

THESE

présentée devant

UNIVERSITE DE LYON - INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE
LYON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR

Spécialité Biochimie

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

par

Romain COLAS

**Syndrome métabolique et diabète chez l'Homme.
Composition lipidique et oxydation des lipoprotéines de
basse densité (LDL) plasmatiques en relation avec
l'activation des plaquettes sanguines.**

Soutenue le 10 décembre 2010

Directeurs de thèse : Pr. Michel LAGARDE / Dr. Catherine CALZADA

JURY :

Dr. Jean-Etienne FABRE
Dr. Anne NEGRE-SALVAYRE
Pr. Philippe MOULIN
Pr. Michel NARCE
Pr. Michel LAGARDE
Dr. Catherine CALZADA

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur (Président)
Directeur de thèse
Co-directrice de thèse

Travail effectué au sein du laboratoire « Régulations Métaboliques, Nutrition et Diabètes »
(INSERM U 870) à l'INSA de Lyon.

INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quadriennal 2007-2010

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	CHIMIE DE LYON http://sakura.cpe.fr/ED206	M. Jean Marc LANCELIN , Université Claude Bernard Lyon 1, Bât CPE, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 email : lancelin@hikari.cpe.fr
E.E.A.	ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE http://www.insa-lyon.fr/eea	M. Alain NICOLAS, Ecole Centrale de Lyon, Bâtiment H9, 36 avenue Guy de Collongue, 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60 97 Fax : 04 78 43 37 17 email: eea@ec-lyon.fr
E2M2	EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION http://biomserv.univ-lyon1.fr/E2M2	M. Jean-Pierre FLANDROIS, CNRS UMR 5558, Université Claude Bernard Lyon 1, Bât G. Mendel, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.26 23 59 50 Fax 04 26 23 59 49 email :e2m2@biomserv.univ-lyon1.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE http://ediis.univ-lyon1.fr	M. Didier REVEL, Hôpital Cardiologique de Lyon, Bâtiment Central, 28 Avenue Doyen Lépine, 69500 BRON Tél : 04.72.68 49 09 Fax :04 72 35 49 16 email :Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr
INFO MATHS	INFORMATIQUE ET MATHEMATIQUES http://infomaths.univ-lyon1.fr	M. Alain MILLE, Université Claude Bernard Lyon 1, LIRIS – INFOMATHS, Bâtiment Nautibus, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 44 82 94 Fax 04 72 43 13 10 email : alain.mille@liris.cnrs.fr
Matériaux	MATERIAUX DE LYON http://edlm.ec-lyon.fr	M. Jean Marc PELLETIER, INSA de Lyon, MATEIS, Bâtiment Blaise Pascal, 7 avenue Jean Capelle, 69621 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 email :Jean-marc.Pelletier@insa-lyon.fr
MEGA	MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE http://mega.ec-lyon.fr	M. Jean Louis GUYADER, INSA de Lyon, Laboratoire de Vibrations et Acoustique, Bâtiment Antoine de Saint Exupéry, 25 bis avenue Jean Capelle, 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72.18.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 email : mega@lva.insa-lyon.fr
ScSo	ScSo*	M. Lionel OBADIA, Université Lyon 2, 86 rue Pasteur, 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.77.23.88 Fax : 04.37.28.04.48 email : Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans l'unité INSERM U870 / INSA-Lyon « Régulations Métaboliques, Nutrition et Diabète » dirigée par le **Dr. Hubert Vidal** au sein de l'équipe 2 animée par le **Pr. Michel Lagarde**.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements au **Dr. Hubert Vidal** et au **Pr. Michel Lagarde** pour m'avoir donné l'opportunité, il y a de cela 4 ans, d'effectuer mon stage de Master Recherche au sein du laboratoire. Je vous remercie également pour la confiance que vous m'avez témoignée en soutenant ma candidature devant l'EDISS et en m'offrant les moyens de réaliser ce travail de doctorat. Je tiens à vous remercier particulièrement pour les nombreux congrès auxquels j'ai pu participer grâce à votre soutien.

Je remercie le **Dr. Anne Negre-Salvayre** pour avoir pris le temps d'apporter votre regard d'experte sur ce travail. La pertinence de vos remarques a contribué à l'amélioration de la qualité de ce mémoire.

Je remercie le **Dr. Jean-Etienne Fabre** pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail d'un œil averti. Je vous remercie également d'avoir su faire face aux aléas du transport de mon manuscrit.

Je remercie le **Pr. Philippe Moulin**, sans qui la partie clinique de ce travail n'aurait pu être réalisée. Je vous remercie beaucoup de m'avoir ouvert les portes de votre service hospitalier. Votre investissement à mes côtés m'a permis de mener à bien le protocole clinique ECLIPSE. Merci du temps que vous avez régulièrement pris pour suivre l'avancement de mes travaux et finalement, merci d'avoir participé à mon jury de thèse.

Je remercie le **Pr. Michel Narce** pour l'intérêt porté à ce travail et pour avoir participé à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier le **Pr. Michel Lagarde**, non plus au titre d'animateur de l'équipe 2, mais en tant qu'encadrant de mon doctorat. Vous avez su donner l'impulsion scientifique à ce travail et vous m'avez aidé à le valoriser tout au long de ces 3 années. Votre esprit critique et vos remarques biochimiques m'ont aidé à avancer dans la bonne direction. Votre persévérance et votre amour des sciences m'ont beaucoup inspiré.

Je remercie le **Dr. Catherine Calzada** pour m'avoir co-encadré tout au long de ces 4 années. Je n'ai fait qu'une thèse (ouf) et ne peux pas vraiment comparer mais pour ce que j'ai pu observer autour de moi, tu es la meilleure encadrante possible (enfin presque, il te manque juste une HDR). Toujours présente, rarement stressée, tu as su m'encadrer avec un mélange parfait alliant autonomie, rigueur, encouragements dans les moments de doute et humour britannique en toute situation. Tu m'as donné le goût de continuer dans ce domaine et les lipos sont devenues une passion ! Merci vraiment de m'avoir montré la voie et d'avoir été à mes côtés tout ce temps.

Je remercie le **Dr. Agnès Sassolas** et **Mme Martine BROYER** pour leur apport à ce travail.

Je remercie **Christine** et **Myriam** sans qui le recrutement aurait été moins aisé.

Je remercie chacune des infirmières de U11 (**Nathalie, Christine, Paulette, Asma, Marie-Paule, Marie-Frédérique, Dominique** et **Martine**) pour leur travail sur le protocole ECLIPSE. Nous nous sommes vus de nombreuses fois tôt le matin et vous aviez toujours le sourire. Merci pour tous les cafés offerts en attendant que les volontaires se présentent !

Je remercie également **tous les volontaires** qui ont participé à l'étude ECLIPSE. Chacun d'entre vous a su prendre un peu de son temps et perdre un peu de son sang pour m'aider et quelque part, ce mémoire vous appartient.

Je remercie **Evelyne** pour tous ses conseils et son aide tout au long de mon parcours. A chaque moment-clé, vous avez su être présente et vous m'avez aidé à surmonter les moultes épreuves du parcours du thésard.

Je remercie **Michel G.** pour tout ce que vous m'avez appris sur la (plate-forme) lipidomique, votre patience et vos conseils. Vous avez largement contribué aux résultats présentés dans ce mémoire.

Je remercie **Marion** (sportive mais fragile ! Merci de m'avoir aidé à préparer mes futurs TP), **Céline** (pour la quantification de certaines classes lipidiques et pour m'avoir proposé les cours que tu avais en trop), **Marie-Caroline** (toujours optimiste et partante pour donner un coup de main), **Alain** (pour avoir donné de votre corps à la sciences), **Patrick** (le vrai sportif avec qui je n'ai jamais eu l'occasion de faire du sport... mais c'est peut-être mieux ainsi... oui, mais pour lequel des deux ?), **Valérie** (pour ta maîtrise de la FPLC et tes nombreuses connaissances sur les lipos), **Sabine** (je te remercie pour la chaleur du sud qui émanait de toi), **Madeleine** (pour nous avoir préservé des dangers de la radioactivité), **Nathalie** (pour nos discussions sur les isoprostanes), **Isabelle** (pour ta bonne humeur), **Christophe** (pour ton aide statviewène), **Sylvie** (toujours disponible pour moi) et **Maryline** (sans qui l'accueil n'est pas le même).

Je remercie également **Romain** (un si joli prénom, tu partais pourtant bien dans la vie...mais ce n'est pas grave, je suis dans ma période « tolérante »), **Nicolas G.** (tu vois, même à New-York, je pense encore à toi, je t'ai rencontré en fin de thèse, maintenant, je sais ce que tu as vécu !), **Emilie** (pour moi, tu seras toujours ma petite padawane, soit forte et ne cède pas à l'appel du côté obscur), **Joffrey** (tu auras essayé de me mettre au whisky jusqu'au bout, mais finalement, bière ou whisky, on en arrive au même point !), **Yann** (notre ingénieur national que l'IMBL a lancé dans sa brillante carrière), **Jérôme B.** (tu m'as vaincu à Ogame, mais je n'étais pas prêt à me relever en pleine nuit pour une flotte...Chapeau bas), **Naïl** (le thésard qui a le plus réglé la ligne de base au cours d'une thèse !), **Lilas** (ou comment être au courant des potins du labos), **Bérengère** (dis, tu veux devenir jedi ?), **Daria** (court séjour mais tu es vraiment une fille bien), **Manar** (toi aussi tu veux devenir jedi ?), **Fabienne** (la pro de la rédaction d'article), **Ping** (merci de m'avoir fait découvrir l'art du thé), **Magali** (pour toutes nos discussions où tu voulais avoir raison et moi aussi...), **Patricia** (pour ta gentillesse), **Miao** (on ne se voit pas beaucoup, mais tu es toujours souriante, j'espère que les plaquettes te porteront chance), **Jenny** (ma partenaire de master, une bonne chose de faite, non ? je te

souhaite plein de bonheur pour la suite), **Réda** (court séjour chez nous mais maintenant, tu as trouvé ta voie) et **Nicolas P.** (pour notre collaboration autour des HHE).

Je remercie tous les membres du laboratoire pour votre aide et tous les moments passés ensembles.

Je remercie ma future femme **Allison**. Nous avons traversé ensemble cette épreuve et nous avons tenu bon...Que notre aventure soit encore longue...

Je remercie mes parents pour votre soutien, votre amour et votre réconfort à chacune de mes visites.

Je remercie ma tante pour toutes tes petites attentions et tes petits mails réguliers.

Je remercie **Sabine, René et Véro** pour leurs petits mots réguliers.

Je remercie également **Brigitte, Daniel, Fanny, Vivien, Max et MJ** pour tout ce que vous m'avez apporté et pour votre accueil en tant que gendre/bof. Et plus globalement, je remercie toute la famille (mais je ne mets pas les noms sinon je vais doubler la taille de mon manuscrit).

Je remercie tous mes amis de longues dates (eh oui, on n'est plus si jeune que ça) : **Guillaume, Anne-Marie, Jérôme, Yannick et Fanouz** pour ne citer que vous. Facile de déconnecter avec vous et de recharger les batteries ! Merci d'être là !

Enfin, je terminerai par une pensée pour un ami qui aurait dû être dans la ligne au-dessus mais dont le destin en a voulu autrement. **Guillaume**, je te dédie cette thèse.

AVANT-PROPOS

Le travail exposé dans ce mémoire a fait l'objet de publications scientifiques et a été présenté par communications orales ou affichées lors de congrès scientifiques nationaux et internationaux.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

► **Colas R.**, Pruneta-Deloche V., Guichardant M., Luquain-Costaz C., Cugnet-Anceau C., Moret M., Vidal H., Moulin P., Lagarde M., and Calzada C. (2010). Increased Lipid Peroxidation in LDL from Type-2 Diabetic Patients. *Lipids* 45, 723-731.

► Calzada C., **Colas R.**, Guillot N., Guichardant M., Laville M., Véricel E., and Lagarde, M. (2010). Subgram daily supplementation with docosahexaenoic acid protects low-density lipoproteins from oxidation in healthy men. *Atherosclerosis* 208, 467-472.

► Nous avons également deux articles en préparation :

- L'un sur le protocole clinique ECLIPSE exposé dans ce manuscrit montrant les modifications lipidiques et oxydatives subies par des LDL de sujets ayant développé un syndrome métabolique ou un diabète de type-2 et leurs effets activateurs sur des plaquettes de volontaires sains.
- L'autre concernant la caractérisation en lipides et peroxydes lipidiques des HDL de patientes atteintes d'abetalipoprotéinémie et leurs effets sur l'activation des plaquettes sanguines.

COMMUNICATIONS ORALES

► **Colas R.**, Cugnet-Anceau C., Moret M., Guichardant M., Vidal H., Moulin P., Lagarde M. and Calzada C. Low-density lipoproteins from patients with a metabolic syndrome or type-2 diabetes activate platelets. *9th Congress of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL)*. 29 may-2 june 2010, Maastricht, NETHERLANDS.

► Calzada C., Véricel E., **Colas R.**, Khanna G., Lagarde M. and Moulin P. Oxidatively modified high-density lipoproteins inhibit human platelet aggregation. *9th Congress of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL)*. 29 may-2 june 2010, Maastricht, NETHERLANDS.

► Calzada C., **Colas R.**, Guillot N., Laville M., Véricel E. and Lagarde M. Effects of increasing doses of docosahexaenoic acid on low-density lipoprotein redox status and oxidizability in human volunteers. *8th Congress of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL)*. 17-22 may 2008, Kansas City, USA.

CONFERENCES INVITEES

► Calzada C., **Colas R.**, Ponsin G., Véricel E., Moulin P. and Lagarde M. Platelet-low-density lipoprotein interaction : from in vitro experiments to clinical studies. *The 6th Euro Fed Lipid Congress*. Oils, Fats and Lipids in the 3rd Millennium: Challenges, Achievements and Perspectives. 7-10 september 2008, Athens, GREECE.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

► **Colas R.**, Luquain-Costaz C., Guichardant M., Cugnet-Anceau C., Moret M., Vidal H., Moulin P., Lagarde M., Calzada C. Marqueurs spécifiques de peroxydation lipidique dans les lipoprotéines de faible densité de diabétiques de type-2. *10^{ème} journée de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL)*. 21 juin 2010, Villeurbanne, FRANCE.

► **Colas R.**, Luquain-Costaz C., Guichardant M., Cugnet-Anceau C., Moret M., Vidal H., Moulin P., Lagarde M., Calzada C. Marqueurs spécifiques de peroxydation lipidique dans les lipoprotéines de faible densité de diabétiques de type-2. *36^{ème} édition de la Société Francophone du Diabète (SFD)*. 16-19 mars 2010, Lille, FRANCE.

► **Colas R.**, Pruneta-Deloche V., Costaz C., Guichardant M., Lagarde M., Calzada C. Composition et peroxydation lipidiques des LDL séparées par ultracentrifugation ou par FPLC. *9^{ème} journée de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL)*. 10 novembre 2009, Marseille, FRANCE.

► **Colas R.**, Moulin P., Ponsin G., Véricel E., Lagarde M., Calzada C. Caractérisation et implication des lipoprotéines de faible densité (LDL) de diabétiques de type 2 dans l'hyperactivation des plaquettes sanguines humaines. *13^{ème} journée de l'EDISS*. 11 mars 2009, Villeurbanne, FRANCE.

► **Colas R.**, Moulin P., Ponsin G., Véricel E., Lagarde M., Calzada C. Caractérisation et implication des lipoprotéines de faible densité (LDL) de diabétiques de type 2 dans l'hyperactivation des plaquettes sanguines humaines. *8^{ème} journée de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL)*. 15 janvier 2009, Villeurbanne, FRANCE.

► **Colas R.**, Moulin P., Ponsin G., Véricel E., Lagarde M., Calzada C. Caractérisation et implication des lipoprotéines de faible densité (LDL) de diabétiques de type 2 dans l'hyperactivation des plaquettes sanguines humaines. *Journée de l'IFR 62*. 4 décembre 2008, Lyon, FRANCE.

► **Colas R.**, Moulin P., Ponsin G., Véricel E., Lagarde M., Calzada C. Caractérisation et implication des lipoprotéines de faible densité (LDL) de diabétiques de type 2 dans l'hyperactivation des plaquettes sanguines humaines. *5^{ème} congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (NSFA)*. 12-14 juin 2008, Biarritz, FRANCE.

► Calzada C., **Colas R.**, Ponsin G., Véricel E., Moulin P. and Lagarde M. Activation des plaquettes sanguines humaines par des lipoprotéines de faible densité glycoxydées in vitro et isolées de diabétiques de type 2. *34^{ème} édition de la Société de la Langue Française pour l'Etude du Diabète et des Maladies métaboliques (ALFEDIAM)*. 25-28 mars 2008, Bruxelles, BELGIQUE.

► Calzada C., **Colas R.**, Ellis S., Ponsin G., Véricel E., Moulin P. and Lagarde M. Relationship between fatty acid composition of low density lipoproteins and platelet activation in type-2 diabetes. *48th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL)*. 4-8 September 2007, Turku, FINLAND.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
AVANT-PROPOS	5
SOMMAIRE	9
ABREVIATIONS	13
RESUME	15
SUMMARY	16
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	17
I. Liste des tableaux :	17
II. Liste des figures :	17
INTRODUCTION	19
BIBLIOGRAPHIE	22
LE SYNDROME METABOLIQUE	23
I. Définitions :	23
II. Prévalence :	24
III. Implication des différents facteurs de risques dans le syndrome métabolique :	25
III.1. Obésité abdominale et conséquences inflammatoires :	25
III.2. Résistance à l'insuline :	26
III.3. Intolérance au glucose :	27
III.4. Dyslipidémie :	28
III.5. Hypertension :	28
IV. Conséquences sur les maladies cardiovasculaires et le diabète de type-2 :	29
LE DIABETE	31
I. Définition :	31
I.1. Diabète de type-1 :	31
I.2. Diabète de type-2 :	32
II. Mécanismes de la toxicité du glucose :	32
II.1. Auto-oxydation du glucose :	33
II.2. Glycation et produits avancés de glycation :	34
II.3. Protéine kinase C :	36
II.4. Voie des polyols :	37
II.5. Voie des hexosamines :	38
III. Conséquences vasculaires :	39
LE STRESS OXYDANT	40
I. Définition :	40
II. Les espèces réactives oxygénées initiant la peroxydation lipidique non enzymatique :	41

III. La peroxydation lipidique :	42
III.1. Mécanisme :	42
III.1.a. Initiation :	42
III.1.b. Propagation :	42
III.1.c. Terminaison :	43
III.2. Exemples de produits formés :	43
IV. Défenses antioxydantes :	45
IV.1. Antioxydants enzymatiques :	45
IV.2. Antioxydants non enzymatiques :	47
IV.2.a. Antioxydants liposolubles :	47
IV.2.b. Antioxydants hydrosolubles :	48
V. Stress oxydant et maladies métaboliques :	50
LES PLAQUETTES SANGUINES	54
I. Origine et structure :	54
I.1. Membranes :	54
I.2. Cytosquelette :	55
I.3. Cytoplasme :	55
II. Physiologie :	55
II.1. Adhésion :	55
II.2. Activation :	57
II.2.a. Récepteurs couplés aux protéines G et signalisation :	58
II.2.b. Changement de forme :	59
II.2.c. La cascade de l'acide arachidonique :	59
II.2.d. Synthèse de protéines :	65
II.2.e. Sécrétion plaquettaire :	65
II.2.f. Activité procoagulante des plaquettes :	66
II.3. Agrégation :	66
III. Plaquettes et stress oxydant :	68
IV. Plaquettes et maladies métaboliques :	69
LES LIPOPROTEINES	71
I. Métabolisme général des lipoprotéines :	71
II. Les LDL :	74
II.1. Composition :	74
II.2. Glycation et stress oxydant dans les LDL :	77
II.2.a. Glycation :	77
II.2.b. Stress oxydant :	78
II.3. Modification des LDL dans le syndrome métabolique et le diabète :	79
II.3.a. Syndrome métabolique :	79
II.3.b. Diabète de type-1 et de type-2 :	80
II.4. LDL et plaquettes :	80
II.4.a. LDL natives et plaquettes :	81
II.4.b. LDL oxydées et plaquettes :	83
II.4.c. Oxydation des LDL par les plaquettes activées :	85
OJECTIFS DE LA THESE	87
MATERIEL ET METHODES	88
MATERIELS	89
I. Réactifs :	89
II. Appareils :	89
METHODES	91
METHODES RELATIVES AUX LDL ET PLASMA	91
I. Isolement des LDL :	91

I.1. Ultracentrifugation séquentielle à temps courts :	92
I.2. FPLC :	92
II. Dosage des protéines :	94
III. Dosage du cholestérol total :	94
IV. Dosage des triacylglycérols :	95
V. Composition en acides gras des classes lipidiques :	96
V.1. Extraction lipidique :	96
V.2. Séparation des classes lipidiques par chromatographie sur couche mince :	96
V.3. Transméthylation des acides gras des classes lipidiques :	97
V.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse :	97
VI. Quantification des lysophosphatidylcholines, des sphingomyélines et du cholestérol non estérifié par HPLC couplée à un DDL :	99
VII. Quantification des acides gras monohydroxylés totaux :	100
VII.1. Extraction lipidique :	100
VII.2. Extraction des acides gras monohydroxylés totaux :	101
VII.3. Analyse par HPLC couplée à un détecteur UV :	101
VIII. Quantification de la 8- <i>iso</i> -prostaglandine F _{2a} totale :	102
VIII.1. Extraction lipidique :	102
VIII.2. Purification et dérivation de la 8- <i>iso</i> -prostaglandine F _{2a} :	102
VIII.3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse équipé d'une trappe d'ions :	103
IX. Dosage du dialdéhyde malonique :	105
IX.1. Dérivation et extraction :	105
IX.2. Analyse par HPLC couplée à un détecteur fluorimétrique :	105
X. Dosage de la vitamine E :	106
X.1. Extraction :	106
X.2. Analyse par HPLC couplée à un détecteur fluorimétrique :	107
XI. Dosage immuno-enzymatique de l'insuline :	107
XII. Détermination de la taille des LDL :	108
METHODES RELATIVES AUX PLAQUETTES	110
I. Isolement et numération des plaquettes :	110
I.1. Isolement des plaquettes :	110
I.2. Numération des plaquettes :	110
II. Dosage des protéines :	110
III. Mesure de l'agrégation plaquettaire :	111
IV. Interactions des LDL avec les plaquettes :	111
IV.1. Conditions d'incubation :	111
IV.2. Conditions de lyse plaquettaire :	112
V. Analyse par immuno-empreinte de l'état de phosphorylation de la p38 MAPK et de la phospholipase A ₂ cytosolique :	112
V.1. Electrophorèse :	112
V.2. Electro-transfert :	113
V.3. Traitements des membranes de nitrocellulose :	113
V.4. Révélation :	113
VI. Dosage immuno-enzymatique du thromboxane B ₂ :	114
PROTOCOLE CLINIQUE ECLIPSE	116
ANALYSES STATISTIQUES	118
RESULTATS ET DISCUSSION	119
COMPARAISON DE DEUX METHODES DE SEPARATION DES LDL	120
I. Composition lipidique des LDL :	120
I.1. Classes lipidiques des LDL :	120
I.2. Composition en acides gras des classes lipidiques :	121
I.2.a. Esters de cholestérol :	121

I.2.b. Triacylglycérols :.....	122
I.2.c. Phosphatidylcholines :.....	123
I.2.d. Phosphatidyléthanolamines :	124
I.2.e. Sphingomyélines :.....	125
II. Paramètres du stress oxydant :	126
II.1. Acides gras monohydroxylés :.....	126
II.2. 8- <i>iso</i> -prostaglandine F _{2α} :.....	127
II.3. Dialdéhyde malonique :	127
II.4. Vitamine E :	128
III. Discussion :.....	128
ETUDE DE LA CARACTERISATION DES LDL ET DE LEUR IMPLICATION DANS L'ACTIVATION PLAQUETTAIRE VIA UN STRESS OXYDANT ET/OU UN ECHANGE LIPIDIQUE (ECLIPSE).....	
I. Paramètres cliniques et traitements en cours :	131
II. Composition lipidique des LDL :	134
II.1. Principales classes lipidiques :.....	134
II.2. Composition en acides gras des classes lipidiques des LDL :	135
II.2.a. Esters de cholestérol :.....	135
II.2.b. Triacylglycérols :	136
II.2.c. Phosphatidylcholines :.....	136
II.2.d. Phosphatidyléthanolamines :.....	137
II.2.e. Sphingomyélines :	138
II.3. Taille des particules de LDL :	143
III. Paramètres du stress oxydant :.....	144
III.1. Acides gras monohydroxylés totaux :.....	144
III.2. Dialdéhyde malonique :.....	145
III.3. Vitamine E :.....	146
IV. Effet des LDL sur les plaquettes :.....	147
IV.1. Effet des LDL sur la p38 MAPK plaquettaire :.....	147
IV.2. Effet des LDL sur la cPLA ₂ plaquettaire :.....	148
IV.3. Effet des LDL sur la production basale de TxB ₂ plaquettaire :	149
IV.4. Effet des LDL sur l'agrégation plaquettaire :	150
V. Corrélations :.....	151
VI. Discussion :.....	153
VI.1. Caractérisation des LDL :	153
VI.2. Effet des LDL sur les plaquettes :.....	157
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	160
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	165

ABREVIATIONS

AA	Acide arachidonique
ADP	Adénosine diphosphate
AG	Acide gras
AGE	« Advanced Glycation End-products »
AGOH	Acide gras monohydroxylé
AGL	Acide gras libre
AGPI	Acide gras polyinsaturé
Apo	Apolipoprotéine
ATP	Adénosine triphosphate
BHT	Butyl-Hydroxy-Toluène
BSA	« Bovine Serum Albumin » (albumine bovine sérique)
CRP	« C-Reactive Protein »
DAG	Diacylglycérol
DDL	Détecteur à Diffusion de Lumière
DMA	Diméthylacétal
EC	Esters de Cholestérol
EDTA	« Ethylenediamine tetraacetic acid »
ERO	Espèces Réactives oxygénées
FADH ₂ /FAD	Flavine Adénine Dinucléotide réduit/oxydé
FPLC	« Fast performance Liquid Chromatography »
GC	« Gas Chromatography » (Chromatographie en phase gazeuse)
GC/MS	« Gas Chromatography-Mass Spectrometry » (Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse)
GLUT	« Glucose Transporter » (transporteur de glucose)
GPx	Glutathion Peroxydase
GSH/GSSG	Glutathion réduit/oxydé
HbA1c	Hémoglobine glyquée
4-HNE	4-hydroxy-nonéal
HDL	« High Density Lipoproteins » (lipoprotéines de haute densité)
HETE	Acide hydroxy-eicosatétraénoïque
HODE	Acide hydroxy-octadécadiénoïque
HpETE	Acide hydroperoxy- eicosatétraénoïque
HPLC	« High Performance Liquid Chromatography »
IDL	« Intermediary density lipoproteins » (lipoprotéines de densité intermédiaire)
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporel
IRS	« Insulin Receptor Substrate »
8-iso-PGF _{2α}	8- <i>iso</i> -prostaglandine F _{2α}
LDL	« Low Density Lipoproteins » (lipoprotéines de basse densité)
LOX-1	« Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 »
LOXs	Lipoxygénase
LPA	« Lysophosphatidic acid »
LPC	Lysophosphatidylcholine

MAPK	« Mitogen Activated Protein Kinase »
MDA	« Malondialdehyde » (dialdéhyde malonique)
NADH,H ⁺ /NAD ⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit/oxydé
NO	Monoxyde d'azote
PBS	« Phosphate Buffer Saline »
PA	Pression artérielle
PAF	« Platelet Activating Factor »
PAI-I	« Plasminogen Activator Inhibitor-I »
PC	Phosphatidylcholine
PDGF	« Platelet Derived Growth Factor »
PE	Phosphatidyléthanolamine
PECAM-1	« Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 »
PKC	Protéine kinase C
PF4	Facteur Plaquettaire 4
PG	Prostaglandine
PGHS	Prostaglandine H synthase
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipides
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PS	Phosphatidylsérine
RAGE	Récepteur aux AGE
RL	Radical libre
sdLDL	« small and dense LDL » (LDL petites et denses)
SM	Sphingomyéline
SOD	Superoxyde dismutase
SR	« Scavenger Receptor » (récepteur éboueur)
TBA	« Thiobarbituric acid »
TBARS	« Thiobarbituric Acid Reactive Species»
TBS	« Tris Buffer Saline »
TBS-T	« Tris Buffer Saline-Tween »
TG	Triacylglycérol
TGF-β	« Transforming growth factor-β »
TNF-α	« Tumor Necrosis Factor-α »
Tx	Thromboxane
VLDL	« Very Low Density Lipoproteins » (lipoprotéines de très basse densité)
vWF	« von Willebrand Factor » (facteur von Willebrand)

RESUME

Le diabète de type-2 et le syndrome métabolique sont associés à une augmentation du stress oxydant et du risque cardiovasculaire. L'hyperactivation plaquettaire et les dyslipoprotéïnémies sont deux causes majeures de l'athéromatose. Nous avons montré que des lipoprotéines de basse densité (LDL) issues du plasma de diabétiques de type-2 activent les plaquettes sanguines. L'objectif principal de notre étude a été d'établir le profil en lipides et peroxydes lipidiques de LDL provenant de volontaires ayant un syndrome métabolique (SM), un diabète de type-1 (DT-1) ou de type-2 (DT-2), comparativement à celui de volontaires sains (V). Un autre objectif a été de déterminer leur impact sur l'activation plaquettaire. Seules les LDL des groupes SM et DT-2 ont des anomalies lipidiques telles que : augmentation des triacylglycérols, diminution des esters de cholestérol et de l'acide linoléique. Les LDL des groupes SM, DT-1 et DT-2 présentent un stress oxydant, démontré par l'augmentation des produits de peroxydation lipidique comme les acides gras hydroxylés et le dialdéhyde malonique, ainsi que par la diminution des plasmalogènes (sous-classe de phospholipides à éthanolamine). Comparativement aux plaquettes incubées avec les LDL de V, les plaquettes incubées avec les LDL des autres groupes sont activées comme le montre une exacerbation de la cascade de l'acide arachidonique (p38 MAPK, phospholipase A₂ cytosolique, thromboxane A₂). Ainsi, dans les états pré-diabétique et diabétique de type-2, les LDL subissent des modifications lipidiques et oxydatives, puis activent les plaquettes. Nos résultats suggèrent que les peroxydes lipidiques des LDL induisent l'hyperactivation plaquettaire.

Mots-clés :

LDL, plaquettes sanguines, acides gras hydroxylés, diabète de type-2, syndrome métabolique, athéromatose, stress oxydant, peroxydation lipidique, p38 MAPK, thromboxane A₂.

SUMMARY

Type-2 diabetes and metabolic syndrome are associated with increased oxidative stress and cardiovascular risk. Platelet hyperactivation and dyslipoproteinemia are two major factors favoring atherothrombosis. We have shown that low-density lipoproteins (LDL) from type-2 diabetic patients activate platelets from healthy volunteers. The primary objective of our study was to establish the lipid and lipid peroxide profile of LDL isolated from plasma of volunteers with a metabolic syndrome (SM), of type-1 (DT-1) or type-2 (DT-2) diabetic patients compared to LDL from healthy volunteers (V). The second objective was to explore their role in platelet activation. Only LDL from MS and DT-2 groups have lipid abnormalities (increased triacylglycerols and decreased cholesteryl esters, decreased linoleic acid). LDL from SM, DT-1 and DT-2 groups show oxidative stress as assessed by increased lipid peroxide derivatives (hydroxylated fatty acids, malondialdehyde) and decreased plasmalogens. Compared to platelets incubated with LDL from the V group, platelets incubated with LDL from other groups are activated as shown by the enhancement of the arachidonic acid signalling cascade (p38 MAPK, cytosolic phospholipase A₂, thromboxane B₂). Thus, in a pre-diabetic state and in type-2 diabetes, LDL undergo lipid and oxidative modifications and activate platelets. Our results show that lipid peroxides in LDL could be the common denominator underlying platelet hyperactivation.

Keywords :

LDL, blood platelets, hydroxylated fatty acids, type-2 diabetes, metabolic syndrome, atherothrombosis, oxidative stress, lipid peroxidation, p38 MAPK, thromboxane A₂.

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

I. Liste des tableaux :

TABLEAU 1 : PRINCIPALES DEFINITIONS DU SYNDROME METABOLIQUE.	24
TABLEAU 2 : PRINCIPALES ESPECES REACTIVES OXYGENEES RADICALAIRES ET NON-RADICALAIRES.	40
TABLEAU 3 : FORMULES ET CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DES PRINCIPAUX ANTIOXYDANTS.	50
TABLEAU 4 : CARACTERISTIQUES PHYSIQUES ET BIOCHIMIQUES DES LIPOPROTEINES DU PLASMA HUMAIN.	71
TABLEAU 5 : CLASSIFICATION ET NOMENCLATURE DES ACIDES GRAS DES LDL.	76
TABLEAU 6 : CONCENTRATIONS DES SOUS-CLASSES DE LDL CHEZ DES PATIENTS INSULINO-SENSIBLES, INSULINO-RESISTANTS ET DIABETIQUES DE TYPE-2 DETERMINEES PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE.	80
TABLEAU 7 : CRITERES D'INCLUSION DES VOLONTAIRES DU PROTOCOLE ECLIPSE.	117
TABLEAU 8 : CLASSES LIPIDIQUES DANS LES LDL ISOLEES PAR ULTRACENTRIFUGATION OU PAR FPLC.	121
TABLEAU 9 : COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES ESTERS DE CHOLESTEROL DES LDL ISOLEES PAR ULTRACENTRIFUGATION OU PAR FPLC.	122
TABLEAU 10 : COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES TRIACYLGLYCEROLS DES LDL ISOLEES PAR ULTRACENTRIFUGATION OU PAR FPLC.	123
TABLEAU 11 : COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES PHOSPHATIDYLCHOLINES DES LDL ISOLEES PAR ULTRACENTRIFUGATION OU PAR FPLC.	124
TABLEAU 12 : COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES PHOSPHATIDYLETHANOLAMINES DES LDL ISOLEES PAR ULTRACENTRIFUGATION OU PAR FPLC.	125
TABLEAU 13 : COMPOSITION EN AG DES SPHINGOMYELINES DES LDL ISOLEES PAR ULTRACENTRIFUGATION OU PAR FPLC.	126
TABLEAU 14 : CONCENTRATIONS DES ACIDES GRAS MONOHYDROXYLES TOTAUX ET RATIO ACIDES GRAS MONOHYDROXYLES / ACIDE GRAS PARENT DANS LES LDL ISOLEES PAR ULTRACENTRIFUGATION OU PAR FPLC.	127
TABLEAU 15 : PARAMETRES CLINIQUES DES VOLONTAIRES ECLIPSE.	133
TABLEAU 16 : LISTE DES TRAITEMENTS EN COURS DES VOLONTAIRES ECLIPSE.	134
TABLEAU 17 : PRINCIPALES CLASSES LIPIDIQUES DES LDL DES VOLONTAIRES ECLIPSE.	135
TABLEAU 18 : COMPOSITION EN PRINCIPAUX ACIDES GRAS DES ESTERS DE CHOLESTEROL DES LDL DES VOLONTAIRES ECLIPSE.	139
TABLEAU 19 : COMPOSITION EN PRINCIPAUX ACIDES GRAS DES TRIACYLGLYCEROLS DES LDL DES VOLONTAIRES ECLIPSE.	140
TABLEAU 20 : COMPOSITION EN PRINCIPAUX ACIDES GRAS DES PHOSPHATIDYLCHOLINES DES LDL DES VOLONTAIRES ECLIPSE.	141
TABLEAU 21 : COMPOSITION EN PRINCIPAUX ACIDES GRAS DES PHOSPHATIDYLETHANOLAMINES DES LDL DES VOLONTAIRES ECLIPSE.	142
TABLEAU 22 : COMPOSITION EN PRINCIPAUX ACIDES GRAS DES SPHINGOMYELINES DES LDL DES VOLONTAIRES ECLIPSE.	143
TABLEAU 23 : CONCENTRATIONS DES DIFFERENTS ISOMERES DE VITAMINE E DANS LES LDL DES VOLONTAIRES ECLIPSE.	147

II. Liste des figures :

FIGURE 1 : PREVALENCE DU SYNDROME METABOLIQUE DANS DIFFERENTS PAYS SELON LES CRITERES DEFINIS PAR L'ATP III.	25
FIGURE 2 : ROLE DES AGL CIRCULANTS DANS LES DIFFERENTES COMPOSANTES DU SYNDROME METABOLIQUE.	29
FIGURE 3 : PREVALENCE GLOBALE DU DIABETE PAR AGE ET PAR SEXE EN 2000 ET NOMBRE ESTIME D'ADULTES QUI AURONT LE DIABETE DANS LE MONDE EN 2030 PAR GROUPE D'AGE.	31
FIGURE 4 : DE LA RESISTANCE A L'INSULINE AU DIABETE DE TYPE-2.	32
FIGURE 5 : PRODUCTION D'ANION SUPEROXYDE PAR LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE DANS DES CONDITIONS HYPERGLYCEMIQUES.	34

FIGURE 6 : REACTION DE MAILLARD CONDUISANT A LA FORMATION DES PRODUITS DE GLYCATION AVANCES.	35
FIGURE 7 : MECANISMES DELETERES INDUITS PAR L'AUGMENTATION DES PRECURSEURS D'AGE.	36
FIGURE 8 : CONSEQUENCES DE L'ACTIVATION DE LA PKC PAR L'HYPERGLYCEMIE.	37
FIGURE 9 : VOIE DES POLYOLS EN CONDITIONS D'HYPERGLYCEMIE.	38
FIGURE 10 : VOIE DES HEXOSAMINES EN CONDITIONS D'HYPERGLYCEMIE.	39
FIGURE 11 : EXEMPLE D'ADDITION DE MICHÄEL ENTRE UNE HISTIDINE ET UN ALDEHYDE.	44
FIGURE 12 : MECANISME UNIFICATEUR DE LA RESISTANCE A L'INSULINE, DE L'HYPERGLYCEMIE ET DU STRESS OXYDANT.	53
FIGURE 13 : ADHESION ET ACTIVATION PLAQUETTAIRE LORS D'UNE LESION DE L'ENDOTHELIUM EN CONDITIONS DE FORCES DE CISAILLEMENT ELEVEES.	57
FIGURE 14 : STRUCTURE ET NOMENCLATURE DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE.	59
FIGURE 15 : MECANISMES CONDUISANT A LA LIBERATION DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE DES PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES PAR LA PHOSPHOLIPASE A ₂ CYTOSOLIQUE LORS DE L'ACTIVATION PLAQUETTAIRE.	62
FIGURE 16 : PEROXYDATION ENZYMATIQUE DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE DANS LES PLAQUETTES SANGUINES PAR LA PGHS-1.	64
FIGURE 17 : SCHEMA DES DIFFERENTES VOIES D'ACTIVATION DE GPIIb/IIIa PLAQUETTAIRE.	68
FIGURE 18 : METABOLISME DES LIPOPROTEINES.	73
FIGURE 19 : PRINCIPAUX LIPIDES PRESENTS DANS LES LDL.	75
FIGURE 20 : EVENEMENTS MAJEURS AYANT LIEU DURANT L'OXYDATION DES LDL.	79
FIGURE 21 : DIFFERENTES VOIES D'ACTIVATION DES PLAQUETTES PAR LES LDL NATIVES.	82
FIGURE 22 : ACTIVATION PLAQUETTAIRE PAR LES LDL OXYDEES.	85
FIGURE 23 : SCHEMA RECAPITULATIF DU SYSTEME FPLC.	93
FIGURE 24 : PROFIL DES FRACTIONS DE LIPOPROTEINES SEPARÉES PAR FPLC EN FONCTION DE LEUR CONTENU EN TRIACYLGLYCEROLS ET EN CHOLESTEROL.	93
FIGURE 25 : SCHEMA RECAPITULATIF D'UN APPAREIL DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.	98
FIGURE 26 : PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE APRES SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE DES ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES GRAS DES PHOSPHATIDYLCHOLINES DES LDL.	99
FIGURE 27 : SCHEMA RECAPITULATIF D'UN APPAREIL DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE.	100
FIGURE 28 : SCHEMA RECAPITULATIF DU SYSTEME DE SPECTROMETRIE DE MASSE EQUIPE D'UNE TRAPPE D'IONS. ..	104
FIGURE 29 : SPECTRE DE MASSE DE LA 8-ISO PGF_{2A} APRES SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLE A UN SPECTROMETRE DE MASSE EQUIPE D'UNE TRAPPE D'IONS.	104
FIGURE 30 : PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE APRES SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE DU COMPLEXE MDA-TBA ₂ DES LDL.	106
FIGURE 31 : PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE APRES SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE DES ISOMERES DE LA VITAMINE E DES LDL.	107
FIGURE 32 : SCHEMA RECAPITULATIF DU DOSAGE IMMUNO-ENZYMATIQUE NON-COMPETITIF DE L'INSULINE.	108
FIGURE 33 : SCHEMA DU PRINCIPE DE LA DETECTION PAR CHIMIO-LUMINESCENCE.	114
FIGURE 34 : SCHEMA RECAPITULATIF DU DOSAGE IMMUNO-ENZYMATIQUE COMPETITIF DU TxB_2	115
FIGURE 35 : TAILLE DES LDL DES SUJETS ECLIPSE.	144
FIGURE 36 : CONCENTRATIONS DES ACIDES GRAS MONOHYDROXYLES DES LDL DES VOLONTAIRES ECLIPSE.	145
FIGURE 37 : CONCENTRATION EN DIALDEHYDE MALONIQUE DES LDL DES VOLONTAIRES ECLIPSE.	146
FIGURE 38 : PHOSPHORYLATION DE LA p38 MAPK PLAQUETTAIRE EN ABSENCE OU EN PRESENCE DES LDL DE VOLONTAIRES ECLIPSE.	148
FIGURE 39 : PHOSPHORYLATION DE LA cPLA ₂ PLAQUETTAIRE EN ABSENCE OU EN PRESENCE DES LDL DE VOLONTAIRES ECLIPSE.	149
FIGURE 40 : CONCENTRATION DE TxB_2 PLAQUETTAIRE EN ABSENCE OU EN PRESENCE DES LDL DE VOLONTAIRES ECLIPSE.	150
FIGURE 41 : AGREGATION PLAQUETTAIRE INDUITE PAR LE COLLAGENE EN ABSENCE OU EN PRESENCE DES LDL DE VOLONTAIRES ECLIPSE.	151
FIGURE 42 : CORRELATIONS ENTRE PARAMETRES DU SYNDROME METABOLIQUE ET DU DIABETE DE TYPE-2 ET ETAT D'OXYDATION DES LDL.	152
FIGURE 43 : CORRELATION ENTRE L'ETAT D'OXYDATION DES LDL ET LE THROMBOXANE A ₂ PLAQUETTAIRE.	153

INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité en Europe (Muller-Nordhorn *et al.*, 2008) et dans le monde selon les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). L'athéromatose est à l'origine de la plupart des accidents cardiovasculaires. Elle résulte de l'association de deux phénomènes, l'athérosclérose et la thrombose. La formation de plaques d'athérome dans les artères est principalement due à la constitution progressive de dépôts lipidiques résultant de l'infiltration pariétale des lipoprotéines de basse densité (LDL), suivie de leur oxydation. La formation d'un thrombus, constitué d'agrégats plaquettaires consolidés par un réseau de fibrine, 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. Les risques d'athéromatose sont particulièrement accrus chez les diabétiques et les sujets ayant un syndrome métabolique.

Le diabète (type-1 et type-2) est associé à une hyperglycémie et à un stress oxydant accru. Le syndrome métabolique est un désordre complexe associé à une obésité abdominale, une hyperglycémie, une hypertriglycéridémie, un taux d'HDL-cholestérol bas et/ou une pression artérielle élevée (au moins trois de ces critères sont requis). Il peut évoluer vers un diabète de type-2. Ces deux états sont associés à une hyperagrégabilité des plaquettes sanguines (Vaidya *et al.*, 2009; Véricel *et al.*, 2004).

Bien que l'athéromatose résulte de nombreux facteurs, deux d'entre eux sont primordiaux: les dyslipoprotéïnémies et l'activation plaquettaire, tous deux interagissant dans un contexte de stress oxydant augmenté. Bien que les LDL oxydées jouent un rôle fondamental dans la formation de la plaque d'athérome, elles peuvent être présentes dans la circulation sanguine et contribuer à l'hyperactivation plaquettaire. Il existe des interactions entre lipoprotéines et plaquettes, incluant à la fois des interactions directes et des transferts de lipides (Engelmann *et al.*, 1996; Ibrahim *et al.*, 2009). Une étude au laboratoire a montré que des LDL de diabétiques de type-2 activent des plaquettes de volontaires sains alors que des LDL de volontaires sont sans effet (Calzada *et al.*, 2007). Il n'existe par contre aucune donnée sur l'effet de LDL issues de sujets présentant un syndrome métabolique sur les plaquettes.

L'objectif principal de mon travail de doctorat a été de caractériser le contenu en peroxydes lipidiques et en lipides de LDL provenant de personnes pré-diabétiques ou ayant développé un diabète (types-1 ou 2) et de déterminer le potentiel activateur de ces LDL sur des plaquettes de volontaires sains.

Ce mémoire comporte quatre sections :

- une première partie bibliographique introduisant les notions de syndrome métabolique et de diabète, puis des chapitres sur le stress oxydant et les plaquettes sanguines et enfin un chapitre sur les LDL et leurs interactions avec les plaquettes dans le contexte de ces pathologies.

- une seconde partie décrivant les matériels et méthodes utilisés lors du travail expérimental.

- une troisième partie exposant les résultats et les discussions. Elle comporte d'une part la comparaison entre deux méthodes d'isolement des LDL -l'ultracentrifugation *versus* la « Fast Performance Liquid Chromatography » (FPLC)- et d'autre part les résultats du protocole clinique baptisé ECLIPSE. Ceux-ci comprennent la caractérisation en lipides et peroxydes lipidiques de LDL isolées du plasma de volontaires sains ou ayant un syndrome métabolique ou de patients diabétiques de type-1 ou 2 ainsi que les effets de ces LDL sur des plaquettes de volontaires sains.

