaire et le transfert. Dans les plaquettes, les PL membranaires sont hydrolysés par la PLA_2, ce qui résulte en une libération des acides gras de la position sn2 des PL et notamment de l'AA. Celui-ci peut alors subir l'action de deux enzymes. La PGHS, avec une contribution importante de son activité COX, catalyse la production de la PGH_2 qui est métabolisée ensuite en différentes classes de PGs sous l'effet des PG synthases correspondantes, aussi bien qu'en TXA_2, un puissant activateur plaquettaire. La 12-LOX transforme l'AA en 12-HpETE, qui, lui aussi, contribue à l'activation plaquettaire. D'autre part, la PLC hydrolyse le PI membranaire en produisant

d'une part l'IP3 qui stimule la mobilisation du Ca^{2+}, et d'autre part les DAG qui stimulent diverses cascades métaboliques.

Pour étudier l'effet de ces différentes voies métaboliques sur le transfert, nous avons mesuré ce dernier en présence de divers inhibiteurs enzymatiques, dans des conditions basales ou sous stimulation par la LPL ou la thrombine. Les inhibitions de l'activité COX par l'aspirine et de celle de la LOX par l'esculétine n'ont pas affecté le transfert des PL, montrant ainsi que ce dernier est indépendant de l'activité de ces deux enzymes. Par contre, le transfert était inhibé par le MAFP, un inhibiteur de la PLA_2, montrant un rôle de l'activité de cette enzyme. Le terme générique de PLA_2 désigne en fait une famille d'enzymes. La $sPLA_2$, la $iPLA_2$ dont l'activité est indépendante du Ca^{2+} et la $cPLA_2$ dont l'activité est dépendante du Ca^{2+} en sont les principales formes. Nos résultats ont d'abord exclu un rôle éventuel de la $sPLA_2$. La mobilisation de l'AA par l'hydrolyse des PL membranaires nécessite d'une part une stimulation de l'activité catalytique de la $cPLA_2$ par phosphorylation, et d'autre part sa translocation vers la membrane, cette dernière étant Ca^{2+}-dépendante (Yedgar et al; 2000) (McNicol et al; 1998). L'inhibition de la PLC, enzyme facilitant la mobilisation du Ca^{2+}, par le U73122 a entraîné une inhibition du transfert de PL. Le BAPTA-AM qui est un chélateur du Ca^{2+} intracellulaire a eu le même effet. Cette Ca^{2+} dépendance indiquait donc que le transfert de PL des VLDL aux plaquettes était contrôlé par l'activité $cPLA_2$. Cette conclusion a été confortée par l'observation d'une absence d'effet du BEL qui est un inhibiteur spécifique de la $iPLA_2$.

En terme d'activité plaquettaire, le U73122 et le BAPTA-AM ont inhibé fortement la production de TXB_2 stimulée par la thrombine et partiellement celle stimulée par la LPL. Ceci était attendu sachant que, comme déjà mentionné ci-dessus, l'activation par la LPL résulte de la libération d'acides gras qui seront ensuite captés par les plaquettes. Ces résultats sont en cohérence avec le concept que la stimulation du transfert de PL aux plaquettes activées est due à l'hydrolyse des PL membranaires par la $cPLA_2$. On peut penser que cette hydrolyse engendre nécessairement un déséquilibre entre les feuillets interne et externe de la membrane, déséquilibre compensé par un mécanisme de flip-flop alimenté par un transfert de PL des VLDL au feuillet externe de la membrane (Bevers et al; 1999) (Sims et al; 2001).

Le bilan des aspects purement mécanistiques de notre étude pouvait se résumer ainsi : i) les VLDL sont capables de transférer des PL aux plaquettes sanguines, ii) ce processus est

stimulé par l'activation plaquettaire, en particulier par la voie dépendante de la $cPLA_2$, et iii) ce transfert est probablement quantitativement pertinent d'un point de vue physiopathologique. Ce dernier point nous a décidé à entreprendre une étude du transfert des PL des VLDL aux plaquettes dans le cadre particulier du diabète de type 2.

Le diabète de type 2 constitue une situation à risque élevé de thrombose et d'athérosclérose, dans laquelle les trois paramètres impliqués dans le transfert de PL des VLDL aux plaquettes sont susceptibles de modifications qui peuvent affecter leurs comportements. En effet, dans cette pathologie, les plaquettes sont hyperactivées (De Cristofaro et al; 2003) (Véricel et al; 2004), et les VLDL sont anormales aussi bien d'un point de vue quantitatif que qualitatif (Krauss; 2004) (Pruneta-Deloche et al; 2004). Quantitativement, la concentration plasmatique des VLDL est élevée chez ces patients, alors que qualitativement leurs VLDL sont plus grandes et ont un rapport TG/CE élevé par comparaison avec des sujets contrôles. Finalement, le diabète de type 2 est accompagné d'un état de stress oxydant provoquant l'oxydation de nombreux constituants moléculaires (De Cristofaro et al; 2003) (Véricel et al; 2004). L'oxydation des acides gras engendre en particulier la production d'hydroperoxydes de PL qui peuvent être transportés par les lipoprotéines, principalement par les LDL mais aussi par les VLDL (McEneny et al; 2000) (Young et al; 2003).

Comme les plaquettes sont hyperactivées dans le diabète de type 2, l'hydrolyse de leur PL membranaires ainsi que leur régénération doivent être élevés. Nous avons effectivement montré in vitro que les plaquettes issues de sujets diabétiques importent davantage de PL des VLDL que les plaquettes contrôles, qu'elles soient stimulées ou pas. D'autre part, nos études sur le transfert de PL des VLDL diabétiques et contrôles à des plaquettes contrôles montrent qu'il n'y a pas de différence dans les conditions basales ou suite à une stimulation des plaquettes par la thrombine. Par contre, le transfert de PL des VLDL de diabétiques stimulé par la LPL était 40% plus bas que celui observé dans les mêmes conditions à partir de VLDL contrôles. Comme déjà montré (Ibrahim et al; 2006), la stimulation par la LPL du transfert de PL des VLDL aux plaquettes dépend de l'hydrolyse des TG des VLDL au cours de la lipolyse. Ainsi, la diminution du transfert stimulé par la LPL dans le cas des VLDL diabétiques pourrait être due à un défaut de lipolyse. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des tests de lipolysabilité des VLDL en présence de LPL. Nous avons observé que les VLDL diabétiques sont moins facilement hydrolysables que les VLDL contrôles. Ces expériences ayant été réalisées à des concentrations constantes en LPL et VLDL, ces résultats

reflètent nécessairement une différence dans les propriétés physicochimiques des deux types de VLDL. Cependant, il serait erroné de conclure de ces données qu'in vivo il y aurait une diminution globale du transfert de PL des VLDL aux plaquettes sanguines. Deux autres paramètres doivent en effet être pris en considération. La concentration plasmatique des VLDL est élevée dans le diabète de type 2, ce qui logiquement doit compenser au moins en partie la diminution de leur capacité à donner leurs PL. Enfin, on sait que dans des conditions physiologiques normales une proportion importante des PL est transportée vers les HDL où ils servent de substrats pour la LCAT (Golmset; 1968) (Patsch et al; 1978). Or, dans le diabète de type 2, non seulement la concentration des HDL est abaissée mais de plus leur capacité à accepter des PL est diminuée (Elchebly et al; 1996). Le flux des PL des VLDL vers les HDL est donc affaibli, les laissant par là même disponibles pour les plaquettes, et favorisant ainsi le maintien de l'état d'hyperactivation de ces dernières.