- une quatrième et dernière partie conclusive et ouvrant sur plusieurs perspectives.

BIBLIOGRAPHIE

LE SYNDROME METABOLIQUE

I. Définitions :

Le syndrome métabolique est une constellation de facteurs de risques cardiométaboliques décrit pour la première fois il y a 90 ans (Kylin, 1923). En 1988 apparaît la notion de syndrome X (Reaven, 1988). Il inclut l'obésité abdominale, la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose (ou l'hyperglycémie), l'hypertension et la dyslipidémie. L'association de ces facteurs de risque est liée à une augmentation du risque de développer un diabète de type-2 et des maladies cardiovasculaires. Afin de faciliter son diagnostic, plusieurs groupes d'études ont établi des critères pour le définir (*Tableau 1*).

Groupe d'étude	Définition
Organisation Mondiale de la Santé (Alberti and Zimmet, 1998)	- Diabète de type-2 ou tolérance au glucose diminuée ou glycémie circulante modifiée ou résistance à l'insuline + 2 ou plus des 4 anormalités suivantes : - Obésité : IMC > 30 ou ratio taille/hanche > 0,9 (H) / 0,85 (F) - Dyslipidémie : TG ≥ 1,7 mM ou HDLc < 0,9 mM (H) / 1,0 mM (F) - Hypertension : PA ≥ 160/90 mm Hg - Microalbuminurie : taux excrétion d'albumine > 20 mcg/min
« National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel (ATP) III » (2001)*	3 ou plus des 5 anormalités suivantes : - Obésité abdominale : tour de taille ≥ 102 cm (H) / 88 cm (F) - Hypertriglycéridémie : TG ≥ 1,7 mM - Faible HDLc : HDLc < 1 mM (H) / 1,3 mM (F) - Hypertension : PA ≥ 130/85 mm Hg - Glycémie à jeun : ≥ 6,1 mM
« American Heart Association » (Grundy <i>et al.</i> , 2004)	3 ou plus des 5 anormalités suivantes : - Obésité abdominale : tour de taille ≥ 102 cm (H) / 88 cm (F) - Hypertriglycéridémie : TG ≥ 1,7 mM ou traitement - Faible HDLc : HDLc < 1 mM (H) / 1,3 mM (F) ou traitement - Hypertension : PA ≥ 130/85 mm Hg ou traitement - Glycémie à jeun : ≥ 5,6 mM ou traitement
Fédération Internationale du Diabète (Alberti <i>et al.</i> , 2005)	Obésité abdominale : tour de taille ≥ 94 cm (H) / 80 cm (F) (avec spécificités ethniques) + 2 ou plus des 4 anormalités suivantes : - Hypertriglycéridémie : TG ≥ 1,7 mM ou traitement - Faible HDLc : HDLc < 1 mM (H) / 1,3 mM (F) ou traitement - Hypertension : PA ≥ 130/85 mm Hg ou traitement - Glycémie à jeun : ≥ 5,6 mM ou diabète de type-2
Définition unifiée (Eckel <i>et al.</i> , 2010)	3 ou plus des 5 anormalités suivantes : - Obésité abdominale : dépendante des populations et des pays - Hypertriglycéridémie : TG ≥ 1,7 mM ou traitement - Faible HDLc : HDLc < 1 mM (H) / 1,3 mM (F) ou traitement - Hypertension : PA ≥ 130/85 mm Hg ou traitement - Glycémie à jeun : ≥ 5,5 mM ou traitement

Tableau 1 : Principales définitions du syndrome métabolique.

*, Etude réalisée par un comité d'experts. F, femme H, homme; HDLc, cholestérol des lipoprotéines de haute densité; IMC, indice de masse corporel; PA, pression artérielle; TG, triacylglycérol.

II. Prévalence :

La prévalence du syndrome métabolique est en augmentation dans les sociétés occidentales. Cependant, la comparaison entre les études de prévalence est difficile aux vues des différents critères du syndrome métabolique retenus pour chacune. Elle varie en fonction de l'âge, du sexe, des populations et de l'ethnie (Azizi *et al.*, 2003) (**Figure 1**). Aux Etats-

Unis, une étude a montré que le syndrome métabolique, suivant les critères de diagnostic définis par l'« Adult Treatment Panel » (ATP) III, augmente avec l'indice de masse corporel (IMC). Il est présent à 4,6%, 22,4% et 59,6% chez des hommes de poids respectivement normal, en surpoids et obèses (Park *et al.*, 2003). La prévalence atteint 80% pour des individus nordiques (Suède et Finlande) atteints de diabète de type-2 (Isomaa *et al.*, 2001).

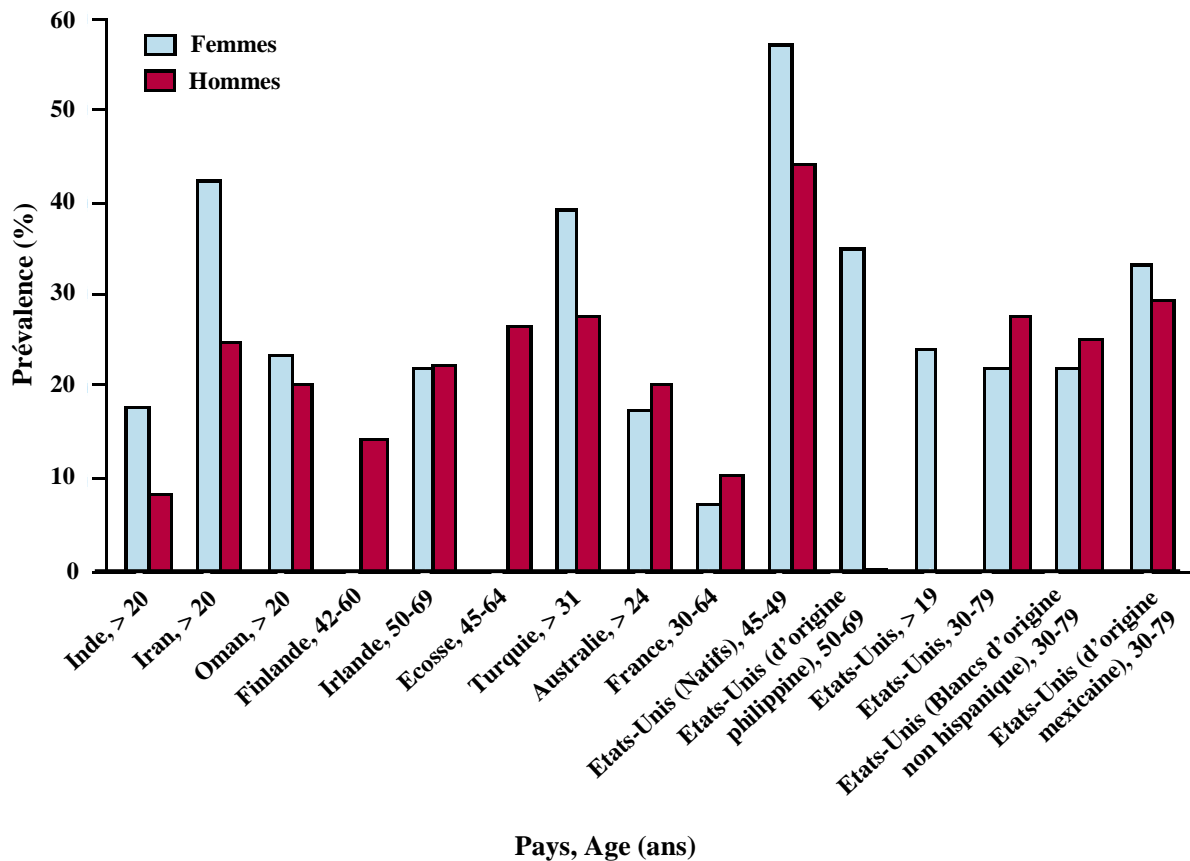


Figure 1 : Prévalence du syndrome métabolique dans différents pays selon les critères définis par l'ATP III.

Traduit de Cameron (Cameron *et al.*, 2004).

III. Implication des différents facteurs de risques dans le syndrome métabolique :

III.1. Obésité abdominale et conséquences inflammatoires :

Des données indiquent que le syndrome métabolique est précédé par un excès de tissu adipeux viscéral (Cameron *et al.*, 2008). C'est un paramètre clinique très intimement lié au syndrome métabolique (2002; Carr *et al.*, 2004), lui-même associé à un état pro-inflammatoire (Sutherland *et al.*, 2004). Une balance énergétique positive conduit au stockage

de l'excès d'énergie dans les adipocytes qui montrent alors une hypertrophie et une hyperplasie. Le tissu adipeux étant un organe endocrine, son expansion induit une sécrétion accrue de médiateurs pro-inflammatoires et pro-athérogéniques comme la leptine, la résistine, le « Tumor Necrosis Factor α » (TNF α), l'interleukine (IL) -6, la « C-Reactive Protein » (CRP) et le « Plasminogen Activator Inhibitor-I » (PAI-I) ainsi qu'une sécrétion diminuée d'adiponectine (Trayhurn and Wood, 2004; Wassink *et al.*, 2007). De plus, des anomalies fonctionnelles des adipocytes apparaissent, notamment un stress du réticulum endoplasmique et des mitochondries, conduisant au développement d'une insulino-résistance (de Ferranti and Mozaffarian, 2008). L'inflammation contribue elle aussi à ce phénomène puisque des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires conduisent à la résistance à l'insuline (Saltiel and Kahn, 2001). L'IL-6 est associée à une inhibition de la signalisation de l'insuline dans des myotubes humains (Rieusset *et al.*, 2004).

III.2. Résistance à l'insuline :

L'insuline est une hormone hypoglycémisante produite sous forme d'un précurseur, la pro-insuline, par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. L'insuline mature est composée de deux chaînes polypeptidiques (la chaîne A de 21 acides aminés et la chaîne B de 30 acides aminés) reliées par deux ponts disulfures. Sa sécrétion est principalement contrôlée par la concentration en glucose plasmatique. Elle joue un rôle dans un ensemble de mécanismes métaboliques. Sa fonction principale est le contrôle de la capture et de l'utilisation du glucose dans les tissus périphériques par l'intermédiaire de transporteurs passifs de glucose (GLUT) (Zhao and Keating, 2007). Cet effet hypoglycémiant est facilité par sa capacité à inhiber la néoglucogenèse et la glycogénolyse tout en stimulant la glycogénèse hépatique. Ces effets sont neutralisés par des hormones hyperglycémisantes s'opposant à l'insuline comme le glucagon (produit par les cellules α des îlots de Langerhans du pancréas). Elle possède également un effet anti-lipolytique au niveau des adipocytes (Manganiello *et al.*, 1991). Lorsqu'un défaut d'action de l'insuline apparaît, il en résulte une hyperinsulinémie à jeun pour maintenir l'euglycémie.

La résistance à l'insuline est en partie due à des facteurs innés génétiques (Bogardus *et al.*, 1989) et à des facteurs acquis avec le style de vie occidental comme par exemple le manque d'activité physique et la sédentarité. En effet, il est connu que l'activité physique augmente la sensibilité à l'insuline (Perseghin *et al.*, 1996). L'obésité favorise la résistance à

l'insuline. Les acides gras libres (AGL) sont libérés en abondance dans la circulation sanguine du tissu adipeux élargi et insulino-résistant et leur clairance est diminuée (Bjorntorp *et al.*, 1969) contribuant à augmenter les taux d'AGL circulants chez les obèses. Ces derniers contribuent à la résistance à l'insuline des muscles squelettiques (Boden *et al.*, 1994) tandis que leur diminution l'améliore (Santomauro *et al.*, 1999). Les AGL favorisent la résistance à l'insuline du foie en inhibant l'action anti-glycogénolytique de l'insuline, contribuant à augmenter la production hépatique de glucose (Boden *et al.*, 2002). Ils contribuent à l'accumulation intracellulaire de lipides, associée à la résistance à l'insuline des muscles squelettiques et au dysfonctionnement des cellules β (Schaffer, 2003). En effet, les AGL pénètrent facilement dans la cellule et leur accumulation contribue à une augmentation de leur ré-estérification en TG mais aussi à une augmentation des diacylglycérols (DAG) produits. Ces derniers activent la protéine kinase C (PKC) qui diminue la phosphorylation des « Insulin Receptor Substrate » (IRS-1/2), diminuant ainsi la capture de glucose (Boden, 2008) (**Figure 2**). Enfin, les AGL diminuent la transcription des gènes codant pour GLUT4 et diminuent la stabilité de leur ARNm (Armoni *et al.*, 2005; Long and Pekala, 1996).

Cependant, il est important de souligner que l'augmentation des AGL induit paradoxalement une sécrétion compensatoire d'insuline ainsi qu'une diminution de sa clairance afin de maintenir l'euglycémie. Seuls les individus dont la compensation est insuffisante deviennent hyperglycémiques, expliquant ainsi pourquoi seulement 50% des obèses insulino-résistants développent un diabète de type-2 (Boden, 2005).

III.3. Intolérance au glucose :

Les défauts d'action de l'insuline dans le métabolisme du glucose entraînent des déficiences de la capacité de l'hormone d'une part à supprimer la production hépatique et rénale de glucose, et d'autre part à induire la capture et l'utilisation du glucose dans les tissus insulino-sensibles. La relation entre insulino-résistance et intolérance au glucose est bien connue : afin de compenser ses défauts d'action, l'organisme est capable de modifier la sécrétion et/ou la clairance de l'insuline (Byrne *et al.*, 1995) pour maintenir une glycémie normale. Lorsque la sécrétion d'insuline commence à diminuer et devient insuffisante pour maintenir l'euglycémie, l'organisme devient intolérant au glucose et des phases d'hyperglycémie apparaissent, notamment en périodes post-prandiales (**Figure 4**, page 32).

III.4. Dyslipidémie :

Dans des conditions de résistance à l'insuline, le flux d'AGL allant du tissu adipeux vers le foie augmente et favorise la synthèse hépatique de triacylglycérols (TG). Il en résulte des modifications du métabolisme des lipoprotéines. On constate alors une augmentation de la production des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) larges, riches en TG (**Figure 2**) et promptes à former des LDL petites et denses (sdLDL) appauvries en esters de cholestérol (EC) et enrichies en TG, ainsi qu'une diminution des lipoprotéines de haute densité (HDL). Le catabolisme des lipoprotéines à apolipoprotéines (apo) B est diminué alors que celui des HDL à apoA-I est augmenté (Chan *et al.*, 2004).

III.5. Hypertension :

L'hypertension peut être induite par l'état de résistance à l'insuline (Ferrannini *et al.*, 1987) durant lequel l'effet vasodilatateur de l'insuline est perdu (Tooke and Hannemann, 2000). Par contre, les effets de l'insuline sur la réabsorption du sodium (Kuroda *et al.*, 1999) et l'activité du système nerveux sympathique sont maintenus (Egan, 2003).

Les AGL peuvent également induire une relative vasoconstriction (Tripathy *et al.*, 2003). En effet, au niveau des cellules endothéliales, la perfusion d'insuline augmente la production de monoxyde d'azote (NO) (vasodilatateur) mais l'élévation d'AGL empêche cette augmentation (Baron, 2002) en activant la PKC et la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NAD(P)H oxydase) et en inhibant IRS-1/2 (Boden, 2008) (**Figure 2**).

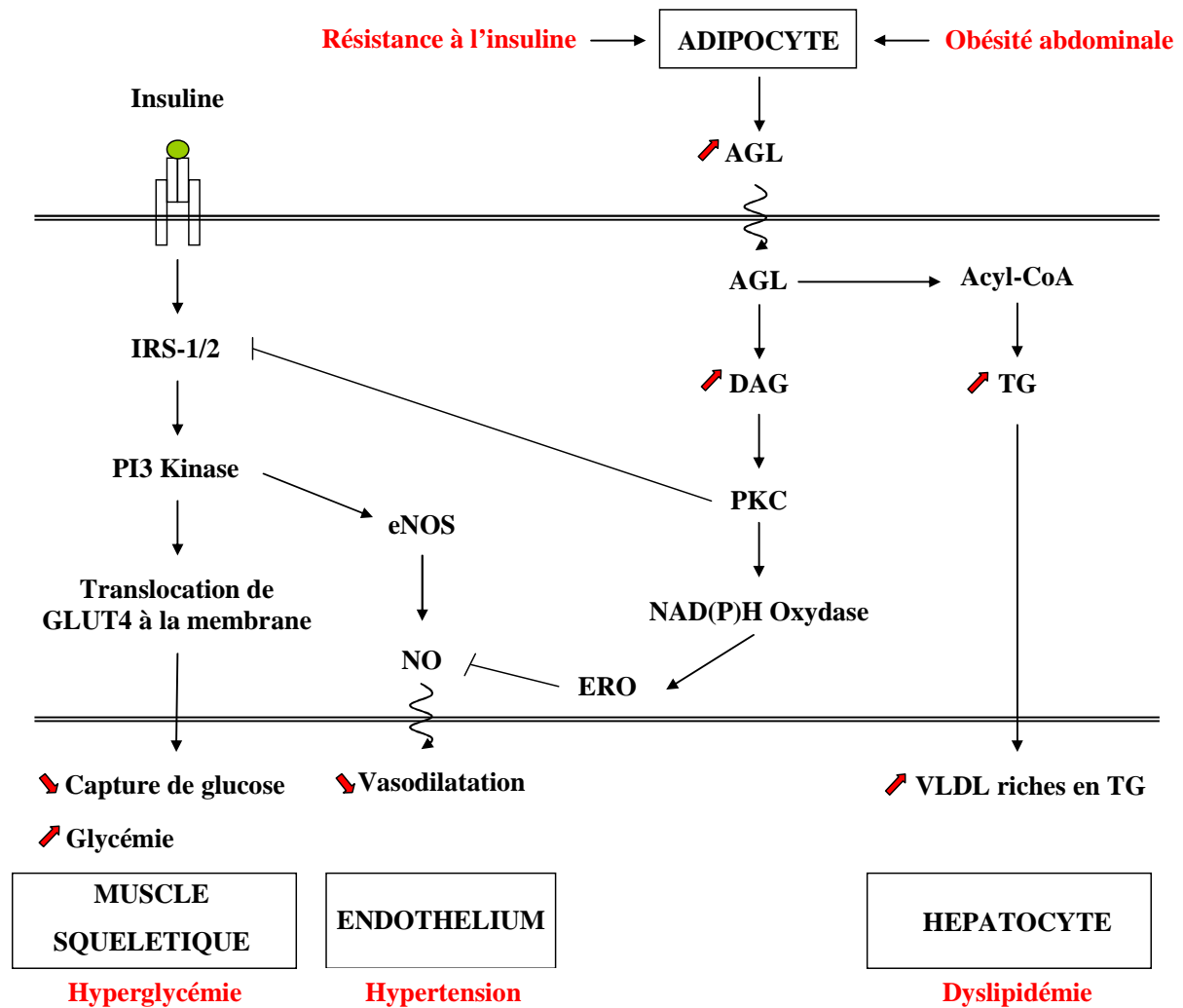


Figure 2 : Rôle des AGL circulants dans les différentes composantes du syndrome métabolique.

Modifié à partir de Boden (Boden, 2008). AGL, acide gras libre; DAG, diacylglycérol; eNOS, « Endothéliale Nitric oxide Synthase »; ERO, espèces réactives oxygénées; GLUT4, « Glucose Transporter type-4 »; IRS-1/2, « Insulin Receptor Substrate-1/2 »; NAD(P)H oxydase, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase; NO, monoxyde d'azote; PKC, protéine kinase C; PI3 Kinase, phosphatidyl inositol 3 kinase; TG, triacylglycérol; VLDL, lipoprotéine de très basse densité.

IV. Conséquences sur les maladies cardiovasculaires et le diabète de type-2 :

Plusieurs méta-analyses montrent que le syndrome métabolique est associé à une augmentation des événements cardiovasculaires (Ford, 2005; Gami *et al.*, 2007) et qu'il entraîne des risques accrus de développer des maladies cardiovasculaires mais aussi un diabète (Grundy *et al.*, 2004). Une étude montre que des hommes d'âge moyen avec un syndrome métabolique ont 4 fois plus de risque de mourir que des hommes sains (Lakka *et*

al., 2002), une autre que des hommes ayant 4 ou 5 composantes du syndrome métabolique ont 4 fois plus de risque de développer des maladies coronariennes et 24 fois plus de risque de faire un diabète (Sattar *et al.*, 2003). La plupart des patients diabétiques ont présenté une insulino-résistance et un syndrome métabolique avant l'apparition de leur diabète (Reaven, 2005). En effet, une insulino-résistance, une hyperinsulinémie, une dyslipidémie et une obésité précèdent l'apparition du diabète de type-2 dans 75 à 85% des cas (Meigs *et al.*, 2007) et environ la moitié des nouveaux cas de diabètes étaient porteurs du syndrome métabolique (défini selon le NCEP) (Wilson *et al.*, 2005).

LE DIABETE

I. Définition :

Le diabète désigne une maladie qui apparaît lorsque l'organisme ne parvient plus à utiliser ou à stocker convenablement le glucose. Il peut provenir d'une incapacité, partielle ou totale, du pancréas à fabriquer l'insuline (type-1) et/ou d'une inaptitude des cellules des tissus périphériques à utiliser l'insuline pour absorber le glucose (type-2). Dans les deux cas, les cellules sont privées de leur principale source d'énergie, le glucose, qui s'accumule dans le sang provoquant une hyperglycémie.

Le nombre de personnes développant un diabète augmente en raison de l'augmentation de la population, du vieillissement, de l'urbanisation et de la prévalence de l'obésité et de l'inactivité physique. En 2000, la prévalence mondiale (type-1 et type-2 confondus) était de 2,8 % et atteindrait 4,4 % en 2030 (*Figure 3*) (Wild *et al.*, 2004).

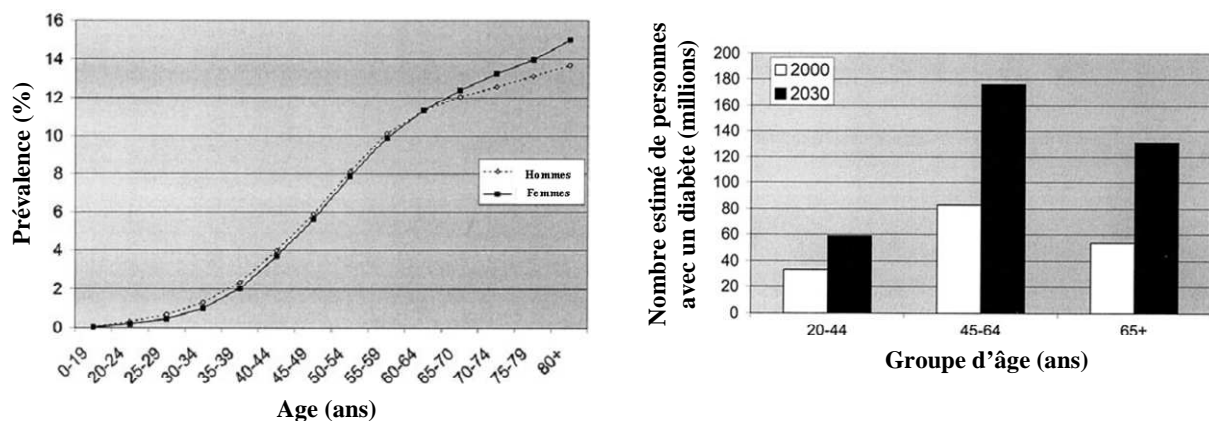


Figure 3 : Prévalence globale du diabète par âge et par sexe en 2000 et nombre estimé d'adultes qui auront le diabète dans le monde en 2030 par groupe d'âge.

Traduit de Wild (Wild *et al.*, 2004).

I.1. Diabète de type-1 :

Le diabète de type-1 ou insulino-dépendant concerne environ 10 % de tous les diabétiques. Il peut se manifester à tout âge, mais apparaît le plus souvent durant l'enfance ou au début de l'âge adulte, d'où son appellation ancienne de « diabète juvénile ». Il peut se développer de manière asymptomatique durant une longue période. Les individus qui en sont

atteints produisent très peu ou pas du tout d'insuline en raison d'une réaction auto-immune qui détruit partiellement ou entièrement les cellules β de leur pancréas.

I.2. Diabète de type-2 :

Le diabète de type-2 ou non insulino-dépendant survient lorsque l'organisme développe une résistance à l'insuline au niveau des tissus périphériques et perd sa capacité à absorber et à métaboliser le glucose. Pour compenser, les cellules β pancréatiques sécrètent davantage d'insuline. Cependant, elles finissent par s'épuiser et en sécrètent de moins en moins jusqu'à ne plus en produire, conduisant à une production excessive de glucose hépatique. La diminution de la sensibilité tissulaire à l'action de l'insuline ou résistance à l'insuline précède souvent le diabète de type-2 de plusieurs années (*Figure 4*).

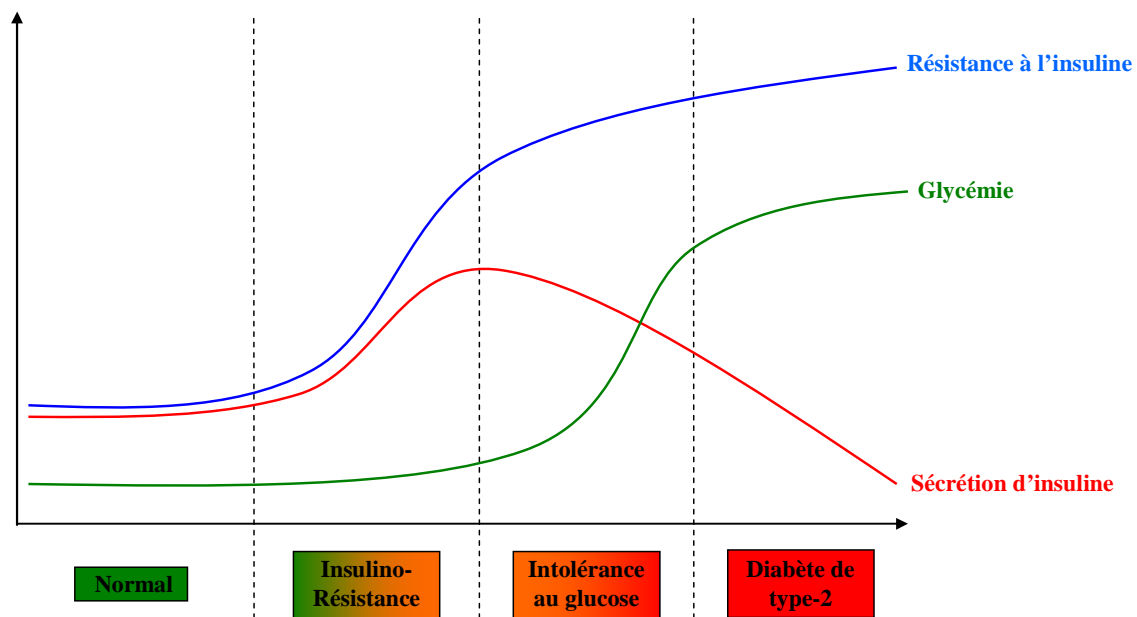


Figure 4 : De la résistance à l'insuline au diabète de type-2.

II. Mécanismes de la toxicité du glucose :

L'hyperglycémie est considérée comme l'élément initiateur des dommages tissulaires diabétiques visant notamment les cellules endothéliales des capillaires de la rétine, les cellules mésangiales des glomérules rénaux, les neurones et les cellules de Schwann des nerfs périphériques. En effet, ces cellules n'étant pas capables de maintenir constantes leurs

concentrations en glucose, en condition d'hyperglycémie, il en résulte une augmentation de sa concentration intracellulaire. Le glucose est capable d'interagir avec les molécules qui l'entourent. Les effets délétères de l'hyperglycémie peuvent être expliqués par plusieurs mécanismes biochimiques dont l'auto-oxydation du glucose, les produits avancés de glycation ou « Advanced Glycation End-products » (AGE), l'activation de la protéine kinase C, la voie des polyols et la voie des hexosamines (Nègre-Salvayre *et al.*, 2009).

II.1. Auto-oxydation du glucose :

La chaîne respiratoire mitochondriale est composée de quatre complexes protéiques nommés I, II, III et IV (*Figure 5*). En conditions normales, lorsque le glucose est métabolisé *via* le cycle des acides tricarboxyliques, il génère des donneurs d'électrons. Le principal est le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH,H⁺), donnant des électrons au complexe I, et l'autre est le flavine adénine dinucléotide réduit (FADH₂), formé par la succinate déshydrogénase, donnant des électrons au complexe II. Les électrons ainsi récupérés sont transférés au coenzyme Q puis au complexe III, au cytochrome c, au complexe IV et finalement à l'oxygène moléculaire, ainsi réduit en eau. L'énergie de ces électrons est utilisée pour pomper des protons à travers la membrane mitochondriale via les complexes I, III et IV. Ceci génère un potentiel de membrane, utilisé par l'adénosine triphosphate (ATP) synthase pour produire de l'ATP ou par les « uncoupling protein » (UCP) pour générer de la chaleur.

Dans des conditions où les concentrations de glucose intracellulaire augmentent, une plus grande quantité de glucose est métabolisée, fournissant plus de donneurs d'électrons. Le potentiel de membrane augmente jusqu'à un seuil critique où le transfert des électrons au complexe III est bloqué (Korshunov *et al.*, 1997). Ces derniers sont alors données à l'O₂, un à un, par le coenzyme Q conduisant à la formation d'anion superoxyde (O₂⁻).

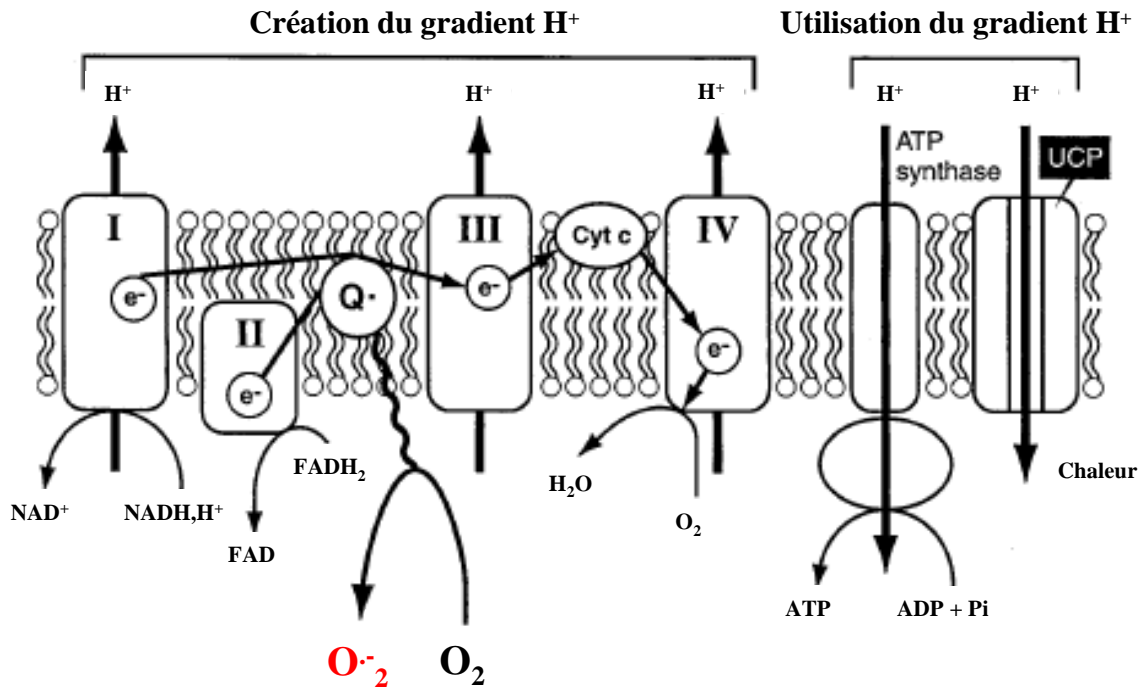


Figure 5 : Production d'anion superoxyde par la chaîne respiratoire mitochondriale dans des conditions hyperglycémiques.

Traduit de Brownlee (Brownlee, 2005). ADP, adénosine diphosphate; ATP, adénosine triphosphate; ATP synthase, adénosine triphosphate synthase; Cyt c, cytochrome c; FAD/FADH₂, flavine adénine dinucléotide oxydée/réduite; NAD⁺/NADH,H⁺, nicotinamide adénine dinucléotide oxydé/réduit; O₂^{•-}, anion superoxyde; UCP, « uncoupling proteins ».

II.2. Glycation et produits avancés de glycation :

La glycation des protéines est un processus de condensation non enzymatique du glucose avec des protéines pour former des adduits covalents stables. Il s'ensuit des altérations structurales et fonctionnelles. Dans des conditions physiologiques, le glucose en solution existe sous deux formes en équilibre, cycle pyranose stable ou aldéhyde à chaîne ouverte (Bunn and Higgins, 1981). La réaction découverte par Maillard met en jeu le groupement aldéhyde du glucose (ou de ses dérivés comme le glycoaldéhyde ou le méthylglyoxal) et les groupements amines des protéines (lysines, hydroxylysines, arginines, histidines ou acides aminés N-terminaux), les lipides et les acides nucléiques (Shinohara *et al.*, 1998). Considéré comme précurseur d'AGE, il forme une base de Schiff réversible sur les groupements amines. Ces produits subissent ensuite un réarrangement d'Amadori conduisant à des céto-amines, bien plus stables. Ces dernières peuvent subir d'autres modifications avant de se fragmenter (ex: carboxyméthyllysine) ou de se réarranger en dicarbonyles (ex : 3-desoxyglucosone, qui peut, à son tour, réagir avec d'autres groupements amines), conduisant

à une famille hétérogène de composés connus sous le nom d'AGE (**Figure 6**). Ces derniers se forment dès le développement embryonnaire à un taux constant, mais lent (Hernebring *et al.*, 2006).

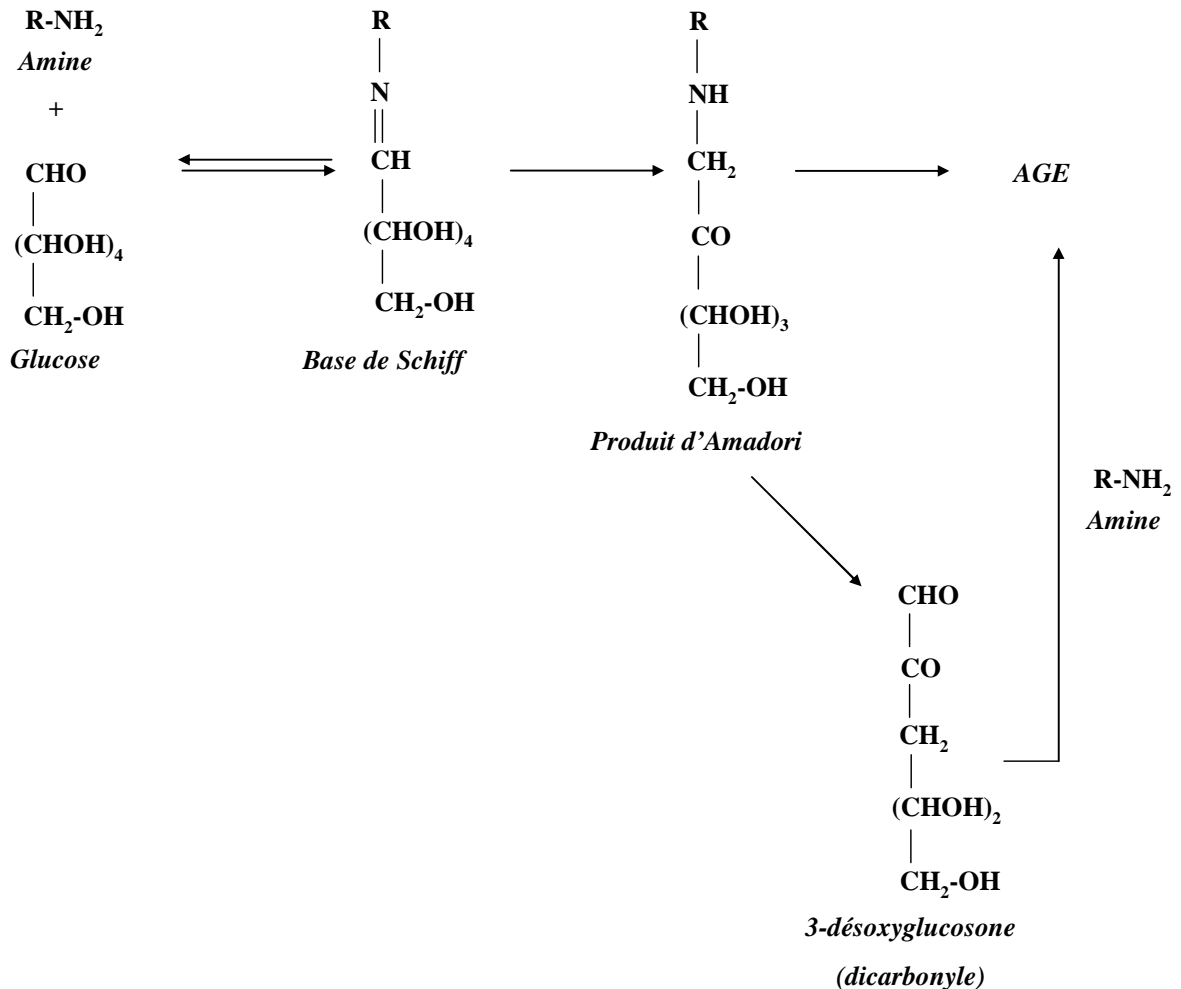


Figure 6 : Réaction de Maillard conduisant à la formation des produits de glycation avancés.

AGE; « Advanced Glycation End-products ».

Au cours du diabète, cette formation est largement accélérée en raison de l'hyperglycémie. Trois mécanismes semblent expliquer les dommages cellulaires (**Figure 7**).

Les précurseurs d'AGE peuvent entraîner la modification de protéines intracellulaires structurales (protéines du cytosquelette et de myéline des nerfs périphériques, protéines de la cornée et du cristallin). Les AGE peuvent alors conduire à la synthèse de certaines protéines (Brownlee, 2005).

Ils peuvent également diffuser en dehors de la cellule et modifier des molécules de la matrice extracellulaire comme le collagène ou la fibronectine (Charonis *et al.*, 1990), causant des dysfonctions cellulaires.

Enfin, ces précurseurs peuvent aussi modifier des protéines circulantes du sang comme l'hémoglobine A1c (HbA1c) (Koenig *et al.*, 1976), l'albumine, les protéines membranaires érythrocytaires ou encore les apolipoprotéines B100 (Tames *et al.*, 1992). Ces protéines modifiées se lient alors à des récepteurs aux AGE (RAGE) (Li *et al.*, 1996) qui induisent l'expression de cytokines inflammatoires (TNF α , IL-1,...), de facteurs de croissance et de molécules d'adhésion (« Vascular Cell Adhesion Protein » (VCAM)) (Abordo and Thornalley, 1997; Kirstein *et al.*, 1992).

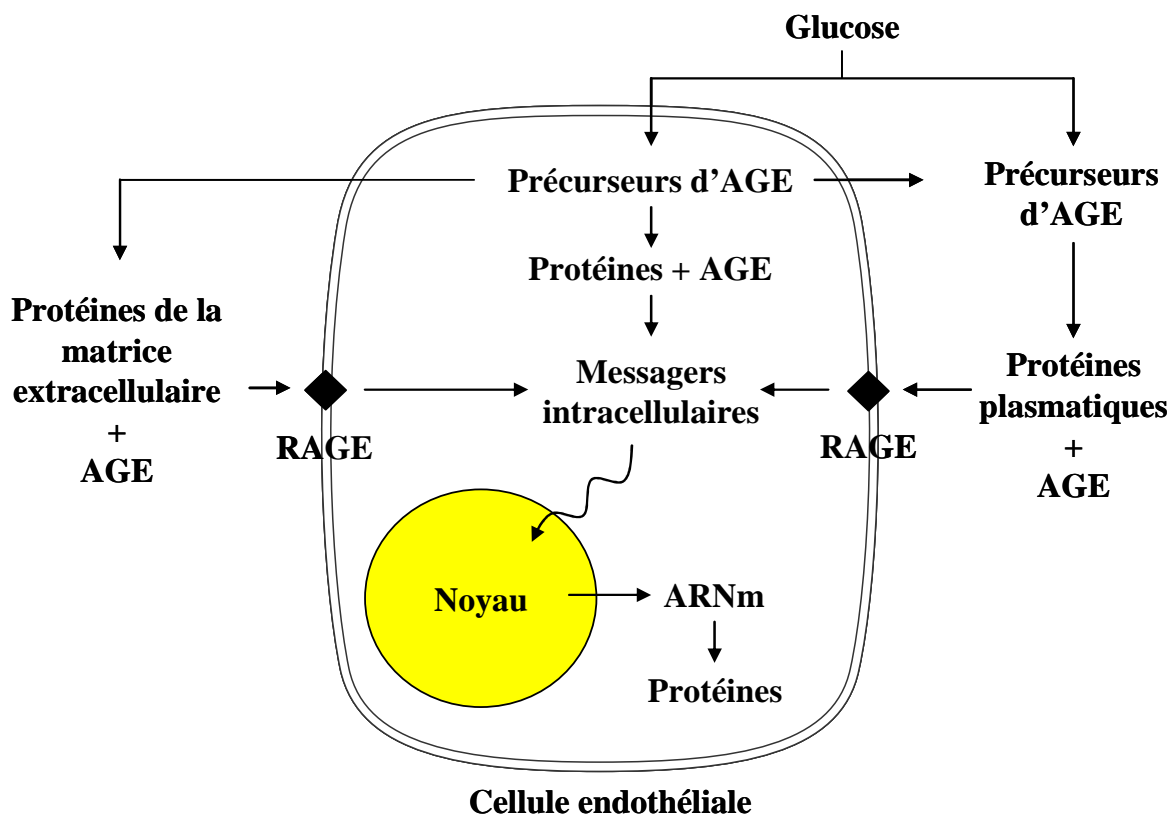


Figure 7 : Mécanismes délétères induits par l'augmentation des précurseurs d'AGE.
Modifié à partir de Brownlee (Brownlee, 2005). AGE, « Advanced Glycation End-products »; RAGE, récepteurs aux AGE.

II.3. Protéine kinase C :

L'hyperglycémie intracellulaire augmente la synthèse de DAG qui active différentes isoformes de la PKC (β , δ et α). L'activation de la PKC a des effets sur l'expression de nombreux gènes et altère le fonctionnement de plusieurs réponses physiologiques (**Figure 8**).

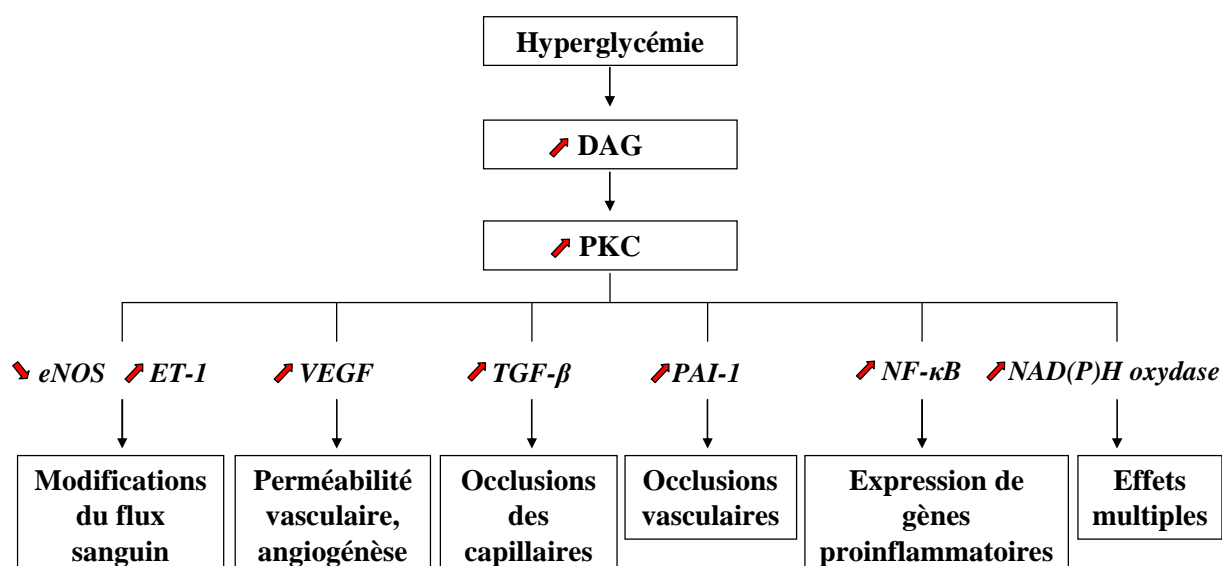


Figure 8 : Conséquences de l'activation de la PKC par l'hyperglycémie.

Modifié à partir de Brownlee (Brownlee, 2005). DAG, diacylglycérol; eNOS, « endothelial nitric oxide synthase »; ET-1, endothéline-1; NAD(P)H oxydase, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase; NF-κB, « Nuclear Factor-κB »; PKC, protéine kinase C; PAI-1, « Plasminogen Activator Inhibitor-1 »; TGF-β, « Transforming Growth Factor-β »; VEGF, « Vascular Endothelium Growth Factor ».

II.4. Voie des polyols :

La voie des polyols fait intervenir l'aldose réductase (**Figure 9**). Cette enzyme réduit les aldéhydes toxiques pour la cellule en leurs alcools inactifs correspondants. Quand les concentrations intracellulaires en glucose augmentent, l'aldose réductase réduit aussi le glucose en sorbitol, ensuite oxydé en fructose par la sorbitol déshydrogénase. Durant cette réaction, du NADPH,H⁺ est consommé (Lee and Chung, 1999). Or, ce dernier est nécessaire à la régénération du glutathion, puissante molécule antioxydante (cf. Le stress oxydant, §IV.2.b., p. 48). Il en découle une diminution de sa régénération et donc une diminution des défenses antioxydantes.