Enfin, puisque les VLDL de diabétiques peuvent contenir des PL oxydés, nous avons comparé le transfert de ceux-ci à celui des PL normaux. *In vivo*, les hydroperoxydes constituent la forme majoritaire des PL oxydés. Nous avons donc préparé des hydroperoxydes de [^{14}C] PAPC pour marquer des VLDL et comparé leur transfert avec celui de [^{14}C] PAPC non oxydé. Le transfert du [^{14}C] PAPC oxydé des VLDL contrôles aux plaquettes contrôles, dans les conditions basales ainsi qu'après stimulation par la LPL ou la thrombine, était 2-3 fois plus élevé que celui du [^{14}C] PAPC dans les mêmes conditions. La raison exacte de cette augmentation n'est pas claire. Elle pourrait être simplement due aux modifications physico-chimiques que subissent les PL oxydés. Alternativement, elle pourrait résulter de la mise en oeuvre d'un mécanisme plus spécifique. On pourrait par exemple envisager l'implication du récepteur CD36. Plusieurs travaux ont en effet montré que ce récepteur possède une forte affinité pour les lipoprotéines oxydées et peut se comporter comme un transporteur de lipides oxydés (Englyst et al; 2003) (Hartwich et al; 2002) (Thorne et al; 2007). Un tel mécanisme apparaîtrait logique. Il faut cependant rappeler qu'à ce jour il reste totalement spéculatif dans la mesure où nous ne disposons d'aucune donnée expérimentale directe susceptible de le valider.

En définitive, quelque soit le mécanisme responsable de l'apport élevé des hydroperoxydes de PL aux plaquettes sanguines, l'existence de cet apport est en soi important dans la mesure où ces espèces lipidiques sont de puissants stimulateurs de l'activation plaquettaire (Coulon et al; 2003) (Calzada et al; 2001). Leur importation dans les plaquettes sanguines pourrait participer

à l’état de stress oxydant de ces dernières dans le diabète de type 2, contribuant ainsi à l'élévation du risque cardiovasculaire qui le caractérise.

En conclusion, notre travail a permis la caractérisation d'un nouveau mécanisme d'apport de PL aux plaquettes sanguines et montré son caractère potentiellement délétère dans une situation à haut risque athéromateux, le diabète de type 2. L'élément qui nous semble peut-être le plus important dans nos résultats est l'observation de la forte affinité des plaquettes sanguines pour les phospholipides oxydés. L'étude précise du mécanisme de leur captation par les plaquettes et de l'implication éventuelle du récepteur CD36 pourrait constituer une suite logique à ce travail.

Références Bibliographiques

Ackermann, A. J., Conde-Frieboes, K., Dennis, E. A. "Inhibition of Macrophage Ca^{2+}-Independent Phospholipase A_2 by Bromoenol Lactone and Trifluoromethyl Ketones." J Biol Chem, 1995, 270, pp. 445-50.

AKIBA, S., SATO, T. "Cellular Function of Calcium-Independent Phospholipase A_2." Biol Pharm Bull, 2004, 27(8), pp. 1174—78.

ambon, A., Schmidt, I., Beisiegel, U., Brunzell, J. D. "Dimeric Lipoprotein Lipase Is Bound to Triglyceride-Rich Plasma Lipoproteins." J Lipid Res, 1996, 37, pp. 2394-404.

Balla, T. "Phosphoinositide-Derived Messengers in Endocrine Signaling." Journal of Endocrinology, 2006, 188, pp. 135-53.

Balsinde, J., Balboa, M. A., Insel, P. A., Dennis, E. A. "Regulation and Inhibition of Phospholipase A_2." Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999, 39, pp. 175-89.

Balsinde, J., Winstead, M. V., Dennis, E. A. "Phospholipase A_2 Regulation of Arachidonic Acid Mobilization" FEBS Lett, 2002, 531, pp. 2-6.

Barbaras, R., Puchois, P., Grimaldi, P., Barkia, A., Fruchart, J. C., Ailhaud, G. "Relationship in Adipose Cells between the Presence of Receptor Sites for High Density Lipoproteins and the Promotion of Reverse Cholesterol Transport." Biochem Biophys Res Commun, 1987, 149(2), pp. 545-54.

Berglund, L., Ramakrishnan, R. "Lipoprotein(a) an Elusive Cardiovascular Risk Factor." Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24, pp. 2219-26.

Bevers, E. M., Comfurius, P., Dekkers, D. W., Zwaal, R. F. "Lipid Translocation across the Plasma Membrane of Mammalian Cells." Biochim Biophys Acta, 1999, 1439, pp. 317-30.

Bierman, E. L. "George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in Diabetes." Arterioscler Thromb, 1992, 12(6), pp. 647-56.

Biggerstaff, K. D., Wooten, J. S. "Understanding Lipoproteins as Transporters of Cholesterol and Other Lipids." Adv Physiol Educ, 2004, 28, pp. 105-06.

Blache, D. "Structure Et Fonctions Des Plaquettes Sanguines." Archives internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique, 1992, 100, pp. A-17-A24.

Bleasdale, J. E., Thakur, N. R., Gremban, R. S., Bundy, G. L., Fitzpatrick, F. A., Smith, R. J., Bunting, S. "Selective Inhibition of Receptor-Coupled Phospholipase C-Dependent Processes in Human Platelets and Polymorphonuclear Neutrophils." J Pharmacol Exp Ther, 1990, 255, pp. 756-68.

Blockmans, D., Deckmyn, H., Vermylen, J. "Platelet Activation." Blood Reviews, 1995, 9, pp. 143-56.

Born, G. V. R. "Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and Its Reversal." Nature, 1962, 194, pp. 927-29.

Börsch-Haubold, A. G., Kramer, R. M., Watson, S. P. "Cytosolic Phospholipase A_2 Is Phosphorylated in Collagen- and Thrombin-Stimulated Human Platelets Independent of Protein Kinase C and Mitogen-Activated Protein Kinase." J Biol Chem, 1995, 270, pp. 25885-92.

Boukhchache, D., Lagarde, M. "Interactions between Prostaglandin Precursors During Their Oxygenation by Human Platelets." Biochim Biophys Acta, 1982, 713, pp. 386-92.

Bouly, M., Masson, D., Lagrost, L., Luc, G. et al. "Induction of the Phospholipid Transfer Protein Gene Accounts for the High Density Lipoprotein Enlargement in Mice Treated with Fenofibrate." J Biol Chem, 2001, 276, pp. 25841-47.

Brousseau, M. E., Schaefer, E. J., Wolfe, M. L., Bloedon, L. T., Digenio, A. G., Clark, R. W., Mancuso, J. P., Rader, D. J. "Effects of an Inhibitor of Cholesteryl Ester Transfer Protein on HDL Cholesterol." N Engl J Med, 2004, 350(15), pp. 1505-15.

Brown, M. S., Goldstein, J. L. "A Receptor-Mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis." Science, 1986, 232, pp. 34-47.

Bryant, R. W., Simon, T. C., Bailey, J. M. "Role of Glutathione Peroxidase and Hexose Monophosphate Shunt in the Platelet Lipoxygenase Pathway." J Biol Chem, 1982, 257, pp. 14937–43.

Bundy, G. L., Nidy, E. G., Epps, D. E., Mizsak, S. A., Wnuk, R. J. "Discovery of an Arachidonic Acid C-8 Lipoxygenase in the Gorgonian Coral Pseudoplexaura Porosa." J Biol Chem, 1986, 261, pp. 747-51.

Bunney, T. D. et Katan, M. "Phospholipase C Epsilon: Linking Second Messengers and Small GTPases." TRENDS in Cell Biology, 2006, 16(12), pp. 640-48.

Calzada, C., Véricel, E., Mitel, B., Coulon, L., Lagarde, M. "12(S)-Hydroperoxy-Eicosatetraenoic Acid Increases Arachidonic Acid Availability in Collagen-Primed Platelets." J Lipid Res, 2001, 42, pp. 1467–73.

Ceriello, A. "Hyperglycaemia: The Bridge between Non-Enzymatic Glycation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Complications." Diabetes Nutr Metab, 1999, 12(1), pp. 42-6.

Clark, J. D., Schievella, A. R., Nalefski, E. A., Lin, L. L. "Cytosolic Phospholipase A_2." J Lipid Mediat Cell Signal, 1995, 12, pp. 83-117.

Cockcroft, S., Thomas, G. M. H. "Inositol-Lipid-Specific Phospholipase C Isoenzymes and Their Differential Regulation by Receptors." Biochem J, 1992, 288, pp. 1-14.

Collet, X., Tall, A. R., Serajuddin, H., Guendouzi, K., Royer, L., Oliveira, H., Barbaras, R., Jiang, X-c., Francone, O. L. "Remodeling of HDL by CETP in Vivo and by CETP and Hepatic Lipase in Vitro Results in Enhanced Uptake of HDL-CE by Cells Expressing Scavenger Receptor B-I." J Lipid Res, 1999, 40, pp. 1185–93.

Coughlin, S. R. "Thrombin Signalling and Protease-Activated Receptors." Nature, 2000, 407, pp. 258-64.

Coulon, L., Calzada, C., Moulin, P., Vericel, E., Lagarde, M. "Activation of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Cytosolic Phospholipase A_2 Cascade in Hydroperoxide-Stressed Platelets." Free Radic Biol Med, 2003, 35, pp. 616-25.

De Cristofaro, R., Rocca, B., Vitacolonna, E., Falco, A., Marchesani, P., Ciabattoni, G., Landolfi, R., Patrono, C., Davì, G. "Lipid and Protein Oxidation Contribute to a Prothrombotic State in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus." J Thromb Haemost, 2003, 1(2), pp. 250-6.

Deckelbaum, R. J., Eisenberg, S., Fainaru, M., Barenholz, Y., Olivecrona, T. "In Vitro Production of Human Low Density Lipoprotein-Like Particles: A Model for Very Low Density Lipoprotein Catabolism." J Biol Chem, 1979, 254, pp. 6079-87.

Deckelbaum, R. J., Ramakrishtan, R., Eisenberg, S., Olivecrona, T., Bengtsson-Olivecrona, G. "Triacylglycerol and Phospholipid Hydrolysis in Human Plasma Lipoproteins: Role of Lipoprotein and Hepatic Lipase." Biochemistry, 1992, 31, pp. 8544-51.

Desrumaux, C., Risold, P. Y., Desor, D., Lagrost, L. et al. "Phospholipid Transfer Protein (PLTP) Deficiency Reduces Brain Vitamin E Content and Increases Anxiety in Mice." FASEB J, 2005, 19(2), pp. 296-97.

Di Leo, E., Lancellotti, S., Gabelli, C., Tarugi, P. "Mutations in MTP Gene in Abeta- and Hypobeta-Lipoproteinemia." Atherosclerosis, 2005, 180(2), pp. 311-18.

Dobner, P., et Engelmann, B. "Low-Density Lipoproteins Supply Phospholipid-Bound Arachidonic Acid for Platelet Eicosanoid Production." Am J Physiol Endocrinol Metab, 1998, 275, pp. 777-84.

Dobner, P., Koller, E., Engelmann, B. "Platelet High Affinity Low Density Lipoprotein Binding and Import of Lipoprotein Derived Phospholipids." FEBS Letters, 1999, 444, pp. 270-74.

Durlach, V. "Post-Prandial Lipemia in Diabetes. How? Why?" Diabete Metab, 1995, 21(2), pp. 112-17.

Elchebly, M., Pulcini, T., Porokhov, B., Berthezène, F., Ponsin, G. "Multiple Abnormalities in the Transfer of Phospholipids from VLDL and LDL to HDL in Non-Insulin-Dependent Diabetes." Eur J Clin Invest, 1996, 26, pp. 216-23.

Engblom, D., Ek, M., Saha, S., Ericsson-Dahlstrand, A., Jakobsson, P. J., Blomqvist, A. "Prostaglandins as Inflammatory Messengers across the Blood-Brain Barrier." J Mol Med, 2002, 80, pp. 5–15.

Engelmann, B., Kögl, C., Kulschar, R. , Schaipp, B. "Transfer of Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine and Sphingomyelin from Low- and High-Density Lipoprotein to Human Platelets." Biochem J, 1996, 315, pp. 781-89.