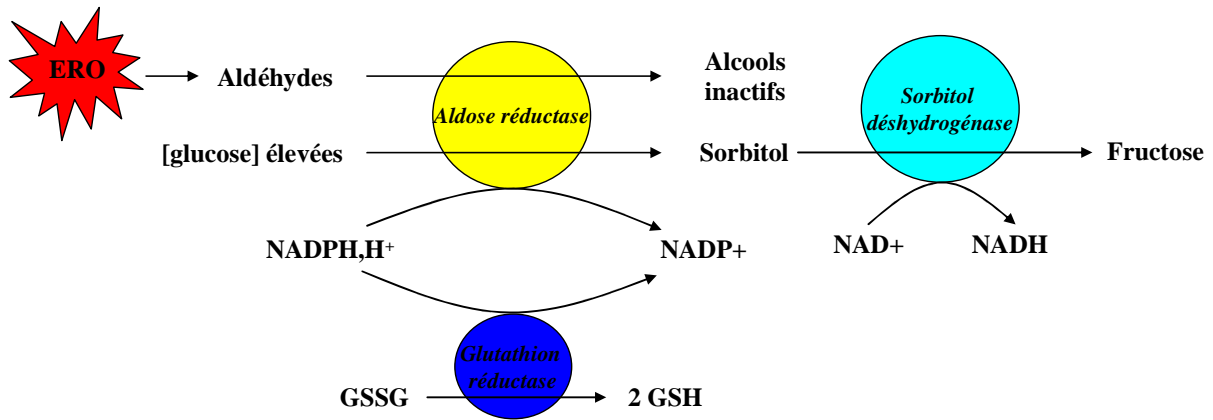


Figure 9 : Voie des polyols en conditions d'hyperglycémie.

Traduit de Brownlee (Brownlee, 2005). ERO, espèces réactives oxygénées; GSH/GSSH, glutathion réduit/oxydé; NADPH, H⁺/NADP⁺, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit/oxydé.

II.5. Voie des hexosamines :

Lorsque les concentrations de glucose intracellulaire sont élevées, la majorité de ce dernier est métabolisé *via* la glycolyse. Cependant, une partie du fructose-6 phosphate est détourné de cette voie et est converti en glucosamine-6 phosphate par la glutamine fructose-6 phosphate aminotransférase. Celui-ci est ensuite converti en uridine diphosphate *N*-acétylglucosamine qui va modifier différents facteurs de transcription conduisant à l'expression de gènes et à la synthèse de protéines tels que « Transforming Growth Factor- β » (TGF- β) et « Plasminogen Activator Inhibitor-I » (PAI-1) (Du *et al.*, 2000) (**Figure 10**).

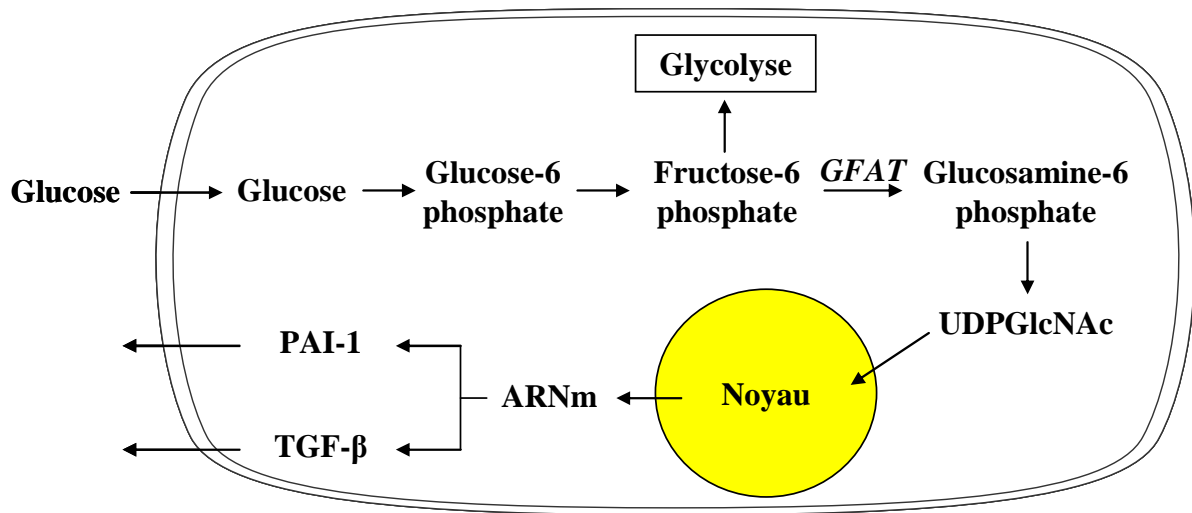


Figure 10 : Voie des hexosamines en conditions d'hyperglycémie.

Traduit de Brownlee (Brownlee, 2005). ARNm, acide ribonucléique messenger; GFAT, glutamine fructose-6 phosphate aminotransférase; PAI-1, « Plasminogen activator inhibitor-1 »; TGF- β , « Transforming Growth Factor- β »; UDPGlcNAc, uridine diphosphate N-acétylglucosamine.

III. Conséquences vasculaires :

L'augmentation de l'HbA1c de 5,5 % à 9,5 % multiplie les risques de maladies microvasculaires (rétinopathies, néphropathies et neuropathies) par dix et les risques de maladies macrovasculaires (infarctus du myocarde, artériopathies périphériques et accidents vasculaires cérébraux) par deux (UKPDS, 1998).

LE STRESS OXYDANT

I. Définition :

Un radical libre (RL) peut être défini comme toute espèce chimique capable d'une existence indépendante et contenant un ou plusieurs électrons non appariés. Cette configuration le rend très réactif. C'est un puissant oxydant.

D'une manière plus large, les espèces réactives oxygénées (ERO) sont des dérivés du métabolisme de l'oxygène (*Tableau 2*). Elles peuvent être de nature radicalaire ou non mais sont ubiquitaires, très réactives et ont un temps de demi-vie très court. Elles réagissent avec les molécules environnantes de leur site de formation. Il existe également des espèces réactives nitrogénées (comme le monoxyde d'azote, le dioxyde de nitrogène ou le peroxydinitrite) que nous ne détaillerons pas ici.

Espèces réactives oxygénées	
Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
radical superoxyde, $O_2^{\cdot-}$	peroxyde d'hydrogène, H_2O_2
radical hydroxyle, $\cdot OH$	ion hypochlorite, ClO^-
radical peroxyde, ROO^{\cdot}	ozone, O_3
radical alkoxyde, RO^{\cdot}	oxygène singulet, 1O_2
	peroxydinitrite*, $ONOO^-$

Tableau 2 : Principales espèces réactives oxygénées radicalaires et non-radicalaires.
D'après Evans (Evans and Halliwell, 1999). *, le peroxydinitrite peut être considéré à la fois comme espèce réactive oxygénée et nitrogénée.

Le stress oxydant est défini par un déséquilibre entre la production et l'inactivation des ERO. Il peut donc être dû à une augmentation de la production d'ERO, à une diminution des défenses antioxydantes ou aux deux à la fois. A faible niveau, les ERO sont indispensables dans de nombreux processus biochimiques comme la signalisation intracellulaire (Bae *et al.*, 1997), la différenciation cellulaire, l'arrêt de croissance, l'apoptose (Ghosh and Myers, 1998), l'immunité (Tohyama *et al.*, 2004) et la défense contre les microorganismes. Cependant, à fort niveau, ils contribuent au dysfonctionnement cellulaire en réagissant avec les macromolécules cellulaires, induisant la peroxydation lipidique, l'altération de l'ADN ou encore la modification des protéines (Dean *et al.*, 1997) et des sucres. Nous nous attarderons

ici uniquement sur le processus délétère de la peroxydation lipidique non enzymatique (Pré, 1991).

II. Les espèces réactives oxygénées initiant la peroxydation lipidique non enzymatique :

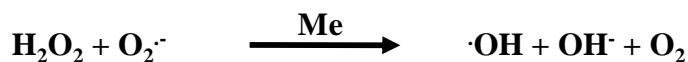
La principale espèce à être produite est l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), espèce oxygénée primaire produite par les organismes aérobie dans la mitochondrie (cf. Les diabètes, §II.1., p.33). En dépit de sa faible réactivité en milieu aqueux, $O_2^{\cdot-}$ est pourtant responsable de perturbations biologiques importantes. En effet, par dismutation, fortement accélérée en présence de superoxyde dismutases, il est à l'origine du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), bien plus stable et diffusible.



La présence de métaux de transition réduits (Me^{n+}) (Fe^{2+}/Fe^{3+} , Cu^+/Cu^{2+}) permet la conversion, selon la réaction de Fenton (décrite avec le fer), de H_2O_2 en radical hydroxyle ($\cdot OH$), extrêmement réactif.



Le radical hydroxyle $\cdot OH$ peut également être produit par la réaction d'Haber-Weiss catalysée par Me^{n+} .



De par sa demi-vie très courte ($T_{1/2} = 10^{-9}$ seconde), $\cdot OH$ ne peut parcourir que 3 nm mais il est considéré avec le radical hydroperoxyde ($HOO\cdot$), comme l'initiateur de la lipoperoxydation (Pré, 1991).

Par la suite, les radicaux alkoxydes ($RO\cdot$) ($T_{1/2} = 10^{-6}$ seconde), peroxydes ($ROO\cdot$) ($T_{1/2} = 7$ secondes) (Pryor, 1986), acyloxydes ($RCOO\cdot$), acylperoxydes ($RCOOO\cdot$), aryloxydes et arylperoxydes sont produits. La diversité des espèces radicalaires apparaissant au cours de la lipoperoxydation résulte du fait que les molécules engagées deviennent à leur tour des RL très réactifs.

III. La peroxydation lipidique :

La peroxydation lipidique consiste en la modification oxydative des lipides. Elle peut être enzymatique (contrôlée) (cf. Les plaquettes, §II.2.c., p.59) ou non enzymatique. Nous détaillerons ci-dessous cette dernière. Il a été montré qu'elle induit une perturbation des structures, une altération de l'intégrité, de la fluidité et de la perméabilité et une perte fonctionnelle des membranes. Elle modifie les LDL pour les rendre proathérogènes et proinflammatoires et enfin, elle génère des produits potentiellement toxiques, mutagènes et carcinogènes (Niki, 2009).

III.1. Mécanisme :

Un RL peut enlever un atome d'hydrogène à une molécule non radicalaire dans le but de se stabiliser. Dans ce cas, un nouveau radical est formé et peut déclencher une réaction en chaîne. Lors de ce processus, on distingue 3 phases : l'initiation, la propagation et la terminaison (Pré, 1991).

III.1.a. Initiation :

Le processus de peroxydation lipidique est initié par l'abstraction, par un radical $\cdot\text{OH}$ ou $\text{HOO}\cdot$, d'un atome d'hydrogène à un groupement méthylène ($-\text{CH}_2-$) d'une chaîne d'acide gras polyinsaturé contenant des atomes de carbone avec des hydrogènes bisallyliques (LH). Un radical carbone ($\text{L}\cdot$) est formé ainsi qu'une molécule d'eau (H_2O). Le $\text{L}\cdot$ se stabilise par remaniement électronique pour former 2 diènes conjugués.



III.1.b. Propagation :

Une molécule de dioxygène (O_2) s'ajoute rapidement sur le $\text{L}\cdot$ pour former un radical peroxyde ($\text{LOO}\cdot$).



Le $\text{LOO}\cdot$ va propager la réaction en chaîne avec une molécule LH voisine pour former un nouveau $\text{L}\cdot$ et un hydroperoxyde lipidique (LOOH). De cette manière, de nombreuses molécules d'hydroperoxydes lipidiques peuvent être formées pour chaque RL initial.



III.1.c. Terminaison :

Cette étape consiste en la formation de composés stables issus de l'association de 2 composés radicalaires. Leurs électrons non appariés s'associent rapidement pour former une liaison covalente stable.



La réaction peut également être stoppée à l'aide d'antioxydants (cf IV.2.a., p.47).

III.2. Exemples de produits formés :

Les LOOH , instables, sont soit réduits par les peroxydases en leur alcool correspondant (LOH), soit rapidement décomposés. Ils peuvent réagir avec des formes ionisées de métaux de transition (cuivre et fer) de structures hémiques (hème, méthémoglobine, cytochromes, céruloplasmine). Il s'agit d'un processus complexe aboutissant à la formation de radicaux $\text{LO}\cdot$ et $\text{LOO}\cdot$.



L'oxydation des AG (acides gras) insaturés ayant 3 doubles liaisons ou plus conduit à la formation de nombreux produits dont des endoperoxydes prostaglandine-like (comme les isoprostanes ou les neuroprostanes). Les isoprostanes sont des produits de peroxydation non enzymatique de l'acide arachidonique (AA) et l'une d'entre elles, la 8-*iso*-prostanglandine $\text{F}_{2\alpha}$ (8-*iso*-PGF $_{2\alpha}$), est devenu un marqueur reconnu de peroxydation lipidique, (Morrow *et al.*, 1990). Des espèces dites de coupure peuvent également être formées par rupture de liaisons covalentes durant ce processus (alcanes, aldéhydes, acides). Ainsi, divers alcanes comportant

de 2 à 8 atomes de carbone sont retrouvés à l'état de traces dans l'air expiré (Wade and van Rij, 1985) (l'éthane provenant de l'oxydation des AG n-3 et le pentane de celle des AG n-6). De nombreux aldéhydes peuvent être formés durant la peroxydation lipidique (Kawai *et al.*, 2007), les plus connus étant le 4-hydroxy-2-trans-nonéanal (4-HNE), le 4-hydroxy-2-trans-hexéanal (4-HHE) et le dialdéhyde malonique (MDA), provenant respectivement de l'oxydation des AG n-6, n-3 et des acides gras polyinsaturés (AGPI) à trois doubles liaisons ou plus. Ces molécules, très réactives, (Esterbauer *et al.*, 1991) forment des composés d'addition stables avec les groupements thiol des résidus cystéinyl et aminés des lysines et histidines par la réaction d'addition de Michäel (**Figure 11**) (Uchida and Stadtman, 1992). Elles se fixent également sur les cystéines du glutathion réduit (GSH), contribuant à sa détoxification. Le groupement carbonyle peut aussi réagir avec les groupements aminés des protéines pour former des bases de Schiff. Enfin, des adduits de Michael et des bases de Schiff peuvent se former avec les phosphatidyléthanolamines (PE) et les phosphatidylsérines (PS) (Bacot *et al.*, 2007).

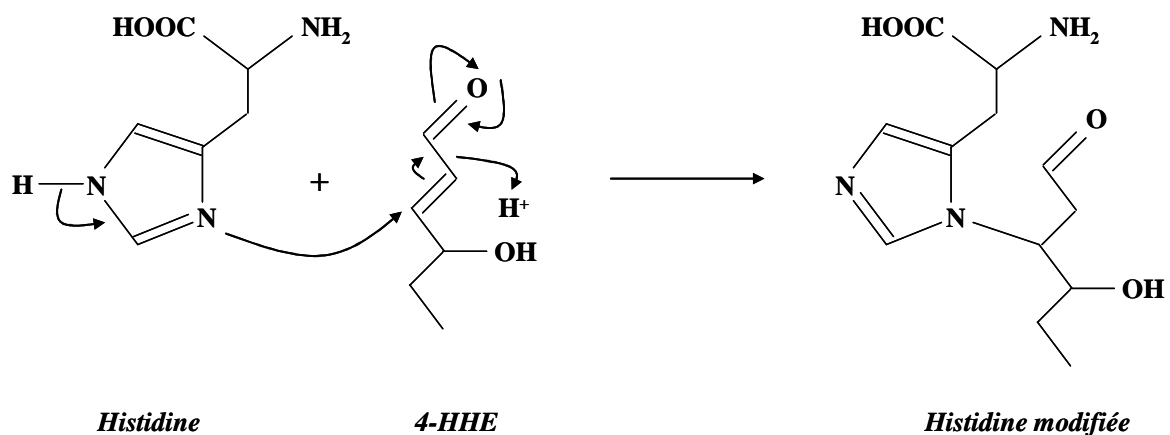


Figure 11 : Exemple d'addition de Michäel entre une histidine et un aldéhyde.
4-HHE, 4-hydroxy-2-trans-hexéanal.

Le cholestérol peut également subir la peroxydation lipidique (Murphy and Johnson, 2008). Ses produits d'oxydation sont appelés les oxystérols (le 7- α,β -hydroperoxycholestérol, le 7- α,β -hydroxycholestérol, le 7-cétocholestérol et le 6-céto-5 α -hydroxycholestérol étant les principaux). On trouve également du 27-hydroxycholestérol dans les LDL oxydées (Brown *et al.*, 1997).

L'attaque radicalaire d'un AGPI estérifié en position *sn*-2 d'un phospholipide (PL) conduit à l'addition d'une molécule d'oxygène dans sa chaîne voir à sa fragmentation. Ces PL, porteur d'AGPI modifiés, sont appelés PL oxydés et sont connus pour avoir des actions pro-inflammatoires. L'oxydation du 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycéro-3-

phosphorylcholine (PAPC) conduit à la formation de 1-palmitoyl-2-(5-oxovaléroyl)-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (POVPC), de 1-palmitoyl-2-glutaroyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (PGPC) et de 1-palmitoyl-2-(5,6-époxyisoprostane E2)-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (PEIPC) (Ashraf *et al.*, 2009).

IV. Défenses antioxydantes :

L'organisme dispose de systèmes de protection contre les ERO. Un antioxydant est un composé capable de combattre les dommages oxydants alors qu'il est en moindre quantité que les molécules qu'il protège. La protection antioxydante comprend des enzymes antioxydantes et de nombreux composés endogènes réagissant et inactivant les ERO. Les cellules maintiennent leur niveau d'antioxydants par les apports alimentaires et/ou la synthèse *de novo*.

IV.1. Antioxydants enzymatiques :

Les superoxyde dismutases.

Chez l'homme, il existe 3 types de superoxyde dismutases (SOD) : mitochondriale (Mn SOD), cytosolique (Cu/Zn SOD) et extracellulaire. Ce sont des enzymes catalysant la dismutation de $O_2^{\cdot -}$ en O_2 et H_2O_2 .



La catalase.

Contrairement à $O_2^{\cdot -}$ qui reste près de son site de production, H_2O_2 peut diffuser à travers les membranes et le cytosol. La catalase est une enzyme essentiellement localisée dans les peroxysomes, convertissant H_2O_2 en H_2O et O_2 .



Les glutathion peroxydases.

Les glutathion peroxydases (GPx) sont des enzymes contenant un sélénium réduisant H₂O₂ ou les hydroperoxydes d'AG en leurs composés hydroxylés correspondants en utilisant le GSH comme co-substrat. Il existe différents types de GPx dont les GPx-1 (cytosolique), GPx-2 (gastro-intestinale), GPx-3 (plasmatique), GPx-4 (cytosolique, mitochondriale et membranaire, spécifique des hydroperoxydes estérifiés dans les PL, le cholestérol et les esters de cholestérol) et GPx-5 (intervenant durant la spermatogénèse).

*Les glutathion transférases.*

Les glutathion transférases sont des enzymes séléno-indépendantes conjuguant le GSH à un grand nombre de composés électrophiles (médicaments, agents cancérigènes,...). Cette addition permet leur métabolisation puis leur excrétion.

La glutathion réductase.

La glutathion réductase utilise le NADPH pour régénérer le GSH à partir du GSSG. Le NADPH est produit par la glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Les peroxyredoxines.

Les peroxyredoxines (Prx) constituent une autre famille de peroxydases constituée de six membres, dont cinq (Prx I-V) possèdent deux sites catalytiques à base de cystéines (Rhee *et al.*, 2005). Séléno-indépendantes, ces peroxydases réduisent un grand nombre de molécules comme l'H₂O₂ et utilisent la thioredoxine (Trx) comme réducteur. Ces enzymes réduisent également les hydroperoxydes d'alkyl, le peroxydinitrite et les hydroperoxydes dérivés de PL ou d'AG. Elles possèdent à la fois des fonctions antioxydantes et sont impliquées dans la signalisation intracellulaire.

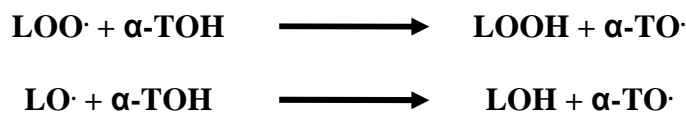


IV.2. Antioxydants non enzymatiques :

IV.2.a. Antioxydants liposolubles :

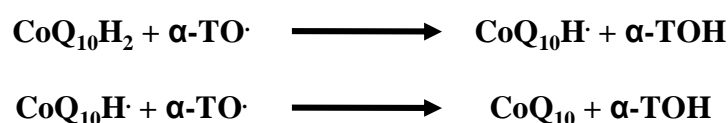
Les tocophérols et tocotriénols (vitamine E).

Il s'agit d'une famille de molécules comprenant les α -, β -, γ - et δ -tocophérols (Tableau 2) ainsi que les α -, β -, γ - et δ -tocotriénols. Ces molécules sont constituées d'un noyau 6-chromanol sur lequel est greffée une chaîne phytyle saturée (tocophérols) ou non (tocotriénols) (*Tableau 3*). Etant liposoluble, la vitamine E se localise dans les membranes et les lipoprotéines. Ces dernières en sont les premiers transporteurs. Ces molécules, dont l' α -tocophérol (α -TOH) est l'isomère majoritaire, sont de très bons piègeurs de radicaux $\text{LO}\cdot$ et $\text{LOO}\cdot$ avec lesquels ils réagissent pour former un hydroperoxyde (LOOH) ou un hydroxyde (LOH) lipidique ainsi qu'un radical α -tocophéryle (α -TO \cdot). La réaction en chaîne de lipoperoxydation est ainsi interrompue.



L'ubidécaquinone (Coenzyme Q₁₀).

Cette molécule appartient à une famille de composés liposolubles synthétisés par l'Homme, connus sous le nom d'ubiquinones. Ces dernières sont composées d'une structure benzoquinone et de 1 à 12 unités isoprènes. L'ubidécaquinone (*Tableau 3*), avec 10 unités isoprènes, est la forme prédominante chez l'Homme. On la trouve dans les membranes cellulaires ainsi que dans les lipoprotéines. Elle existe sous 3 états d'oxydation ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, $\text{CoQ}_{10}\text{H}\cdot$, CoQ_{10}). Bien que présente en moindre quantité que l' α -TOH dans les LDL, $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ est capable de réduire α -TO \cdot en α -TOH.



Les caroténoïdes.

Ce sont des composés naturels non synthétisés par l'Homme comprenant plus de 500 composés différents identifiés parmi lesquels on trouve les carotènes (α -carotène, β -carotène - majoritaire-, lycopène,...) (**Tableau 3**) et les xanthophylles (zéaxanthine, lutéine...). Leurs propriétés antioxydantes proviennent de leurs nombreuses doubles liaisons conjuguées qui leur permettent de neutraliser l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et d'inhiber les réactions radicalaires avec les radicaux peroxy (Krinsky and Yeum, 2003).

IV.2.b. Antioxydants hydrosolubles :*L'ascorbate (Vitamine C).*

L'Homme ne peut pas synthétiser l'ascorbate (**Tableau 3**) qui doit donc être apporté par son alimentation. Il est considéré comme la première ligne de défense antioxydante contre les radicaux présents dans la phase aqueuse en raison de sa capacité à donner un électron puis un proton à de nombreux substrats. Par exemple, l' $\alpha\text{-TO}\cdot$ est réduit par l'ascorbate en $\alpha\text{-TOH}$. La vitamine E est ainsi régénérée (Packer *et al.*, 1979).



Le radical ascorbyle est ensuite réduit grâce aux systèmes enzymatiques dépendants du glutathion, recyclant ainsi le pool d'ascorbate disponible.

L'urate.

L'urate (**Tableau 3**) est produit par l'oxydation de l'hypoxanthine ou de la xanthine catalysée par la xanthine oxydase et la xanthine déshydrogénase. A pH physiologique, il est présent sous forme monoanionique et peut directement capturer l'oxygène singulet, les radicaux hydroxyles et peroxy (Ames *et al.*, 1981). Au cours de cette réaction, l'urate est transformé en radical d'urate, réduit par la suite par l'ascorbate.

La bilirubine.

La bilirubine (**Tableau 3**) est un produit terminal de dégradation de l'hème. C'est un puissant agent réducteur, majoritairement lié à l'albumine, le rendant hydrosoluble. La bilirubine libre et liée réduisent l' α -TO \cdot et inhibent la peroxydation lipidique du plasma et des LDL (Neuzil and Stocker, 1994), agissant comme une seconde ligne de défense derrière l'ascorbate.

Le glutathion.

Le GSH est un tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine) (**Tableau 3**) synthétisé par les cellules. C'est un antioxydant important de par son rôle de cofacteur de nombreuses enzymes comme les glutathion-péroxydases et transférases et les déshydroascorbate réductases (régénérant l'ascorbate) (Pompella *et al.*, 2003). C'est aussi un puissant agent réducteur piégeant les radicaux hydroxyles et l'oxygène singulet. L'oxydation du GSH conduit à la formation du glutathion oxydé (GSSG). Sa régénération fait intervenir la GSSG réductase et nécessite du NADPH (produit grâce à la glucose 6-phosphate déshydrogénase de la voie des pentoses phosphate).

Acide alpha-lipoïque.

L'acide α -lipoïque (**Tableau 3**) est un cofacteur du complexe pyruvate déshydrogénase. Il se situe principalement au niveau des mitochondries. C'est également un antioxydant naturel capable d'agir en milieu hydrophile comme hydrophobe. Il participe au réseau de défense antioxydante cellulaire en augmentant les concentrations de GSH intracellulaires (Han *et al.*, 1997). D'autre part, il neutralise les radicaux hydroxyle, l' HOCl et l'oxygène singulet, chélate les métaux de transition, réduit la peroxydation lipidique et prévient la glycation de l'albumine du sérum. Sa forme réduite, l'acide dihydrolipoïque, est capable de régénérer la vitamine C (Packer *et al.*, 1995).

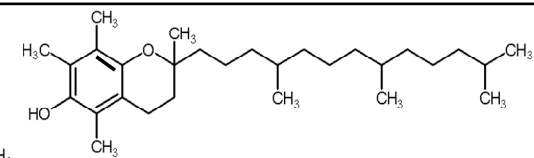
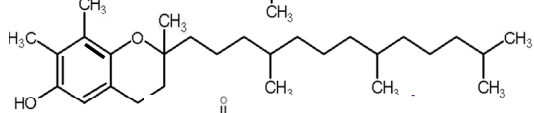
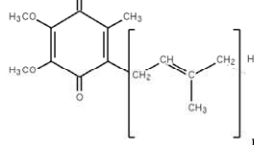
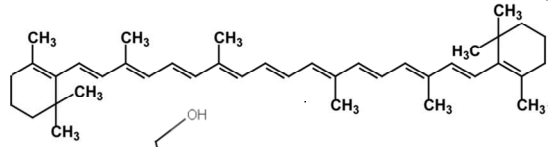
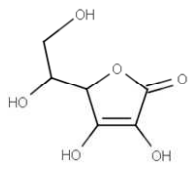
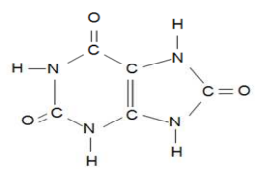
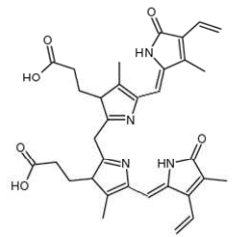
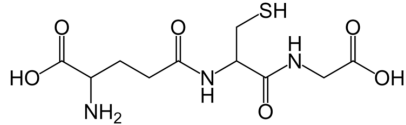
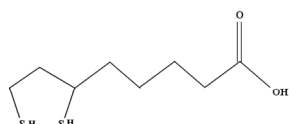
Nom	Formule	Concentration plasmatique ($\mu\text{mol/L}$)
α-tocophérol		15-40
γ-tocophérol		3-5
Ubidécaquinone		0,4-1,0
β-carotène		0,3-0,6
Acide ascorbique		30-150
Acide urique		160-450
Bilirubine		5-20
Glutathion		1-2
Acide α-lipoïque		< 0,005

Tableau 3 : Formules et concentrations plasmatiques des principaux antioxydants.
D'après Sies et Teichert (Sies and Stahl, 1995; Teichert and Preiss, 2002).

V. Stress oxydant et maladies métaboliques :

Syndrome métabolique.

Les composantes du syndrome métabolique, obésité, résistance à l'insuline, hypertension, sont associées à un stress oxydant (Hopps *et al.*, 2010; Urakawa *et al.*, 2003) qui pourrait jouer un rôle important dans les pathologies liées au syndrome métabolique comme les maladies cardiovasculaires et le diabète de type-2 (Ceriello and Motz, 2004). Ceci suggère que le stress oxydant pourrait être un événement précoce dans ces maladies plutôt

qu'une conséquence ou un élément isolé. Les patients ayant un syndrome métabolique ont une diminution des défenses antioxydantes (diminutions de la vitamine C, de l' α -tocophérol et de l'activité de la SOD plasmatique) et une augmentation de la peroxydation lipidique (niveaux élevés des « Thiobarbituric acid Reactive Species » (TBARS) sériques) et protéique (augmentation des protéines carbonylées) (Armutcu *et al.*, 2008; Palmieri *et al.*, 2006).

Parmi les différentes composantes du syndrome métabolique, l'obésité est associée à un stress oxydant et notamment à une augmentation des concentrations sériques de TBARS et urinaires de 8-isoPGF_{2 α} (Furukawa *et al.*, 2004). La résistance à l'insuline est étroitement associée au stress oxydant. Comme nous l'avons vu (Syndrome métabolique §III.1., p.25), la résistance à l'insuline augmente le flux d'acide gras libre libérés par les adipocytes. Suite à l'augmentation des AGL circulants et des acétylCoA produits par β -oxydation, sont formés du NADH et de FADH₂, donneurs d'électron au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Leur augmentation va conduire à la surproduction d'ERO (O₂⁻) au niveau mitochondrial (Les diabètes §II.1., p.33) et aux mécanismes délétères précédemment décrits (**Figure 12**). Il a été montré que les ERO sont impliqués dans la progression de la résistance à l'insuline ainsi que dans le dysfonctionnement des cellules β (Evans *et al.*, 2002) conduisant au diabète. Le stress oxydant, mais d'une manière plus large, l'adiposité et la résistance à l'insuline, composantes clé du syndrome métabolique, sont impliqués dans le développement de l'hypertension (Yanai *et al.*, 2008).

Diabète de type-1 et de type-2.

L'hyperglycémie chronique induit un stress oxydant (Dandona *et al.*, 1996) favorisant une augmentation de la production d'ERO chez les patients diabétiques de type-1 et 2 et une chute des défenses antioxydantes cellulaires (diminution des concentrations plasmatiques d'urate et de vitamine C) (Maxwell *et al.*, 1997). Les diabétiques de type-2 ont une augmentation de l'oxydation des lipides (Davi *et al.*, 1999) et des protéines qui pourrait être corrélé à leur contrôle glycémique (Davi *et al.*, 2005; Martin-Gallan *et al.*, 2003). Plusieurs études montrent que l'incubation de cellules endothéliales ou musculaires lisses avec des concentrations croissantes de glucose induisent une augmentation du stress oxydant (Ceriello *et al.*, 1996; Du *et al.*, 2000).

Au niveau mécanistique, l'hyperglycémie induit une augmentation de NADH et de FADH₂ entraînant une surproduction des ERO mitochondriaux (cf. Les diabètes, §II.1., p.33).

Ce stress oxydant va alors activer les différentes voies délétères précédemment décrites (**Figure 12**). De plus, l'augmentation du glucose intracellulaire va activer la voie des polyols et contribuer à la diminution des défenses antioxydantes. Le stress oxydant favorisant la résistance à l'insuline et la diminution de la sécrétion d'insuline (Evans *et al.*, 2002) et donc *in fine* l'hyperglycémie, nous voyons ici que les notions d'hyperglycémie, de résistance à l'insuline et de stress oxydant sont intimement liées.

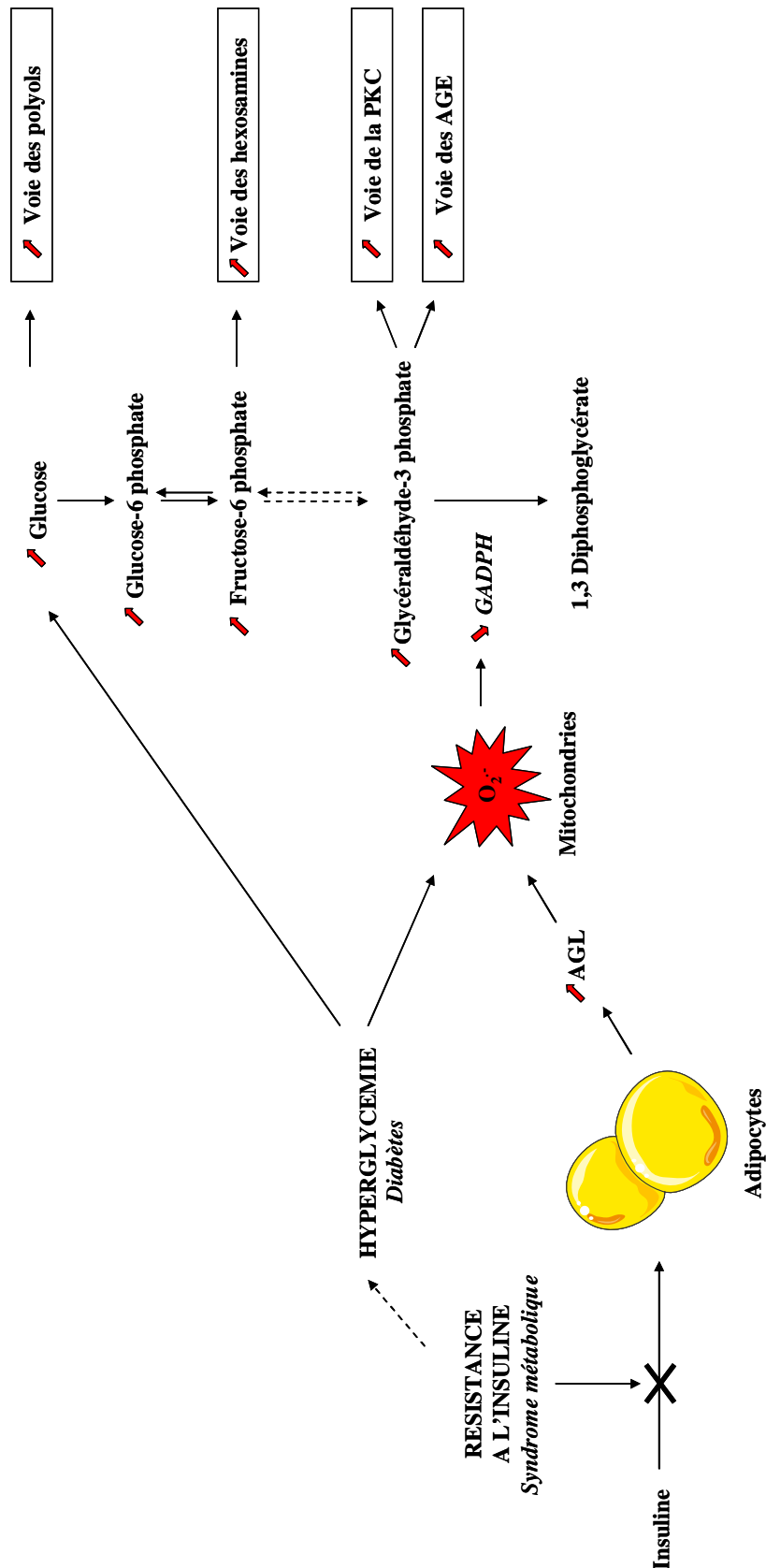


Figure 12 : Mécanisme unificateur de la résistance à l'insuline, de l'hyperglycémie et du stress oxydant.

Modifié à partir de Brownlee (Brownlee, 2005).

LES PLAQUETTES SANGUINES

I. Origine et structure :

Les plaquettes sont de petites cellules anucléées de forme discoïde (2 à 3 μm de diamètre pour 1 μm d'épaisseur, 6 à 8 μm^3) circulant dans le sang et participant à l'hémostase. Leur rôle est de stopper la perte de sang après une lésion vasculaire. Elles se forment dans la moelle osseuse par fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes (Behnke and Forer, 1998). Elles sont dépourvues d'ADN mais contiennent des ARNm provenant des mégacaryocytes (Newman *et al.*, 1988) ainsi que la machinerie nécessaire à la traduction (Kieffer *et al.*, 1987). La numération plaquettaire normale est de 150000 à 400000 par μL de sang. Leur durée de vie est de 7 à 12 jours. Les plaquettes les plus jeunes sont les plus réactives chez des patients souffrant de maladies cardiovasculaires (Schneider *et al.*, 2008; Thattaliyath *et al.*, 2005). La rate séquestre en continu mais de manière transitoire environ 1/3 des plaquettes circulantes. Les plaquettes vieillies sont phagocytées par les macrophages de la rate et du foie.

I.1. Membranes :

La membrane plasmique est majoritairement composée de phospholipides (65 à 70%) dont ceux chargés négativement, comme la PS et la phosphatidylinositol (PI), sont confinés au feuillet interne où ils peuvent servir de substrats à différentes phospholipases (Chap *et al.*, 1977). Parmi les phospholipides, on distingue 4 classes majeures : les phosphatidylcholines (PC) (55 %), les PE (21 %), les PS (7 %) et PI (15 %) (Guichardant and Lagarde, 1983). La position sn-1 est généralement occupée par un acide gras saturé comme l'acide palmitique (16:0) ou l'acide stéarique (18:0) ou monoinsaturé alors que la position sn-2 est occupée par un acide gras polyinsaturé, principalement l'AA (20:4n-6) ou l'acide linoléique (18:2n-6). On trouve également dans une moindre mesure des lipides neutres (20 à 25 %) (cholestérol et acides gras non estérifiés) et des glycolipides (2-5 %).

L'AA est l'acide gras polyinsaturé majeur avec 20 % de l'ensemble des acides gras plaquettaires (Marcus *et al.*, 1969). Il est estérifié en position sn-2 des phospholipides, principalement les PC et les PE, et représente l'un des substrats les plus importants dans la

synthèse de médiateurs biologiques. Il est à noter que l'acide arachidonique non estérifié n'est présent, dans la plaquette à l'état de repos, qu'en très faible quantité (Burgoyne and Morgan, 1990).

Les plaquettes possèdent un important réseau membranaire : l'un connecté avec le milieu extracellulaire par de profondes invaginations, le système caniculaire ouvert, et l'autre uniquement intracellulaire, le système tubulaire dense. Ce dernier est l'équivalent du réticulum endoplasmique lisse dans les autres types cellulaires. Il contient les réserves de calcium ainsi que les enzymes impliquées dans la synthèse de prostaglandines.

I.2. Cytosquelette :

Un cytosquelette très développé, composé de microtubules et de microfilaments d'actine et de myosine, stabilise la bicouche lipidique, maintient la forme discoïde des plaquettes quiescentes et permet le changement de forme des plaquettes durant l'activation.

I.3. Cytoplasme :

On trouve un grand nombre d'organites dispersés dans le cytoplasme incluant des granules, des mitochondries, des particules de glycogène, des lysosomes et des peroxysomes. Les granules α ainsi que les granules denses sont des granules de stockage spécifiques des plaquettes. Les granules α contiennent des protéines comme le fibrinogène, le facteur plaquettaire 4 (PF-4), la β -thromboglobuline (β -TG), le « Platelet Derived Growth Factor » (PDGF), la fibronectine, la thrombospondine, PAI-1 et le facteur von Willebrand (vWF). Les membranes des granules α contiennent GPIIb/IIIa, la P-sélectine et le « Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecular-1 » (PECAM-1). Les granules denses sont riches en sérotonine, adénosine diphosphate (ADP), ATP, Ca^{2+} et Mg^{2+} .

II. Physiologie :

II.1. Adhésion :

La rupture de l'intégrité de l'endothélium vasculaire entraîne l'exposition de différents composants de la matrice vasculaire (différents types de collagènes -I, III, IV, V, VI, VIII,

XII, XIII et XIV- (Barnes and Farndale, 1999), du vWF, de la fibronectine, de la laminine, de la fibuline et de la thrombospondine) au flux sanguin, favorisant l'interaction entre les plaquettes et la paroi vasculaire.

Dans des conditions de forces de cisaillement élevées (présentes dans les petites artères, les artérioles et les artères sténosées), le vWF circulant (10 µg/mL de plasma) est essentiel à l'étape d'adhésion initiale (**Figure 13**). Sa liaison au collagène exposé entraîne un changement conformationnel qui lui permet, entre autres, d'interagir avec le récepteur plaquettaire GPIb α (ou GPIb/V/IX) (signalisation « outside-in ») (Ruggeri, 2000) (25000 copies/plaquette). Cependant, cette interaction active le récepteur intégrine GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) (60000 à 80000 copies/plaquette + stock plaquettaire supplémentaire) (Kasirer-Friede *et al.*, 2004) et diminue la vitesse des plaquettes permettant à GPVI de se lier au collagène. La glycoprotéine GPVI joue un rôle central dans l'adhésion des plaquettes au collagène et leur activation (signalisation « outside-in ») (Nieswandt *et al.*, 2001). Il initie la cascade de signalisation conduisant à la libération d'ADP et de TxA₂, messagers secondaires, et active *via* des signalisations « inside-out » le récepteur glycoprotéique GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$). Cette glycoprotéine lie, entre autres, le fibrinogène et le vWF, stabilisant l'adhésion des plaquettes à l'endothélium. De même, une signalisation « inside-out » augmente l'affinité de GPIa-IIa (ou $\alpha_{II}\beta_1$) pour le collagène (2000 à 4000 copies/plaquette) (Nieswandt and Watson, 2003).

Dans des conditions de forces de cisaillement plus faibles (présentes dans les veines et les grosses artères), l'adhésion plaquettaire au collagène se déroule principalement *via* le récepteur GPIa-IIa ($\alpha_2\beta_1$) (Saelman *et al.*, 1994). Dans une moindre mesure, la fibronectine, la laminine, la vitronectine et la thrombospondine contribuent à l'adhésion plaquettaire stable en se liant respectivement aux récepteurs GPIc-IIa, GPIc'-IIa ($\alpha_6\beta_1$), $\alpha_v\beta_3$ et GPIV.

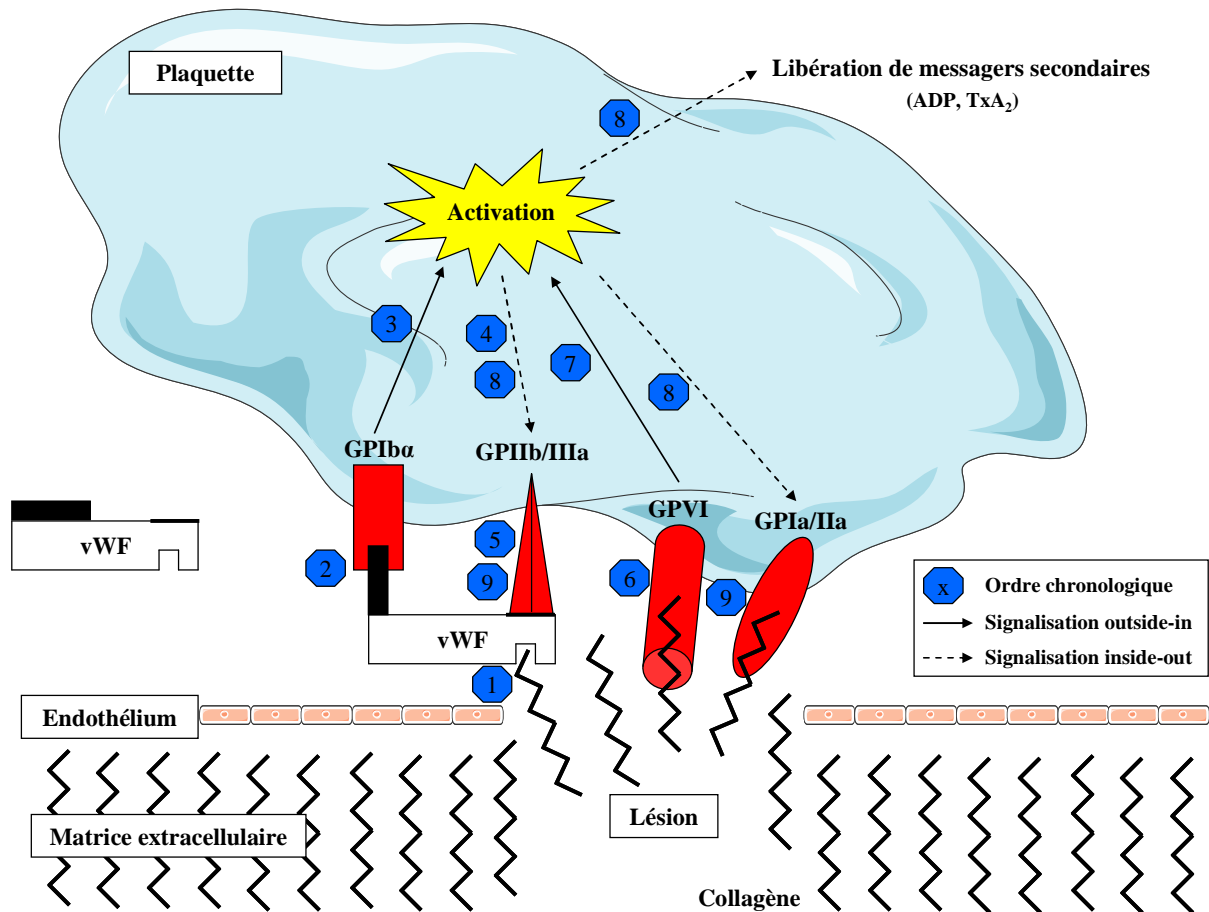


Figure 13 : Adhésion et activation plaquettaire lors d'une lésion de l'endothélium en conditions de forces de cisaillement élevées.

ADP, Adénosine diphosphate; GP, glycoprotéine; TxA₂, Thromboxane A₂; vWF, facteur von willebrand.

Le collagène exposé et le vWF immobilisé sur du collagène peuvent donc être considérés comme des agonistes primaires du processus d'adhésion permettant de former une monocouche de plaquettes activées.

II.2. Activation :

Après l'étape initiale d'adhésion à la matrice extracellulaire, le processus d'hémostase nécessite le recrutement d'autres plaquettes pour former un clou hémostatique. Les plaquettes activées par l'adhésion, libèrent ou produisent de nombreux médiateurs autocrines et paracrines, subissent un changement conformationnel et libèrent leur calcium intracellulaire.

II.2.a. Récepteurs couplés aux protéines G et signalisation :

Les protéines G sont constituées d'un complexe trimérique composé d'une sous-unité α liant spécifiquement les nucléotides guanyliques et de deux sous-unités β et γ . L'occupation des récepteurs couplés aux protéines G stimule le remplacement du GDP lié à α par du GTP qui conduit à la dissociation de ses composants. Le GTP est hydrolysé et le complexe ternaire se reforme. Le thromboxane (Tx) A_2 , l'ADP, la thrombine, l'épinephrine et la sérotonine activent les plaquettes *via* ces récepteurs couplés à des protéines G pour finalement conduire à l'activation de GPIIb/IIIa (α IIb β 3) (Hodivala-Dilke *et al.*, 1999).

Le TxA₂ est synthétisé par les plaquettes activées. Dans les plaquettes, il existe 2 variants d'épissage du récepteur au TxA₂ : TP α (majoritaire) et TP β (Habib *et al.*, 1999; Hirata *et al.*, 1991; Raychowdhury *et al.*, 1994). Ils sont couplés aux protéines G_q (Shenker *et al.*, 1991) et G_{12/13} (Offermanns *et al.*, 1994) activant respectivement la phospholipase C (PLC) - β et « Rho guanine-nucleotide exchange factors » (RhoGEF).

L'ADP, stocké dans les granules denses, est sécrété lors de l'activation. Il se lie aux récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ couplés respectivement à G_q et G_i (Murugappa and Kunapuli, 2006), P2Y₁₂ étant le récepteur majeur (Dorsam and Kunapuli, 2004). L'activation de P2Y₁ augmente le niveau de Ca²⁺ intracellulaire et celle de P2Y₁₂ inhibe l'adénylate cyclase, causant une diminution d'AMPc. En absence de ces récepteurs, la réponse à la thrombine et au TxA₂ est réduite.

La thrombine est la protéase clé des processus de coagulation et un puissant activateur plaquettaire. Elle est rapidement générée à partir de la prothrombine circulante à la surface des plaquettes activées (Heemskerk *et al.*, 2002) et clive le fibrinogène en fibrine. Les plaquettes possèdent 2 récepteurs à la thrombine : « protease-activated receptor » 1 et 4 (PAR1 et PAR4) (Kahn *et al.*, 1999). PAR1 et PAR4 sont couplés aux protéines G_{12/13} (Offermanns *et al.*, 1994), G_q et G_i. Les sous-unités α de G₁₂ et G₁₃ se lient aux RhoGEF, probablement impliqués dans le changement de forme des plaquettes. G_q et G_i conduisent à l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire et à la diminution d'AMPc.

D'autres ligands des récepteurs aux protéines G ont été identifiés mais ce sont des activateurs faibles des plaquettes qui potentialisent la réponse plaquettaire aux autres agonistes. L'épinephrine potentialise les effets des autres stimuli en agissant sur le récepteur

adrénergique α_{2A} couplé à G_i (Yang *et al.*, 2000) mais est incapable d'activer seule les plaquettes. La sérotonine active le récepteur 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT_{2A}) couplé à G_q .

II.2.b. Changement de forme :

Le changement de forme est la réponse initiale des plaquettes aux agonistes tels que la thrombine, l'ADP ou le TxA₂. C'est un processus très rapide, basé sur la réorganisation du cytosquelette (Hartwig, 1992; Wurzinger, 1990), durant lequel de nouveaux filaments d'actine sont formés conduisant à la formation d'un réseau sous-membranaire et à la formation de filopodes. De plus, la stimulation des processus de contraction, basés sur l'actomyosine, résulte en la centralisation des granules denses et α . Enfin, la dépolymérisation des microtubules permet le passage d'une forme discoïde à une forme sphérique. Ce changement de forme, induit par des concentrations d'agonistes inférieures à celles requises pour la dégranulation et l'agrégation, est considéré comme un pré requis pour une sécrétion efficace du contenu des granules.

II.2.c. La cascade de l'acide arachidonique :

L'AA est un acide gras polyinsaturé de la famille des ω -6 (*Figure 14*).

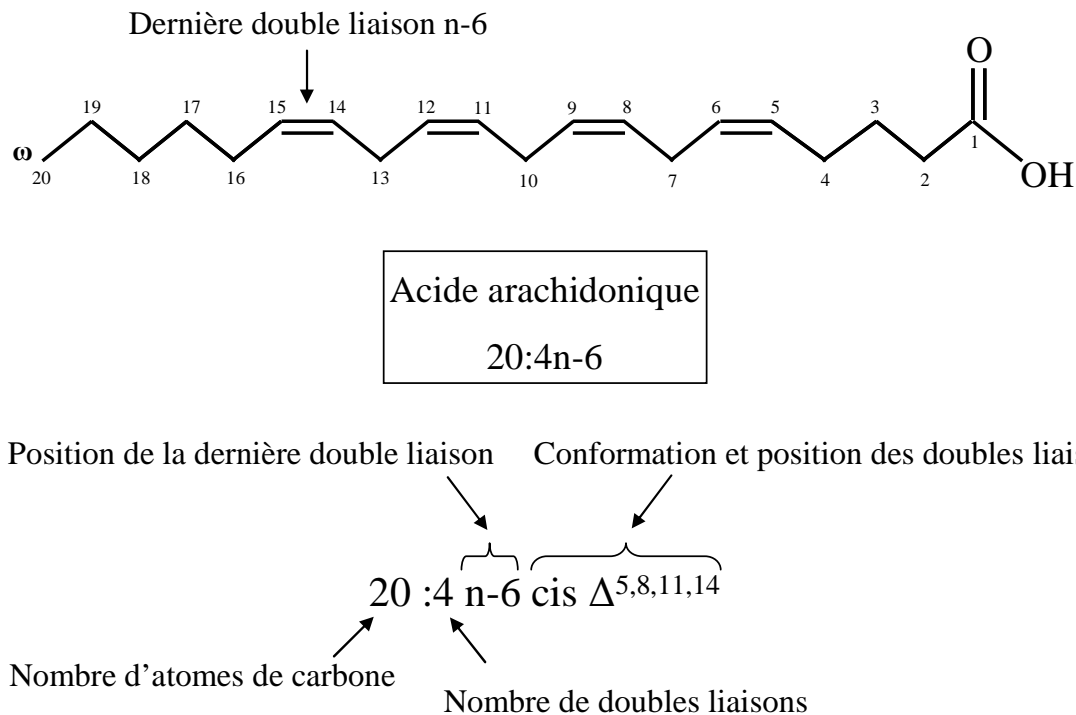


Figure 14 : Structure et nomenclature de l'acide arachidonique.

*Libération de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires :**Les phospholipases C.*

Les PLC (β , γ et δ) sont des enzymes spécifiques des phosphoinositides (phosphatidylinositol (PI), phosphatidylinositol phosphate (PIP), phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂)) qu'elles convertissent en inositol phosphates (respectivement inositol phosphate (IP), inositol bisphosphate (IP₂) et inositol trisphosphate (IP₃)) et en DAG. Sept isoformes sont présentes dans les plaquettes et dans l'ordre décroissant suivant $\gamma_2 > \beta_2 > \beta_3 > \beta_1 > \gamma_1 > \delta_1 > \beta_4$ (Lee *et al.*, 1996). Leur localisation peut être cytosolique ou membranaire (Cockcroft and Thomas, 1992). En réponse à divers agonistes, elles sont activées soit par des protéines G (Brass *et al.*, 1987) soit par des tyrosine kinases (Blake *et al.*, 1994). Elles convertissent alors le PIP₂ en IP₃ et en DAG (Berridge and Irvine, 1984). En se liant à des récepteurs du système tubulaire dense, IP₃ joue un rôle critique dans la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire (Irvine, 1990) dont la concentration passe de 100nM à 1 μ M. DAG est, quant à lui, responsable de la translocation membranaire et de l'activation de la PKC qui va contribuer à l'activation d' α IIB β 3 (Shattil and Brass, 1987) et à la libération d'AA (Halenda and Rehm, 1987). La PKC- δ est nécessaire pour l'activation d' α IIB β 3 et l'agrégation stimulée par le collagène. Elle déclenche l'activation des voies ERK et p38 « Mitogen Activated Protein Kinase » (MAPK) (Yacoub *et al.*, 2006) (**Figure 15**).

Les p38 MAPK.

Les p38 MAPK (α , β , γ et δ ou respectivement SAPK2_A, 2_B, 3 et 4) font partie de la superfamille des sérine/thréonine protéines kinases (Pearson *et al.*, 2001). La cascade classique d'activation de cette famille commence par une petite protéine G (Ras ou Rho) qui stimule MAPKKKK (ou MKKKK) qui va activer la MAPKKK conduisant à l'activation de la MAPKK. Cette dernière active la MAPK qui phosphoryle les Ser et Thr de nombreux substrats. Les plaquettes sanguines contiennent les MAPK suivantes : ERK1/2 (ou p42/p44 MAPK) (Papkoff *et al.*, 1994), JNK1 (Bugaud *et al.*, 1999) et les p38 MAPK α , β , γ et δ (Börsch-Haubold *et al.*, 1999). Ces dernières sont activées par phosphorylations de la Thr180 et de la Tyr182 en réponse à de nombreux stimuli de stress endogènes et exogènes dont l'hyperglycémie, le stress oxydant, le stress osmotique, les cytokines proinflammatoires, les

protéines « heat shock » et les UV (Tibbles and Woodgett, 1999). Au cours de l'activation plaquettaire, la thrombine (Kramer *et al.*, 1995), le collagène (Saklatvala *et al.*, 1996), l'ADP (Dangelmaier *et al.*, 2000), le vWF (Canobbio *et al.*, 2004) et le TxA₂ (Saklatvala *et al.*, 1996) peuvent activer les p38 MAPK. L'un de leurs substrats majeurs est la phospholipase A₂ IV A (Börsch-Haubold *et al.*, 1998) (**Figure 15**).

La PLA₂ IV A.

La PLA₂ IV A fait partie de la superfamille des phospholipases A₂ (PLA₂) comprenant les sPLA₂ sécrétées, les cPLA₂ cytosoliques, les iPLA₂ indépendantes du Ca²⁺, les « platelet activating factor » (PAF) acétylhydrolases et les PLA₂ lysosomales (Burke and Dennis, 2009). Ces enzymes catalysent l'hydrolyse spécifique de la liaison ester en position *sn*-2 des PL pour former un acide gras libre et un lysophospholipide. Les cPLA₂ possèdent une dyade catalytique Ser/Asp et ont besoin de Ca²⁺ (concentration submicromolaire) pour leur activité. Parmi les cPLA₂, la PLA₂ IV A (ou cPLA₂ α) (85 kDa), présente dans les plaquettes sanguines (Kramer *et al.*, 1986), clive préférentiellement les PL contenant l'AA (Clark *et al.*, 1991). Pour être active, elle doit être transloquée à la membrane et phosphorylée. Tout d'abord, la présence de Ca²⁺ et son interaction avec un domaine de liaison aux lipides (CaLB) permet sa translocation du cytosol à la membrane (Evans *et al.*, 2001). Cependant, sa liaison avec des messagers lipidiques secondaires comme le PI(4,5)P₂ ou le céramide 1-phosphate augmentent son activité catalytique indépendamment du Ca²⁺ (Mosior *et al.*, 1998) et son temps de résidence à la membrane (Subramanian *et al.*, 2007). Ensuite, la phosphorylation de la Ser⁵⁰⁵ par la p38 MAPK est le deuxième facteur essentiel à l'activation de la PLA₂ IV A (Börsch-Haubold *et al.*, 1998). Une fois transloquée et activée, elle libère l'AA des PL membranaires (**Figure 15**).

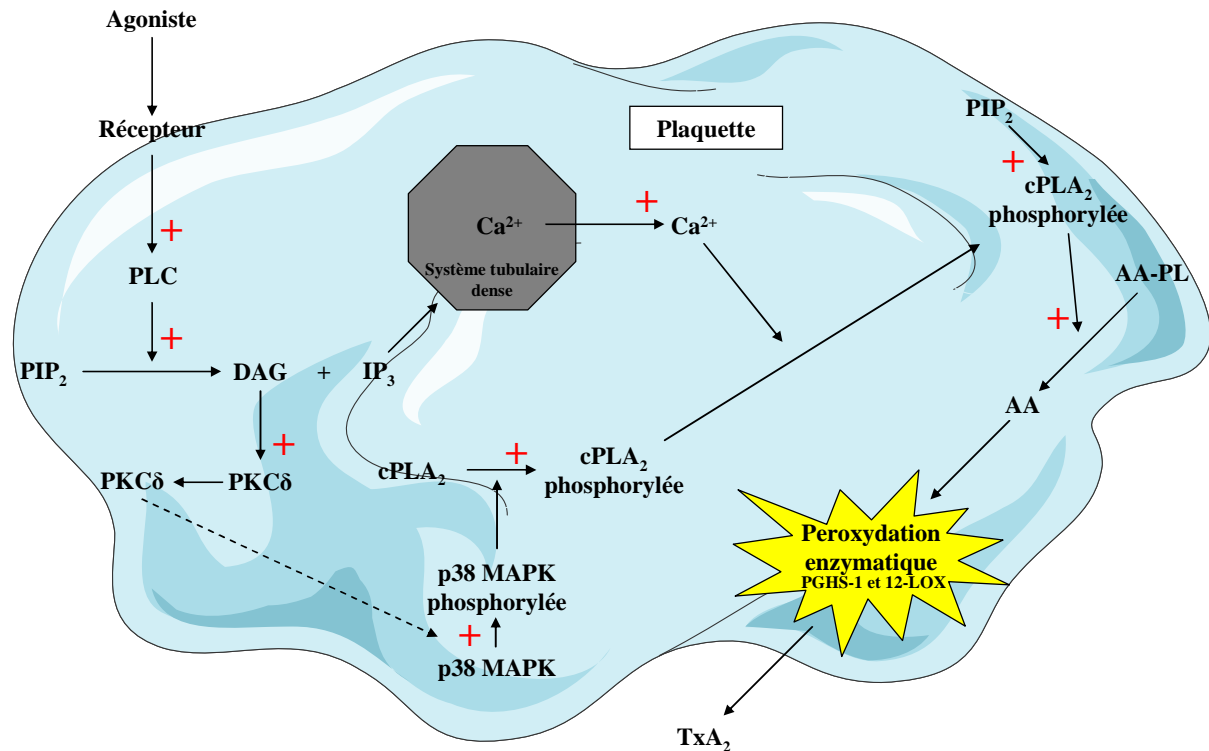


Figure 15 : Mécanismes conduisant à la libération de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires par la phospholipase A₂ cytosolique lors de l'activation plaquettaire.

PLC, phospholipase C; PIP₂, phosphatidylinositol (4,5) bis phosphate; DAG, 1,2-diacylglycérol; IP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate; PKC, protéine kinase C; MAPK, « mitogen-activated protein kinase »; cPLA₂, phospholipase A₂ cytosolique; Ca²⁺, calcium; AA-PL, acide arachidonique estérifié dans un phospholipide; AA, acide arachidonique non estérifié; PGHS-1, prostaglandine H synthase; 12-LOX, 12-lipoxygénase; TxA₂, thromboxane A₂.

Peroxydation enzymatique de l'acide arachidonique :

L'AA est métabolisé en différentes molécules biologiquement actives par les voies des prostaglandine H synthase (PGHS), 12-lipoxygénase et époxygénase.

La voie de la prostaglandine H synthase.

La PGHS (70kDa) est une enzyme ubiquiste bifonctionnelle possédant une activité cyclooxygénase et une activité hydroperoxydase. Elle est spécifique des AG à 20 carbones possédant 3 doubles liaisons en 8, 11 et 14 (tels l'acide dihomo- γ -linoléinique, l'AA et l'acide eicosapentaénoïque) et permet la production de différentes prostaglandines (PG) selon le type cellulaire où elle s'exprime (Smith *et al.*, 1991). Il existe deux isoformes de PGHS: PGHS-1, constitutive et PGHS-2, inductible. Les plaquettes n'expriment que PGHS-1 (Vane *et al.*,

1998). L'AA non estérifié est métabolisé par PGHS-1, de manière régio- et stéréo-isomère spécifique (Schneider *et al.*, 2007), en PGG₂ (activité cyclooxygénase) puis en PGH₂ (activité hydroperoxydase) (**Figure 16**). PGH₂ est converti en TxA₂ par la thromboxane synthase (Needleman *et al.*, 1976). Au cours de la réaction, de l'acide heptadécatriénoïque et du MDA (Haurand and Ullrich, 1985) sont produits simultanément. Contrairement au TxA₂, ces derniers peuvent également être produits non enzymatiquement. Le TxA₂ diffuse ensuite à travers la membrane plasmique pour agir de manière autocrine ou paracrine sur les cellules à proximité de son lieu de production. C'est un métabolite ayant une demi-vie d'environ 30 secondes, rapidement hydrolysé en TxB₂ inactif (Hamberg *et al.*, 1975). Il provoque diverses réactions physiopathologiques dont l'activation, le changement de forme, l'agrégation et la sécrétion plaquettaires promouvant la formation du thrombus.

La PGH₂ peut également être prise en charge par diverses prostaglandine synthases pour former les prostaglandines primaires PGE₂, PGD₂ et PGF_{2α}.

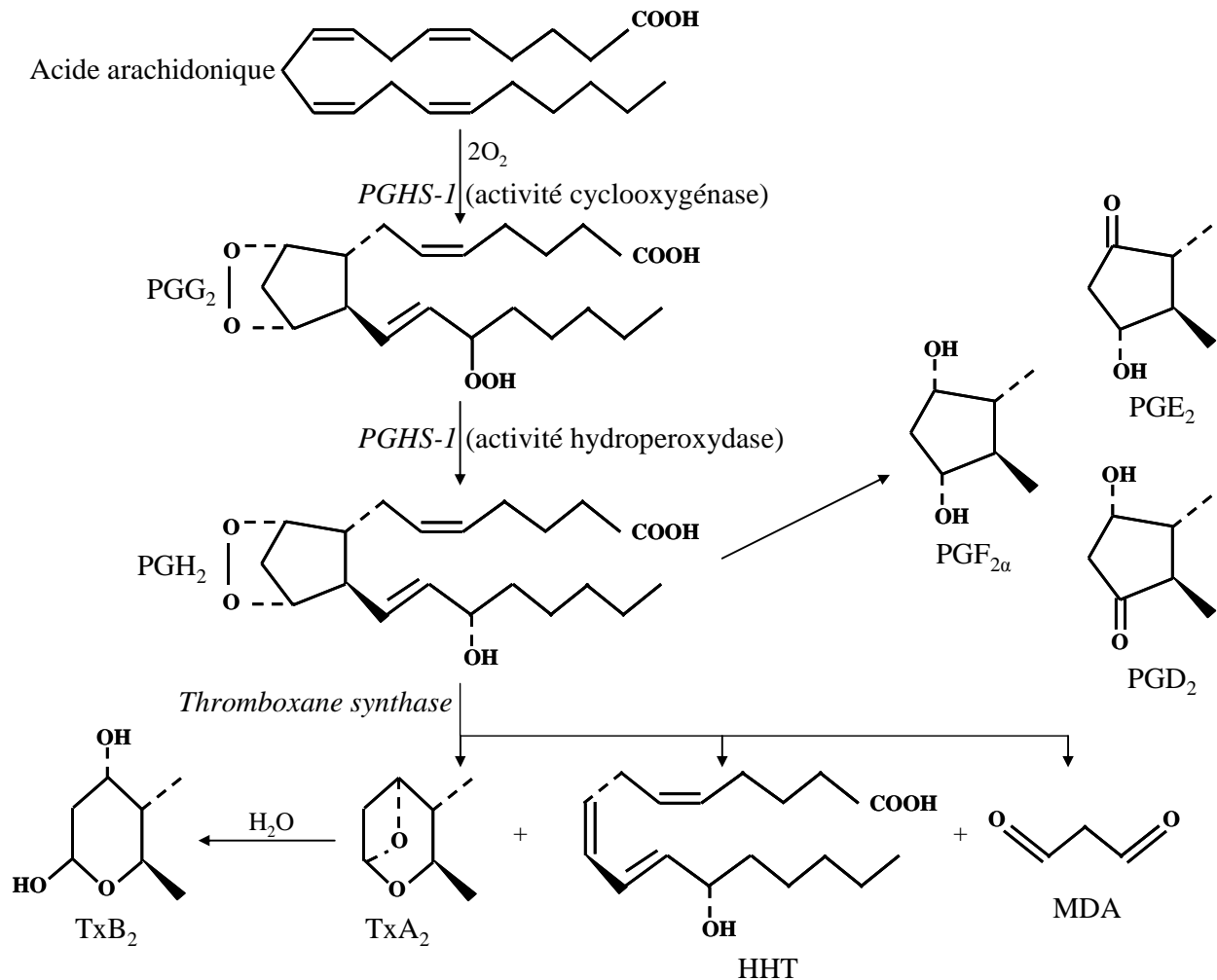


Figure 16 : Peroxydation enzymatique de l'acide arachidonique dans les plaquettes sanguines par la PGHS-1.

Pour les $PGF_{2\alpha}$, E_2 , D_2 , TxA_2 et B_2 , la suite de la structure est identique à celle de la PGH_2 . MDA, dialdéhyde malonique; PGHS-1, prostaglandine H synthase-1; PG, prostaglandine; TxA_2/B_2 , thromboxane A_2/B_2 ; HHT, acide heptadécatriénoïque.

La voie des lipoxygénases.

Les lipoxygénases (LOXs) sont des enzymes catalysant l'addition stéréospécifique d'une molécule d'oxygène sur des AGPI de structure 1,4-cis,cis pentadiène pour former des hydroperoxydes d'AG. Ces derniers sont ensuite réduits par la glutathion peroxydase cytosolique en AGOH. Il existe 3 isoformes de LOXs nommées selon le carbone de l'AA où a lieu l'addition (Spector *et al.*, 1988): les 5-, 12- et 15-LOX. Les plaquettes ne contiennent que la 12-LOX (Hamberg and Samuelsson, 1974). Elle convertit l'AA non estérifié en acide 12(S)-hydroperoxy-eicosatétraénoïque (12(S)-HpETE) réduit en acide 12(S)-hydroxy-eicosatétraénoïque (12(S)-HETE) par la glutathion peroxydase cytosolique. De faibles

concentrations de 12-HpETE activent la PGHS-1 (Calzada *et al.*, 1997) et la 12-LOX (Croset and Lagarde, 1985).

La voie des époxygénases du cytochrome P450.

Ces enzymes catalysent la formation d'époxydes par insertion d'un atome d'oxygène au niveau d'une double liaison de l'AA non estérifié pour former des acides époxyeicosatriénoïques ensuite hydrolysés par des époxydes hydrolases en acides dihydroxyeicosatriénoïques (Spector *et al.*, 2004). Mineurs au niveau des plaquettes (Lagarde, 1988), certains des produits formés régulent négativement le Ca^{2+} intracellulaire en réponse au collagène (Zhang *et al.*, 2008) et inhibent l'agrégation plaquettaire (Heizer *et al.*, 1991).

II.2.d. Synthèse de protéines :

Bien que les plaquettes n'aient pas de noyau et d'ADN, elles contiennent des ARNm hérités des mégacaryocytes et peuvent synthétiser des protéines. A titre d'exemple, les plaquettes contiennent l'ARN pré-messager (pré-ARNm) du facteur tissulaire (TF), facteur essentiel dans la cascade de coagulation conduisant à la formation de thrombine et de fibrine. Lors de l'activation, le pré-ARNm est épissé et permet la production de TF (Schwartz *et al.*, 2006). Plus généralement, durant l'activation, un mécanisme d'épissage de pré-ARNm, signal dépendant, permet la synthèse *de novo* de protéines dont IL-1 β , PAI-1, COX-1 et le « B-cell lymphoma » (Bcl-3) (Weyrich *et al.*, 2009).

II.2.e. Sécrétion plaquettaire :

La dégranulation est un mécanisme important amplifiant l'activation plaquettaire (Reed *et al.*, 2000). Elle se déroule en 2 temps. On observe d'abord la libération du contenu des granules denses et α puis la libération du contenu des lysosomes. La libération d'ADP, de sérotonine et de calcium des granules denses est un événement-clé dans les fonctions plaquettaires et dans le recrutement de nouvelles plaquettes. La translocation des protéines d'adhésion présentes dans les granules α (P-selectine, GPIIb/IIIa) perpétue et amplifie le processus d'adhésion.

II.2.f. Activité procoagulante des plaquettes :

L'activation plaquettaire et l'activation de la cascade de coagulation sont des processus complémentaires et imbriqués. La sécrétion plaquettaire fournit des facteurs de coagulations additionnels (fibrinogène). Lors d'une activation forte, les plaquettes contribuent à la formation de la thrombine par le complexe prothrombinase. L'exposition de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane plasmique des plaquettes est essentielle à leur activité procoagulante (Heemskerk *et al.*, 2002).

II.3. Agrégation :

L'agrégation est l'étape qui conduit en quelques minutes à l'accumulation de plaquettes formant le thrombus blanc. Cette accumulation est basée sur de multiples interactions plaquettes/plaquettes et est médiée par des substrats d'adhésion liés aux membranes des plaquettes.

Il existe trois mécanismes distincts pouvant initier l'agrégation plaquettaire en fonction des conditions de forces de cisaillement. A des forces inférieures à 1000 s^{-1} , le fibrinogène engagé à la surface des plaquettes adhérentes interagit avec le récepteur GPIIb/IIIa des plaquettes circulantes permettant la formation de ponts interplaquettaires. Les agonistes solubles produits par la suite permettent un changement de forme et une augmentation de l'activation de GPIIb/IIIa stabilisant le thrombus. A des forces comprises entre 1000 s^{-1} et 10000 s^{-1} , GPIIb/IIIa et GPIb α interviennent en liant le fibrinogène et le vWF. Au-delà de 10000 s^{-1} , seuls GPIb α et le vWF (soluble et immobilisé) sont requis (Jackson, 2007).

Quel que soit l'élément déclencheur (ADP, thrombine, collagène ou vWF), l'agrégation plaquettaire est régulée dans sa phase finale par l'activation du récepteur GPIIb/IIIa, protéine la plus abondante à la surface des plaquettes. C'est un α/β hétérodimère de 1008 (α) et 762 (β) acides aminés. Chaque sous-unité comprend un petit domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire et un large domaine extracellulaire permettant la liaison, en présence de cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} et Mn^{2+}), des ligands dont le fibrinogène, le vFW (liant les plaquettes ensemble), la vitronectine et la fibronectine (modulant l'agrégation). L'activation de GPIIb/IIIa nécessite un changement conformationnel des deux sous-unités le composant, passant ainsi d'une faible affinité à une forte affinité pour

ses ligands (*Figure 17*). De nombreux agonistes plaquettaires interagissent avec sa partie cytoplasmique. Parmi eux, la taline, une protéine cytosolique abondante (3% de la totalité des protéines plaquettaires) composée de deux sous-unités (taline-H et taline-R), est capable, une fois exposée, de lier les intégrines à l'actine du cytosquelette, initiant le réarrangement du domaine extracellulaire. Trois voies permettent cette activation: d'une part, l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique active la calpaïne qui clive la taline, d'autre part, l'activation de Rab1 *via* la PKC facilite l'association de « Rab1 Interacting Adaptator Molecule » (RIAM) à la taline et permet sa liaison à GPIIb/IIIa et enfin, les sites de liaison de la taline peuvent être exposés suite à sa liaison à PIP_2 (Ma *et al.*, 2007). Une fois activé (signalisation « inside-out »), GPIIb/IIIa est à son tour capable de déclencher un signal (signalisation « outside-in »). Sa liaison avec du fibrinogène conduit à la phosphorylation de son domaine cytoplasmique, déclenchant la formation de nombreux complexes avec des protéines du cytosquelette et de signalisation, conduisant par exemple à l'activation de la PI-3 kinase et à celle de GPIa-IIa ($\alpha_2\beta_1$), liant le collagène. Cette boucle de rétro-contrôle positive contribue à la stabilisation du thrombus.

Cependant, l'activation de GPIIb/IIIa peut être réversible. Ainsi, l'activation plaquettaire *via* $P2Y_{12}$ provoque une activation transitoire de GPIIb/IIIa passant par les PI-3 kinases β et γ et Rab1b. GPIIb/IIIa peut également être inactivé de manière secondaire par une exposition prolongée à des concentrations élevées de Ca^{2+} . Les plaquettes n'adhèrent plus, retrouvent une forme sphérique et exposent leurs PS au niveau du feuillet membranaire externe. Dans un thrombus, seule une sous-population de plaquettes développe ce phénotype. Dites pro-coagulantes, elles offrent un accès optimal aux facteurs de coagulation plasmatiques.

Par contre, la stimulation par des agonistes forts (collagène et thrombine) conduit à des agrégats plaquettaires moins susceptibles de se disloquer (Cosemans *et al.*, 2008).

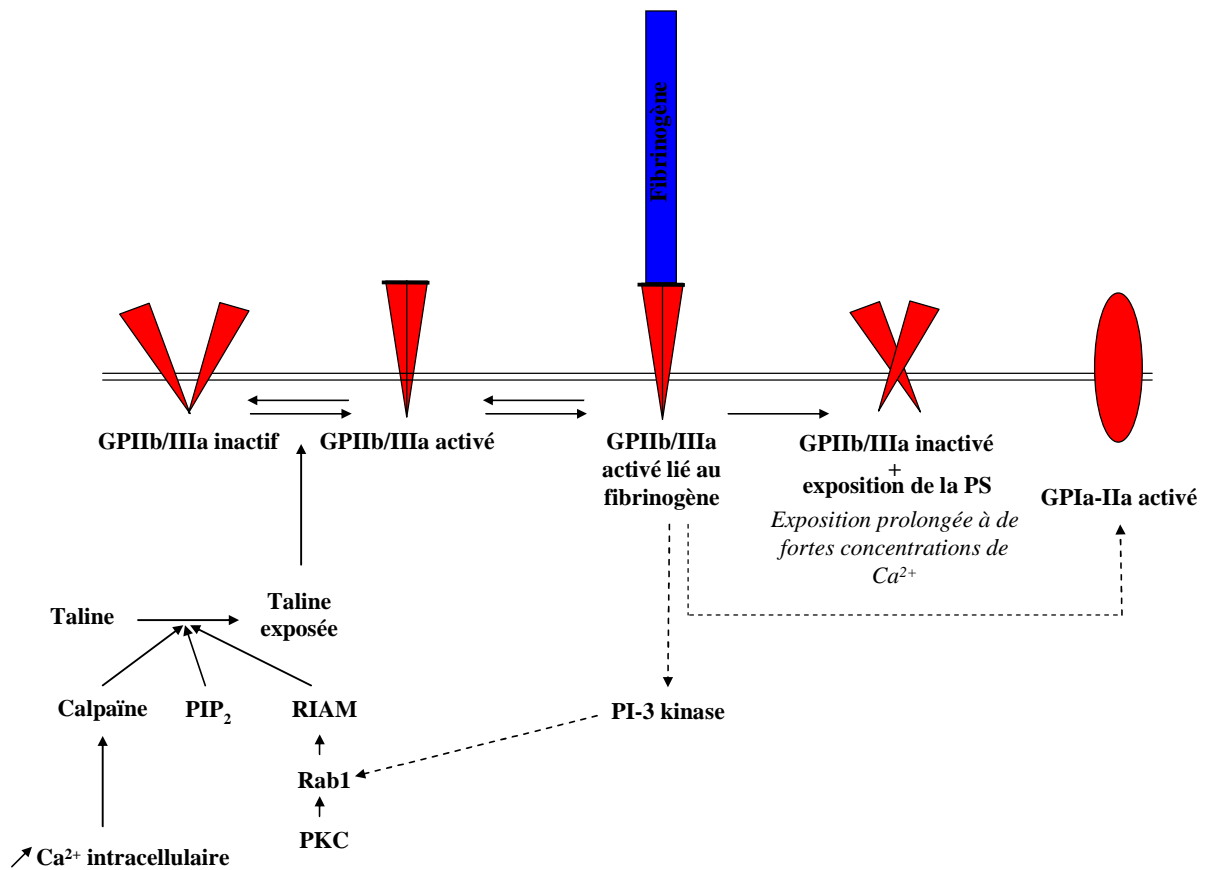


Figure 17 : Schéma des différentes voies d'activation de GPIIb/IIIa plaquettaire.

Modifié à partir de Ma (Ma et al., 2007) et Cosemans (Cosemans et al., 2008). Ca²⁺, Calcium; PKC, Protéine kinase C; PI, Phosphatidylinositol; PIP₂, phosphatidylinositol bisphosphate; PS, phosphatidylsérine; RIAM, « Rab1 Interacting Adaptator Molecule ».

III. Plaquettes et stress oxydant :

Les plaquettes ont la capacité de produire des ERO. L'activation des plaquettes par des agonistes s'accompagne d'une explosion de la consommation d'oxygène (Bressler *et al.*, 1979) et d'une augmentation transitoire du glutathion oxydé (Burch and Burch, 1990). Les plaquettes quiescentes ou activées génèrent des anions superoxyde (Marcus *et al.*, 1977). De plus, les plaquettes stimulées par le collagène libèrent du H₂O₂ (Pignatelli *et al.*, 1998) et des radicaux HO[•] (Pratico *et al.*, 1999). Les sources d'ERO incluent la cyclooxygénase, la lipoxygénase (Singh *et al.*, 1981) et la NADPH oxydase (Seno *et al.*, 2001) dont l'activation stimule la libération d'anions superoxyde. Ces derniers augmentent alors le recrutement de plaquettes sur le site de formation du thrombus (Krotz *et al.*, 2002).

Les ERO modulent les fonctions plaquettaires. Il a été montré que des plaquettes exposées aux ERO générés par le système xanthine/xanthine oxydase agrègent et libèrent leur contenu en sérotonine et qu'une exposition chronique sensibilise la réponse plaquettaire à la

thrombine (Handin *et al.*, 1977). En cohérence avec ces observations, la SOD inhibe l'adhésion et l'agrégation de plaquettes stimulées par la thrombine (Salvemini *et al.*, 1989).

Des concentrations micromolaires d'H₂O₂ stimulent l'agrégation plaquettaire en augmentant la formation de cGMP via la guanylate cyclase, alors que des concentrations millimolaires d'H₂O₂ l'inhibent (Ambrosio *et al.*, 1994; Rodvein *et al.*, 1976). D'ailleurs, l'agrégation plaquettaire induite par le collagène est associée à une production d'H₂O₂ plaquettaire qui pourrait agir comme un messager secondaire en libérant de l'acide arachidonique via les PLA₂ et PLC et en augmentant la formation de thromboxane A₂ (Pignatelli *et al.*, 1998). H₂O₂ facilite la phosphorylation du récepteur GPIIb/IIIa, indispensable à l'adhésion et l'agrégation plaquettaire (Irani *et al.*, 1998). Des concentrations nanomolaires de 12-HpETE potentialisent l'agrégation des plaquettes stimulées par le collagène et activent la cascade enzymatique de l'AA (p38 MAPK, cPLA₂, PGHS) (Calzada *et al.*, 2001; Coulon *et al.*, 2003).

Le stress oxydant apparaît donc comme intimement lié à la physiologie plaquettaire.

IV. Plaquettes et maladies métaboliques :

De nombreuses études montrent que les plaquettes de diabétiques (type-1 et 2) sont hyperagrégables (Bensoussan *et al.*, 1975; Manduteanu *et al.*, 1992) même en l'absence de complications cardiovasculaires (Véricel *et al.*, 2004). L'hyperactivation plaquettaire est associée à une augmentation du TxA₂ dans les plaquettes non stimulées de patients diabétiques (type-1 et 2) (Véricel *et al.*, 2004; Ziboh *et al.*, 1979). De plus, les plaquettes de diabétiques expriment à leur surface plus de GPIb et GPIIb/IIIa (Tschoepe *et al.*, 1990), indiquant l'augmentation de la liaison des protéines d'adhésion (dont le vWF et le fibrinogène) à ces récepteurs. L'hyperglycémie augmente la production d'ERO dans les plaquettes humaines, en particulier la production d'anion superoxyde, potentialisant l'agrégation des plaquettes stimulées par le collagène et la libération de PDGF (Yamagishi *et al.*, 2001). L'hyperglycémie induit la glycation non enzymatique des protéines de surface, diminuant la fluidité de la membrane et augmentant l'activation plaquettaire (Winocour *et al.*, 1992). L'induction de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie chez des sujets non diabétiques augmente la sensibilité des plaquettes (Vaidyula *et al.*, 2006). De façon cohérente, l'amélioration du contrôle glycémique de diabétiques de type-2 diminue cette sensibilité (Yngen *et al.*, 2006).

Quelques études récentes indiquent que les plaquettes de sujets ayant un syndrome métabolique sont hyperactives (Vaduganathan *et al.*, 2008; Vaidya *et al.*, 2009) et ont un volume plaquettaire augmenté (Tavil *et al.*, 2007). Parmi les facteurs associés au syndrome métabolique, l'hypertension artérielle diastolique est associée à une plus grande sensibilité des plaquettes à l'ADP (Nityanand *et al.*, 1993). L'obésité abdominale est associée à une hyperactivation plaquettaire objectivée par l'augmentation de l'excrétion urinaire du 11-dehydro-TxB₂ (Davi *et al.*, 2002) et la moindre sensibilité aux anti-agrégants plaquettaires (Anfossi *et al.*, 2009). La résistance à l'insuline des personnes susceptibles de faire un diabète et la déficience en insuline altèrent les fonctions plaquettaires. En effet, l'insuline diminue l'agrégation des plaquettes induite par divers agonistes (collagène, ADP, épinéphrine et PAF) (Westerbacka *et al.*, 2002). Ainsi, une résistance à l'insuline ou l'absence d'insuline contribuent à augmenter la réactivité plaquettaire.

LES LIPOPROTEINES

I. Métabolisme général des lipoprotéines :

Les graisses alimentaires et les lipides endogènes synthétisés par le foie doivent être transportés entre les tissus et les organes pour y être métabolisés. Ce transport plasmatique est assuré par les lipoprotéines. Ce sont des macromolécules de taille et de composition variables mais dont la structure générale est identique. Elles sont constituées d'un cœur lipidique hydrophobe (TG et EC) entouré d'une monocouche de lipides polaires (PL et cholestérol libre). Des protéines structurales spécifiques appelées apolipoprotéines sont insérées dans la monocouche et assurent d'une part la cohésion du complexe lipoprotéique et sa solubilisation et d'autre part son devenir métabolique (co-facteurs et/ou activateurs d'enzymes, ligand des protéoglycanes endothéliaux, ligands de récepteurs). Les lipoprotéines sont généralement classées selon leurs densités, leurs tailles ou leurs compositions protéiques (*Tableau 4*).

Lipoprotéines	Chylomicrons	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densité (g/mL)	< 0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,21
Taille (nm)	75-1200	30-80	25-35	18-25	5-12
Protéines (%)	2	8	14	22	45
Lipides (%)	98	92	86	78	55
Principaux lipides	TG	TG	TG	Cholestérol	PL
Principales apolipoprotéines	B-48, C-I, II et III, E	B-100, C-I, II et III, E	B-100, E	B-100	A-I, II et IV, C-I et III, E
Temps de demi-vie	6 minutes	6 heures	-	4 jours	6 jours

Tableau 4 : Caractéristiques physiques et biochimiques des lipoprotéines du plasma humain.

Adapté d'après le « *Traité de nutrition artificielle de l'adulte* » (Cano et al., 2007). HDL, « *High Density Lipoproteins* »; IDL, « *Intermediary Density Lipoproteins* »; LDL, « *Low Density Lipoproteins* »; PL, *phospholipides*; TG, *triacylglycérols*; VLDL, « *Very Low Density Lipoproteins* ».

Les lipides, émulsifiés grâce aux sels biliaires, sont hydrolysés dans le duodénum en monoglycérides, acides gras, cholestérol et lysophospholipides par les enzymes pancréatiques (lipases, phospholipases et cholestérol estérases) pour être absorbés par les entérocytes. Dans ces derniers, les lipides sont synthétisés de nouveau par la voie de Kennedy pour les

phospholipides et par la voie de Clark et Hubscher pour les TG. Les chylomicrons sont synthétisés par les entérocytes avec une partie très riche en TG, peu d'EC et une monocouche de PL et de cholestérol libre. Enchâssées dans cette monocouche, on trouve les apolipoprotéines B-48 et C-III. Ces chylomicrons sont drainés *via* le système lymphatique jusqu'au sang veineux où ils s'enrichissent en apolipoprotéines C-II et E. La lipoprotéine lipase (LPL), reconnaissant l'apoC-II, hydrolyse très rapidement leurs TG. Les particules de chylomicrons sont alors déstabilisées et libèrent des HDL naissantes composés de PL, de cholestérol, d'apoC et d'apoA. Les chylomicrons résiduels, enrichis en apoB-48 et E, se reforment autour des molécules d'EC et de TG et sont dégradés par le foie qui les capte grâce à des récepteurs reconnaissant l'apoE.

La synthèse des VLDL est réalisée de façon continue par le foie. Ce sont des particules riches en TG contenant les apoB-100, C-I, C-II, C-III et E. Leur dégradation plasmatique est identique à celle des chylomicrons. La diminution du contenu en TG conduit à la libération des apoC. Les VLDL résiduelles, appelés « Intermediary density lipoproteins » (IDL), peuvent alors suivre deux voies métaboliques. Une grande partie est internalisée puis dégradée par les hépatocytes grâce aux récepteurs B/E reconnaissant l'apoE et l'apoB-100. Une quantité plus faible est dégradée dans la circulation par la lipase hépatique pour former des LDL. Le plasma de personnes normolipidémiques a une concentration en LDL d'environ 1 mg protéine/mL. Ces dernières transportent environ 60 % de l'ensemble du cholestérol circulant dans le sérum (Myant, 1990). Par la suite, les LDL sont captées par les mêmes récepteurs que les IDL au niveau hépatique mais aussi au niveau des cellules périphériques (Brown and Goldstein, 1979), où elles délivrent leur cholestérol (*Figure 18*).

Les HDL naissantes ont une structure discoïdale composée d'une couche unique repliée sur elle-même de PL, de cholestérol et d'apolipoprotéines. Leur origine est mixte. Elles peuvent être soit tissulaires, sécrétées par le foie, et essentiellement composées d'apoE, soit plasmatiques, formées lors de la déstabilisation des chylomicrons et des VLDL, et sont principalement composées d'apoA-I et C. Les HDL discoïdales s'enrichissent en cholestérol provenant des cellules périphériques. Ce dernier est estérifié grâce à la « Lecithin Cholesterol Acyl Transferase » (LCAT), le faisant passer de l'enveloppe au cœur des HDL qui deviennent ainsi des HDL3. En s'enrichissant en cholestérol, les HDL3 deviennent des HDL2, plus grandes et moins denses. Ces dernières sont dégradées par les hépatocytes grâce aux récepteurs reconnaissant l'apoA-I. Le cholestérol transporté au foie est éliminé dans la bile.

Deux protéines de transfert permettent des échanges entre les différentes lipoprotéines. La « Cholesterol Ester Transfer Protein » (CETP), associée aux HDL, catalyse le transfert du cholestérol estérifié des HDL2 vers les lipoprotéines riches en apoB100 (VLDL, IDL et LDL) et celui inverse des TG. La « Phospholipid Transfer Protein » (PLTP) assure le transfert des PL, du cholestérol, de l' α -tocophérol et des lipopolysaccharides entre les lipoprotéines.