Engelmann, B., Schaipp, B., Dobner, P., Stoeckelhuber, M., Kögl, C., Siess, W., Hermetter, A. "Platelet Agonists Enhance the Import of Phosphatidylethanolamine into Human Platelets." J Biol Chem, 1998, 273, pp. 27800-08.

Englyst, N. A., Taube, J. M., Aitman, T. J., Baglin, T. P., Byrne, C. D. "A Novel Role for CD36 in VLDL-Enhanced Platelet Activation." Diabetes, 2003, 52, pp. 1248-55.

Evans, J. H., Spencer, D. M., Zweifach, A., Leslie, C. C. "Intracellular Calcium Signals Regulating Cytosolic Phospholipase A_2 Translocation to Internal Membranes." J Biol Chem, 2001, 276, pp. 30150–60.

Ferretti, G., Rabini, R. A., Mazzanti, L. "Glycated Low Density Lipoproteins Modify Platelet Properties: A Compositional and Functional Study." J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87, pp. 2180–84.

Fielding, C. J. "Lipoprotein Receptors, Plasma Cholesterol Metabolism and the Regulation of Cellular Free Cholesterol Concentration." FASEB J, 1992, 6, pp. 3162-68.

Fielding, C. J., Fielding, P. E. "Molecular Physiology of Reverse Cholesterol Transport." J Lipid Res, 1995, 36, pp. 211-28.

Flaumenhaft, R. "Molecular Basis of Platelet Granule Secretion." Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23, pp. 1152-60.

Flower, R. J. "The Development of COX2 Inhibitors." Nature Rev Drug Discov, 2003, 2(3), pp. 179–91.

Francis, G.A. "High Density Lipoprotein Oxidation: In Vitro Susceptibility and Potential in Vivo Consequences." Biochim Biophys Acta, 2000, 1483(2), pp. 217-35.

Fujimoto, Y., Sakuma, S., Tsunomori, M., Sumiya, T., Fujita, T. "Sphingomyelin Inhibits Platelet 12-Lipoxygenase Activity." Eur J Pharmacol, 1999, 378(2), pp. 233-36.

Fürstenberger, G., Marks, F., Krieg, P. "Arachidonate 8(S)-Lipoxygenase." Prostaglandins & other Lipid Mediators, 2002, 68–69, pp. 235–43.

Gaffet, P., Bettache, N., Bienvenüe, A. "Transverse Redistribution of Phospholipids During Human Platelet Activation: Evidence for a Vectorial Outflux Specific to Aminophospholipids." Biochemistry, 1995, 34, pp. 6762-69.

Gauthier, A., Lau, P., Zha, X., Milne, R., McPherson, R. "Cholesteryl Ester Transfer Protein Directly Mediates Selective Uptake of High Density Lipoprotein Cholesteryl Esters by the Liver." Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25, pp. 2177-84.

George, J. N. "Platelets." Lancet, 2000, 355, pp. 1531-39.

Gibbins, J. M. "Platelet Adhesion Signalling and the Regulation of Thrombus Formation." Journal of Cell Science, 2004, 117, pp. 3415-25.

GIBBONS, G. F. "Assembly and Secretion of Hepatic Very-Low-Density Lipoprotein." Biochem J, 1990, 268, pp. 1-13.

Gijón, M. A., Leslie, C. C. "Regulation of Arachidonic Acid Release and Cytosolic Phospholipase A_2 Activation." J Leuk Biol, 1999, 65, pp. 330-36.

Glomset, J. A. "The Plasma Lecithin: Cholesterol Acyl Transferase Reaction." J Lipid Res, 1968, 9, pp. 155-67.

Gretch, D. G., Sturley, S. L., Talmud, P., Attie, A. D. et al. "The Amino Terminus of Apolipoprotein B Is Necessary but Not Sufficient for Microsomal Triglyceride Transfer Protein Responsiveness." J Biol Chem, 1996, 271, pp. 8682–91.

Grundy, S. M. "Hypertriglyceridemia, Atherogenic Dyslipidemia, and the Metabolic Syndrome." Am J Cardiol, 1998, 81, pp. 18B-25B.

Ha, K. S., Exton, J. H. "Differential Translocation of Protein Kinase C Isozymes by Thrombin and Platelet-Derived Growth Factor. A Possible Function for Phosphatidylcholine-Derived Diacylglycerol." J Biol Chem, 1993, 268, pp. 10534-39.

Hackeng, C. M., Relou, I. A., Pladet, M. W., Gorter, G., van Rijn, H. J., Akkerman, J. W. "Early Platelet Activation by Low Density Lipoprotein Via P38 MAP Kinase." Thromb Haemost, 1999, 82(6), pp. 1749-56.

Hamberg, M., Samuelsson, B. "Prostaglandin Endoperoxides. Novel Transformations of Arachidonic Acid in Human Platelets." Proc Natl Acad Sci, 1974, 71, pp. 3400-04.

Hartwich, j., Dembinska-Kiec, A., Gruca, A., Motyka, M., Partyka, L., Skrzeczynska, J., Bzowska, M., Pryjma, J., Huber, J., Leitinger, N., Schmitz, G. "Regulation of Platelet Adhesion by Oxidized Lipoproteins and Oxidized Phospholipids." Platelets, 2002, 13, pp. 141-51.

Havel, R. J. "The Formation of LDL: Mechanisms and Regulation." J Lipid Res, 1984, 25, pp. 1570-76.

Havel, R. J., Eder, H. A., Bragdon, J. H. "The Distribution and Chemical Composition of Ultracentrifugally Separated Lipoproteins in Human Serum." J Clin Invest, 1955, 34, pp. 1345-54.

Hawkins, D. J., Brash, A. R. "Eggs of the Sea Urchin, Strongylocentrotuspurpuratus, Contain a Prominent (11r) and (12r) Lipoxygenase Activity." J Biol Chem, 1987, 262, pp. 7629-34.

HaZen, S. L., Zupan, L. A., Weissg, R. H., Getmang, D. P., Gross, R. W. "Suicide Inhibition of Canine Myocardial Cytosolic Calcium-Independent Phospholipase A_2: Mechanism-Based Discrimination between Calcium-Dependent and -Independent Phospholipases A_2." J Biol Chem, 1991, 266, pp. 7227-32.

Hollenberg, M. D., Compton, S. J. "Proteinase-Activated Receptors." Pharmacol Rev, 2002, 54, pp. 203–17.

Hourani, S. M. O., Cusack, N. J. "Pharmacological Receptors on Blood Platelets." Pharmacol Rev, 1991, 43, pp. 243-98.

Hug, H., Sarre, T. F. "Protein Kinase C Isoenzymes: Divergence in Signal Transduction." Biochem J, 1993, 291, pp. 329-43.