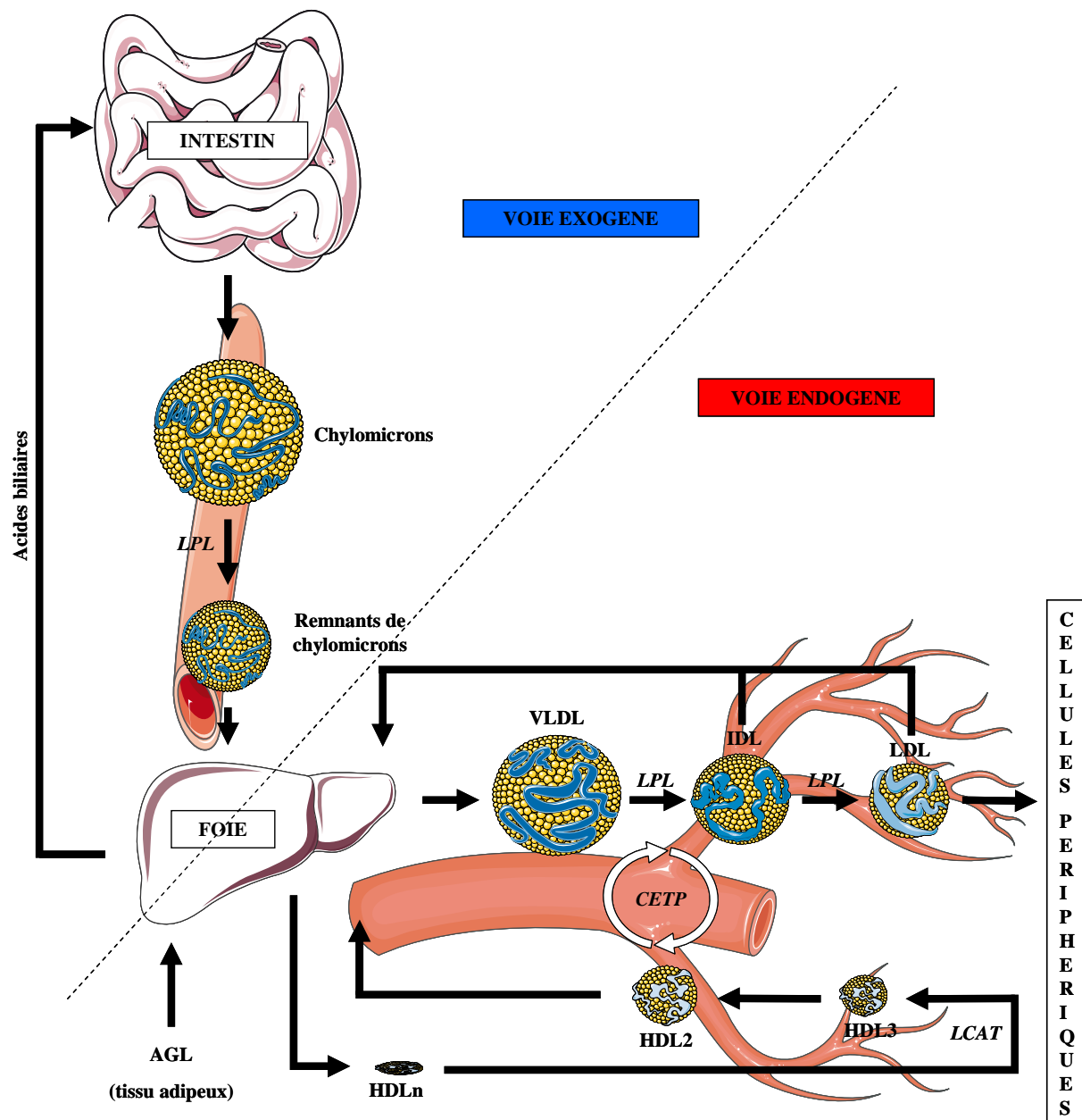


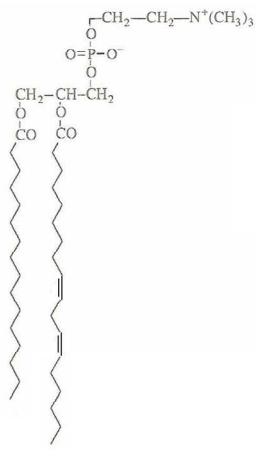
Figure 18 : Métabolisme des lipoprotéines.

CETP, « Cholesterol Ester Transfer Protein »; *HDL*, « High Density Lipoproteins; *IDL*, « Intermediary Density Lipoproteins »; *LCAT*, « Lecithin Cholesterol Acyl-Transferase »; *LDL*, « Low Density Lipoproteins »; *LPL*, lipoprotéine lipase; *VLDL*, « Very Low Density Lipoproteins »

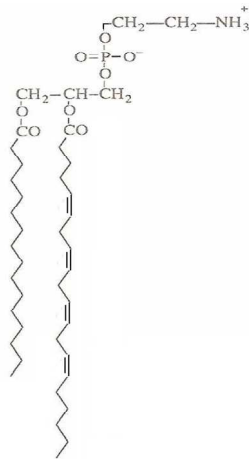
II. Les LDL :

II.1. Composition :

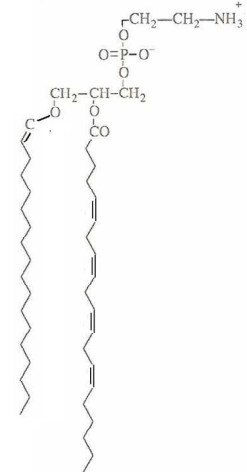
Les LDL ont un diamètre compris entre 19 et 25 nm et leur masse moléculaire varie de 1,8 à 2,8 MDa. Leur densité se situe entre 1,019 et 1,063. Leur cœur est composé d'environ 1600 molécules d'esters de cholestérol et 170 molécules de triacylglycérols. Il est enveloppé dans une monocouche comprenant 700 molécules de phospholipides (principalement des phosphatidylcholines et une petite quantité de phosphatidyléthanolamines, sphingomyélines et lysophosphatidylcholines) ainsi que 600 molécules de cholestérol (*Figure 19*). Les têtes polaires des PL sont localisées à la surface de la particule et contribuent à la solubilité des LDL en milieu aqueux (Esterbauer *et al.*, 1992). Environ la moitié de leurs acides gras sont polyinsaturés, principalement l'acide linoléique (18:2n-6) et en plus petites quantités, les acides arachidonique et docosahexaénoïque (Esterbauer *et al.*, 1992) (*Tableau 5*). Ceux-ci sont protégés contre l'attaque des radicaux libres et de l'oxydation par différents antioxydants. On trouve majoritairement l' α -tocophérol (6 molécules par LDL) mais aussi, en plus petites quantités, le γ -tocophérol, le β -carotène, l' α -carotène, le lycopène, la cryptoxanthine, la cantaxanthine, la lutéine, la zéaxanthine, le phytofluène et l'ubiquinol-10 (Esterbauer *et al.*, 1992). La présence dans les LDL de plasmalogènes à PE (1-O-alkényl-2-acyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamines) (Vance, 1990), aux propriétés antioxydantes (Zoeller *et al.*, 1988), pourrait également contribuer à leur résistance à l'oxydation. Les concentrations en acides gras polyinsaturés et en antioxydants sont très variables d'un individu à l'autre (Esterbauer *et al.*, 1992).



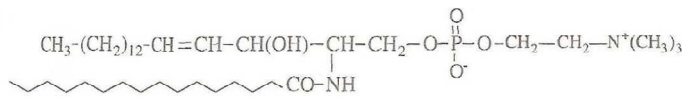
1,2-diacyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine



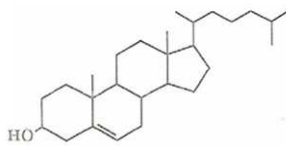
1,2-diacyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine



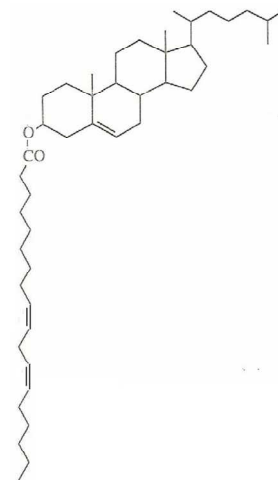
1-O-alkényl-2-acyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine



sphingomyéline



cholestérol



acyl-cholestérol

Figure 19 : Principaux lipides présents dans les LDL.

Catégorie	Formule	Nom commun ou IUPAC
Acides Gras Saturés (AGS)	16 :0	acide palmitique
	18 :0	acide stéarique
	20 :0	acide arachidique
	22 :0	acide béhénique
	24 :0	acide lignocérique
Acides Gras Mono-Insaturés (AGMI)	16:1n-7	acide 9-cis-hexadécénoïque
	16:1n-9	acide palmitoléique
	18:1n-7	acide 11-cis-octadécénoïque
	18:1n-9	acide oléique
	20:1n-9	acide eicosénoïque
	22:1n-9	acide érucique
	24:1n-9	acide nervonique
Acides Gras Poly-Insaturés (AGPI)	18:2n-6	acide linoléique
	18:3n-3	acide α -linoléique
	18:3n-6	acide γ -linoléique
	20:3n-6	acide di-homo- γ -linoléique
	20:4n-6	acide arachidonique
	20:5n-3	acide eicosapentaénoïque
	22:5n-3	acide docosapentaénoïque
22:6n-3	acide docosahexaénoïque	

Tableau 5 : Classification et nomenclature des acides gras des LDL.

Enchâssée dans la monocouche amphiphile, l'apoB-100 est la principale apolipoprotéine des LDL. Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux de l'hépatocyte puis associée aux lipides endogènes grâce à la « Microsomal Triglyceride Transfer Protein » (MTTP) avant d'être excrétée avec les VLDL. Il s'agit d'une protéine non échangeable, très peu soluble dans la phase aqueuse, dont un seul exemplaire est présent par lipoprotéine. L'apoB-100 compte parmi l'une des protéines monomériques les plus grandes avec 4536 acides aminés. Sa glycosylation (mannose, galactose, glucosamine et acide sialique) représente entre 8 % et 10 % de sa masse moléculaire d'environ 550 kDa (Esterbauer *et al.*, 1992). L'apoB-100 est la seule lipoprotéine des LDL ayant une densité comprise entre 1,0271 et 1,0393. Cependant, pour des densités inférieures et supérieures, on trouve de l'apoE

(ratio apoE/apoB-100 allant de 1:60 à 1:8) et de l'apo[a] (ratio apo[a]/apoB-100 allant de 1:29 à 1:17), protéine majeure de la lipoprotéine[a]. De l'apoC-III est présente à l'état de traces pour des densités supérieures à 1,0358 (Chapman *et al.*, 1988). Une analyse protéomique des LDL révèle la présence des apolipoprotéines B100, C-II, C-III (3 isoformes), E (4 isoformes), A-I, A-IV, J et M (3 isoformes) ainsi que d'amyloïde sérique A-IV (2 isoformes), de calgranuline A et de lysozyme C (Karlsson *et al.*, 2005). Certaines apolipoprotéines échangeables sont plus spécifiquement présentes dans les sdLDL comme les apoE, C-I, C-III et A-I (Davidsson *et al.*, 2005).

Les PAF acétylhydrolases (PLA₂ VII et VIII) font partie de la superfamille des PLA₂ (cf. §II.2.c.γ La PLA₂ IV A). Elles hydrolysent la liaison ester en *sn*-2 du PAF, médiateur de l'inflammation, afin de l'inactiver (Prescott *et al.*, 2000). Les PAF-AH plasmatiques (PLA₂ VII) circulent pour les 2/3 avec les particules de LDL (une enzyme pour mille particules) et pour 1/3 avec une sous-fraction de HDL contenant l'apoE (Stafforini *et al.*, 1987). Elles sont principalement secrétées par les macrophages (Elstad *et al.*, 1989). Malgré leurs affinités pour les résidus acétyle ou les chaînes courtes, elles perdent cette restriction lorsque l'acide gras (AG) estérifié en *sn*-2 est oxydé. Ainsi, les PAF-AH plasmatiques sont capables d'hydrolyser les hydroperoxydes (Kriska *et al.*, 2007) et les F₂-isoprostanés (Stafforini *et al.*, 2006) estérifiées dans des PL et permettent ainsi la libération de dérivés d'acides gras réactifs dans la phase aqueuse, évitant qu'ils ne modifient les LDL et n'influent sur leur fonction et leur turnover. La destruction de ces PL oxydés permet d'éviter leur reconnaissance par les récepteurs au PAF (Marathe *et al.*, 1999) et par le CD36 (Podrez *et al.*, 2002).

II.2. Glycation et stress oxydant dans les LDL :

II.2.a. Glycation :

L'hyperglycémie conduit à une glycation des lipoprotéines (VLDL et LDL) et en particulier de l'apoB100. Le pourcentage d'apoB glyquée est augmenté (8 % vs 4 %) et corrélé au pourcentage d'HbA1c chez les diabétiques (Tames *et al.*, 1992). Cependant, la glycation des LDL est déjà présente chez des sujets non diabétiques (3,6 %) (Younis *et al.*, 2009) et des patients hyperlipidémiques non diabétiques (Akanji *et al.*, 2002). Les résidus lysine de l'apoB100 sont la cible majeure et une glycation de 2 à 5 % diminue le catabolisme des LDL de 5 à 25 % (Steinbrecher and Witztum, 1984). Récemment, il a été montré que,

chez des individus non diabétiques, 85 % de l'apoB plasmatique glyquée se trouve dans les LDL, 68 % de cette dernière se trouvant dans les sdLDL qui sont plus sensibles à la glycation que les LDL moins denses (Younis *et al.*, 2009). Les AGE liés à l'apoB sont augmentés et favorisent la susceptibilité des LDL à l'oxydation (Bucala *et al.*, 1993). La partie protéique n'est pas la seule à subir la glycation. Ainsi, les PL possédant un groupement amine (dont PE et PS) sont également une cible. La glycation et l'oxydation des LDL sont étroitement associés (glycoxydation) et probablement des phénomènes concomitants. Même en absence d'oxygène ou d'ERO, des RL peuvent être générés par la glycation elle-même à partir du glucose et des produits d'Amadori-PE (Oak *et al.*, 2000), favorisant ainsi une oxydation avancée (Sobal *et al.*, 2000).

II.2.b. Stress oxydant :

L'oxydation des LDL est un processus complexe (cf. Le stress oxydant, §II et §III) durant lequel les protéines ainsi que les lipides subissent des modifications oxydatives et forment de nombreux produits plus ou moins stables (**Figure 20**). La décomposition des peroxydes lipidiques génère des aldéhydes et des cétones qui se lient de façon covalente aux résidus lysine et histidine de l'apoB (Uchida *et al.*, 1994). Les radicaux hydroxyle, hydroperoxyde et superoxyde induisent la fragmentation de l'apoB; le radical hydroxyle génère aussi des pontages intra- et inter- moléculaires entre apoB (Bedwell *et al.*, 1989; Hashimoto *et al.*, 2002).

Le processus d'oxydation est interrompu par des antioxydants.

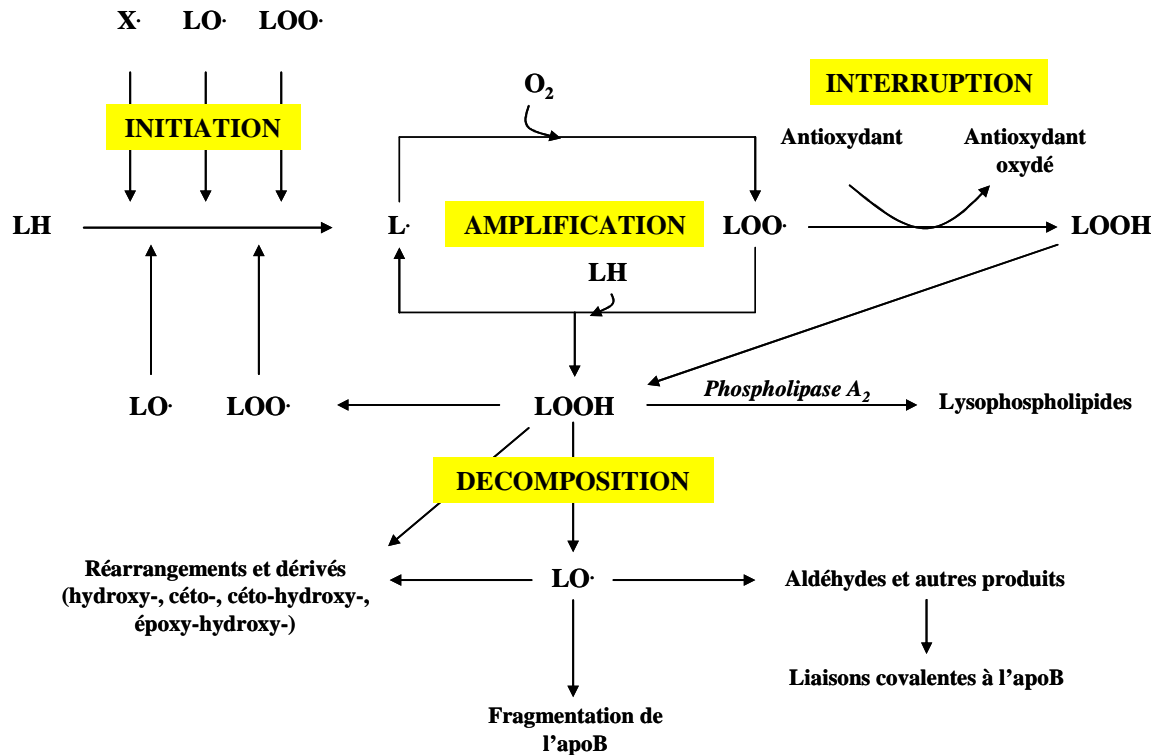


Figure 20 : Evénements majeurs ayant lieu durant l'oxydation des LDL.

D'après Esterbauer (Esterbauer et al., 1992). $L\cdot$, radical d'acide gras; LH , acide gras possédant des hydrogènes bisallyliques; $LO\cdot$, radical alkoxy; $LOO\cdot$, radical peroxy; $LOOH$, hydroperoxyde d'acide gras; $X\cdot$, radical pouvant soustraire un hydrogène à un LH .

II.3. Modification des LDL dans le syndrome métabolique et le diabète :

II.3.a. Syndrome métabolique :

La résistance à l'insuline a des effets sur la taille des lipoprotéines ainsi que sur la concentration des différentes sous-classes des LDL, avec une augmentation des sdLDL (Garvey et al., 2003) (**Tableau 6**). Lorsque la triglycéridémie est supérieure à 2 mM, on observe une augmentation des concentrations de sdLDL (de Graaf et al., 1993; Manzato et al., 1993). Or, ces concentrations des sous-classes de LDL semblent prédictives du risque cardiovasculaire (Blake et al., 2002). Le potentiel athérogène des sdLDL semble lié à différentes propriétés physicochimiques et métaboliques de ces particules dont une affinité diminuée pour leur récepteur (Campos et al., 1996; Galeano et al., 1994), augmentant leur temps de résidence plasmatique, et une plus grande susceptibilité à subir des modifications oxydatives (de Graaf et al., 1991; Tribble et al., 1992). Le syndrome métabolique est associé

à une augmentation des concentrations sériques de LDL oxydées (Holvoet *et al.*, 2004) et l'accentue chez les sujets obèses avec syndrome métabolique (Van Guilder *et al.*, 2006).

II.3.b. Diabète de type-1 et de type-2 :

Les anomalies lipidiques rencontrées lors du diabète de type-1 semblent liées au contrôle glycémique. Cependant, les sdLDL sont augmentées chez les diabétiques de type-1, indépendamment du contrôle glycémique (Guy *et al.*, 2009).

Le diabète de type-2 est associé à un ensemble d'anormalités des lipides plasmatiques et des lipoprotéines incluant notamment une augmentation des concentrations de sdLDL (Haffner, 2003) (*Tableau 6*). Lors du syndrome métabolique et du diabète de type-2, les sdLDL sont enrichies en apo-CIII, dont le contenu est corrélé à l'affinité pour le versican, un protéoglycane artériel (Davidsson *et al.*, 2005). Les diabétiques de type-2 montrent une plus grande susceptibilité à l'oxydation de leur LDL (Rabini *et al.*, 1994), corrélée à leur degré de glycosylation (Bowie *et al.*, 1993).

LDL (nmol/L)	Insulino-sensibles (n = 56)	Insulino-résistants (n = 46)	Diabétiques de type-2 (n = 46)
Totales	1201,5 ± 367,0	1435,0 ± 399,3*	1593,4 ± 504,4*
Larges	589,3 ± 324,5	533,6 ± 357,3	385,4 ± 417,8*
Intermédiaires	237,5 ± 315,6	213,3 ± 270,7	385,2 ± 424,5*
Petites (sdLDL)	365,6 ± 397,5	668,4 ± 599,1*	805,0 ± 711,7*

Tableau 6 : Concentrations des sous-classes de LDL chez des patients insulino-sensibles, insulino-résistants et diabétiques de type-2 déterminées par résonance magnétique nucléaire.

*D'après Garvey (Garvey *et al.*, 2003). Moyenne ± SD, *, P < 0,05 par rapport aux patients insulino-sensibles.*

II.4. LDL et plaquettes :

Une plaquette humaine non stimulée contient environ 1500 sites de liaison aux LDL (Koller *et al.*, 1982). Les lipoprotéines influent sur les fonctions plaquettaires (Surya and Akkerman, 1993) et les voies de signalisation activées ont été en partie caractérisées. L'incubation des plaquettes sanguines avec des LDL induit une hypersensibilité des plaquettes à ses agonistes, augmentant leur adhésion, la sécrétion de leurs granules ainsi que leur agrégation.

II.4.a. LDL natives et plaquettes :

Les plaquettes contiennent un récepteur aux LDL appelé ApoE-R2' (Lutters *et al.*, 2003) différent du récepteur classique des cellules extrahépatiques (Pedreno *et al.*, 1992). La reconnaissance se fait à grâce au site-B de l'apoB des LDL (Relou *et al.*, 2002). Il n'est pas encore connu si les LDL natives s'y lient simplement et restent à la surface des plaquettes ou si elles sont internalisées par endocytose. Les LDL altèrent les fonctions plaquettaires en induisant la resynthèse ou le remodelage des PL de la membrane cellulaire par insertion de PL circulants dans les LDL, changeant ainsi leur composition membranaire en PL (Engelmann *et al.*, 1996). Elles activent ApoE-R2', déclenchant une cascade de signalisations *via* au moins 4 voies (Akkerman, 2008) (**Figure 21**) :

Cascade de l'acide arachidonique.

La p38 MAPK, en amont de la cPLA₂, est rapidement activée par phosphorylation. Cependant, la production de TxA₂ est lente et insuffisante pour déclencher l'agrégation et la sécrétion indépendamment d'autres facteurs activateurs. Par contre, elle est suffisamment forte pour augmenter les réponses des plaquettes aux agonistes (ADP, collagène, thrombine) (Korporaal *et al.*, 2004).

PECAM-1.

Les LDL activent la protéine de 130 kDa PECAM-1 (=CD31) (10000 copies/plaquette). Il s'agit d'un récepteur régulant négativement la signalisation. Son activation inhibe la voie p38 MAPK en recrutant la phosphatase PP2A déphosphorylant soit directement la p38 MAPK soit une kinase en amont, la MKK3 (Relou *et al.*, 2003).

FAK.

Une troisième voie est l'activation de la kinase d'adhésion focale (FAK, « Focal Adhesion Kinase ») (Hackeng *et al.*, 1999). Il s'agit d'une tyrosine kinase ne possédant pas de récepteurs et servant de protéine d'ancrage pour le « Growth factor receptor-bound protein-

2 » (Grb2) (protéine adaptatrice) et une sous-unité de la PI-3 kinase dans différentes voies de signalisation (Hanks and Polte, 1997; Hitchcock *et al.*, 2008).

Rab1b.

Une quatrième voie de signalisation conduit à l'activation de la petite GTPase Rap1b (Hackeng *et al.*, 2000) dont un des rôles est d'activer GPIIb/IIIa (Stork and Dillon, 2005).

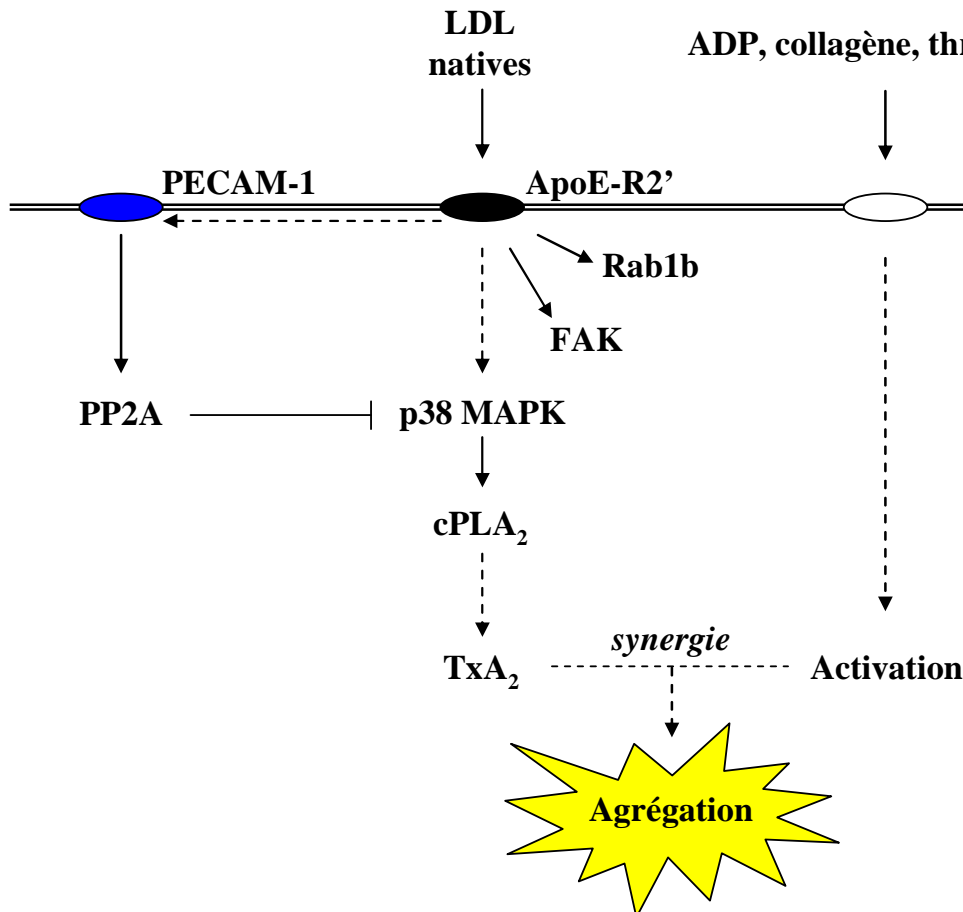


Figure 21 : Différentes voies d'activation des plaquettes par les LDL natives.

Adapté d'après Akkerman (Akkerman, 2008). ADP, adénosine diphosphate; cPLA₂, phospholipase A₂ cytosolique; FAK, « focal adhesion kinase »; LDL, « low density lipoproteins »; p38 MAPK, « p38 mitogen-activated protein kinase »; PECAM-1, « Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 »; PP2A, phosphatase PP2A; TxA₂, thromboxane A₂.

L'activation plaquettaire *via* la p38 MAPK prend fin après 10 minutes avec l'activation de PECAM-1. Ainsi, l'état de quiescence des plaquettes circulantes est maintenu par un équilibre entre la voie d'activation (p38 MAPK) et celle d'inhibition (PECAM-1).

II.4.b. LDL oxydées et plaquettes :

Les LDL oxydées ne sont pas seulement présentes dans l'intima de la paroi artérielle mais peuvent aussi se retrouver dans la circulation sanguine comme le montre la présence dans le plasma d'anticorps dirigés contre des épitopes spécifiques des LDL oxydées (Bellomo *et al.*, 1995). Les plaquettes peuvent donc être en contact avec ces LDL oxydées qui induisent un changement rapide de forme et l'agrégation des plaquettes (Maschberger *et al.*, 2000). Différents récepteurs peuvent intervenir dans la reconnaissance des LDL oxydées (**Figure 22**).

CD36 et SR-A.

Le récepteur CD36 (ou GPIV) (12000/plaquette) est une glycoprotéine transmembranaire de 88 kDa exprimée dans de nombreux types cellulaires dont les macrophages, les plaquettes et les cellules endothéliales (Asch *et al.*, 1987; Febbraio *et al.*, 2001). De la famille des récepteurs éboueurs B (SR-B, « scavenger receptor type B »), il joue un rôle important dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques tels que le métabolisme lipidique (transport d'AG), les réponses immunitaires innées, l'angiogenèse, l'athérogenèse, le diabète (Febbraio *et al.*, 2001) et l'activation plaquettaire (Aiken *et al.*, 1990). Le récepteur SR-A, exprimé dans les plaquettes, les monocytes et les macrophages, est un trimère de 77 kDa liant les LDL oxydées et acétylées (Suzuki *et al.*, 1997). Le CD36 plaquettaire est associé à des tyrosine kinases de la famille Src (Huang *et al.*, 1991). Il reconnaît de nombreux ligands dont la thrombospondine-1 (Asch *et al.*, 1992), le collagène (Tandon *et al.*, 1989), les acides gras à longue chaîne, les diacylglycérides microbiens et les LDL oxydées (Febbraio *et al.*, 2001; Hoebe *et al.*, 2005; Silverstein and Febbraio, 2000; Volf *et al.*, 1999). Dans les macrophages, les LDL glyquées sont également reconnues par CD36 et SR-A (Brown *et al.*, 2007). L'activation combinée de CD36 et SR-A conduit à l'activation de la p38 MAPK plaquettaire par les LDL oxydées (Korporaal *et al.*, 2007). Les ligands de CD36 transportés par les LDL oxydées ne sont pas totalement caractérisés mais sont d'origine lipidique. En effet, des LDL oxydées délipidées ne sont pas reconnues par CD36 alors que des liposomes de phospholipides anioniques se lient au CD36 (Nicholson *et al.*, 1995; Rigotti *et al.*, 1995; Ryeom *et al.*, 1996). Il a été montré récemment que des glycérophosphocholines oxydées (Podrez *et al.*, 2002) se lient au CD36 et induisent l'activation plaquettaire

(activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et augmentation de l'expression de la P-sélectine en surface) (Podrez *et al.*, 2007). Des études récentes montrent que l'hyperlipidémie *in vivo* et les LDL oxydées *in vitro* activent JNK2 *via* MKK4 dans les plaquettes murines en se liant au CD36 (Chen *et al.*, 2008).

LOX-1.

LOX-1 (« lectin-like oxidized LDL receptor-1 ») est un récepteur de la famille SR-E d'environ 50 kDa, exprimé dans les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules musculaires lisses et les plaquettes (Chen *et al.*, 2001; Sawamura *et al.*, 1997). LOX-1 contribue à l'activation des GPIIb/IIIa et GPIa/IIa (intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et $\alpha\text{II}\beta\text{1}$), dans des plaquettes stimulées par l'ADP (Marwali *et al.*, 2007). LOX-1 est exprimé à la surface des plaquettes activées suite à sa translocation à la membrane lors de la fusion des membranes des granules α avec la membrane plasmique (Chen *et al.*, 2001). Il joue un rôle dans les plaquettes activées mais pas dans les plaquettes quiescentes et lie entre autres les LDL oxydées (Chen *et al.*, 2001).

LPA-R.

LPA-R est un récepteur couplé à une protéine G, spécifique de l'acide lysophosphatidique (LPA) (Lin *et al.*, 2010). Des LDL modérément oxydées contiennent du LPA et induisent, *via* ce récepteur, le changement de forme des plaquettes, la phosphorylation de Syk, la translocation de Scr, Fyn et Syk au cytosquelette et l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (Maschberger *et al.*, 2000).

SR-BI.

Le récepteur éboueur SR-BI (CLA-I) fait partie de la classe B de la grande famille des CD36. Ce récepteur lie les HDL et est impliqué dans la captation sélective des EC par les hépatocytes. Il stimule aussi le flux de cholestérol libre entre les cellules et les lipoprotéines (Ma *et al.*, 2010). Il lie aussi les VLDL, les LDL (natives, acétylées ou oxydées) et les HDL (natives et oxydées) (Calvo *et al.*, 1997; Valiyaveetil *et al.*, 2008). Des études récentes ont montré que SR-BI, exprimé dans les plaquettes (Imachi *et al.*, 2003), joue un rôle important

dans la thrombose dans des conditions hyperlipidémiques (Ma *et al.*, 2010). Il est également impliqué dans l'activité anti-thrombotique des HDL oxydées (Valiyaveetil *et al.*, 2008).

CD68.

Marqueur lysosomal, le récepteur éboueur de classe D (CD68) est exprimé à la surface des plaquettes activées (Nofer *et al.*, 2004). Dans les macrophages, CD68 lie les LDL oxydées (Lougheed *et al.*, 1997) mais il n'est pas connu si cette liaison joue un rôle dans l'activation des plaquettes.

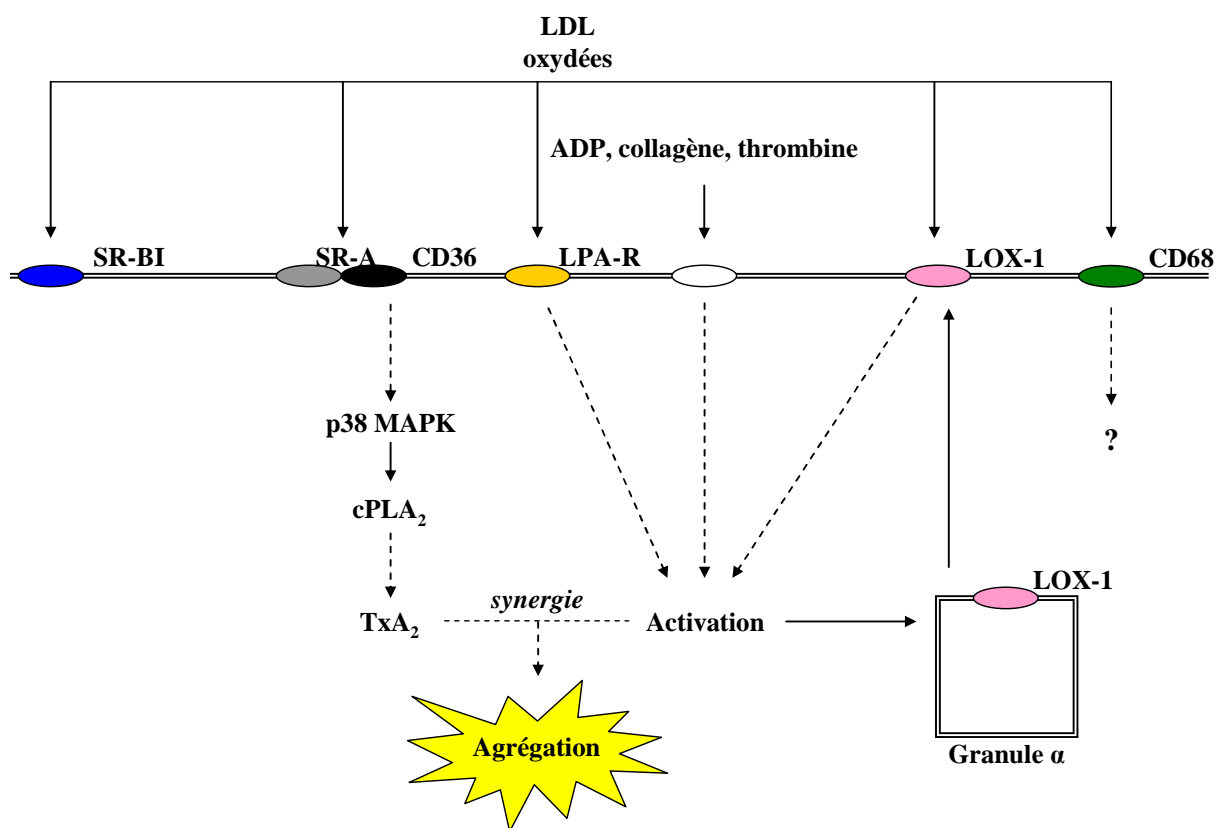


Figure 22 : Activation plaquettaire par les LDL oxydées.

ADP, adénosine diphosphate; CD, « Cluster of Differentiation »; cPLA₂, phospholipase A₂ cytosolique; LDL, « Low density Lipoproteins »; LPA-R, récepteur au lysophosphatidate; SR, récepteur éboueur; LOX-1, « lectin-like oxidized LDL receptor-1 »; p38 MAPK, « p38 mitogen activated protein kinase »; TxA₂, thromboxane A₂.

II.4.c. Oxydation des LDL par les plaquettes activées :

Il a été montré que les plaquettes activées par de fortes doses de thrombine modifient oxydativement les LDL. Ces LDL oxydées induisent alors l'accumulation d'EC dans les

monocytes/macrophages (Fogelman *et al.*, 1980). Une étude récente confirme que les plaquettes stimulées par le collagène modifient oxydativement les LDL *via* la production d'anion superoxyde par la NADPH oxydase. Il en résulte une augmentation de leur capture par les monocytes (Carnevale *et al.*, 2007). Ces résultats *in vitro* sont confirmés par des expériences *ex vivo* montrant que des plaquettes de patients hypercholestérolémiques oxydent davantage les LDL que celles de volontaires sains et augmentent le contenu en EC des monocytes.

OJECTIFS DE LA THESE

Les LDL constituent une population hétérogène de particules dont les AGPI, représentant la moitié de la totalité des AG, sont les cibles initiales de la peroxydation lipidique non enzymatique. L'isolement des LDL du plasma est donc une étape cruciale dans les études portant sur leurs modifications oxydatives. Il a été rapporté que l'ultracentrifugation séquentielle, méthode d'isolement la plus largement utilisée, pouvait causer la perte de certaines apolipoprotéines et de lysophospholipides, alors que la FPLC ne modifiait pas la structure des lipoprotéines. La première partie de mon travail de doctorat a eu pour objectif de comparer ces deux méthodes d'isolement afin d'utiliser par la suite la méthode la moins dommageable pour les LDL. Nous avons d'une part analysé et quantifié les classes lipidiques des LDL et leur composition en AG et d'autre part déterminé différents marqueurs complémentaires de la peroxydation lipidique.

L'athérombose est à l'origine de la plupart des accidents cardiovasculaires. Or, les risques d'athérombose sont particulièrement accrus chez les diabétiques ainsi que chez les sujets ayant un syndrome métabolique. Bien que l'athérombose résulte de nombreux facteurs, deux d'entre eux sont primordiaux: les dyslipoprotéïnémies et l'activation plaquettaire, tous deux interagissant dans un contexte de stress oxydant augmenté. Les LDL oxydées sont notamment impliquées dans le développement de l'athérosclérose et présentes dans la circulation sanguine. Nous avons montré que des LDL de diabétiques de type-2 activent les plaquettes alors que des LDL de volontaires sont sans effet. La caractérisation sommaire des LDL n'avait pas permis d'identifier les facteurs activateurs des LDL. De plus, à notre connaissance, il n'existe aucune donnée sur l'effet de LDL issues de sujets présentant un syndrome métabolique sur les plaquettes. La seconde partie de mon travail est une étude clinique baptisée ECLIPSE dont l'objectif a été d'une part de caractériser le contenu en lipides et peroxydes lipidiques de LDL isolées du plasma de volontaires sains ou ayant un syndrome métabolique ou de patients diabétiques de type-1 ou 2 et d'autre part de déterminer le potentiel activateur de ces LDL sur des plaquettes de volontaires sains.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS

I. Réactifs :

Tous les réactifs utilisés proviennent de **Sigma-Aldrich** à l'exception de ceux spécifiés ci-dessous :

- Anticorps p38 MAPK, phospho-p38 MAPK et phospho-cPLA₂, **Cell Signaling Technology**.
- Cholestérol RTU et TG PAP 150, **Biomérieux**.
- Colonne Nucleosil C₁₈ (5 µm, 4,6 x 250 mm), colonne Nucleosil C₁₈ (5 µm, 4 x 150 mm), **Macherey-Nagel**.
- Colonne Oasis, colonne silice, colonne X Bridge C₁₈ (3,5 µm, 4,6 x 150 mm), **Waters**.
- Gels d'électrophorèse Critérium XT MOPS 12% Bis-Tris, tampon migration, **BioRad**.
- 8-isoPGF_{2α}, 8-isoPGF_{2α}-d4, ester méthylique de PGF_{2α}, 15-HEDE, mélanges d'HETEs et d'HODEs, **Cayman**.
- Kit ELISA d'insuline, **Dako**.
- Kit ELISA thromboxane B₂ Biotrak, kit de détection « ECL Advance », colonne Superose 6 HR 10/30, **GE Healthcare**.
- Membrane de nitrocellulose, **Schleicher & Schuell**.
- Tampon de décrochage « stripping buffer », **Gene Bio-Application Ltd**.
- Tubes « Ethylenediamine tetraacetic acid » (EDTA) 10 mL, **BD Vacutainer**.

II. Appareils :

- Agrégomètre Dual Aggro-meter **Chrono-log**
- Balances **Mettler**
- Centrifugeuse GR4,11 **Jouan**
- Centrifugeuse 4K15 **Sigma**
- Chromatographie en phase gazeuse série HP6890 modèle G1530 **Hewlett Packard**

- Détecteur fluorimétrique SFM **Kontron**
- FPLC HR workstation **Biorad**
- HPLC 320 system **Kontron**
- HPLC 1100 Series **Agilent**
- HPLC 1100 Series **Hewlett Packard**
- Model 2110 collecteur de fraction **Biorad**
- Spectrophotomètre **Kontron Instruments**
- Système chromatographique FPLC **Biorad**
- Ultracentrifugeuse optima, rotor 100.3 **Beckman Coulter**
- pH-mètre **Radiometer Copenhagen/Tacussel**
- Système d'électrophorèse Mini-Protean II et d'électrotransfert Mini-Trans Blot **Biorad**
- Système d'imagerie ImageMaster VDS-CL (logiciel ImageQuant) **Amersham Pharmacia**

METHODES

METHODES RELATIVES AUX LDL ET PLASMA

En introduction à cette partie, je tiens à préciser que le plus grand soin a été apporté à la préparation des échantillons, de façon à éviter l'auto-oxydation du plasma, des LDL et de leurs différents extraits. Lors de chaque étape requérant des temps d'attente, les échantillons ont été mis à l'abri du dioxygène de l'air en remplaçant ce dernier par de l'azote. De l'EDTA, un chélateur d'ions divalent, a systématiquement été rajouté aux LDL afin d'éviter leur oxydation par des ions divalents métalliques comme le Cu^{2+} ou le Fe^{2+} . Enfin, du « Butyl-Hydroxy-Toluène (BHT), antioxydant synthétique, a été ajouté afin de prévenir l'auto-oxydation des échantillons.

I. Isolement des LDL :

Concernant l'étude comparative des deux méthodes d'isolement des LDL, le sang de donneurs de l'EFS est recueilli par ponction veineuse sur anticoagulant CPD (acide citrique 15,6 mM, citrate de sodium 89,4 mM, phosphate monosodique 16,1 mM, dextrose 128,7 mM, pH 5,6) à raison d'1 volume de CPD pour 7 volumes de sang. Le sang est immédiatement centrifugé à 1800 g durant 10 minutes à 20°C afin d'obtenir du plasma auquel 1mM d'EDTA et 10 μM de BHT sont ajoutés. Le plasma est utilisé immédiatement.

Concernant le protocole clinique ECLIPSE (cf. Protocole clinique ECLIPSE, p.116), après avoir consulté un médecin et signé le formulaire de consentement, le volontaire à jeun est pris en charge par une infirmière de l'unité 11 (Fédération d'Endocrinologie Maladies métaboliques Diabète Nutrition) des Hospices Civils de Lyon qui recueille le sang par ponction veineuse sur tube sec avec EDTA. Le sang est immédiatement centrifugé à 1800 g durant 10 minutes à 20°C afin d'obtenir du plasma auquel 10 μM de BHT sont ajoutés. Le plasma est aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

I.1. Ultracentrifugation séquentielle à temps courts :

La séparation des lipoprotéines par ultracentrifugation à temps courts (Tong *et al.*, 1998) est basée sur leurs différences de densité. Leurs propriétés de flottaison sont différentes en fonction de la densité du milieu.

Le plasma est ultracentrifugé à 100000 g durant 3h30 à 15°C pour faire flotter un anneau, contenant les VLDL ($0,95 < d < 1,006$), qui est retiré. La densité du plasma est alors ajustée de 1,006 à 1,063 g/mL à l'aide de KBr. Nous réalisons une deuxième ultracentrifugation à 100000 g pendant 5h à 4°C afin de prélever l'anneau contenant les LDL ($d < 1,063$). Ces dernières sont mises à dialyser dans 2 L de PBS 1X (NaCl 136,8 mM, KCl 2,6 mM, KH_2PO_4 1,71 mM, Na_2HPO_4 8 mM, pH 7,2), EDTA 1 mM, deux fois pendant 3h à température ambiante et une nuit à 4°C. Elles sont ensuite conservées à -80°C jusqu'à utilisation, à l'exception du volume nécessaire à l'interaction avec les plaquettes sanguines qui est conservé à 4°C durant quelques jours (7 jours au maximum).

I.2. FPLC :

La séparation des lipoprotéines par FPLC (**Figure 23**) (Zambon *et al.*, 1996) est basée sur leur différence de taille. Il s'agit d'une chromatographie gel exclusion qui permet leur séparation par ordre de taille décroissante.

Le plasma est filtré (0,22 μm) pour éliminer les débris cellulaires et les chylomicrons puis injecté sur une colonne Superose 6HR. Un tampon Tris pH 7,4 (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2mM, 0,02% d'azide de sodium) circulant à un débit de 0,3 mL/min pour une pression de 150 psi permet l'élution des lipoprotéines. L'élution des échantillons est suivie par détection de la DO à 280 nm. Des fractions de 0,3 mL sont alors collectées. Leurs contenus en TG et cholestérol sont dosés (cf. §III et §IV, p.94) afin de différencier les différentes classes de lipoprotéines (**Figure 24**). Une fois les différentes fractions contenant les LDL identifiées (19-33), elles sont concentrées sur un filtre Amicon (cut-off 30000 kDa) lors d'une centrifugation à 4000 g de 10 minutes. Les LDL sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

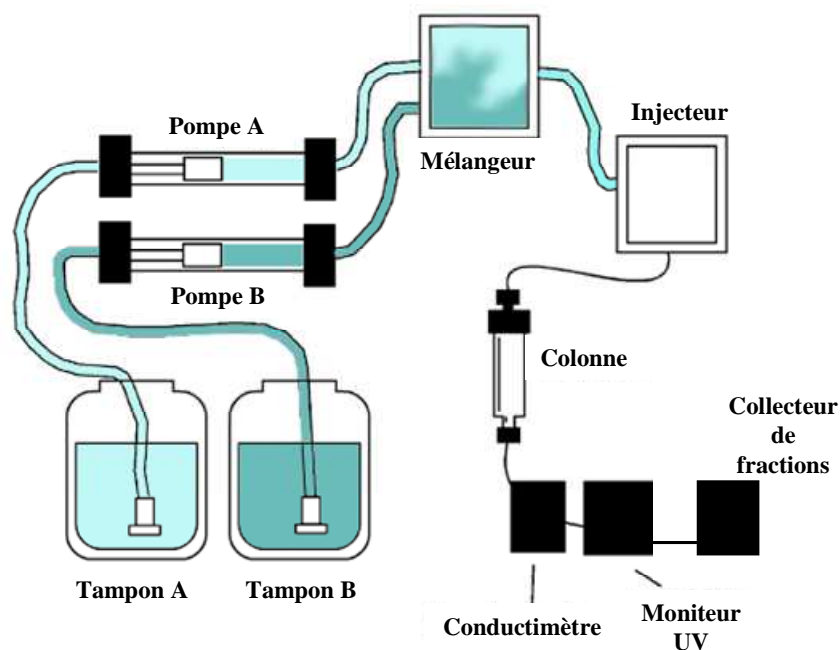


Figure 23 : Schéma récapitulatif du système FPLC.

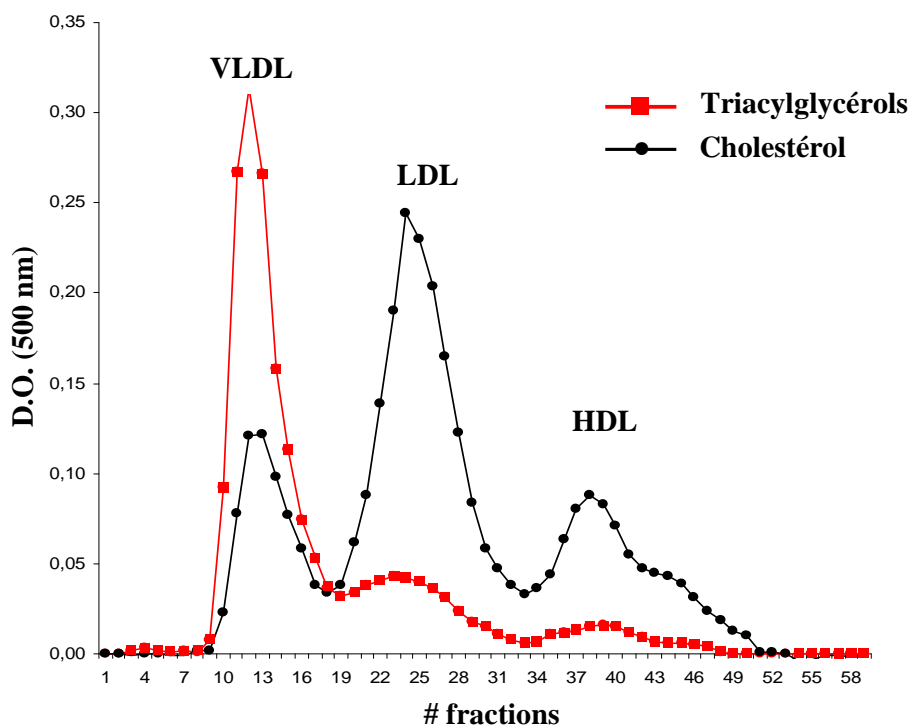


Figure 24 : Profil des fractions de lipoprotéines séparées par FPLC en fonction de leur contenu en triacylgcérols et en cholestérol.

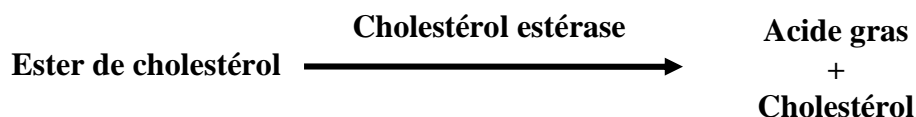
Après avoir effectué un dosage enzymatique, la densité optique à une longueur d'onde de 500 nm a été mesurée. D.O., densité optique; VLDL, « Very Low Density Lipoproteins »; LDL, « Low Density Lipoproteins »; HDL, « High Density Lipoproteins ».

II. Dosage des protéines :

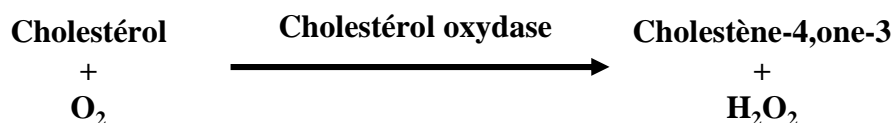
Le contenu protéique des LDL est déterminé par une réaction colorimétrique selon la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Celle-ci combine une réaction du biuret et une du réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$), formant un complexe entre deux liens peptidiques consécutifs en présence de cuivre en milieu alcalin. Le complexe résultant absorbe fortement dans le bleu. La lecture du dosage s'effectue par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 750 nm. Une gamme étalon est réalisée avec des concentrations connues et croissantes d'albumine bovine sérique (BSA).

III. Dosage du cholestérol total :

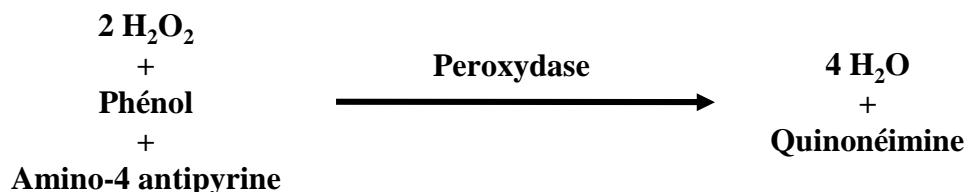
Le contenu en cholestérol des LDL est déterminé par une réaction enzymatique selon la méthode d'Allain (Allain *et al.*, 1974). Celle-ci consiste à hydrolyser les esters de cholestérol à l'aide de cholestérol estérase pour former du cholestérol et des acides gras non estérifiés.



Le cholestérol, en présence de dioxygène, est oxydé par la cholestérol oxydase en cholestène-4,one-3 et peroxyde d'hydrogène.



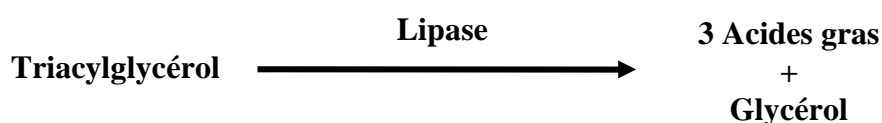
En présence de peroxydase, le peroxyde d'hydrogène se combine au phénol et à l' amino-4 antipyrine pour former de la quinonéimine, absorbant de 492 à 550 nm.



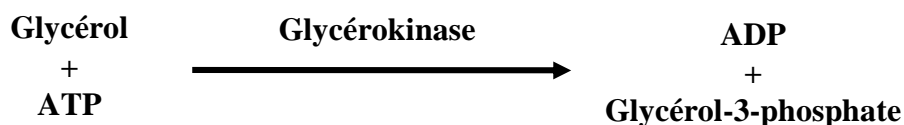
10 μ L d'échantillon sont incubés avec 1 mL de réactif pendant 10 minutes à température ambiante. La lecture du dosage s'effectue par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 500 nm. Une gamme étalon est réalisée avec des concentrations connues et croissantes de cholestérol.

IV. Dosage des triacylglycérols :

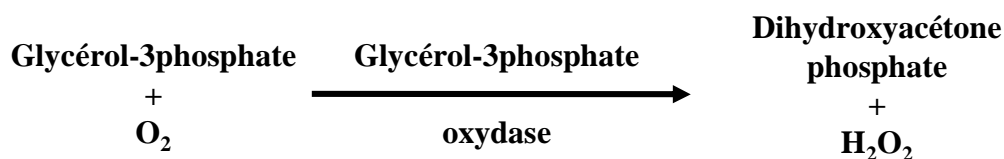
Le contenu en TG des LDL est déterminé par une réaction enzymatique selon la méthode de Fossati (Fossati and Prencipe, 1982). Celle-ci consiste à hydrolyser les triglycérides en glycérol et acides gras non estérifiés à l'aide d'une lipase.



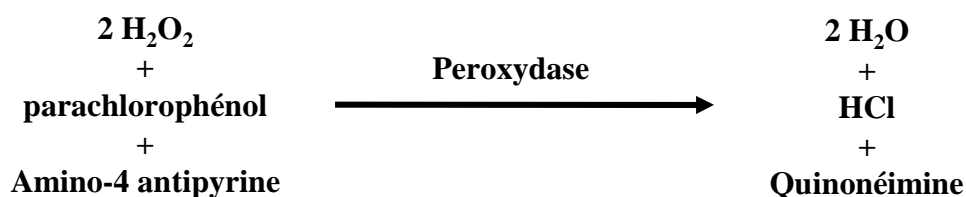
Le glycérol, en présence d'ATP, est phosphorylé par une glycérokinase pour donner du glycérol-3-phosphate.



Ce dernier est oxydé en dihydroxyacétone et en peroxyde d'hydrogène par la glycérol-3-phosphate oxydase.



En présence de peroxydase, le peroxyde d'hydrogène se combine au 4-aminoantipyrine et au 3,5 dichloro-2-hydroxybenzène sulfonate pour former de la quinonéimine, absorbant de 492 à 550 nm.



10 μ L d'échantillon sont incubés avec 1 mL de réactif pendant 10 minutes à température ambiante. La lecture du dosage s'effectue par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 500 nm. Une gamme étalon est réalisée avec des concentrations connues et croissantes de TG.

V. Composition en acides gras des classes lipidiques :

La composition en acides gras des principales classes lipidiques des LDL (PC, PE, SM, TG et EC) est déterminée suite à l'analyse par chromatographie gazeuse (GC) des acides gras méthylés de chacune de ces classes. Une première étape d'extraction des lipides est nécessaire avant de séparer les classes lipidiques par différentes chromatographies sur couche mince (CCM). Une fois celles-ci séparées, une étape de transméthylation des acides gras est réalisée permettant de les rendre volatiles avant leur injection en GC.

V.1. Extraction lipidique :

400 μ L d'eau sont ajoutés à 100 μ L de LDL (~3 mg/mL) ainsi que différents standards internes: 30 μ g de diheptadécanyl-glycérophosphocholine, 20 μ g de cholestéryl-heptadécanoate, 10 μ g de triheptadécanyl-glycérol et 3 μ g de diheptadécanyl-glycérophosphoéthanolamine. On extrait les lipides par 1,5 mL d'éthanol et 3 mL de chloroforme en présence de 50 μ M de BHT. L'échantillon est centrifugé à 600 g durant 10 minutes. On récupère la phase organique inférieure qui est évaporée sous azote et conservée à -20°C. Une seconde extraction est effectuée sur la phase aqueuse (éthanol/chloroforme, 1:2, v/v, BHT 50 μ M) et laissée à décanter une nuit. La seconde phase organique est poolée à la première, évaporée sous azote puis conservée à -20°C.

V.2. Séparation des classes lipidiques par chromatographie sur couche mince :

Trois migrations sont réalisées de manière à séparer les principales classes de PL ainsi que les EC et les TG.

Les échantillons secs sont repris avec de l'éther diéthylique/méthanol (9:1, v/v) puis déposés sur une plaque de silice (gel 60, 20x20 cm) préalablement éluée par du méthanol. La phase mobile très apolaire, composée de chloroforme/méthanol (80:8, v/v) permet de séparer les lipides chargés ($R_f = 0$) des lipides neutres ($R_f_{TG+EC} = 0,9$). Les lipides sont révélés en

lumière UV après vaporisation de dichlorofluorescéine (0,02%, éthanol/eau, 95:5, v/v). La silice contenant les EC/TG est grattée puis les lipides sont extraits 3 fois par de 2 mL d'éther diéthylique/méthanol (9:1, v/v). Une centrifugation à 600 g de 10 minutes est réalisée, la phase liquide est prélevée et évaporée sous azote. Les échantillons secs sont repris avec de l'éther diéthylique/méthanol (9:1, v/v) puis déposés comme précédemment sur une autre plaque de silice afin de séparer les TG des EC. Le solvant de migration utilisé est un mélange d'hexane/éther/acide acétique (80:20:1, v/v) (R_f TG = 0,56 et R_f EC = 0,92). Pour séparer les classes de PL (SM, PC et PE) n'ayant pas migré (R_f = 0) sur la première plaque, on utilise un solvant de migration plus polaire : chloroforme/méthanol/eau (63:27:4, v/v) (R_f SM = 0,16; R_f PC = 0,26; R_f PE = 0,56). Les zones de silice contenant les différentes classes lipidiques, révélées par la vaporisation de dichlorofluorescéine et l'observation en lumière UV, sont grattées.

V.3. Transméthylation des acides gras des classes lipidiques :

Cette étape permet de séparer les acides gras du squelette où ils sont estérifiés, tout en les rendant volatils afin de permettre leur analyse en GC. La réaction chimique de transméthylation, en présence d'un catalyseur (le trifluorure de bore), permet de rompre la liaison ester pour en former une autre avec un groupement méthyle.

On ajoute à la silice 250 μ L de toluène/méthanol (40:60, v/v) et 250 μ L de BF_3 /méthanol (1,3 M, 10% dans le méthanol). Les échantillons sont placés dans un bain sec à 100°C pendant 1h30 (Morrison and Smith, 1964). La réaction est arrêtée dans la glace 5 minutes puis 1,5 mL de carbonate dipotassique 5% (K_2CO_3) est ajouté pour neutraliser l'acidité du milieu. L'extraction des acides gras méthylés est réalisée deux fois par 2mL d'isooctane. Une centrifugation à 600 g de 10 minutes permet de séparer la phase aqueuse de la phase organique. Cette dernière est récupérée et évaporée sous azote. Les échantillons sont repris dans un volume défini d'isooctane pestipur de manière à être suffisamment dilués pour leur analyse.

V.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse :

Les AG, dérivés sous forme d'esters méthyliques, sont analysés dans un chromatographe en phase gazeuse (HP6890 G1530) (*Figure 25*). 1 μ L est injecté *via* un

injecteur split/splitless ($T = 230^{\circ}\text{C}$) dans une colonne capillaire SGE ($60\text{m} \times 0,25\text{ mm}$). La température du four augmente régulièrement de 50°C à 140°C à raison de $20^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ puis de 140°C à 250°C à raison de $2^{\circ}\text{C}/\text{minute}$. Les acides gras sont portés à ébullition et entraînés dans la colonne BPX 70 recouverte intérieurement d'un film de phase stationnaire ($25\mu\text{m}$) par de l'hydrogène et interagissent avec la phase stationnaire selon leur polarité. Ils sont séparés en fonction de leur point d'ébullition et de leur affinité avec la phase stationnaire. La détection est réalisée par un détecteur à ionisation de flamme ($T = 250^{\circ}\text{C}$). Le flux de la colonne arrive dans un brûleur alimenté en air et hydrogène. La combustion produit des ions responsables du courant ionique qui est transformé en tension avec un électromètre pour donner un signal. La réponse est proportionnelle au nombre de carbones présents dans les molécules détectées. Les différents acides gras sont identifiés selon leur temps de rétention comparativement à des standards injectés seuls (*Figure 26*). Le standard interne nous permet de quantifier chaque acide gras ainsi que la classe dont il est issu.

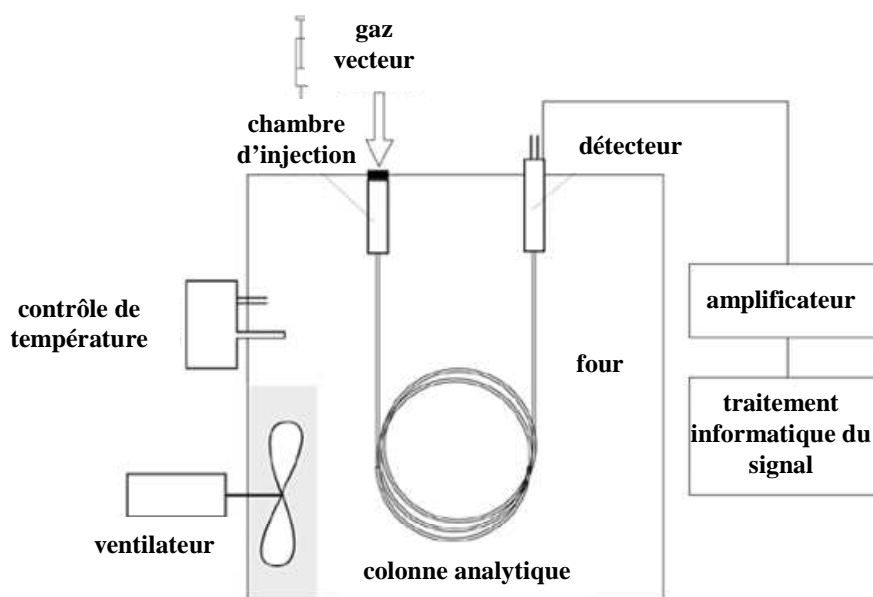


Figure 25 : Schéma récapitulatif d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse.

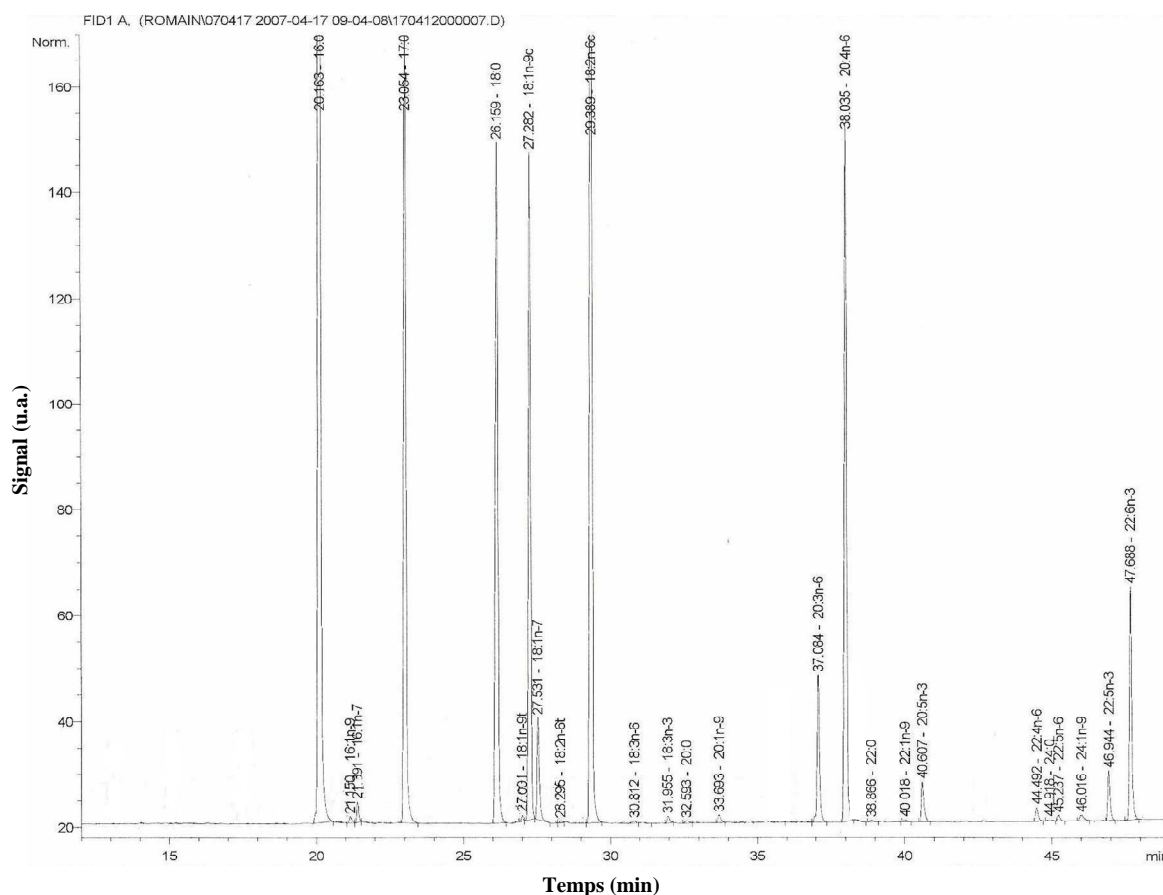


Figure 26 : Profil chromatographique après séparation par chromatographie gazeuse des esters méthyliques d'acides gras des phosphatidylcholines des LDL.

VI. Quantification des lysophosphatidylcholines, des sphingomyélines et du cholestérol non estérifié par HPLC couplée à un DDL :

La quantification des LPC, SM et du cholestérol non estérifié est réalisée grâce à une HPLC couplée à un détecteur à diffusion de lumière (DDL). Après une séparation des molécules d'intérêt sur HPLC, celles-ci sont nébulisées en petites gouttelettes et transportées devant un faisceau de lumière. Les variations de l'intensité lumineuse permettent de quantifier les molécules ayant interrompu le faisceau.

Suite à l'extraction lipidique des LDL (20 μ L, \sim 3 mg/mL), les extraits lipidiques sont repris dans du chloroforme/méthanol (2:1, v/v) et injectés dans une HPLC (**Figure 27**) équipée d'une colonne S3W Spherisorb 3 μ m (4,6 x 100 mm) (Seppanen-Laakso *et al.*, 2001). La méthode a été optimisée pour séparer et quantifier le cholestérol non estérifié, les SM et les LPC. Un gradient composé de trois mélanges différents de solvants permet la séparation de ces classes d'intérêt. Le premier mélange est de l'hexane/tétrahydrofurane (99:1, v/v), le second,

du 2-propanol/chloroforme (4:1, v/v) et le troisième du 2-propanol/eau (1:1, v/v). Le débit de solvant est fixé à 1,5 mL/min. En sortie de colonne, les composés entrent dans le DDL (Sedex 55) dont la température est fixée à 45°C. Ils sont nébulisés en fines gouttelettes, éluées par le gaz vecteur (air) à une pression de 2,5 bars et passent devant un faisceau lumineux. Les variations de son intensité induites par le passage des composés sont traduites en un signal. Une gamme étalon de chaque lipide est alors utilisée pour les quantifier.

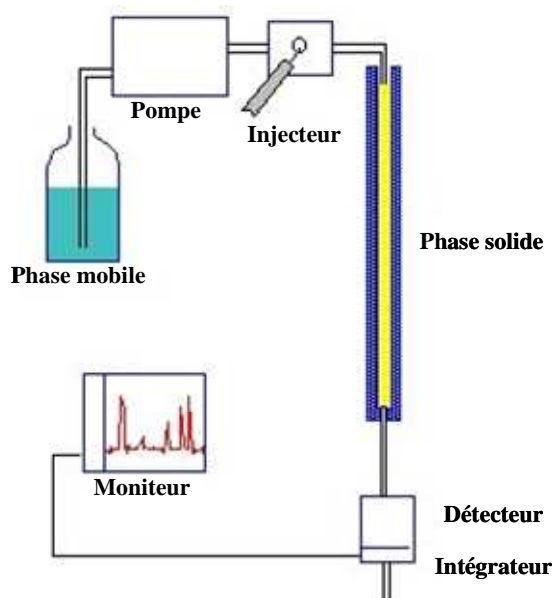


Figure 27 : Schéma récapitulatif d'un appareil de chromatographie en phase liquide.

VII. Quantification des acides gras monohydroxylés totaux :

Les acides gras monohydroxylés sont soit estérifiés à certaines classes lipidiques composant les LDL soit non estérifiés. Afin de quantifier l'intégralité des acides gras monohydroxylés (AGOH) contenus dans les particules de LDL, nous effectuons une hydrolyse des liaisons esters des PL, EC et TG en condition basique. Une double purification, sur colonne « Oasis » et par CCM, est alors nécessaire avant de séparer et quantifier les différents AGOH par HPLC couplée à un détecteur UV.

VII.1. Extraction lipidique :

250 μ L d'eau sont ajoutés à 250 μ L de LDL (3 mg/mL) ainsi que 924 pmoles d'acide 15-hydroxy-eicosadiénoïque comme standard interne. La phase aqueuse est acidifiée à pH 3 à l'aide d'acide acétique. On extrait les lipides par 1,5 mL d'éthanol et 3 mL de chloroforme en

présence de 50 μM de BHT. L'échantillon est centrifugé à 600 g durant 10 minutes. On récupère la phase organique inférieure qui est évaporée sous azote et conservée à -20°C . Une seconde extraction est effectuée sur la partie restante (éthanol/chloroforme, 1:2, v/v, BHT 50 μM) et laissée à décanter une nuit. La seconde phase organique est poolée à la première, évaporée sous azote puis conservée à -20°C .

VII.2. Extraction des acides gras monohydroxylés totaux :

Les AGOH estérifiés sont hydrolysés. Pour cela, l'extrait sec est repris dans 950 μL d'éthanol. Il subit une hydrolyse basique en présence de 50 μL de KOH 10 M et 50 μM de BHT pendant 20 minutes à 60°C . 10 mL de tampon Borax Phosphate pH 8,2 (Borax 27,5 mM, KH_2PO_4 45 mM) sont ajoutés avant le dépôt sur une colonne « Oasis » préalablement lavée par 6 mL de méthanol et équilibrée par 6 mL d'eau. Il s'agit d'une colonne mixte C18 et échangeuse d'anions permettant de retenir les espèces anioniques hydrophobes (les AGL et les AGOH) et d'éliminer la majorité du cholestérol issu de l'hydrolyse des esters de cholestérol présents dans les LDL. La colonne est lavée par 8 mL de NH_4OH 2% puis 8 mL de méthanol. Les molécules d'intérêt sont éluées par 8 mL d'acétonitrile/2-propanol (60:40, v/v) acidifié par 5% d'acide formique. Le solvant est évaporé sous azote. L'échantillon est repris avec de l'éther diéthylique/méthanol (9:1, v/v) et déposé sur une plaque de silice préalablement éluée par du méthanol. Le solvant de migration hexane/éther diéthylique/acide acétique (60:40:1, v/v) permet de séparer les AGOH ($R_f = 0,3$) des acides gras non estérifiés ($R_f = 0,6$). Les AGOH sont extraits trois fois par 2mL de méthanol. Une centrifugation à 600 g de 10 minutes permet d'éliminer la silice. Le solvant est récupéré et évaporé sous azote.

VII.3. Analyse par HPLC couplée à un détecteur UV :

Les AGOH sont repris avec de l'acétonitrile/eau pH 3 (3:7, v/v) et analysés par HPLC sur une colonne C18 XBridge (3,5 μm , 4,6 x 150 mm). Un gradient de solvant composé d'acétonitrile/eau pH 3 (1:9, v/v) (A) et d'acétonitrile (B) permet l'éluion des composés injectés ($t = 5$ min, 0% B; $t = 10$ min, 30% B; $t = 30$ min, 40% B; $t = 50$ min, 60% B; $t = 65$ min, 100% B). Le débit du solvant est fixé à 1 mL/min. En sortie de colonne, les composés passent dans un détecteur UV. Les AGOH, possédant une double liaison conjuguée, absorbent à 235 nm.

VIII. Quantification de la 8-*iso*-prostaglandine F_{2α} totale :

La 8-isoPGF_{2α} est présente sous forme non estérifiée et estérifiée dans les LDL. Une hydrolyse des liaisons esters en condition basique est nécessaire afin de la quantifier dans son intégralité. Une triple purification, sur colonne « Oasis » puis sur colonne de silice et enfin par CCM, est nécessaire. La molécule est également dérivée afin de la rendre volatile pour la quantifier par GC/MS.

VIII.1. Extraction lipidique :

L'extraction lipidique se déroule de la même manière que celle décrite au paragraphe VII.1. 16 ng de 8-isoPGF_{2α}-d4 sont ajoutés comme standard interne.

VIII.2. Purification et dérivation de la 8-*iso*-prostaglandine F_{2α} :

Les isoprostanes estérifiées sont hydrolysées puis purifiées sur colonne « Oasis » de manière identique au paragraphe VII.2. Le solvant d'élution de la colonne « Oasis » est évaporé. Le résidu lipidique obtenu est repris par 8 mL d'acétate d'éthyle/hexane (1:1, v/v) puis passé sur une colonne de silice préalablement équilibrée par 5 mL d'acétate d'éthyle. La colonne est lavée par 5 mL d'acétate d'éthyle pour éliminer les acides gras non estérifiés. Les isoprostanes sont éluées par 5 mL d'acétate d'éthyle/méthanol (1:1, v/v). Le solvant est évaporé. Le groupement carboxyle est dérivé par 100 µL d'un mélange d'acétonitrile contenant 7% de α-bromo-2,3,4,5,6-pentafluorotoluène et 20% de N,N-diisopropyléthylamine durant 20 minutes à 37°C. Après évaporation, l'échantillon est repris par de l'acétate d'éthyle et déposé sur une plaque de silice précédemment éluee par du méthanol. Le solvant de migration chloroforme/éthanol (93:7, v/v) permet de séparer les isoprostanes dérivées (R_f = 0,22). Ces dernières sont extraites deux fois par 2mL d'acétate d'éthyle /méthanol (4:1, v/v). Une centrifugation à 600 g de 10 minutes permet d'éliminer la silice. Le solvant est récupéré et évaporé sous azote. Les groupements hydroxyle de la molécule sont dérivés par 100 µL de N,O-bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide une nuit à température ambiante.

VIII.3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse équipé d'une trappe d'ions :

Les échantillons, dérivés sous forme d'ester pentafluorobenzyle et d'éther triméthylsilylés, sont analysés dans un chromatographe en phase gazeuse (Trace Ultra GC-Thermo Electron) couplé à un spectromètre de masse équipé d'une trappe d'ions (Polaris Q-Thermo Electron). 2 μL sont injectés *via* un injecteur split/splitless chauffé à 250°C dans une colonne de silice capillaire (60 m x 0,25 mm) recouverte d'un film de phase stationnaire (Solge-1MS-SGE) (0,25 μm). La température du four contenant la colonne est maintenue à 57°C pendant 4 minutes avant d'atteindre 260°C (40°C/minute) puis 300°C (8°C/minute) pour y être maintenue pendant 20 minutes. Après cette séparation, les molécules arrivent dans un spectromètre de masse à trappe ionique par une interface maintenue à 300°C (**Figure 28**) où elles sont ionisées (énergie = 70 eV) et fragmentées par le gaz réactant (méthane). La température de la source est de 200°C. L'analyse GC-MS³ est réalisée par ionisation chimique en mode négatif. L'hélium sert de gaz vecteur (2mL/minute) et de gaz « damping » (1,2 mL/minute). Le système de spectrométrie de masse équipé d'une trappe ionique permet de stocker les ions. Ainsi, les ions de M/Z sélectionné (M/Z = 569) restent dans la trappe où ils sont de nouveau fragmentés. Les ions fils sélectionnés (M/Z = 483) sont conservés et à leur tour fragmentés avant d'être libérés (M/Z = 255) pour arriver au niveau du détecteur. Ce dernier a pour rôle de détecter les ions proportionnellement à leur nombre et d'amplifier le courant correspondant pour le rendre détectable par l'électronique du système. Le standard interne possède un rapport M/Z augmenté de 4 en raison des 4 deutériums (M = 2 g/mol) remplaçant 4 hydrogènes (M = 1 g/mol) à 573 puis 483 et enfin 259 (**Figure 29**).

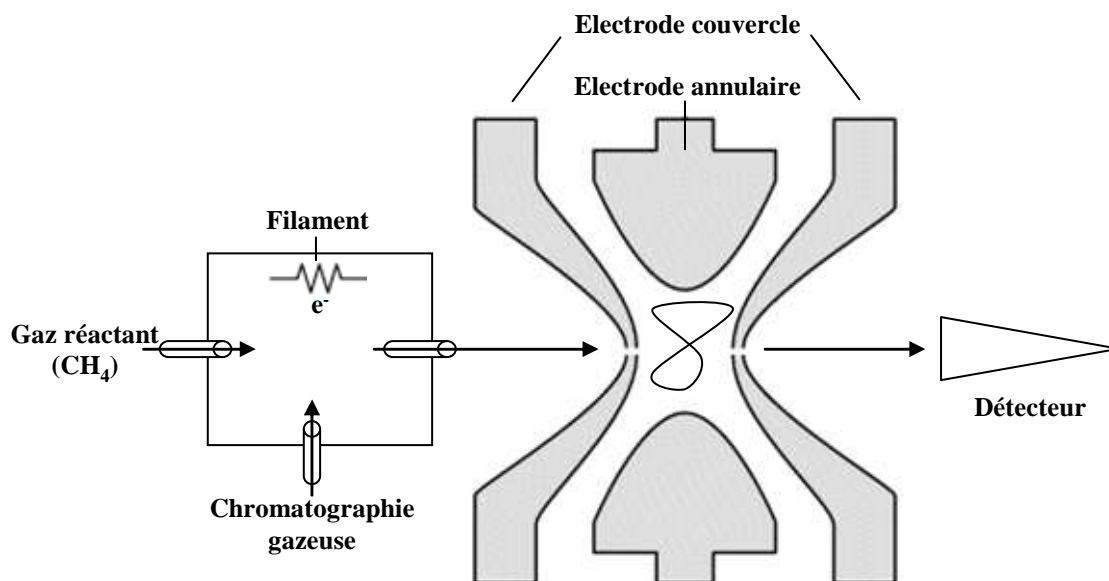


Figure 28 : Schéma récapitulatif du système de spectrométrie de masse équipé d'une trappe d'ions.

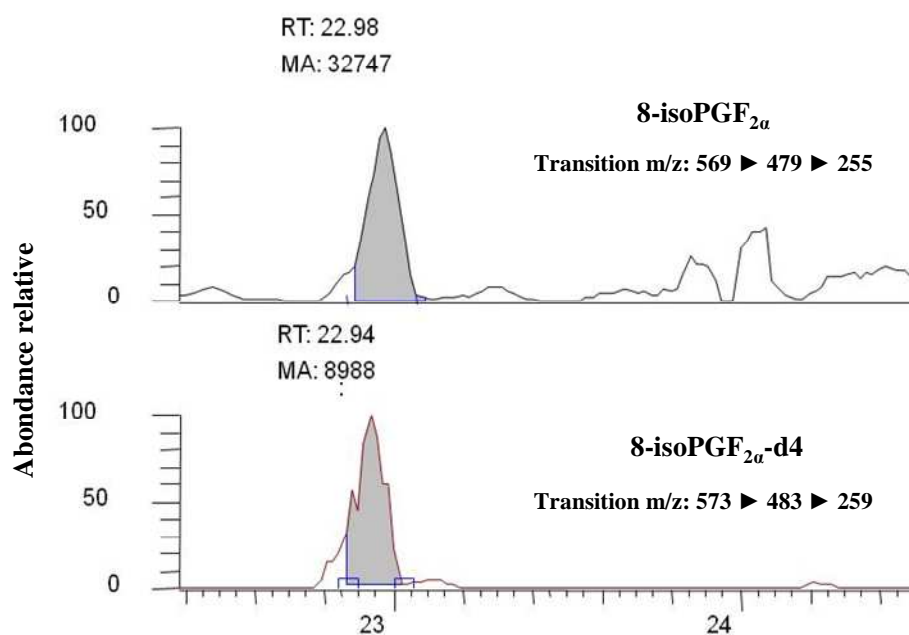


Figure 29 : Spectre de masse de la 8-isoPGF_{2α} après séparation par chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse équipé d'une trappe d'ions.

IX. Dosage du dialdéhyde malonique :

Ce dosage est basé sur la réaction du MDA avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) en milieu acide et à chaud. Après extraction et séparation par HPLC en phase inverse, le complexe MDA-TBA₂ est détecté par fluorimétrie (Therasse and Lemonnier, 1987).

IX.1. Dérivation et extraction :

Pour ce dosage, une gamme étalon est réalisée avec des quantités croissantes de précurseur du MDA, le 1,1,3,3-tétraméthoxypropane (0, 5, 10, 20, 40 et 80 pmol). 50 µL de LDL (~ 3 mg/mL) auxquelles nous ajoutons 350 µL d'eau sont placés dans un tube. On ajoute aux LDL ou au TMP, 40 µL de BHT 5 mM, 100 µL d'acide acétique 16,5 N et 200 µL de TBA 10 mM, dissous dans un tampon phosphate (KH₂PO₄ 0,1 M, pH 3). Les échantillons sont placés 1h à 95°C. La réaction est stoppée dans la glace 5 minutes. Le milieu est acidifié avec 10 µL d'HCl 6N pour favoriser l'extraction du complexe MDA-TBA₂ par 2 mL d'acétate d'éthyle. Après une centrifugation de 10 minutes à 1800 g, la phase organique supérieure est récupérée et évaporée sous azote.

IX.2. Analyse par HPLC couplée à un détecteur fluorimétrique :

L'extrait est alors repris par 200 µL de méthanol/eau (1:9, v/v) puis analysé par HPLC en phase inverse couplée à un détecteur fluorimétrique. Le complexe MDA-TBA₂ est séparé sur une colonne Nucléosil greffée de C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) parcourue par le solvant méthanol/eau (2:8, v/v) à un débit de 0,8 mL/min. Le détecteur fluorimétrique va exciter le complexe MDA-TBA₂ sortant de la colonne à une longueur d'onde de 515 nm qui va alors émettre à 553 nm (*Figure 30*).

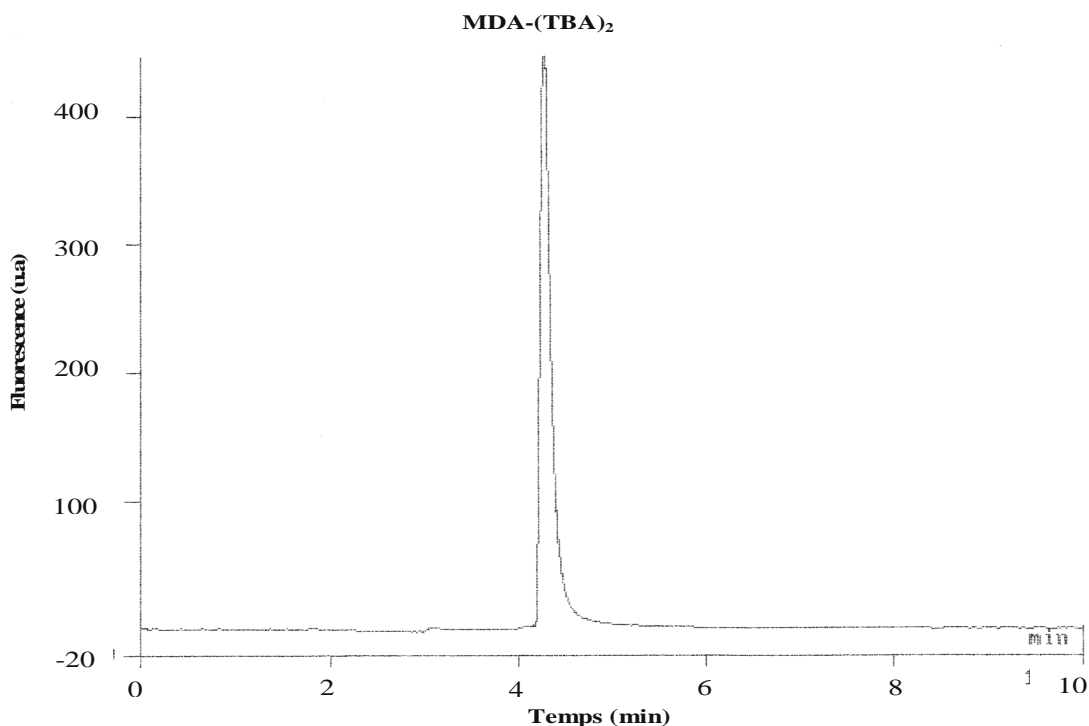


Figure 30 : Profil chromatographique après séparation par chromatographie en phase liquide du complexe MDA-TBA₂ des LDL.

X. Dosage de la vitamine E :

Nous avons déterminé les concentrations des deux isomères de la vitamine E présents dans les LDL: l' α -tocophérol et le γ -tocophérol. Après une extraction, ces derniers sont séparés par HPLC en phase inverse et détectés par fluorimétrie.

X.1. Extraction :

490 μ L d'eau sont ajoutés à 10 μ L de LDL (~3 mg/mL). Nous ajoutons 200 pmoles de δ -tocophérol comme standard interne. Les différents isomères de vitamine E sont extraits par 500 μ L d'éthanol et 2 mL d'hexane. Le mélange est centrifugé à 1800 g durant 10 minutes à 4°C. La phase organique supérieure est prélevée. La phase aqueuse restante est soumise à une seconde extraction par 2 mL d'hexane suivi de la même centrifugation. La seconde phase organique est poolée à la première et évaporée sous azote.

X.2. Analyse par HPLC couplée à un détecteur fluorimétrique :

L'extrait est repris par 300 μ L de méthanol/eau (85:15, v/v) et analysé par HPLC en phase inverse couplée à un détecteur fluorimétrique. La colonne Nucléosil greffée de C18 (5 μ m, 150 mm x 4,6 mm) est parcourue par le solvant méthanol/eau (95:5, v/v) à un débit de 1 mL/min permettant l'élution des différents isomères de vitamine E du plus polaire au plus apolaire. Le détecteur fluorimétrique excite les isomères sortant de la colonne à 295 nm qui vont alors émettre à 340 nm (**Figure 31**). L' α -tocophérol et le γ -tocophérol sont quantifiés grâce au standard interne.

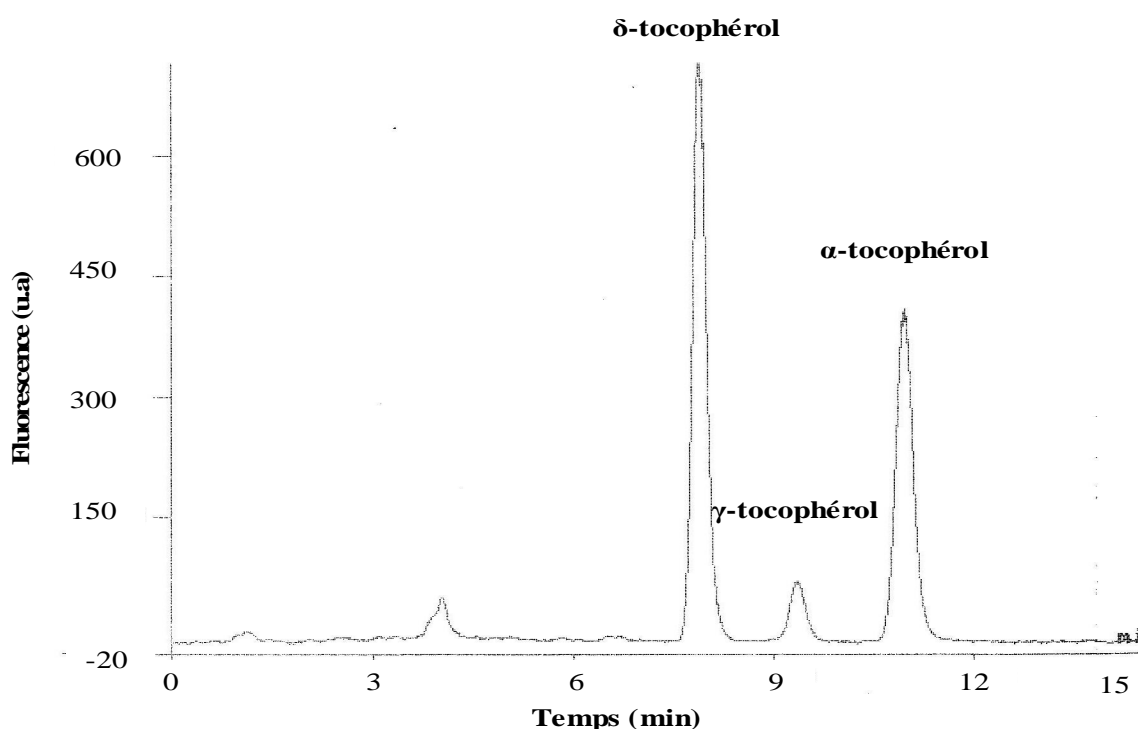


Figure 31 : Profil chromatographique après séparation par chromatographie en phase liquide des isomères de la vitamine E des LDL.

XI. Dosage immuno-enzymatique de l'insuline :

L'essai, non compétitif, est basé sur l'utilisation de deux anticorps monoclonaux dirigés contre l'insuline. L'incubation simultanée de l'échantillon avec un anticorps anti-insuline couplé à une enzyme dans un puits revêtu d'un autre anticorps anti-insuline conduit à la formation d'un complexe. L'enzyme réagit ensuite avec le substrat chromogène tétraméthylbenzidine (TMB) et permet de quantifier l'insuline (**Figure 32**).

Le kit combine l'utilisation d'insuline, d'un anticorps anti-insuline immobilisé sur une microplaque de 96 puits et d'un second anticorps anti-insuline couplé à une peroxydase. Une gamme étalon permet de déterminer des quantités d'insuline de l'échantillon.

25 μL de plasma ou d'étalon sont mis dans chaque puits. On ajoute 100 μL d'anticorps anti-insuline conjugué à une peroxydase. Une gamme croissante de standards est réalisée. La plaque est mise à incuber 1h à température ambiante sous agitation. On ajoute 100 μL de substrat pour l'enzyme et une nouvelle incubation de 10 minutes sous agitation à température ambiante est réalisée. La réaction est alors stoppée avec 100 μL de solution d'arrêt pour bloquer l'activité enzymatique et la D.O. est mesurée à 450 nm.

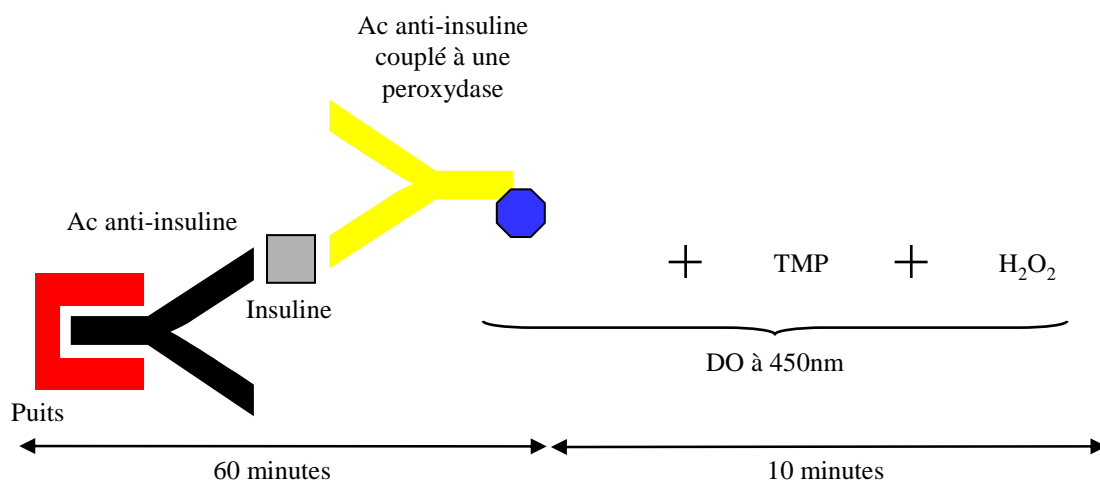


Figure 32 : Schéma récapitulatif du dosage immuno-enzymatique non-compétitif de l'insuline.