Hussain, M. M. "A Proposed Model for the Assembly of Chylomicrons." Atherosclerosis, 2000, 148, pp. 1-15.

Hussain, M. M., Shi, J., Dreizen, P. "Microsomal Triglyceride Transfer Protein and Its Role in ApoB-Lipoprotein Assembly." J Lipid Res, 2003, 44, pp. 22-32.

HWANG, J. I., OH, Y. S., SHIN, K. J., KIM, H., RYU, S. H., SUH, P. G. "Molecular Cloning and Characterization of a Novel Phospholipase C, PLC-Eta." Biochem J, 2005, 389, pp. 181–86.

Ibrahim, S., Calzada, C., Pruneta-Deloche, V., Lagarde, M., Ponsin, G. "The Transfer of VLDL-Associated Phospholipids to Activated Platelets Depends Upon Cytosolic Phospholipase A_2 Activity." J Lipid Res, 2007, 48(7), pp. 1533-38.

Ibrahim, S., Djimet-Baboun, A., Pruneta-Deloche, V., Calzada, C., Lagarde, M., Ponsin, G. "Transfer of Very Low Density Lipoprotein-Associated Phospholipids to Activated Human Platelets." J Lipid Res, 2006, 47(2), pp. 341-48.

Jackson, R. L., McLean, L. R., Demel, R. A. "Mechanism of Action of Lipoprotein Lipase and Hepatic Triglyceride Lipase." Am Heart J, 1987, 113, pp. 551-54.

Jakuš, V., Rietbrock, N. "Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications." Physiol Res, 2004, 53, pp. 131-42.

Jenkins, A. J., Best, J. D., Klein, R. L., Lyons, T. J. "Lipoproteins, Glycoxidation and Diabetic Angiopathy." Diabetes Metab Res Rev, 2004, 20, pp. 349–68.

Jiang, X. C., Agellon, L. B., Walsh, A., Breslow, J. L., Tall, A. "Dietary Cholesterol Increases Transcription of the Human Cholesteryl Ester Transfer Protein Gene in Transgenic Mice; Dependence on Natural Flanking Sequences." J Clin Invest, 1992, 90, pp. 1290-95.

Kent, C. "Eukariotic Phospholipid Biosynthesis." Ann Rev Biochem, 1995, 64, pp. 315-43.

Kitatani, K., Oka, T., Murata, T., Hayama, M., Akiba, S., Sato, T. "Acceleration by Ceramide of Calcium-Dependent Translocation of Phospholipase A_2 from Cytosol to Membranes in Platelets." Arch Biochem Biophys, 2000, 382(2), pp. 296-302.

Krauss, R. M. "Lipids and Lipoproteins in Patients with Type 2 Diabetes." Diabetes Care, 2004, 27, pp. 1496–504.

Kuhn, H., Bernd, J. T. "The Diversity of the Lipoxygenase Family: Many Sequence Data but Little Information on Biological Significance." FEBS Lett, 1999, 449, pp. 7-11.

Kuhn, H., Walther, M., Kuban, R. J. "Mammalian Arachidonate 15-Lipoxygenases Structure, Function, and Biological Implications." Prostaglandins & other Lipid Mediators, 2002, 68–69, pp. 263–90.

Lagarde, M. "Metabolism of Fatty Acids by Platelets and the Functions of Various Metabolites in Mediating Platelet Function." Prog Lipid Res, 1988, 27, pp. 137-52.

Lagarde, M., Bryon, P. A., Guichardant, M., Dechavanne, M. "A Simple and Efficient Method for Platelet Isolation from Their Plasma." Thromb Res, 1980, 17, pp. 581-88.

Lagrost, L., Athias, A., Gambert, P., Lallemant, C. "Comparative Study of Phospholipid Transfer Activities Mediated by Cholesteryl Ester Transfer Protein and Phospholipid Transfer Protein." J Lipid Res, 1994, 35, pp. 825-35.

Lalanne, F., Ponsin, G. "Mechanism of the Phospholipid Transfer Protein-Mediated Transfer of Phospholipids from Model Lipid Vesicles to High Density Lipoproteins." Biochim Biophys Acta, 2000, 1487, pp. 82-91.

Landino, L. M., Crews, B. C., Gierse, J. K., Hauser, S. D., Marnett, L. J. "Mutational Analysis of the Role of the Distal Histidine and Glutamine Residues of Prostaglandin-Endoperoxide Synthase-2 in Peroxidase Catalysis, Hydroperoxide Reduction, and Cyclooxygenase Activation." J Biol Chem, 1997, 272(34), pp. 21565–74.

Lee-Rueckert, M., Vikstedt, R., Metso, J., Ehnholm, C., Kovanen, P. T., Jauhiainen, M. "Absence of Endogenous Phospholipid Transfer Protein Impairs Abca1-Dependent Efflux of Cholesterol from Macrophage Foam Cells." J Lipid Res, 2006, 47, pp. 1725–32.

Lima, V. L. M., Coelho, C. B. B., Kennedy, J. F., Owen, J. S., Dolphin, P. J. "Lecithin-Cholesterol Acyltransferase (LCAT) as a Plasma Glycoprotein." Carbohydr Polym, 2004, 55, pp. 179–91.

Lio, Y. C., Reynolds, L. J., Balsinde, J., Dennis, E. A. "Irreversible Inhibition of Ca^{2+} Independent Phospholipase A_2 by Methyl Arachidonyl Fluorophosphonate." Biochim Biophys Acta, 1996, 1302, pp. 55-60.

Lookene, A., Skottova, N., Olivecrona, G. "Interactions of Lipoprotein Lipase with the Active Site Inhibitor Tetrahydrolipstatin (Orlistat)." Eur J Biochem, 1994, 222, pp. 395-403.

Lopez, J. A., Andrews, R. K., Afshar-Kharghan, V., Berndt, M. C. "Bernard-Soulier Syndrome." Blood, 1998, 91, pp. 4397–418.

Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C. "Flexibility of the Nsaid Binding Site in the Structure of Human Cyclooxygenase-2." Nat Struct Biol, 1996, 3(11), pp. 927–33.

Lynch, S. F., Ludlam, C. A. "Plasma Microparticles and Vascular Disorders." Br J Haematol, 2007, 137(1), pp. 36-48.

Mahley, R. W., Innerarity, T. L., Rall, S. C., Weisgraber, K. H. "Plasma Lipoproteins: Apolipoprotein Structure and Function." J Lipid Res, 1984, 25, pp. 1277-94.

Marçais, C., Verges, B., Charrière, S., Pruneta, V., Merlin, M., Billon, S., Perrot, L., Drai, J., Sassolas, A., Pennacchio, L. A., Fruchart-Najib, J., Fruchart, J. C., Durlach, V., Moulin, P. "Apoa5 Q139x Truncation Predisposes to Late-Onset Hyperchylomicronemia Due to Lipoprotein Lipase Impairment." J Clin Invest, 2005, 115(10), pp. 2862–69.