Ac, anticorps; TMP, tétraméthylbenzidine.

XII. Détermination de la taille des LDL :

Les analyses ont été conduites par Mme Martine BROYER, membre du laboratoire des dyslipidémies et de cardiobiologie (dirigé par le Dr. Agnès SASSOLAS) au centre de biologie et pathologie Est du Groupement Hospitalier Est des Hospices Civils de Lyon.

L'électrophorèse (SpiraGel) sur gel en gradient de polyacrylamide permet la détermination de la distribution en taille des LDL plasmatiques. L'analyse densimétrique du profil de distribution des lipoprotéines colorées au bleu de Coomassie donne des informations sur leurs diamètres apparents moyens et leurs abondances relatives.

On ajoute 750 μL d'une solution de KBr ($d = 1,33$) à 250 μl de plasma. Nous réalisons une ultracentrifugation (Ultracentrifugeuse Sorval Discovery M150SE) à 884000g durant

2h30. 150 µl de surnageant (comprenant les lipoprotéines totales) ($d < 1,21$) sont recueillis. 10 µL d'échantillon (~2 mg/mL) ou de calibrateur (HMW GE Healthcare) ou de pool témoin sont déposés sur le gel de polyacrylamide (1,5-25%). L'électrophorèse est réalisée dans un tampon de migration (Tris 90 mM, acide borique 80 mM, EDTA-Na₂ 3 mM, pH 8,3) à 4°C, à une tension constante de 70 V durant 1h puis de 150 V pendant 24h. Le gel est coloré (bleu de Coomassie G250 0,46 mM, acide perchlorique 2,88%) durant 2h puis décoloré (acide acétique 7,5% et méthanol 5%) durant 12h. La lecture est réalisée à l'aide d'un analyseur d'image ChemiDoc XRS BioRad et du logiciel « Quantity One ».

METHODES RELATIVES AUX PLAQUETTES

I. Isolement et numération des plaquettes :

I.1. Isolement des plaquettes :

Les plaquettes sont isolées selon la méthode de Lagarde, M. (Lagarde *et al.*, 1980). Le sang, fourni par l'EFS, est prélevé par ponction veineuse sur anticoagulant CPD à raison d'1 volume de CPD pour 7 volumes de sang. Il est centrifugé à 200 g durant 17 minutes à 20°C. Nous récupérons le plasma riche en plaquettes (PRP) (phase supérieure) que nous acidifions à pH 6,4 à l'aide d'acide citrique 0,15 M afin d'éviter l'agrégation spontanée des plaquettes. Le PRP, réparti dans des tubes à ailettes de 7 mL, est alors centrifugé à 900 g durant 12 minutes à 20°C. Le surnageant, c'est-à-dire le « plasma pauvre en plaquettes » (« PPP »), est enlevé avec précaution et chaque culot plaquettaire est repris par 5 mL de tyrode-HEPES (NaCl 137 mM; KCl 12,7 mM; NaHCO₃ 11,9 mM; NaH₂PO₄, H₂O 0,41 mM; MgCl₂, 6 H₂O 1 mM; HEPES 5mM; glucose 5 mM, pH 7,35). Les plaquettes sont laissées 1h à reposer avant toute autre manipulation.

I.2. Numération des plaquettes :

Le nombre de plaquettes est déterminé à l'aide d'une cellule de Thomas et d'un microscope optique. Les plaquettes sont diluées au 1/100^{ème} et déposées sur la cellule pour le comptage.

II. Dosage des protéines :

Pour déterminer la concentration en protéines des plaquettes, nous utilisons la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Cette méthode est basée sur la fixation non covalente du colorant bleu de Coomassie G250 sur les acides aminés basiques (principalement l'arginine) et aromatiques en milieu acide. Cette complexation provoque un transfert de son pic d'absorption qui passe de 465 nm à 595 nm. Le dosage s'effectue par spectrophotométrie à une longueur

d'onde de 595 nm. Une gamme étalon est réalisée avec des concentrations connues et croissantes de BSA.

III. Mesure de l'agrégation plaquettaire :

De façon à s'assurer de la fonctionnalité des plaquettes, nous réalisons un test d'agrégation par la méthode turbidimétrique de Born, G.V. (Born, 1962) qui consiste en la mesure, dans un agrégomètre, de l'augmentation de la transmission d'un faisceau lumineux au travers de la suspension plaquettaire après ajout d'un agoniste. La suspension plaquettaire (400 µL) est pré-incubée 2 min à 37°C puis l'agoniste est ajouté (2 µM d'AA) sous agitation (1000 tours/min). Le changement de transmission est détecté par une cellule photoélectrique de l'agrégomètre, lui-même couplé à un enregistreur nous permettant de suivre la cinétique de l'agrégation. L'agrégation est mesurée durant 4 minutes à 37°C.

IV. Interactions des LDL avec les plaquettes :

Afin de tester la capacité d'activation des plaquettes par les LDL des quatre groupes, ces dernières sont incubées avec des plaquettes de volontaires sains. Différents marqueurs d'activation plaquettaire sont ensuite étudiés.

IV.1. Conditions d'incubation :

Avant de mettre les LDL en présence des plaquettes, il est nécessaire de réaliser une dernière dialyse de 3h dans 2L de PBS 1X sans EDTA. Cette étape permet d'éliminer ce chélateur d'ions divalents qui piègerait le calcium, ion nécessaire aux divers mécanismes d'activation plaquettaire. Les plaquettes à concentration physiologique sont incubées en absence ou en présence de LDL (1mg/mL) de témoins sains, de volontaires présentant un syndrome métabolique, de diabétiques de type-1 ou de type-2 pendant 2 heures à 37°C. A la fin de l'incubation, 50 µL sont prélevés et stockés à -80°C pour le dosage du TxB₂.

IV.2. Conditions de lyse plaquettaire :

Après une centrifugation de 5 minutes à 13000 g, le surnageant est éliminé et remplacé par 500 μ L de solution de lyse (Trizma 20 mM, Triton-X100 1%, $MgCl_2$ 5mM, EGTA 2mM, pH=8 en présence d'inhibiteurs de phosphatases : $Na_4P_2O_7$, 10 H_2O 40mM, NaF 50 mM, Na_3VO_4 100 μ M et d'inhibiteurs de protéases : AEBSF 2mM, aprotinine 3 μ M, leupeptine 43 μ M, pepstatine 29 μ M). Les tubes sont vortexés puis laissés 30 minutes dans la glace. Après une centrifugation de 5 minutes à 13000 g, aucun culot ne devant être observé, des fractions aliquotes de 50 μ L sont prélevées (pour les dosages de la concentration en protéines plaquettaires, des p38 MAPK totale et phosphorylée et des cPLA₂ totale et phosphorylée) et conservées à -80°C.

V. Analyse par immuno-empreinte de l'état de phosphorylation de la p38 MAPK et de la phospholipase A₂ cytosolique :

Suite au dosage protéique, les mêmes quantités de lysat plaquettaire sont utilisées. Les protéines sont dénaturées par ajout d'un tampon de dénaturation et chauffage à 100°C durant 5 minutes. La réaction est stoppée dans la glace avant dépôt.

V.1. Electrophorèse :

Il s'agit d'une électrophorèse en conditions dénaturantes dans laquelle les protéines sont séparées uniquement selon leurs tailles.

Les dépôts (35 μ g) sont réalisés sur des gels de polyacrylamide 12% Bis-Tris pré-coulés (Bio-Rad). Des marqueurs colorés de masses moléculaires connues sont déposés afin de permettre la localisation de la p38 MAPK et de la cPLA₂ sur la membrane. L'électrophorèse est réalisée dans un tampon de migration XT MOPS (Biorad) à une tension constante de 200 V durant 1h.

V.2. Electro-transfert :

Les protéines séparées sur gel sont électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose dans du tampon de transfert (Trizma 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20%) réfrigéré. L'électrotransfert dure 30 minutes à une tension constante de 100 V.

V.3. Traitements des membranes de nitrocellulose :

La membrane est alors rincée 5 minutes dans un tampon salin TBS-T (Trizma 20 mM, NaCl 137 mM, Tween 0,1%, pH 7,6) puis incubée durant 1h sous agitation dans du tampon de blocage (TBS-T contenant 5% de lait écrémé) afin de saturer les sites aspécifiques. Plusieurs rinçages successifs sont ensuite réalisés avec du TBS-T (deux rapides, un de 15 minutes et deux de 5 minutes) avant d'incuber la membrane une nuit à 4°C avec des anticorps polyclonaux de lapin anti phospho-cPLA₂ (Ser⁵⁰⁵) (dilution au 1/5000^{ème} dans 10 mL de TBS-T contenant 5% de BSA). Le lendemain, la membrane est de nouveau rincée (deux fois rapidement, une fois 15 minutes et deux fois 5 minutes) puis mise à incuber pendant 1h à température ambiante avec des anticorps secondaires polyclonaux de chèvre anti-Ig G de lapin couplés à la peroxydase de Raifort (dilution 1/10000^{ème} dans 10 mL de TBS-T contenant 5% de BSA). De nouveau la membrane est rincée (deux fois rapidement, une fois 15 minutes et quatre fois 5 minutes) avant d'être révélée.

Les anticorps fixés sont alors détachés de la membrane pendant une incubation sous agitation de 10 minutes dans une solution de stripping commerciale. La membrane est ensuite rincée cinq fois 5 minutes avec de l'eau puis est incubée comme décrit précédemment en remplaçant l'anticorps anti-phospho-cPLA₂ par un anticorps anti-phospho-p38 MAPK ou anti-cPLA₂ ou anti-p38 MAPK.

V.4. Révélation :

La révélation est effectuée par chimiluminescence grâce au kit ECL Advance (**Figure 33**). L'utilisation d'une caméra VDS et du logiciel « Image Quant » permet de quantifier l'intensité des bandes révélées par vidéodensitométrie.

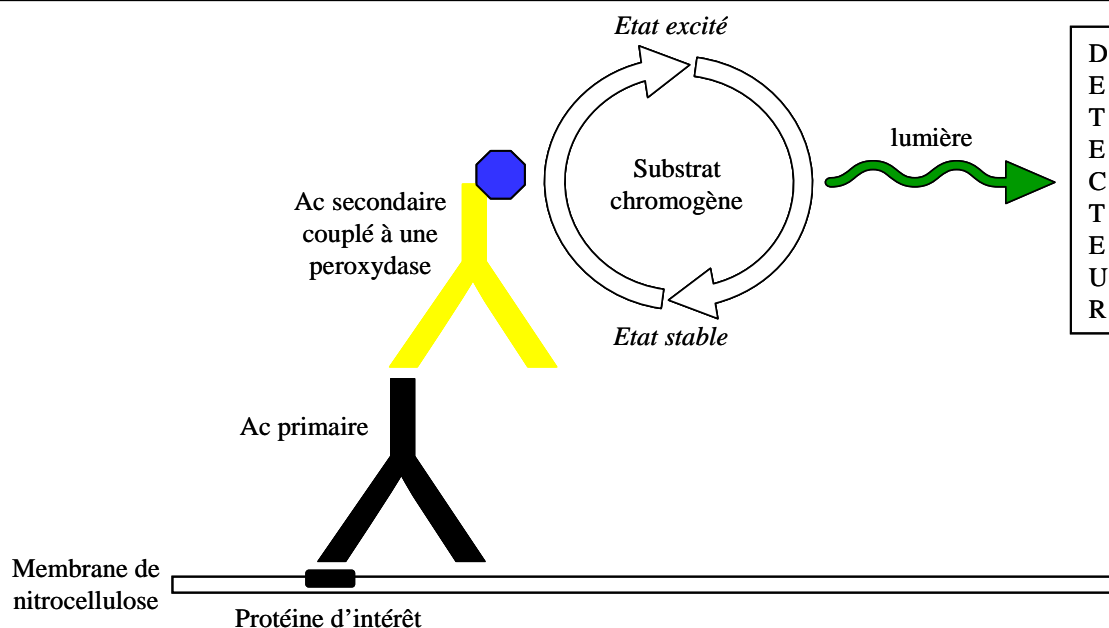


Figure 33 : Schéma du principe de la détection par chimioluminescence.
Ac, anticorps.

VI. Dosage immuno-enzymatique du thromboxane B₂ :

L'essai est basé sur la compétition entre une quantité fixe de TxB₂ couplé à une peroxydase et le TxB₂ non couplé pour un nombre de sites limités. La peroxydase réagit ensuite avec le substrat chromogène et le peroxyde d'hydrogène permettant de doser le thromboxane B₂ (**Figure 34**).

Le kit combine l'utilisation de TxB₂ couplé à la peroxydase de raifort, un anticorps de lapin anti-TxB₂ immobilisé sur une microplaque de 96 puits (préparée avec des anticorps d'âne anti-lapin fixés) et du TxB₂ seul. Cette méthode, rapide et sensible, permet de déterminer des quantités de TxB₂ allant de 0,5 à 64 pg/puits. Avec des quantités fixes d'anticorps et de TxB₂ couplé, la quantité de ligand couplé fixée est inversement proportionnelle à la quantité de ligand non couplé.

Les plaquettes sont lysées par trois cycles de congélation/décongélation successifs afin de libérer le TxB₂ intraplaquettaire. Les échantillons sont dilués de 50 à 800 fois avec de l'eau, suivant l'état d'activation des plaquettes. Une gamme croissante de standards (TxB₂ non couplé) est réalisée. On rajoute ensuite 50 µL d'anticorps anti-TxB₂ et 50 µL de TxB₂ couplé à la peroxydase. La plaque est mise à incuber 1h à température ambiante sous agitation. Les puits sont ensuite lavés 4 fois avec du tampon de lavage et 150 µL de substrat pour l'enzyme sont ajoutés. Une nouvelle incubation de 15 minutes sous agitation à température ambiante est

réalisée puis la réaction est stoppée avec 100 μL d'acide sulfurique pour bloquer l'activité enzymatique. La D.O. est mesurée à 450 nm.

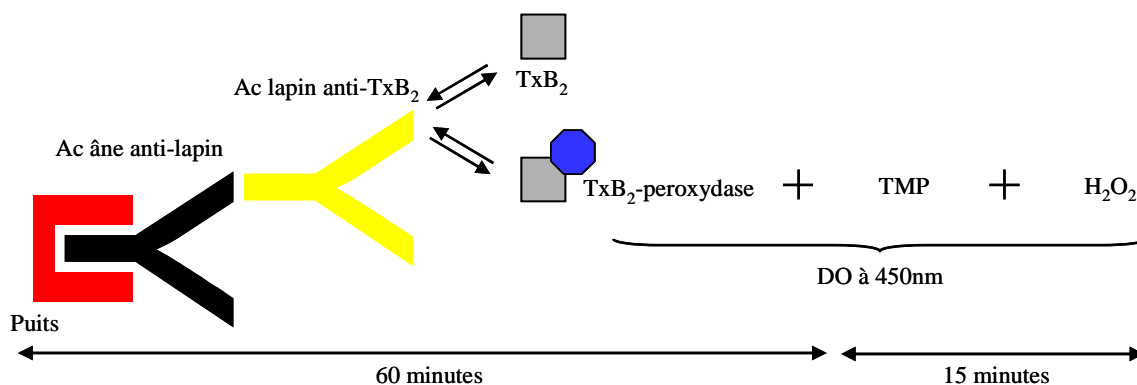


Figure 34 : Schéma récapitulatif du dosage immuno-enzymatique compétitif du TxB_2 .
Ac, anticorps; TMP, tétraméthylbenzidine; TxB_2 , thromboxane B_2 .

VII. Effets des LDL sur l'agrégation plaquettaire :

Afin de tester les effets des LDL issues des quatre groupes sur l'agrégation plaquettaire, des plaquettes de volontaires sains sont incubées avec ces LDL puis stimulées par le collagène.

Les plaquettes (400 μL) à concentration physiologique sont pré-incubées en absence ou en présence de LDL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de témoins sains, de volontaires ayant un syndrome métabolique, de diabétiques de type-1 ou de type-2 dans la cuve d'un agrégomètre (cf. II) pendant 5 minutes à 37°C sous agitation (1000 tours/min). A la fin de la pré-incubation, du collagène est ajouté ($0,075 \pm 0,009 \mu\text{g}/\text{mL}$) et la cinétique d'agrégation est mesurée durant 4 minutes.

PROTOCOLE CLINIQUE ECLIPSE

Un protocole de recherche clinique intitulé « Etude de la Caractérisation des Lipoprotéines de basse densité lors du diabète de type-2 et de leur Implication dans l'activation Plaquettaire *via* un Stress oxydant et / ou un Echange lipidique (ECLIPSE) » a été soumis et validé par l'AFSSAPS et le CPP Sud-Est IV. Il est enregistré dans la banque de données internationale de « ClinicalTrials.gov » sous le numéro NCT00932087. Il s'agit d'une étude physiopathologique monocentrique où un seul prélèvement de 60 mL de sang a été effectué sur des sujets à jeun dans le but principal d'identifier le(s) facteur(s) lipidique(s) déterminant(s) présent(s) dans les LDL de diabétiques de type-2 responsable(s) de l'activation des plaquettes sanguines.

Le promoteur de l'étude a été les Hospices Civils de Lyon (HCL) et l'inclusion des sujets a été réalisée par le service d'Endocrinologie-Diabétologie-Maladies métaboliques-Nutrition du Groupement Hospitalier Est des HCL (dirigé par le Prof. P. Moulin). L'hypothèse principale de ce travail était que l'augmentation de la concentration des peroxydes lipidiques dans les LDL pouvait être un facteur déterminant dans leur capacité à activer les plaquettes et leur pouvoir athérotrombogène.

Le calcul de l'effectif a été réalisé sur les concentrations en isoprostanes plasmatiques de patients diabétiques. Le nombre de sujets nécessaires à inclure pour comparer un écart de moyenne de concentration plasmatique d'isoprostanes chez des diabétiques *vs* des témoins pour un risque α à 0,05 et un risque β à 0,20 est de 8 par groupe. Nous avons décidé de recruter un minimum de 10 personnes par groupe: un groupe témoin composé de volontaires sains (V), un groupe de volontaires ayant un syndrome métabolique (SM), un groupe de patients ayant un diabète de type-1 (DT-1) et un groupe de patients ayant un diabète de type-2 avec un syndrome métabolique (DT-2). Tous les sujets devaient être de sexe masculin, leur âge compris entre 30 et 75 ans et ils devaient répondre à différents critères (**Tableau 7**). Les SM ont été sélectionnés selon les critères de la Fédération Internationale du Diabète (FID) où l'obésité abdominale est un facteur requis (Alberti *et al.*, 2005). Cependant, la limite du tour de taille a été fixée à 102 cm selon le critère défini par le NCEP-ATPIII (2001) et non à 94 cm comme défini par la FID. Les DT-1 ont été inclus lorsque leur HbA1c était supérieure à 7% et qu'ils ne présentaient pas de syndrome métabolique. Les DT-2 devaient à la fois avoir une HbA1c supérieure à 7% et un syndrome métabolique selon les critères pré-définis.

		V	SM	DT-1	DT-2
Requis	Tour de taille ≥ 102 cm		V		V
	HbA1c $\geq 7\%$			V	V
2 ou + (pour les groupes SM et DT-2)	TG $\geq 1,69$ mM		V		V
	HDL-cholestérol $\leq 1,04$ mM		V		V
	PA $\geq 130/85$ mmHg		V		V
	Glycémie $\geq 6,1$ mM		V	V	V

Tableau 7 : Critères d'inclusion des volontaires du protocole ECLIPSE.

V = oui. DT-1, patients ayant un diabète de type-1; DT-2, patients ayant un diabète de type-2 et un syndrome métabolique; HbA1c, hémoglobine glyquée; HDL, « High Density Lipoproteins »; PA, pression artérielle; SM, volontaires ayant un syndrome métabolique; TG, triacylglycérols; V, volontaires sains.

Nous avons introduit de nombreux critères d'exclusion afin de limiter les effets confondants pour l'interprétation ultérieure de nos résultats. Ainsi, les patients diabétiques prenant un traitement hypolipémiant (fibrates ou statines) l'ont suspendu pendant sept jours (environ deux temps de demi-vie des LDL) avant le prélèvement. En effet, les hypolipémiants tels que l'atorvastatine (Singh *et al.*, 2008) et le fénofibrate (Rosenson *et al.*, 2007) sont connus pour réduire respectivement les LDL oxydées et acides gras oxydés. Plus généralement, les fibrates ont de nombreux autres effets sur les lipides plasmatiques (Staels and Fruchart, 2005). Nous avons catégoriquement exclu les traitements suivants: les glitazones, diminuant les concentrations d'AGL plasmatiques (Boden *et al.*, 2005) et les suppléments en vitamines antioxydantes, améliorant la sensibilité à l'insuline (Vincent *et al.*, 2009). La prise de tabac, pouvant augmenter le stress oxydant (Zhou *et al.*, 2000) ou d'alcool en prises excessives (> 2 verres de vin/jour ou équivalent), augmentant le stress oxydant (Meagher *et al.*, 1999), font également partie des critères d'exclusion. Les patients en situation de prévention secondaire, augmentant entre autres le stress oxydant (Singh *et al.*, 1994), ou sous insulinothérapie de type multiinjection introduite moins de 5 ans après la découverte du diabète type-2, n'ont pas été inclus.

ANALYSES STATISTIQUES

Pour l'étude comparative, les valeurs présentées correspondent aux moyennes \pm S.D. (écart-type ou déviation standard). Les comparaisons des moyennes sont effectuées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney.

Pour l'étude ECLIPSE, les valeurs présentées correspondent aux moyennes \pm S.E.M. (écart standard à la moyenne). Les comparaisons multiples de moyennes sont effectuées à l'aide d'une analyse de variance ANOVA suivi d'un test de PLSD Fisher. Les corrélations sont réalisées par régression linéaire.

RESULTATS ET DISCUSSION

COMPARAISON DE DEUX METHODES DE SEPARATION DES LDL

Les LDL sont une population hétérogène de particules tant au niveau de leur densité, de leur taille que de leur composition lipidique. Les AGPI, représentant la moitié de la totalité des AG des LDL (Gotto *et al.*, 1986) sont les cibles initiales de la peroxydation lipidique non enzymatique conduisant à la formation d'un large panel de produits oxydés. L'isolement des LDL du plasma constitue donc une étape cruciale pour leur étude et l'oxydation artéfactuelle doit être évitée. L'ultracentrifugation séquentielle est la méthode la plus largement utilisée pour isoler les lipoprotéines (Havel *et al.*, 1955). Cependant, il a été rapporté qu'elle pouvait causer la perte de certaines apolipoprotéines (Park *et al.*, 1985) et des LPC. Parmi les méthodes alternatives, la FPLC, dont la séparation des particules est basée sur la taille, n'affecte pas la structure des lipoprotéines et est souvent utilisée en clinique lorsque les quantités de sang sont limitées.

Afin de déterminer si l'ultracentrifugation génère des LDL au contenu en lipides et en peroxydes lipidiques comparable à celles isolées par FPLC, nous avons traité en parallèle du plasma non congelé selon les deux méthodes. D'une part, nous avons analysé et quantifié les classes lipidiques des LDL et leur composition en AG, d'autre part, nous avons déterminé différents marqueurs complémentaires de la peroxydation lipidique: les AGOH, dérivés des principaux AGPI, le MDA, marqueur global de la peroxydation des AGPI, la 8-isoPGF_{2α}, marqueur spécifique de la peroxydation non enzymatique de l'AA et la vitamine E, principal antioxydant des LDL.

I. Composition lipidique des LDL :

I.1. Classes lipidiques des LDL :

Nous avons d'abord déterminé la composition lipidique des LDL (**Tableau 8**). Les LDL séparées par ultracentrifugation contiennent des EC, des TG, du cholestérol, des PC, des SM et des PE. Les EC représentent la classe majoritaire (51,8 %) et les TG une classe mineure (3,4 %). Le cholestérol représente 28,9 % et les PC sont la classe majeure de PL (11,2 %) suivis par les SM (3,7 %) et très peu de PE (0,4 %). Les résultats ne montrent

aucune différence de composition entre les LDL séparées par ultracentrifugation et les LDL séparées par FPLC.

Classe lipidique	Ultracentrifugation		FPLC	
	nmol/mg protéine	%	nmol/mg protéine	%
Esters de cholestérol	2661 ± 344	51,8	2450 ± 257	51
Triacylglycérols	173 ± 111	3,4	210 ± 66	4,4
Phosphatidylcholines	576 ± 50	11,2	587 ± 16	12,2
Phosphatidyléthanolamines	18 ± 1	0,4	18 ± 1	0,4
Sphingomyélines	189 ± 50	3,7	136 ± 39	2,8
Lysophosphatidylcholines	31 ± 5	0,6	26 ± 11	0,5
Cholestérol	1484 ± 118	28,9	1378 ± 100	28,7

Tableau 8 : Classes lipidiques dans les LDL isolées par ultracentrifugation ou par FPLC.

Les LDL ont été séparées du plasma non congelé par ultracentrifugations séquentielles à temps courts ou par FPLC. La quantification des classes lipidiques a été réalisée suite à l'analyse par chromatographie gazeuse des acides gras méthylés (esters de cholestérol, triacylglycérols, phosphatidylcholines et phosphatidyléthanolamines) ou par HPLC couplée à un détecteur à diffusion de lumière pour les sphingomyélines, les lysophosphatidylcholines et le cholestérol. Les résultats, exprimés en nmol/mg protéine ou en mol%, représentent les moyennes ± S.D. de 3 sujets.

I.2. Composition en acides gras des classes lipidiques :

Pour établir un profil lipidique le plus précis possible, nous avons ensuite étudié la composition en AG de chaque classe lipidique. Les résultats sont exprimés à la fois en pourcentage molaire (mol %) et en concentration (nmol/mg protéine).

I.2.a. Esters de cholestérol :

Nous voyons (**Tableau 9**) que les EC sont composés de 14 % d'AG saturés (AGS), de 26 % d'AG monoinsaturés (AGMI) et de 60 % d'AGPI dont 50 % de 18:2n-6 et 6 % de 20:4n-6. Leur proportion ne change pas quelle que soit la méthode d'isolement utilisée.

Acide gras	ESTERS DE CHOLESTEROL			
	Ultracentrifugation		FPLC	
	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine
16:0	12,7 ± 0,9	366,2 ± 64,6	12,8 ± 0,7	338,7 ± 53,1
16:1n-7	4,2 ± 0,2	120,6 ± 11,7	4,0 ± 0,1	105,3 ± 10,0
16:1n-9	0,2 ± 0,3	6,0 ± 8,6	0,4 ± 0,4	11,9 ± 11,5
18:0	0,9 ± 0,1	22,5 ± 6,0	1,0 ± 0,1	25,0 ± 4,6
18:1n-7	0,8 ± 0,6	19,5 ± 15,3	0,7 ± 0,6	16,2 ± 12,3
18:1n-9	21,2 ± 2,5	562,1 ± 136,1	21,2 ± 2,5	517,4 ± 112,5
18:2n-6	49,8 ± 3,3	1308,6 ± 92,9	49,6 ± 3,7	1201,1 ± 32,1
18:3n-3	0,7 ± 0,2	17,7 ± 3,6	0,7 ± 0,2	16,3 ± 3,9
18:3n-6	1,2 ± 0,4	31,5 ± 13,3	1,1 ± 0,2	28,6 ± 3,9
20:0	0,1 ± 0,0	2,6 ± 0,3	0,1 ± 0,1	1,7 ± 1,4
20:1n-9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	1,1 ± 1,2
20:3n-6	0,7 ± 0,1	17,4 ± 1,0	0,7 ± 0,1	16,1 ± 1,6
20:4n-6	5,9 ± 0,8	144,4 ± 33,2	5,8 ± 0,7	130,8 ± 26,8
20:5n-3	1,1 ± 0,4	28,8 ± 14,9	1,1 ± 0,4	25,3 ± 11,9
22:6n-3	0,5 ± 0,1	11,0 ± 0,9	0,5 ± 0,0	9,7 ± 0,8

Tableau 9 : Composition en acides gras des esters de cholestérol des LDL isolées par ultracentrifugation ou par FPLC.

Les LDL ont été séparées du plasma non congelé par ultracentrifugations séquentielles à temps courts ou par FPLC. Les lipides ont été extraits des LDL puis les esters de cholestérol ont été séparés par chromatographie sur couche mince. La composition et la quantification ont été réalisées suite à l'analyse par chromatographie gazeuse des acides gras méthylés. Les résultats, exprimés en mol% ou en nmol/mg protéine, représentent les moyennes ± S.D. de 3 sujets.

I.2.b. Triacylglycérols :

Les TG (**Tableau 10**) sont composés de 38 % d'AGS, de 45 % d'AGMI et de 17 % d'AGPI dont 12 % de 18:2n-6. Aucune différence n'apparaît selon la méthode utilisée.

Acide gras	TRIACYLGLYCEROLS			
	Ultracentrifugation		FPLC	
	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine
16:0	32,7 ± 3,2	162,1 ± 109,6	34,3 ± 4,4	231,2 ± 88,2
16:1n-7	3,5 ± 0,2	17,5 ± 12,0	3,6 ± 0,2	24,2 ± 8,2
16:1n-9	0,7 ± 0,5	2,5 ± 1,5	0,4 ± 0,6	2,0 ± 3,4
18:0	4,9 ± 0,5	21,5 ± 12,4	5,6 ± 0,6	33,1 ± 8,0
18:1n-7	1,7 ± 1,1	8,7 ± 9,8	0,7 ± 1,2	6,1 ± 10,3
18:1n-9	39,2 ± 4,5	171,4 ± 101,0	36,8 ± 3,6	222,6 ± 65,0
18:2n-6	12,1 ± 2,8	56,2 ± 40,1	12,9 ± 2,6	78,8 ± 26,6
18:3n-3	0,9 ± 0,7	5,0 ± 5,5	1,2 ± 0,2	7,2 ± 2,4
18:3n-6	0,3 ± 0,5	1,4 ± 1,7	0,3 ± 0,2	2,0 ± 2,4
20:0	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,8	0,2 ± 0,2	0,9 ± 0,8
20:1n-9	0,2 ± 0,2	0,8 ± 1,0	0,2 ± 0,2	1,0 ± 0,8
20:3n-6	0,2 ± 0,2	0,9 ± 1,2	0,2 ± 0,2	1,4 ± 1,2
20:4n-6	1,7 ± 0,7	6,7 ± 3,7	1,6 ± 0,7	8,7 ± 3,1
20:5n-3	0,4 ± 0,8	1,6 ± 2,7	0,5 ± 0,8	2,5 ± 3,5
22:6n-3	0,7 ± 1,1	3,0 ± 3,6	0,8 ± 1,0	4,2 ± 4,1
24:0	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,4	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,4

Tableau 10 : Composition en acides gras des triacylglycérols des LDL isolées par ultracentrifugation ou par FPLC.

Les LDL ont été séparées du plasma non congelé par ultracentrifugations séquentielles à temps courts ou par FPLC. Les lipides ont été extraits des LDL puis les triacylglycérols ont été séparés par chromatographie sur couche mince. La composition et la quantification ont été réalisées suite à l'analyse par chromatographie gazeuse des acides gras méthylés. Les résultats, exprimés en mol% ou en nmol/mg protéine, représentent les moyennes ± S.D. de 3 sujets.

I.2.c. Phosphatidylcholines :

Les PC (**Tableau 11**), classe majoritaire des PL, sont composés de 48 % d'AGS, de 15 % d'AGMI et de 37 % d'AGPI dont 23 % de 18:2n-6 et 6,5 % de 20:4n-6. Leur composition en AG est la même quelle que soit la méthode utilisée.

PHOSPHATIDYLCHOLINES				
Acide gras	Ultracentrifugation		FPLC	
	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine
16:0	33,7 ± 1,1	429,7 ± 23,4	34,4 ± 1,3	438,2 ± 9,4
16:1n-7	0,7 ± 0,1	8,5 ± 1,4	0,7 ± 0,1	8,6 ± 1,1
18:0	14,0 ± 1,1	162,2 ± 18,4	14,4 ± 1,2	166,1 ± 18,7
18:1n-7	1,1 ± 0,7	13,3 ± 8,4	1,1 ± 0,7	13,2 ± 8,1
18:1n-9	12,8 ± 1,6	150,1 ± 25,4	12,7 ± 1,6	147,7 ± 22,3
18:2n-6	23,1 ± 1,9	271,4 ± 29,6	22,7 ± 1,8	265,1 ± 21,4
18:3n-3	0,3 ± 0,1	3,8 ± 0,9	0,3 ± 0,1	3,8 ± 0,8
18:3n-6	0,1 ± 0,0	1,6 ± 0,3	0,1 ± 0,1	1,1 ± 0,8
20:3n-6	3,2 ± 0,3	34,7 ± 3,0	3,1 ± 0,3	33,3 ± 2,6
20:4n-6	6,5 ± 0,9	70,8 ± 9,2	6,3 ± 1,1	67,7 ± 10,6
20:5n-3	1,1 ± 0,5	11,6 ± 5,5	1,0 ± 0,5	11,3 ± 5,4
22:5n-3	0,4 ± 0,3	4,0 ± 2,8	0,4 ± 0,3	3,8 ± 2,6
22:6n-3	2,2 ± 0,3	22,1 ± 2,1	2,1 ± 0,3	21,4 ± 2,3

Tableau 11 : Composition en acides gras des phosphatidylcholines des LDL isolées par ultracentrifugation ou par FPLC.

Les LDL ont été séparées du plasma non congelé par ultracentrifugations séquentielles à temps courts ou par FPLC. Les lipides ont été extraits des LDL puis les phosphatidylcholines ont été séparées par chromatographie sur couche mince. La composition et la quantification ont été réalisées suite à l'analyse par chromatographie gazeuse des acides gras méthylés. Les résultats, exprimés en mol% ou en nmol/mg protéine, représentent les moyennes ± S.D. de 3 sujets.

I.2.d. Phosphatidyléthanolamines :

Les PE (**Tableau 12**) sont composées de 48 % d'AGS, de 12 % d'AGMI et de 40 % d'AGPI dont 12 % de 18:2n-6, 15 % de 20:4n-6 et 9 % de 22:6n-3. On trouve dans cette classe les AG présents dans la sous-classe des 1-alkényl-2-acyl-GPE (ou plasmalogènes à phosphoéthanolamines) avec 6 % de 16:0 diméthylacétal (DMA), 8 % de 18:0 DMA et 2 % de 18:1n-9 DMA. Aucune différence significative dans leur composition n'apparaît quelle que soit la méthode utilisée.

PHOSPHATIDYLETHANOLAMINES				
Acide gras	Ultracentrifugation		FPLC	
	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine
16:0	16,8 ± 1,0	6,8 ± 0,5	17,2 ± 4,7	6,9 ± 2,0
16:0 DMA	6,0 ± 1,4	2,3 ± 0,5	5,0 ± 1,5	1,9 ± 0,5
16:1n-9	1,0 ± 1,8	0,4 ± 0,7	0,4 ± 0,7	0,2 ± 0,3
18:0	16,7 ± 2,0	6,2 ± 1,0	18,7 ± 3,7	6,8 ± 1,5
18:0 DMA	7,7 ± 2,6	2,9 ± 1,0	5,9 ± 5,1	2,1 ± 1,8
18:1n-9	6,9 ± 1,9	2,6 ± 0,8	6,9 ± 2,4	2,5 ± 0,9
18:1n-9 DMA	2,1 ± 0,7	0,8 ± 0,3	1,6 ± 1,4	0,6 ± 0,5
18:2n-6	11,8 ± 3,2	4,4 ± 1,3	12,1 ± 3,7	4,5 ± 1,4
20:3n-6	1,0 ± 0,8	0,3 ± 0,3	0,8 ± 0,8	0,3 ± 0,3
20:4n-6	14,7 ± 0,7	5,1 ± 0,2	16,2 ± 0,5	5,5 ± 0,3
20:5n-3	2,0 ± 0,8	0,7 ± 0,3	1,9 ± 1,6	0,6 ± 0,5
22:1n-9	1,4 ± 1,2	0,4 ± 0,4	1,3 ± 2,3	0,4 ± 0,7
22:5n-3	0,7 ± 1,3	0,2 ± 0,4	0,8 ± 1,4	0,3 ± 0,4
22:6n-3	8,9 ± 3,1	2,9 ± 1,0	8,3 ± 0,5	2,6 ± 0,2

Tableau 12 : Composition en acides gras des phosphatidyléthanolamines des LDL isolées par ultracentrifugation ou par FPLC.

Les LDL ont été séparées du plasma non congelé par ultracentrifugations séquentielles à temps courts ou par FPLC. Les lipides ont été extraits des LDL puis les phosphatidyléthanolamines ont été séparées par chromatographie sur couche mince. La composition et la quantification ont été réalisées suite à l'analyse par chromatographie gazeuse des acides gras méthylés. Les résultats, exprimés en mol% ou en nmol/mg protéine, représentent les moyennes ± S.D. de 3 sujets.
DMA, diméthylacétal.

I.2.e. Sphingomyélines :

Les SM (**Tableau 13**) sont majoritairement composées d'AGS (74 %) et de 24:1n-9 (21 %). On trouve seulement 4 % d'AGPI. Les résultats ne mettent en évidence aucune différence de composition selon la méthode utilisée.

Acide gras	SPHINGOMYELINES			
	Ultracentrifugation		FPLC	
	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine
16:0	32,2 ± 5,6	62,0 ± 25,1	29,2 ± 4,0	37,3 ± 15,3
18:0	10,2 ± 2,5	18,5 ± 3,3	11,6 ± 2,5	13,9 ± 1,5
18:1n-9	0,4 ± 0,5	0,8 ± 0,7	0,1 ± 0,3	0,3 ± 0,4
18:2n-6	0,6 ± 0,6	1,0 ± 0,9	0,5 ± 0,5	0,6 ± 0,6
20:0	5,6 ± 1,4	6,9 ± 0,9	5,8 ± 1,4	10,0 ± 0,9
22:0	14,9 ± 4,9	26,8 ± 2,4	15,6 ± 3,5	18,6 ± 1,5
22:4n-6	2,8 ± 4,9	7,3 ± 12,7	2,3 ± 3,9	3,9 ± 6,8
22:6n-3	0,4 ± 0,8	1,1 ± 1,9	0,6 ± 1,1	1,1 ± 1,8
22:1n-9	0,6 ± 0,5	1,1 ± 1,0	0,9 ± 0,8	1,1 ± 1,0
24:0	10,8 ± 2,7	20,3 ± 7,1	11,2 ± 2,9	13,9 ± 4,9
24:1n-9	21,1 ± 2,3	39,2 ± 11,1	21,8 ± 2,1	27,3 ± 9,1

Tableau 13 : Composition en AG des sphingomyélines des LDL isolées par ultracentrifugation ou par FPLC.

Les LDL ont été séparées du plasma non congelé par ultracentrifugations séquentielles à temps courts ou par FPLC. Les lipides ont été extraits des LDL puis les sphingomyélines ont été séparées par chromatographie sur couche mince. La composition a été réalisée suite à l'analyse par chromatographie gazeuse des acides gras méthylés. Les résultats, exprimés en mol%, représentent les moyennes ± S.D. de 3 sujets.

II. Paramètres du stress oxydant :

II.1. Acides gras monohydroxylés :

Les AGOH sont formés durant la peroxydation non enzymatique des AGPI. Les échantillons ayant subi une hydrolyse basique de leurs liaisons ester, nos résultats reflètent la totalité des AGOH (estérifiés ou non) présents dans les LDL. Pour chaque volontaire, nous avons pu détecter les acides 9-hydroxy-octadécadiénoïque (HODE) et 13-HODE, dérivés du 18:2n-6 ainsi que l'acide 15-hydroxy-eicosatétraénoïque (HETE), dérivé du 20:4n-6. Comme nous le voyons (**Tableau 14**), les 9-HODE et 13-HODE sont les principaux AGOH avec des concentrations respectives 217 et 242 pmol/mg cholestérol dans les LDL séparées par ultracentrifugation et des concentrations de 196 et 228 pmol/mg cholestérol dans les LDL séparées par FPLC. Le 15-HETE est une espèce mineure avec 35 et 28 pmol/mg cholestérol

dans les LDL séparées par ultracentrifugation et par FPLC. Les concentrations d'AGOH sont donc similaires quelle que soit la méthode utilisée. Il en est de même lorsque les AGOH sont exprimés en fonction de leur AG parent.

	Ultracentrifugation	FPLC
9-HODE (pmol/mg cholestérol)	217 ± 140	196 ± 132
13-HODE (pmol/mg cholestérol)	242 ± 47	228 ± 25
HODE/mole 18:2n-6 (µmol/mol)	519 ± 162	499 ± 151
15-HETE (pmol/mg cholestérol)	35 ± 8	28 ± 5
HETE/mole 20:4n-6 (µmol/mol)	313 ± 95	328 ± 48

Tableau 14 : Concentrations des acides gras monohydroxylés totaux et ratio acides gras monohydroxylés / acide gras parent dans les LDL isolées par ultracentrifugation ou par FPLC.

Les LDL ont été séparées du plasma non congelé par ultracentrifugations séquentielles à temps courts ou par FPLC. Les lipides ont été extraits des LDL puis les liaisons ester ont subi une hydrolyse basique (KOH). Les acides gras monohydroxylés totaux ont été séparés sur colonne Oasis et par chromatographie sur couche mince. La composition et la quantification ont été réalisées suite à l'analyse par HPLC couplée à un détecteur UV (234 nm). Les résultats, exprimés en pmol/mg cholestérol et en µmol/mol, représentent les moyennes ± S.D. de 3 sujets.

II.2. 8-iso-prostaglandine F_{2α} :

La 8-isoPGF_{2α} est l'une des nombreuses isoprostanes produites lors de la peroxydation non enzymatique de l'AA. L'hydrolyse basique des liaisons ester nous a permis de doser la totalité de la 8-isoPGF_{2α} présente dans les LDL. Malgré cela, nous sommes tout de même restés à la limite du seuil de détection et n'avons pu la détecter que chez un seul volontaire. Sa concentration dans des LDL séparées par ultracentrifugation (0,064 pmol/µmol cholestérol) est très proche de celle dans des LDL séparées par FPLC (0,069 pmol/µmol cholestérol).

II.3. Dialdéhyde malonique :

Le MDA est un produit terminal de la peroxydation non enzymatique des LDL. On trouve autant de MDA dans les LDL séparées par ultracentrifugation (118 ± 9 pmol/mg cholestérol) que dans les LDL séparées par FPLC (131 ± 32 pmol/mg cholestérol).

II.4. Vitamine E :

En tant qu'antioxydant majeur des LDL, la vitamine E constitue la première ligne de défense contre les radicaux peroxydes et alkoxydes. Deux isomères de vitamine E sont détectés dans les LDL, l' α -tocophérol et le γ -tocophérol. Nous trouvons des concentrations similaires d' α -tocophérol dans les LDL séparées respectivement par ultracentrifugation et par FPLC ($3,68 \pm 0,58$ vs $3,68 \pm 0,72$ nmol/mg cholestérol). Nous trouvons aussi du γ -tocophérol; sa concentration représente 10 % de celle de l' α -tocophérol et ne change pas que les LDL soient isolées par ultracentrifugation ou FPLC ($0,39 \pm 0,14$ vs $0,31 \pm 0,06$ nmol/mg cholestérol).

III. Discussion :

Pour clarifier le rôle exact des LDL oxydées dans diverses pathologies, il est essentiel d'utiliser une méthode d'isolement des particules minimisant leurs modifications oxydatives artéfactuelles. La plupart des études sur l'oxydation des lipoprotéines utilisent l'ultracentrifugation séquentielle pour séparer les différentes classes de lipoprotéines selon leurs densités (Havel *et al.*, 1955). Cependant, la perte d'apolipoprotéines et l'auto-oxydation ont été décrites durant ce protocole et les étapes de dialyses ultérieures (Napoli *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1985). La FPLC, utilisée en clinique, est une méthode alternative qui n'affecte pas la structure des lipoprotéines. Nous avons comparé les contenus en lipides et en peroxydes lipidiques de LDL isolées du plasma par ultracentrifugations séquentielles puis dialysées ou par FPLC afin de déterminer si l'une des méthodes est plus dommageable que l'autre.

En accord avec la littérature (Wiesner *et al.*, 2009), les LDL isolées par les deux méthodes possèdent des proportions équivalentes de leurs classes lipidiques avec 16 % de PL, 29 % de cholestérol libre, 51 % d'EC et 4 % de TG. Les PL des LDL isolées par ultracentrifugation contiennent 70,8 % de PC; 23,2 % de SM; 3,8 % de LPC et 2,2 % de PE. Ces résultats ne sont pas différents pour les LDL isolées par FPLC (76,5 % de PC; 17,7 % de SM; 3,5 % de LPC et 2,3 % de PE) et sont proches de ceux rapportés dans la littérature pour des LDL séparées par FPLC et analysées par spectrométrie de masse (68 % de PC, 25 % de SM, 4 % de LPC et 1,9 % de PE) (Wiesner *et al.*, 2009). Les plasmalogènes PE, particulièrement prompts à l'oxydation (Engelmann *et al.*, 1994), représentent 31,6 % et 25 % des PE dans les LDL isolées respectivement par ultracentrifugation et par FPLC, suggérant que la procédure d'ultracentrifugation suivie des dialyses n'est pas plus dommageable que la

FPLC. Quelle que soit la méthode utilisée, les LPC sont détectés en proportion similaire dans les LDL (0,5 % des lipides totaux) rendant peu probable leur perte dans la phase aqueuse durant la dialyse.

Les AGPI, cibles primaires de la peroxydation lipidique, représentent 46 % des AG présents dans les différentes classes lipidiques soit 2085 nmol/mg protéine, correspondant aux valeurs rapportées dans la littérature (Barre, 2003; Esterbauer *et al.*, 1992; Gotto *et al.*, 1986). La détermination des concentrations donne de nouvelles informations sur les concentrations de chaque AG dans chaque classe lipidique. Les principaux AGPI sont les acides linoléique (1641 nmol/mg protéine) et arachidonique (227 nmol/mg protéine) dont 75 % sont estérifiés dans les EC et 20 % dans les PC. On trouve des résultats similaires dans les LDL isolées par FPLC, quelle que soit l'expression des résultats (mol% ou nmol/mg protéine), indiquant que les AGPI ne subissent pas plus de peroxydation durant l'ultracentrifugation et les dialyses que durant la FPLC.