Marcus, A. J., Safier, L. B. "Thromboregulation: Multicellular Modulation of Platelet Reactivity in Hemostasis and Thrombosis." FASEB J, 1993, 7(6), pp. 516 –22.

Martínez, M. C, Kunzelmann, C., Freyssinet, J. M. "Remodelage De La Membrane Plasmique Et Stimulation Cellulaire." Medecine/Sciences, 2004, 20, pp. 189-95.

Masferrer, J. L., Seibert, K., Zweifel, B., Needleman, P. "Endogenous Glucocorticoids Regulate an Inducible Cyclooxygenase Enzyme." Proc Natl Acad Sci, 1992, 89, pp. 3917-21.

Massey, J. B., Hickson-Bick, D., Via, D. P., Gotto Jr., A. M., Pownall, H. J. "Measurement and Prediction of the Rates of Spontaneous Transfer of Phospholipids between Plasma Lipoproteins." Biochim Biophys Acta, 1984, 794, pp. 274-80.

McAdam, B. F., Fitzgerald, G. A. et al. "Systemic Biosynthesis of Prostacyclin by Cyclooxygenase (COX)-2: The Human Pharmacology of a Selective Inhibitor of Cox-2." Proc Natl Acad Sci, 1999, 96, pp. 272–77.

McEneny, J., O'Kane, M. J., Young, I. S. "Very Low Density Lipoprotein Subfractions in Type II Diabetes Mellitus: Alterations in Composition and Susceptibility to Oxidation." Diabetologia, 2000, 43, pp. 485-93.

McNicol, A., Shibou, T.S. "Translocation and Phosphorylation of Cytosolic Phospholipase A_2 in Activated Platelets." Thromb Res, 1998, 92, pp. 19-26.

Mead, J. R., Irvine, S. A., Ramji, D. P. "Lipoprotein Lipase: Structure, Function, Regulation, and Role in Disease." J Mol Med, 2002, 80, pp. 753–69.

Mounier, C. M., Ghomashchi, F., Lindsay, M. R. et al. "Arachidonic Acid Release from Mammalian Cells Transfected with Human Groups Iia and X Secreted Phospholipase A_2 Occurs Predominantly During the Secretory Process and with the Involvement of Cytosolic Phospholipase A_2-Alpha." J Biol Chem, 2004, 279, pp. 25024–38.

Nishida, H. I., Nishida, T. "Phospholipid Transfer Protein Mediates Transfer of Not Only Phosphatidylcholine but Also Cholesterol from Phosphatidylcholine-Cholesterol Vesicles to High Density Lipoproteins." J Biol Chem, 1997, 272(11), pp. 6959–64.

Ochocka, A. M. et Pawelczyk, T. "Isozymes Delta of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C and Their Role in Signal Transduction in the Cell." Acta Biochimica Polonica, 2003, 50(4), pp. 1097–110.

Oka, T., Kujiraoka, T., Jauhiainen, M., Hattori, H. et al. "Distribution of Phospholipid Transfer Protein in Human Plasma: Presence of Two Forms of Phospholipid Transfer Protein, One Catalytically Active and the Other Inactive." J Lipid Res, 2000, 41, pp. 1651–57.

Olson, R. E. "Discovery of the Lipoproteins, Their Role in Fat Transport and Their Significance as Risk Factors." J Nutr, 1998, 128, pp. 439S-43S.

Oury, C., Toth-Zsamboki, E., Vermylen, J., Hoylaerts, M. F. "The Platelet ATP and ADP Receptors." Curr Pharm Des, 2006, 12(7), pp. 859-75.

Patrono, C. "Aspirin: New Cardiovascular Uses for an Old Drug." Am J Med, 2001, 110(1A), pp. S62-S65.

Patsch, J. M., Gotto Jr., A. M., Olivecrona, T., Eisenberg, S. "Formation of High Density Lipoprotein 2- Like Particles During Lipolysis of Very Low Density Lipoproteins in Vivo." Proc Natl Acad Sci USA, 1978, 75, pp. 4519-23.

Ponsin, G., Calvo, C., Berthezene, F. "Metabolic Consequences of the Nonenzymatic Glucosylation of Apolipoproteins." Diabete Metab, 1991, 17(6), pp. 497-502.

Potter, B. J., Sorrentino, D., Berk, P. D. "Mechanisms of Cellular Uptake of Free Fatty Acids." Ann Rev Nutr, 1989, 9, pp. 253-70.

Pruneta, V., Autran, D., Ponsin, G., Marçais, C., Duvillard, L., Verges, B., Berthezène, F., Moulin, P. "Ex Vivo Measurement of Lipoprotein Lipase-Dependent Very Low Density Lipoprotein (VLDL)-Triglyceride Hydrolysis in Human VLDL: An Alternative to the Postheparin Assay of Lipoprotein Lipase Activity." J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86, pp. 797-803.

Pruneta-Deloche, V., Marçais, C., Perrot, L., Sassolas, A., Delay, M., Estour, B., Lagarde, M., Moulin, P. "Combination of Circulating Antilipoprotein Lipase (Anti-LPL) Antibody and Heterozygous S172 Fsx179 Mutation of LPL Gene Leading to Chronic Hyperchylomicronemia." J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90, pp. 3995–98.

Pruneta-Deloche, V., Sassolas, A., Dallinga-Tie, G. M., Berthezène, F., Ponsin, G., Moulin, P. "Alteration in Lipoprotein Lipase Activity Bound to Triglyceride-Rich Lipoproteins in the Postprandial State in Type 2 Diabetes." J Lipid Res, 2004, 45, pp. 859-65.

Pruzanski, W., Lambeau, L., Lazdunsky, M. et al. "Differential Hydrolysis of Molecular Species of Lipoprotein Phosphatidylcholine by Groups IIa, V and X Secretory Phospholipases A_2." Biochim Biophys Acta, 2005, 1736, pp. 38–50.

Rådmark, O. "Arachidonate 5-Lipoxygenase." Prostaglandins & other Lipid Mediators, 2002, 68–69, pp. 211–34.

Relou, I. A., Hackeng, C. M., Akkerman, J. W., Malle, E. "Low-Density Lipoprotein and Its Effect on Human Blood Platelets." Cell Mol Life Sci, 2003, 60(5), pp. 961-71.

Rizzo, M., Berneis, K. "Small, Dense Low-Density-Lipoproteins and the Metabolic Syndrome." Diabetes Metab Res Rev, 2007, 23, pp. 14–20.

Roberts, D. E., McNicol, A., Bose, R. "Mechanism of Collagen Activation in Human Platelets." J Biol Chem, 2004, 279, pp. 19421-30.

Rodger, W. "Insulin-Dependent (Type I) Diabetes Mellitus." Can Med Assoc J, 1991, 145(10), pp. 1227-37.

Rodger, W. "Non-Insulin-Dependent (Type II) Diabetes Mellitus." Can Med Assoc J, 1991, 145(12), pp. 1571-81.

Roveri, A., Maiorino, M., Ursini, F. "Enzymatic and Immunological Measurements of Soluble and Membrane-Bound Phospholipid-Hydroperoxide Glutathione Peroxidase." Methods Enzymol, 1994, 233, pp. 202-12.

Rye, K. A., Barter, P. J. "Formation and Metabolism of Prebeta-Migrating, Lipid-Poor Apolipoprotein a-I." Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24, pp. 421-28.

Saltzman, A. G., Morse, B., Whitman, M. M., Ivanshchenko, Y., Jaye, M., Felder, S. "Cloning of the Human Serotonin 5-HT2 and 5-HTlc Receptor Subtypes." Biochem Biophys Res Commun, 1991, 181, pp. 1469-78.

Salvemini, D., Botting, R. "Modulation of Platelet Function by Free Radicals and Free-Radical Scavengers." Trends Pharmacol Sci, 1993, 14(2), pp. 36-42.

Samuelsson, B. "The Discovery of the Leukotrienes." Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161, pp. S2-S6.

Samuelsson, B., Goldyne, M., Granström, E., Hamberg, M., Hammarström, S., Malmsten, C. "Prostaglandins and Thromboxanes." Ann Rev Biochem, 1978, 47, pp. 997-1029.

Santamarina-Fojo, S., González-Navarro, H., Freeman, L., Wagner, E., Nong, Z. "Hepatic Lipase, Lipoprotein Metabolism, and Atherogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24, pp. 1750-54.

Santoro, S. A., Zutter, M. M. "The Alpha-2 beta-1 Integrin: A Collagen Receptor on Platelets and Other Cells." Thromb Haemost, 1995, 74, pp. 813–21.

Santoso, S., Kunicki, T. J., Kroll, H., Haberbosch, W., Gardemann, A. "Association of the Platelet Glycoprotein Ia C807 T Gene Polymorphism with Nonfatal Myocardial Infarction in Younger Patients." Blood, 1999, 93, pp. 2449–53.

Schaloske, R. H., Dennis, E. A. "The Phospholipase A_2 Superfamily and Its Group Numbering System." Biochim Biophys Acta, 2006, 1761, pp. 1246–59.

Seibold, S. A., Smith, W. L., Babcock, G. T. et al. "Peroxidase Activity in Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1 Occurs with a Neutral Histidine Proximal Heme Ligand." Biochemistry, 2000, 39, pp. 6616-24.

Sekiya, K., Okuda, H., Arichi, S. "Selective Inhibition of Platelet Lipoxygenase by Esculetin." Biochim Biophys Acta, 1982, 713, pp. 68-72.

Sharma, J. N., Mohammed, L. A. "The Role of Leukotrienes in the Pathophysiology of Inflammatory Disorders." Inflammopharmacology, 2006, 14(3-4), pp. 99-102.

Sharp, P., Blindermann, L., Combs, K. A., et al. "Cloning and Gene Defects in Microsomal Triglyceride Transfer Protein Associated with Abetalipoproteinemia." Nature, 1993, 365, pp. 65–69.

Shattil, S. J., Kashiwagi, H., Pampori, N. "Integrin Signaling: The Platelet Paradigm." Blood, 1998, 91, pp. 2645–57.

Shitashige, M., Morita, I., Murota, S. "Different Substrate Utilization between Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1 and -2 in NIH3T3 Fibroblasts." Biochim Biophys Acta, 1998, 1389, pp. 57–66.

Siess, W., Zangl, K. J., Essler, M., Bauer, M., Brandl, R., Corrinth, C., Bittman, R., Tigyi, G., Aepfelbacher, M. "Lysophosphatidic Acid Mediates the Rapid Activation of Platelets and Endothelial Cells by Mildly Oxidized Low Density Lipoprotein and Accumulates in Human Atherosclerotic Lesions." Proc Natl Acad Sci, 1999, 96(12), pp. 6931-36.

Sims, P. J., Wiedmer, T. "Unraveling the Mysteries of Phospholipids Scrambling." Thromb Haemost, 2001, 86, pp. 266-75.

Singer, A. G., Ghomashchi, F., Le Calvez, C. et al. "Interfacial Kinetic and Binding Properties of the Complete Set of Human and Mouse Groups I, II, V, X, and XII Secreted Phospholipases A_2." J Biol Chem, 2002, 277, pp. 48535–49.

Snipes, J. A., Kis, B., Shelness, G. S., Hewett, J. A., Busija, D. W. "Cloning and Characterization of Cyclooxygenase-1b (Putative Cyclooxygenase-3) in Rat." J Pharmacol Exp Ther, 2005, 313(2), pp. 668-76.

Soslau, G., Classi, R., Morgan, D. A. et al. "Unique Pathway of Thrombin-Induced Platelet Aggregation Mediated by Glycoprotein Ib." J Biol Chem, 2001, 276, pp. 21173–83.

Spector, A. A., Hoak, J. C., Warner, E. D., Fry, G. L. "Utilization of Long-Chain Free Fatty Acids by Human Platelets." J Clin Invest, 1970, 49, pp. 189-96.

Steen, V. M., Holmsen, H., Aarbakke, G. "The Plateletstimulating Effect of Adrenaline through Alfa 2-Adrenergic Receptors Requires Simultaneous Activation by a True Stimulatory Platelet Agonist. Evidence That Adrenaline Per Se Does Not Induce Human Platelet Activation in Vitro." Thromb Haemost, 1993, 70, pp. 506-13.

Stoeckelhuber, M., Dobner, P., Baumgartner, P., Ehlert, J., Brandt, E., Mentele, R., Adam, D., Engelmann, B. "Stimulation of Cellular Sphingomyelin Import by the Chemokine Connective Tissue-Activating Peptide III." J Biol Chem, 2000, 275(48), pp. 37365-72.

Swann, K., Saunders, C. M., Rogers, N. T., Lai F. A. "PLC(Zeta): A Sperm Protein That Triggers Ca^{2+} Oscillations and Egg Activation in Mammals." Seminars in Cell & Developmental Biology, 2006, 17, pp. 264–73.

Takahara, K., Murray, R., Fitzgerald, G. A., Fitzgerald, D. J. "The Response to Thromboxane A_2 Analogues in Human Platelets. Discrimination of Two Binding Sites Linked to Distinct Effector Systems." J Biol Chem, 1990, 265, pp. 6836-44.

Takeda, H., Yano, T., Shichiri, M. "Abnormalities in Platelets and Vascular Endothelial Cells Induced by Glycated Lipoproteins." Internal Medicine, 1992, 31, pp. 746-51.

Tall, A. R., Krumholz, S., Olivecrona, T., Deckelbaum, R. J. "Plasma Phospholipid Transfer Protein Enhances Transfer and Exchange of Phospholipids between Very Low Density Lipoproteins and High Density Lipoproteins During Lipolysis." J Lipid Res, 1985, 26(842-851).

Taskinen, M. R., Smith, U. "Lipid Disorders in Niddm: Implications for Treatment." J Intern Med, 1998, 244, pp. 361-70.

Thorne, R. F., Mhaidat, N. M., Ralston, K. J., Burns, G. F. "CD36 Is a Receptor for Oxidized High Density Lipoprotein: Implications for the Development of Atherosclerosis." FEBS Lett, 2007, 581(6), pp. 1227-32.

Tornwall, P., Olivecrona, G., Karpe, F., Hamsten, A., Olivecrona, T. "Lipoprotein Lipase Mass and Activity in Plasma and Their Increase after Heparin Are Separate Parameters with Different Relations to Plasma Lipoproteins." Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995, 15, pp. 1086-93.

Triplett, D. A. "Coagulation and Bleeding Disorders." Clinical Chemistry, 2000, 46(8(B)), pp. 1260–69.

Urban, S., Zieseniss, S., Werder, M., Hauser, H., Budzinski, R., Engelmann, B. "Scavenger Receptor B1 Transfers Major Lipoprotein-Associated Phospholipids into the Cells." J Biol Chem, 2000, 275, pp. 33409-15.

Van Tol, A. "Phospholipid Transfer Protein." Curr Opin Lipidol, 2002, 13, pp. 135-39.

Vance, D. E., Vance, J. E. "Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.," Elsevier, 2002,

Vane, J. R., Botting, R. M. "The Mechanism of Action of Aspirin." Thromb Res, 2003, 110, pp. 255-58.

Véricel, E., Januel, C., Carreras, M., Moulin, P., Lagarde, M. "Diabetic Patients without Vascular Complications Display Enhanced Basal Platelet Activation and Decreased Antioxidant Status." Diabetes, 2004, 53, pp. 1046–51.

Vilella, E., Joven, J., Fernández, M., Vilaró, S., Brunzell, J. D., Olivecrona, T., Bengtsson-Olivecrona, G. "Lipoprotein Lipase in Human Plasma Is Mainly Inactive and Associated with Cholesterol-Rich Lipoproteins." J Lipid Res, 1993, 34, pp. 1555-64.

Wallace, J. L., McKnight, W., Reuter, B. K. Vergnolle, N. "Nsaid-Induced Gastric Damage in Rats: Requirement for Inhibition of Both Cyclooxygenase 1 and 2." Gastroenterology, 2000, 119, pp. 706–14.

Watala, C., Boncler, M., Gresner, P., "Blood Platelet Abnormalities and Pharmacological Modulation of Platelet Reactivity in Patients with Diabetes Mellitus." Pharmacol Rep, 2005, 57, pp. 42-58.

Watson, A. D., Leitinger, N., Navab, M., Faull, K. F., Hörkkö, S., Witztum, J. L., Palinski, W., Schwenke, D., Salomon, R. G., Sha, W., Subbanagounder, G., Fogelman, A. M., Berliner, J. A. "Structural Identification by Mass Spectrometry of Oxidized Phospholipids in Minimally Oxidized Low Density Lipoprotein That Induce Monocyte/Endothelial Interactions and Evidence for Their Presence in Vivo." J Biol Chem, 1997, 272(21), pp. 13597-607.

Weber, A. A., Hohlfeld, T., Schrör, K. et al. "Flow Cytometry Analysis of Platelet Cyclooxygenase-2 Expression: Induction of Platelet Cyclooxygenase-2 in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting." Br J Haematol, 2002, 117, pp. 424–26.

Williams, R. L., Katan, M. "Structural Views of Phosphoinositidespecific Phospholipase C: Signalling the Way Ahead." Structure, 1996, 4, pp. 1387–94.

Witztum, J. L. "Susceptibility of Low-Density Lipoprotein to Oxidative Modification." Am J Med, 1993, 94(4), pp. 347-49.

Wright, E. Jr, Scism-Bacon, J. L., Glass, L. C. "Oxidative Stress in Type 2 Diabetes: The Role of Fasting and Postprandial Glycaemia." Int J Clin Pract, 2006, 60(3), pp. 308-14.

Yamaji-Hasegawa, A., Tsujimoto, M. "Asymmetric Distribution of Phospholipids in Biomembranes." Biol Pharm Bull, 2006, 29(8), pp. 1547—53.

Yamashita, S., Hirano, K., Sakai, N., Matsuzawa, Y. "Molecular Biology and Pathophysiological Aspects of Plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein." Biochim Biophys Acta, 2000, 1529, pp. 257-75.

Yedgar, S., Lichtenberg, D., Schnitzer, E. "Inhibition of Phospholipase A_2 as a Therapeutic Target" Biochim Biophys Acta, 2000, 1488, pp. 182-87.

Yoshimoto, T., Takahashi, Y. "Arachidonate 12-Lipoxygenases." Prostaglandins & other Lipid Mediators, 2002, 68–69, pp. 245–62.

Young, I. S., McFarlane, C., McEneny, J. "Oxidative Modification of Triacylglycerol-Rich Lipoproteins." Biochemical Society Transactions, 2003, 31(5), pp. 1062-65.

Zachowski, A. "Phospholipids in Animal Eukaryotic Membranes: Transverse Asymmetry and Movement." Biochem J, 1993, 294, pp. 1-14.

Zhou, Q., Zhao, J., Stout, J. G., Luhm, R. A., Wiedmer, T., Sims, P. J. "Molecular Cloning of Human Plasma Membrane Phospholipid Scramblase. A Protein Mediating Transbilayer Movement of Plasma Membrane Phospholipids." J Biol Chem, 1997, 272, pp. 18240-44.

Zieseniss, S., Zahler, S., Muller, I., Hermetter, A., Engelmann, B. "Modified Phosphatidylethanolamine as the Active Component of Oxidized Low Density Lipoprotein Promoting Platelet Prothrombinase Activity." J Biol Chem, 2001, 276(23), pp. 19828-35.

Zwaal, R. F., Schroit, A. J. "Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells." Blood, 1997, 89, pp. 1121-32.