Nous avons détecté les deux AGOH dérivés du 18:2n-6 et l'un de ceux dérivé du 20:4n-6. La détection de ce seul HETE dans cette étude alors que nous en détectons quatre dans l'étude clinique, peut être expliquée par les quantités plus faibles de LDL utilisées pour les analyses. La mesure de ces premiers produits stables issus de la peroxydation lipidique non enzymatique nous indique que les HODE et HETE représentent respectivement 0,05 et 0,03 % de leurs AG parents, soulignant la faible peroxydation lipidique dans des LDL de volontaires sains. Une seule étude rapporte des concentrations en dérivés hydroxylés du 18:2n-6 et du 20:4n-6 inférieures à 0,5 nmol/mg protéine dans les LDL (Lenz *et al.*, 1990). Nous apportons ici des valeurs plus précises en accord avec ces dernières. Le MDA, dérivé de la peroxydation lipidique non enzymatique des AGPI contenant trois doubles liaisons ou plus (Dahle *et al.*, 1962; Pryor and Stanley, 1975) est communément utilisé comme index de peroxydation lipidique. Nos résultats montrent des concentrations similaires dans les LDL isolées par ultracentrifugation et par FPLC, rendant peu probable sa perte durant la dialyse (Esterbauer *et al.*, 1987). Les isoprostanes sont considérées comme un marqueur de la peroxydation non enzymatique *in vivo* (Morrow *et al.*, 1990). Une étude récente rapporte des concentrations de 0,25 pmol/ μ mol cholestérol dans des LDL isolées par ultracentrifugation et de 0,27 pmol/ μ mol cholestérol dans des LDL isolées par FPLC (Proudfoot *et al.*, 2009). Nous n'avons dosé qu'une seule d'entre elles, la 8-isoPGF_{2 α} , pouvant expliquer sa détection chez un seul volontaire (0,06 pmol/ μ mol cholestérol). Concernant l' α -tocophérol et le γ -tocophérol,

nos résultats ne montrent aucune différence de concentrations quelle que soit la méthode d'isolement des LDL rendant peu probable leurs pertes durant la dialyse (Scheek *et al.*, 1995).

Nos résultats indiquent clairement que les deux méthodes d'isolement sont équivalentes et permettent d'obtenir des LDL de même composition lipidique et de même contenu en peroxydes lipidiques. Nous avons donc choisi d'utiliser l'ultracentrifugation séquentielle pour réaliser le protocole ECLIPSE.

ETUDE DE LA CARACTERISATION DES LDL ET DE LEUR IMPLICATION DANS L'ACTIVATION PLAQUETTAIRE VIA UN STRESS OXYDANT ET/OU UN ECHANGE LIPIDIQUE (ECLIPSE)

Une étude conduite au laboratoire a montré que des patients diabétiques sans complications cardio-vasculaires présentent une hyperactivation plaquettaire associée à un stress oxydant accru comparativement à des volontaires sains (Véricel *et al.*, 2004). D'autre part, nous avons récemment montré que des LDL isolées du plasma de diabétiques (au contrôle glycémique médiocre) ou glycoxydées *in vitro* activent les plaquettes alors que des LDL de volontaires sains sont sans effet sur l'activation plaquettaire (Calzada *et al.*, 2007). Durant mon stage de Master 2, nous avons montré que des LDL de diabétiques de type-2 fortement déséquilibrés alliaient une forte diminution de leur proportion en 18:2n-6 dans les principales classes lipidiques et une forte augmentation de leur concentration en MDA à une capacité accrue à induire l'activation de la cascade de l'AA dans les plaquettes. Les modifications observées dans ces LDL semblaient d'autant plus prononcées que les diabétiques avaient une dyslipidémie (élévation des TG et diminution du HDL-cholestérol) et un IMC élevé, laissant supposer la présence d'un syndrome métabolique.

La concentration en cholestérol et la taille des LDL sont les paramètres classiquement associés à leur athérogénicité (Witztum and Steinberg, 1991). Cependant, la modification oxydative des LDL et la peroxydation lipidique sont impliquées dans le processus d'athérosclérose et sont reconnues moduler les fonctions cellulaires. Les peroxydes lipidiques pourraient donc représenter d'éventuels médiateurs des effets activateurs des LDL sur les plaquettes. Le profil lipidique détaillé des LDL activatrices et les mécanismes impliqués dans l'activation plaquettaire restent à déterminer.

L'objectif principal de notre protocole clinique a été de corrélérer un profil des LDL en peroxydes lipidiques à leur capacité à activer les plaquettes. Notre premier objectif a été d'établir un profil détaillé en lipides et peroxydes lipidiques des LDL isolées du plasma de diabétiques de type-2 comparativement à celui de volontaires sains. Dans le but de déterminer les contributions respectives de l'insulino-résistance et de l'hyperglycémie, le profil des LDL a également été défini chez des volontaires présentant un syndrome métabolique et des diabétiques de type-1 à évolution lente. Notre second objectif a été de déterminer l'effet des différentes populations de LDL sur l'activation des plaquettes.

I. Paramètres cliniques et traitements en cours :

Les paramètres cliniques sont récapitulés dans le *Tableau 15*. Comparativement aux volontaires du groupe témoin, les sujets du groupe SM, légèrement plus âgés, présentent un syndrome métabolique attesté par un tour de taille supérieur à 102 cm, une hypertriglycémie, un taux de HDL-cholestérol bas et une hypertension artérielle. Ces sujets présentent également une hyperinsulinémie. La glycémie, l'index HOMA-IR et le pourcentage d'hémoglobine glyquée sont similaires aux valeurs contrôle.

Comparativement au groupe témoin, les sujets du groupe DT-1, plus jeunes, présentent un diabète de type-1 attesté par un pourcentage d'hémoglobine glyquée et une glycémie élevés. Ces sujets ne présentent aucune caractéristique d'un syndrome métabolique. Paradoxalement, leur insulinémie est effondrée. L'absence quasi totale d'insuline s'explique par l'insuline recombinante qu'ils utilisent, non détectée par notre kit ELISA.

Comparativement au groupe témoin, les sujets du groupe DT-2, de même âge, présentent d'une part un diabète de type-2 attesté par un pourcentage d'hémoglobine glyquée et une glycémie élevés et d'autre part, un syndrome métabolique attesté par un tour de taille supérieur à 102 cm, une hypertriglycémie, un taux de HDL-cholestérol bas et une tension artérielle systolique plus élevée. L'absence significative d'augmentation de la pression artérielle diastolique peut s'expliquer par la prise d'hypotenseurs par certains patients. Il est à noter que les sujets de ce groupe ont un diabète très déséquilibré, bien plus que les sujets du groupe DT-1, comme en témoigne leur pourcentage très élevé d'hémoglobine glyquée (10,4%). Malgré cela, l'insuline à jeun est similaire aux valeurs contrôles. Ceci reflète sans doute l'épuisement des cellules β faisant suite à une longue période d'insulino-résistance compensée par une sécrétion accrue.

Paramètre clinique	V	SM	DT-1	DT-2
Age (années)	50 ± 3	58 ± 2*	42 ± 2*	57 ± 3
IMC (kg/m ²)	24,3 ± 0,7	30,7 ± 1,4*	24,9 ± 0,7	30,8 ± 1,1**
Tour de taille (cm)	92 ± 2	111 ± 3**	89 ± 3	116 ± 7**
Glucose à jeun (mM)	5,5 ± 0,2	5,6 ± 0,1	8,2 ± 0,8*	9,0 ± 1,0**
Insuline à jeun (µIU/mL)	5,9 ± 0,9	9,8 ± 1,8*	0,5 ± 0,2	6,5 ± 1,7
HOMA-IR	1,54 ± 0,29	2,53 ± 0,52	0,25 ± 0,11	2,75 ± 0,92
HbA1c (%)	5,4 ± 0,1	5,7 ± 0,1	7,7 ± 0,2**	10,4 ± 0,9**
Pression artérielle systolique (mmHg)	121 ± 3	144 ± 3**	123 ± 3	132 ± 6*
Pression artérielle diastolique (mmHg)	78 ± 4	88 ± 5*	72 ± 2	77 ± 3
Cholestérol total (mM)	6,0 ± 0,4	5,2 ± 0,3	5,0 ± 0,3*	4,8 ± 0,4*
HDL-cholestérol (mM)	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1**	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1**
Cholestérol total/ HDL-cholestérol	4,5 ± 0,4	4,9 ± 0,3	3,6 ± 0,2*	5,3 ± 0,3*
LDL-cholestérol (mM)	4,1 ± 0,4	3,2 ± 0,2	2,9 ± 0,3*	2,7 ± 0,4**
VLDL-cholestérol (mM)	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1**	0,4 ± 0,0	1,0 ± 0,1**
Triacylglycérols (mM)	1,3 ± 0,1	2,2 ± 0,3**	0,9 ± 0,1	2,6 ± 0,2**

Tableau 15 : Paramètres cliniques des volontaires ECLIPSE.

Les diminutions significatives sont signalées en bleu, les augmentations significatives en jaune. Les résultats représentent les moyennes ± S.E.M. de 8 à 10 sujets par groupe et par paramètre. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparativement aux volontaires sains.

DT-1, patients diabétiques de type-1; DT-2, patients diabétiques de type-2; HbA1c, hémoglobine A1c glyquée; HOMA-IR, « Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance » calculé selon (glycémie x insulémie)/22,5; IMC, indice de masse corporelle calculé selon poids / (taille x taille); SM, volontaires ayant un syndrome métabolique; V, volontaires sains.

La liste des traitements en cours est présentée dans le **Tableau 16**.

Groupe	Traitement en cours
V	Aucun
SM	Hypotenseurs (2/10), Anti-thrombotiques (1/10), Hypocholestérolémiant (1/10)
DT-1	Hypotenseurs (3/10), Analogues d'insuline (9/10)
DT-2	Hypotenseurs (4/10), Anti-thrombotiques (1/10), Analogues d'insuline (2/10), Anti-diabétiques (5/10)

Tableau 16 : Liste des traitements en cours des volontaires ECLIPSE.

Entre parenthèses, nombre de sujets traités. Hypotenseurs: Isobar, Sectar, Detensiel, Esidrex, Triatec, Aprovel, Hyzaar, Lercan, Coaprovel, Amlor, Eupressyl, Temerit, Odrik. Anti-thrombotiques: Kardegic. Hypocholestérolémiant: Ezetrol. Analogues d'insuline : Novorapid, Lantus, Humalog, Humalog Mix, Novomix. Anti-diabétiques : Amarel, Byetta, Diamicron, Glucophage. DT-1, patients diabétiques de type-1; DT-2, patients diabétiques de type-2; SM, volontaires ayant un syndrome métabolique; V, volontaires sains.

II. Composition lipidique des LDL :

II.1. Principales classes lipidiques :

Après séparation par CCM des principales classes lipidiques des LDL, nous les avons quantifiées par GC à l'aide d'une standardisation interne (**Tableau 17**). Les EC sont la classe lipidique majoritaire des LDL. Très apolaires, ils se trouvent dans le cœur hydrophobe des particules avec les TG, une classe lipidique mineure des LDL. Les PC sont la classe lipidique majoritaire des phospholipides des LDL. Amphiphiles, ils se trouvent dans la monocouche enveloppant les particules avec les PE, les SM, les LPC et le cholestérol libre.

Comparativement aux LDL du groupe témoin, nous voyons une diminution de la concentration en EC dans les LDL des groupes SM et DT-2 (respectivement -13% et -20%) alors que les concentrations de TG augmentent, respectivement de +50% et +72%. Les concentrations de PC ne diminuent significativement que dans les LDL du groupe DT-1 (-11%). Enfin, nous voyons que les concentrations de PE restent les mêmes dans tous les groupes.

Ne disposant pas de standards internes pour le cholestérol, les LPC et les SM, nous les avons séparés par HPLC couplé à un détecteur à diffusion de lumière. Après quelques dosages préliminaires, nous n'avons vu aucune variation de leurs concentrations entre les groupes. Nous n'avons donc pas poursuivi ce dosage.

Classe lipidique (nmol/mg protéine)	V	SM	DT-1	DT-2
Esters de cholestérol	2459 ± 118	2132 ± 61**	2250 ± 76	1975 ± 88**
Triacylglycérols	140 ± 11	210 ± 19*	182 ± 16	241 ± 37**
Phosphatidylcholines	521 ± 17	477 ± 18	463 ± 13 *	479 ± 21
Phosphatidyléthanolamines	17 ± 2	15 ± 1	20 ± 2	18 ± 1

Tableau 17 : Principales classes lipidiques des LDL des volontaires ECLIPSE.

La quantification des classes lipidiques a été réalisée suite à l'analyse par chromatographie gazeuse des acides gras méthylés. Les diminutions significatives sont signalées en bleu, les augmentations significatives en jaune. Les résultats, exprimés en nmol/mg protéine, représentent les moyennes ± S.E.M. de 8 à 10 sujets par groupe. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparativement aux volontaires sains. DT-1, patients diabétiques de type-1; DT-2, patients diabétiques de type-2; SM, volontaires ayant un syndrome métabolique; V, volontaires sains.

II.2. Composition en acides gras des classes lipidiques des LDL :

Nous avons ensuite analysé par GC la composition détaillée en AG de ces classes lipidiques. Les résultats sont exprimés à la fois en pourcentages molaires et en concentrations.

II.2.a. Esters de cholestérol :

13,5% de la totalité de leurs AG sont des AGS, dont 92% de 16:0, 24,4% sont des AGMI, dont 84% de 18:1n-9 et 62% sont des AGPI, dont 84% de 18:2n-6 et 11% de 20:4n-6 (**Tableau 18**, page 139).

Comparativement aux EC des LDL du groupe V, nous observons une diminution significative du pourcentage molaire des AGPI (-6%) des EC des LDL du groupe SM, majoritairement due à la diminution du 18:2n-6 (-11%). Parallèlement, les AGMI et AGS augmentent (respectivement +11% et +9%) du fait de l'augmentation des 16:0 (+9%) et 16:1n-7 (+68%). Quantitativement, nous observons une diminution des AGPI (-19%) dont le 18:2n-6 (-22%) ainsi qu'une augmentation du 16:1n-7 (+47%).

Concernant les EC des LDL du groupe DT-1., les principaux AG ne varient pas significativement. Cependant, nous notons des diminutions du pourcentage molaire des 16:1n-7 (-32%) et 20:3n-6 (-25%) et des diminutions des concentrations des AGMI (-11%) dont le 16:1n-7 (-35%). La concentration de 20:3n-6 diminue également (-32%).

Les EC des LDL du groupe DT-2 ont une composition en AG différente de celle des EC des LDL témoins. Nous observons une augmentation du pourcentage molaire des AGS (+9%) dont le 16:0 (+10%) et une diminution des AGPI (-5%) dont le 18:2n-6 (-10%). En revanche, le 20:4n-6 augmente (+34%). Quantitativement, nous voyons à l'inverse une diminution des AGS (-12%) dont le 16:0 (-11%) et des AGMI (-13%) dont le 18:1n-9 (-13%). La concentration en AGPI diminue significativement (-24%) dont le 18:2n-6 (-27%).

II.2.b. Triacylglycérols :

33,3% de la totalité de leurs AG sont des AGS, dont 84% de 16:0. 47% sont des AGMI, dont 89% de 18:1n-9 et 19,3% sont des AGPI, dont 73% de 18:2n-6 (*Tableau 19*, page 140).

Comparativement aux TG des LDL du groupe V, nous observons une augmentation du pourcentage molaire des AGS (+12%) des TG des LDL du groupe SM, principalement due à l'augmentation du 16:0 (+11%). Nous voyons une diminution des 20:5n-3 (-60%) et 22:6n-3 (-55%). En revanche, nous n'observons aucune modification des concentrations des AG.

Concernant les TG des LDL du groupe DT-1, nous n'observons aucune différence de la majorité des AG hormis une diminution des pourcentages molaires d'AG quantitativement mineurs, les 20:3n-6 (-77%), 20:5n-3 (-60%) et 22:6n-3 (-75%). Aucune différence de composition en AG n'est à noter lorsque les résultats sont exprimés en concentration.

Pour les TG des LDL du groupe DT-2, nous voyons une diminution du pourcentage molaire des 20:5n-3 (-60%) et 22:6n-3 (-55%). Quantitativement, nous observons une augmentation des AGS (+56%), dont les 16:0 (+55%) et 18:0 (+63%), des AGMI (+60%) dont le 18:1n-9 (+62%) et des AGPI (+40%) dont les 18:2n-6 (+49%) et 20:4n-6 (+50%).

II.2.c. Phosphatidylcholines :

50% de la totalité de leurs AG sont des AGS dont 67% de 16:0 et 32% de 18:0. 12,9% sont des AGMI dont 84% de 18:1n-9 et 37,1% sont des AGPI dont 59% de 18:2n-6 et 19% de 20:4n-6 (*Tableau 20*, page 141).

Comparativement aux PC des LDL du groupe V, nous observons une diminution du pourcentage molaire du 18:2n-6 (-12%) et une augmentation du 20:3n-6 (+19%) dans les PC des LDL du groupe SM. Nous voyons une diminution quantitative du 18:2n-6 (-19%).

Concernant les PC des LDL du groupe DT-1, les pourcentages molaires des principaux AG ne sont pas significativement différents de ceux des témoins, si ce n'est une diminution du pourcentage molaire du 20:3n-6 (-29%). Les concentrations d'AGS (-13%) diminuent dont les 16:0 (-12%) et 18:0 (-18%), de même que celles du 20:3n-6 (-37%).

Les PC des LDL du groupe DT-2 possèdent moins de 18:2n-6 (-10%) et davantage de 20:4n-6 (+29%) lorsque les résultats sont exprimés en pourcentage molaire. En quantité absolue, les concentrations des 18:0 (-12%) et 18:2n-6 (-13%) diminuent.

II.2.d. Phosphatidyléthanolamines :

Les PE comportent deux sous-classes principales, les diacylglycérophosphoéthanolamines et les alkényl-acyl-glycérophosphoéthanolamines (sous-classe des plasmalogènes à PE). Celles-ci sont caractérisées par une liaison ester ou vinyl-éther en position *sn*-1 et une liaison ester en position *sn*-2. Les diméthylacétals (DMA) sont formés par transméthylation des chaînes alkényles.

38,9% de la totalité des AG des PE sont des AGS dont 42% de 16:0 (acyl et alkényl) et 55% de 18:0 (acyl et alkényl). 11,3% sont des AGMI dont 80% de 18:1n-9 (acyl et alkényl) et 49,8% sont des AGPI dont 17% de 18:2n-6, 43% de 20:4n-6 et 25% de 22:6n-3 (**Tableau 21**, page 142). La somme des trois DMA (16:0 DMA, 18:0 DMA et 18:1n-9 DMA) représente 24,3% des AG des PE.

Comparativement aux PE des LDL du groupe V, nous observons une diminution du pourcentage molaire des 16:0 DMA (-22%) et 18:0 DMA (-23%) ainsi qu'une augmentation du 18:0 (+38%) dans les PE des LDL du groupe SM. La somme des trois DMA représente 18,9% de la totalité des AG et est diminuée de -22% par rapport au témoin. Nous voyons également une diminution de la concentration du 16:0 DMA (-27%).

Concernant les PE des LDL de du groupe DT-1, le pourcentage molaire du 16:0 DMA diminue (-22%) alors que celui du 18:0 augmente (+24%). La somme des trois DMA représente 20,6% de la totalité des AG et est diminuée de -15% par rapport aux témoins. Les concentrations des 16:0, 18:0 et 18:2n-6 augmentent respectivement de 48%, 55% et 46%.

Dans les PE des LDL du groupe DT-2, les pourcentages molaires des 16:0 DMA (-47%), 18:0 DMA (-50%), 18:1n-9 DMA (-42%) et 20:5n-3 (-60%) diminuent alors que ceux des 16:0 (+48%) et 18:0 (+73%) augmentent. La somme des trois DMA représente 12,4% de la totalité des AG et est diminuée de -49%. Les concentrations en 16:0 DMA, 18:0 DMA,

18:1n-9 DMA et 20:5n-3 diminuent (respectivement -47%, -50%, -42% et -55%) alors que celles des 16:0 et 18:0 augmentent (respectivement +62% et +96%).

II.2.e. Sphingomyélines :

La majorité des AG des SM sont des AGS (75,4%) dont 46% de 16:0, 16% de 18:0, 6% de 20:0, 18% de 22:0 et 14% de 24:0. 21,3% sont des AGMI dont 90% de 24:1n-9 et 3,4% sont des AGPI (*Tableau 22*, page 143).

Il n'apparaît aucune différence de composition en AG entre les différents groupes.

ESTERS DE CHOLESTEROL									
Acide Gras	V		SM		DT-1		DT-2		nmol/mg protéine
	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine	
16:0	12,4 ± 0,4	328,7 ± 12,2	13,5 ± 0,4*	311,3 ± 11,4	12,5 ± 0,4	302,8 ± 8,5	13,7 ± 0,3*	291,8 ± 11,9*	
16:1n-7	2,5 ± 0,3	65,2 ± 6,4	4,2 ± 0,3**	96,2 ± 8,7**	1,7 ± 0,2*	41,5 ± 4,1*	2,8 ± 0,3	57,9 ± 7,2	
16:1n-9	0,3 ± 0,1	8,4 ± 1,8	0,4 ± 0,1	8,7 ± 2,2	0,4 ± 0,1	9,0 ± 2,0	0,5 ± 0,1	11,1 ± 2,4	
18:0	1,0 ± 0,1	23,5 ± 1,7	1,0 ± 0,1	21,1 ± 1,2	1,0 ± 0,0	22,0 ± 1,0	1,0 ± 0,1	18,6 ± 2,0	
18:1n-7	1,0 ± 0,2	23,4 ± 4,6	0,7 ± 0,2	15,6 ± 4,1	1,3 ± 0,2	28,5 ± 3,6	1,0 ± 0,2	19,0 ± 4,1	
18:1n-9	20,6 ± 0,7	496,8 ± 17,5	21,7 ± 0,7	457,8 ± 21,1	20,2 ± 0,8	449,0 ± 20,1	22,1 ± 0,7	428,9 ± 15,1*	
18:2n-6	52,0 ± 1,2	1277,7 ± 81,4	46,7 ± 1,4**	991,1 ± 42,5**	53,0 ± 1,4	1191,0 ± 62,2	46,7 ± 1,1**	924,6 ± 58,9**	
18:3n-3	0,4 ± 0,1	11,1 ± 1,6	0,7 ± 0,0	14,1 ± 0,8	0,5 ± 0,1	10,7 ± 1,3	0,5 ± 0,1	9,1 ± 1,7	
18:3n-6	0,8 ± 0,1	19,4 ± 3,7	1,1 ± 0,1	23,0 ± 2,2	0,5 ± 0,1	11,9 ± 1,6	0,8 ± 0,2	16,4 ± 3,1	
20:3n-6	0,8 ± 0,0	17,0 ± 1,4	0,9 ± 0,1	18,2 ± 1,4	0,6 ± 0,3*	11,5 ± 1,6*	0,9 ± 0,1	15,7 ± 1,7	
20:4n-6	6,2 ± 0,4	141,7 ± 16	7,0 ± 0,6	136,6 ± 11,7	6,5 ± 0,3	134,9 ± 8,8	8,3 ± 0,5**	149,8 ± 7,2	
20:5n-3	1,3 ± 0,2	28,0 ± 4,5	1,3 ± 0,2	24,5 ± 2,6	1,0 ± 0,2	21,5 ± 3,2	1,0 ± 0,2	18,5 ± 3,0	
22:6n-3	0,7 ± 0,1	13,8 ± 1,5	0,6 ± 0,1	10,1 ± 0,8	0,7 ± 0,1	13,1 ± 2,1	0,6 ± 0,1	11,0 ± 1,5	
AGS	13,5 ± 0,5	353,8 ± 13,6	14,7 ± 0,4*	334,9 ± 11,7	13,5 ± 0,4	326,4 ± 9,3	14,7 ± 0,3*	311,3 ± 12,5*	
AGMI	24,4 ± 0,8	594,7 ± 17,4	27,1 ± 1,0*	579,1 ± 30,2	23,6 ± 0,9	528,7 ± 23,1*	26,4 ± 0,5	517,3 ± 15,1*	
AGPI	62,1 ± 1,1	1511,6 ± 97,9	58,3 ± 1,2*	1219,5 ± 41,5*	62,9 ± 1,2	1396,2 ± 65,6	59,0 ± 0,7*	1146,1 ± 62,9*	

Tableau 18 : Composition en principaux acides gras des esters de cholestérol des LDL des volontaires ECLIPSE.

Les diminutions significatives sont signalées en bleu, les augmentations significatives en jaune. Les résultats, exprimés en mol% ou en nmol/mg protéine, représentent les moyennes ± S.E.M. de 8 à 10 sujets par groupe. * P<0,05, ** P<0,01 comparativement aux volontaires sains.

DT-1, patients diabétiques de type-1; DT-2, patients diabétique de type-2; SM, volontaires ayant un syndrome métabolique; V, volontaires sains.

TRIACYLGLYCEROLS											
Acide Gras	V		SM		DT-1		DT-2				
	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine	
16:0	28,2 ± 1,2	140,5 ± 14,5	31,4 ± 0,7*	199,3 ± 20,7	27,5 ± 0,8	161,5 ± 16,1	28,3 ± 0,9	218,5 ± 33,2*			
16:1n-7	2,5 ± 0,3	12,6 ± 2,2	3,0 ± 0,2	19,4 ± 2,7	1,8 ± 0,3	10,5 ± 2,3	2,3 ± 0,3	17,7 ± 3,1			
16:1n-9	0,4 ± 0,1	1,6 ± 0,6	0,3 ± 0,1	1,7 ± 0,9	0,3 ± 0,1	1,5 ± 0,6	0,2 ± 0,1	2,1 ± 1,4			
18:0	4,8 ± 0,3	21,7 ± 2,6	5,6 ± 0,3	31,5 ± 2,8	5,3 ± 0,4	27,2 ± 2,4	4,9 ± 0,5	35,5 ± 7,6*			
18:1n-7	1,4 ± 0,3	6,9 ± 1,9	1,5 ± 0,3	8,6 ± 2,0	1,9 ± 0,2	10,5 ± 1,6	1,7 ± 0,3	12,5 ± 3,5			
18:1n-9	42,8 ± 1,1	193,2 ± 16,9	41,7 ± 0,6	241,5 ± 25,3	45,8 ± 0,9	240,9 ± 19,3	43,6 ± 1,8	312,9 ± 53,8*			
18:2n-6	14,2 ± 0,9	63,9 ± 5,8	12,1 ± 1,2	71,1 ± 11,7	13,3 ± 0,7	71,9 ± 7,9	14,7 ± 1,8	95,3 ± 10,3*			
18:3n-3	0,8 ± 0,1	3,5 ± 0,6	0,7 ± 0,1	3,9 ± 0,8	0,8 ± 0,2	4,6 ± 1,2	0,6 ± 0,2	4,3 ± 1,0			
18:3n-6	0,4 ± 0,1	1,8 ± 0,4	0,2 ± 0,1	1,2 ± 0,4	0,2 ± 0,1	1,3 ± 0,4	0,3 ± 0,1	1,8 ± 0,5			
20:3n-6	0,3 ± 0,0	1,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	1,7 ± 0,3	0,1 ± 0,0*	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1	1,4 ± 0,4			
20:4n-6	1,8 ± 0,2	7,6 ± 1,2	1,4 ± 0,1	7,6 ± 0,9	1,5 ± 0,1	7,4 ± 0,7	1,8 ± 0,2	11,4 ± 2,1*			
20:5n-3	0,5 ± 0,2	2,1 ± 0,7	0,2 ± 0,0*	1,0 ± 0,3	0,2 ± 0,1*	1,0 ± 0,3	0,2 ± 0,1*	1,2 ± 0,3			
22:5n-3	0,3 ± 0,1	1,3 ± 0,5	0,2 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,2 ± 0,1	1,0 ± 0,3	0,2 ± 0,1	1,1 ± 0,3			
22:6n-3	1,1 ± 0,3	4,1 ± 1,3	0,5 ± 0,1*	2,8 ± 0,5	0,4 ± 0,1*	2,1 ± 0,5	0,5 ± 0,1*	3,2 ± 0,6			
AGS	33,3 ± 1,3	163,0 ± 16,4	37,4 ± 1,0*	233,1 ± 23,8	33,0 ± 0,9	189,6 ± 18,1	33,3 ± 1,2	254,7 ± 40,6*			
AGMI	47,4 ± 0,8	215,6 ± 19,0	46,8 ± 0,6	273,1 ± 28,9	50,2 ± 0,8	265,5 ± 21,8	48,1 ± 1,9	347,4 ± 60,7*			
AGPI	19,3 ± 1,2	85,7 ± 8,2	15,8 ± 1,3	90,6 ± 13,4	16,8 ± 0,8	90,1 ± 10,1	18,6 ± 2,0	119,9 ± 12,8*			

Tableau 19 : Composition en principaux acides gras des triacylglycérols des LDL des volontaires ECLIPSE.

La légende est identique à celle du tableau 18. Les résultats, exprimés en mol% ou en nmol/mg protéine, représentent les moyennes ± S.E.M. de 10 sujets par groupe. * P<0,05 comparativement aux volontaires sains.

PHOSPHATIDYLCHOLINES										
Acide Gras	V			SM			DT-1		DT-2	
	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine
16:0	33,5 ± 0,7	375,9 ± 14,8	34,7 ± 0,4	355,7 ± 12,4	33,4 ± 0,5	332,1 ± 7,4*	34,3 ± 0,5	354,2 ± 17,5		
16:1n-7	0,3 ± 0,1	3,8 ± 0,8	0,5 ± 0,1	5,5 ± 0,8	0,3 ± 0,0	2,8 ± 0,3	0,3 ± 0,1	3,0 ± 0,9		
18:0	16,0 ± 0,5	162,4 ± 6,1	15,8 ± 0,7	146,9 ± 8,1	14,9 ± 0,3	133,9 ± 3,8**	15,3 ± 0,7	142,5 ± 8,1*		
18:1n-7	1,3 ± 0,3	12,8 ± 2,7	1,0 ± 0,2	9,9 ± 2,1	1,5 ± 0,2	13,5 ± 2,2	1,2 ± 0,3	11,5 ± 2,6		
18:1n-9	10,9 ± 0,5	111,8 ± 5,4	10,9 ± 0,5	102,3 ± 6,5	11,5 ± 0,2	104,1 ± 3,2	11,6 ± 0,3	109,7 ± 6,6		
18:2n-6	21,8 ± 1,0	225,2 ± 13,0	19,2 ± 0,7*	180,9 ± 10,6**	23,3 ± 0,6	213,5 ± 10,1	19,6 ± 0,7*	185,3 ± 9,6*		
20:3n-6	3,1 ± 0,2	29,4 ± 2,1	3,7 ± 0,3*	32,4 ± 3,0	2,2 ± 0,1**	18,7 ± 0,9*	3,3 ± 0,2	28,9 ± 2,4		
20:4n-6	7,2 ± 0,6	69,3 ± 6,9	8,8 ± 0,7	76,3 ± 7,0	7,7 ± 0,4	64,9 ± 3,2	9,3 ± 0,5*	81,2 ± 5,0		
20:5n-3	1,1 ± 0,3	10,5 ± 2,8	1,1 ± 0,1	9,8 ± 0,8	0,9 ± 0,1	7,7 ± 1,0	0,9 ± 0,2	7,7 ± 1,6		
22:5n-3	0,4 ± 0,2	3,6 ± 1,4	0,4 ± 0,2	3,4 ± 1,3	0,4 ± 0,1	3,4 ± 1,1	0,4 ± 0,1	3,7 ± 0,9		
22:6n-3	3,2 ± 0,4	27,7 ± 3,1	2,6 ± 0,3	21,0 ± 1,5	2,9 ± 0,3	22,8 ± 2,3	2,9 ± 0,2	23,3 ± 1,4		
AGS	50,0 ± 0,9	541,9 ± 19,2	50,9 ± 0,7	505,9 ± 18,3	48,6 ± 0,6	468,5 ± 9,9**	49,9 ± 0,6	499,3 ± 22,7		
AGMI	12,9 ± 0,6	131,7 ± 6,9	13,0 ± 0,6	121,5 ± 7,8	13,6 ± 0,2	123,3 ± 3,9	13,4 ± 0,4	126,5 ± 7,0		
AGPI	37,1 ± 1,0	368,3 ± 16,4	36,1 ± 0,9	326,2 ± 15,4	37,8 ± 0,7	333,9 ± 14,6	36,7 ± 0,6	332,8 ± 14,2		

Tableau 20 : Composition en principaux acides gras des phosphatidylcholines des LDL des volontaires ECLIPSE.

La légende est identique à celle du tableau 18. Les résultats, exprimés en mol% ou en nmol/mg protéine, représentent les moyennes ± S.E.M. de 8 à 9 sujets par groupe. * P<0,05, ** P<0,01 comparativement aux volontaires sains.

PHOSPHATIDYLETHANOLAMINES												
Acide Gras	V			SM			DT-1			DT-2		
	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine	mol %	nmol/mg protéine
16:0	8,1 ± 0,5	2,9 ± 0,2	10,1 ± 1,0	3,5 ± 0,4	9,7 ± 0,9	4,3 ± 0,5*	12,0 ± 1,1**	4,7 ± 0,4**				
16:0 DMA	8,5 ± 0,5	3,0 ± 0,3	6,6 ± 0,4*	2,2 ± 0,2*	6,6 ± 0,7*	2,8 ± 0,3	4,3 ± 0,5**	1,6 ± 0,2**				
16:1n-9	0,7 ± 0,3	0,3 ± 0,1	1,3 ± 0,5	0,5 ± 0,2	1,0 ± 0,4	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,3 ± 0,2				
18:0	8,8 ± 0,6	2,9 ± 0,2	12,1 ± 0,5*	3,8 ± 0,2	10,9 ± 0,9*	4,5 ± 0,6*	15,2 ± 0,8**	5,7 ± 0,7**				
18:0 DMA	12,5 ± 1,1	4,6 ± 1,0	9,6 ± 0,7*	3,1 ± 0,3	11,0 ± 0,8	4,6 ± 0,5	6,2 ± 0,9**	2,3 ± 0,4**				
18:1n-9	5,7 ± 0,8	1,8 ± 0,2	5,0 ± 0,3	1,6 ± 0,1	6,0 ± 0,2	2,5 ± 0,2	5,8 ± 0,5	2,1 ± 0,2				
18:1n-9 DMA	3,3 ± 0,2	1,2 ± 0,2	2,7 ± 0,2	0,9 ± 0,1	3,0 ± 0,5	1,3 ± 0,2	1,9 ± 0,2**	0,7 ± 0,1*				
18:2n-6	8,6 ± 0,6	2,8 ± 0,2	9,1 ± 0,8	2,9 ± 0,2	9,7 ± 0,6	4,1 ± 0,5**	7,7 ± 0,7	2,8 ± 0,2				
20:3n-6	2,0 ± 0,5	0,7 ± 0,2	2,9 ± 0,6	0,9 ± 0,2	1,7 ± 0,3	0,7 ± 0,2	2,4 ± 0,7	0,8 ± 0,2				
20:4n-6	21,3 ± 1,5	7,1 ± 1,4	20,6 ± 1,4	6,2 ± 0,7	21,3 ± 0,9	8,2 ± 0,8	20,3 ± 1,3	7,0 ± 0,7				
20:5n-3	3,5 ± 0,9	1,1 ± 0,2	2,7 ± 0,3	0,8 ± 0,1	2,7 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,5**	0,5 ± 0,2*				
22 :1n-9	0,7 ± 0,4	0,3 ± 0,2	1,7 ± 0,8	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,3	0,3 ± 0,1	2,6 ± 1,9	0,8 ± 0,6				
22:5n-3	1,3 ± 0,5	0,4 ± 0,2	1,7 ± 0,6	0,5 ± 0,2	1,5 ± 0,5	0,5 ± 0,2	1,1 ± 0,4	0,4 ± 0,2				
22:6n-3	12,6 ± 1,0	3,6 ± 0,3	10,9 ± 0,6	3,0 ± 0,2	10,9 ± 0,7	3,8 ± 0,3	12,5 ± 1,5	4,2 ± 0,8				
24:0	0,5 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,1				
24:1n-9	0,6 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0				
AGS	38,9 ± 0,9	13,7 ± 1,5	39,7 ± 1,0	12,9 ± 0,6	39,6 ± 0,8	16,6 ± 1,2	39,7 ± 2,0	15,0 ± 1,2				
AGMI	11,3 ± 0,7	3,8 ± 1,3	11,4 ± 1,1	3,6 ± 0,4	11,6 ± 0,9	4,7 ± 0,5	13,1 ± 3,5	4,8 ± 1,3				
AGPI	49,8 ± 0,9	15,9 ± 2,0	48,9 ± 1,2	14,5 ± 0,9	48,8 ± 0,8	18,8 ± 1,7	47,2 ± 2,4	16,4 ± 1,7				
Somme DMA	24,3 ± 1,4	8,7 ± 1,4	18,9 ± 1,0**	6,2 ± 0,6*	20,6 ± 1,7*	8,6 ± 1,0	12,4 ± 1,4**	4,6 ± 0,6**				

Tableau 21 : Composition en principaux acides gras des phosphatidyléthanolamines des LDL des volontaires ECLIPSE.

La légende est identique à celle du tableau 18. Les résultats, exprimés en mol% ou en nmol/mg protéine, représentent les moyennes ± S.E.M. de 8 à 9 sujets par groupe. * P<0,05, ** P<0,01 comparativement aux volontaires sains.

DMA, diméthylacétals.

SPHINGOMYELINES					
Acide Gras	V	SM	DT-1	DT-2	
	mol %	mol %	mol %	mol %	mol %
16:0	34,6 ± 1,2	31,3 ± 1,3	35,1 ± 1,5	33,2 ± 2,0	
18:0	12,0 ± 0,6	13,5 ± 1,0	12,0 ± 1,1	14,5 ± 1,6	
18:1n-9	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,2 ± 0,4	
18:2n-6	1,0 ± 0,4	1,6 ± 0,5	1,7 ± 0,4	0,9 ± 0,3	
20:0	4,9 ± 0,2	4,9 ± 0,3	4,4 ± 0,2	5,2 ± 0,3	
22:0	13,5 ± 0,6	14,0 ± 0,9	12,8 ± 0,7	13,4 ± 0,8	
22:1n-9	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	
22:6n-3	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,3	
24:0	10,5 ± 0,7	10,6 ± 0,8	10,0 ± 0,7	9,2 ± 1,0	
24:1n-9	19,1 ± 1,3	18,8 ± 1,3	18,6 ± 1,3	19,2 ± 2,0	
AGS	75,4 ± 1,4	74,3 ± 1,0	74,3 ± 0,9	75,6 ± 1,7	
AGMI	21,2 ± 1,3	20,8 ± 1,1	20,7 ± 1,1	21,8 ± 1,8	
AGPI	3,4 ± 0,8	4,9 ± 1,4	5,0 ± 1,0	3,3 ± 0,7	

Tableau 22 : Composition en principaux acides gras des sphingomyélines des LDL des volontaires ECLIPSE.

La légende est identique à celle du tableau 18. Les résultats, exprimés en mol%, représentent les moyennes ± S.E.M. de 10 sujets par groupe.

II.3. Taille des particules de LDL :

Nous avons déterminé la taille des LDL présentes dans le plasma des volontaires des différents groupes (**Figure 35**). Comparativement aux LDL du groupe témoin, nous observons une diminution très faible mais significative du diamètre des LDL des groupes SM et DT-2. Les LDL du groupe DT-1 ont pour leur part le même diamètre que les LDL des témoins.

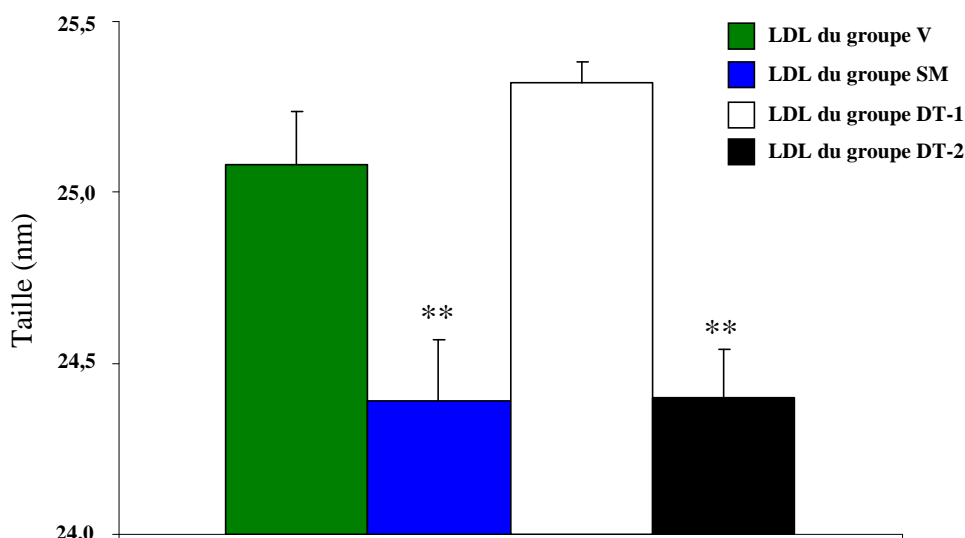


Figure 35 : Taille des LDL des sujets ECLIPSE.

Les résultats, exprimés en nm, représentent les moyennes \pm S.E.M. de 10 sujets par groupe. ** $P < 0,01$ comparativement aux volontaires sains.

DT-1, patients diabétiques de type-1; DT-2, patients diabétiques de type-2; SM, volontaires ayant un syndrome métabolique; V, volontaires sains.

III. Paramètres du stress oxydant :

III.1. Acides gras monohydroxylés totaux :

Pour chaque sujet, nous avons pu détecter les 9-HODE et 13-HODE, dérivés du 18:2n-6, et les 8-HETE, 11-HETE, 12-HETE et 15-HETE, dérivés du 20:4n-6 (**Figure 36**) (Figure 24). Comme nous le voyons, les 9-HODE et 13-HODE constituent 78% des AGOH détectés dans les LDL. Seuls quatre des six isomères HETE sont détectés et représentent 22% des AGOH.

Comparativement aux LDL du groupe témoin, nous observons une augmentation des 9-HODE et 13-HODE dans les LDL de chacun des trois groupes : groupe SM (respectivement +62% et +55%), groupe DT-1 (respectivement +50% et +59%) et groupe DT-2 (respectivement +52% et +50%).

Concernant les HETE, nous observons une augmentation du 15-HETE (+82%) dans les LDL du groupe DT-2 mais ne mettons en évidence aucune modification significative des 8, 11, 12 et 15-HETE dans les LDL des autres groupes comparativement aux LDL du groupe témoin.

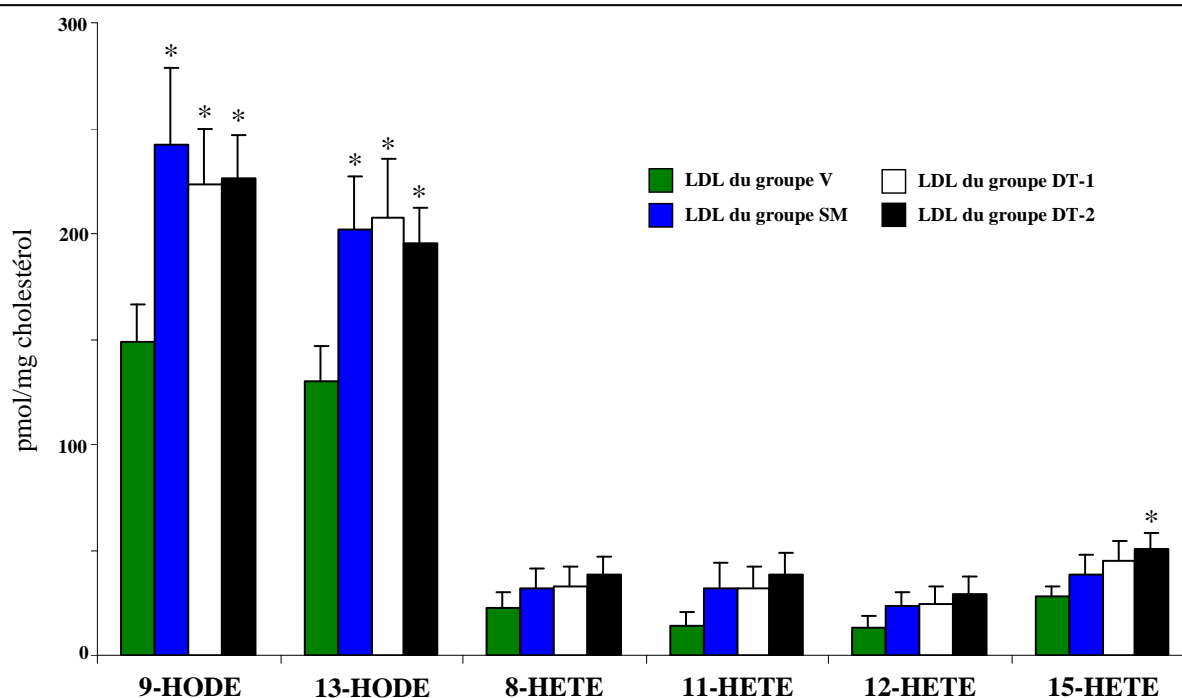


Figure 36 : Concentrations des acides gras monohydroxylés des LDL des volontaires ECLIPSE.

Les lipides ont été extraits des LDL puis les liaisons ester ont subi une hydrolyse basique (KOH). Les acides gras monohydroxylés totaux ont été séparés sur colonne Oasis et par chromatographie sur couche mince. La composition et la quantification ont été réalisées suite à l'analyse par HPLC couplée à un détecteur UV. Les résultats, exprimés en pmol/mg cholestérol, représentent les moyennes \pm S.E.M. de 7 à 9 sujets par groupe. * $P < 0,05$ comparativement aux volontaires sains.

DT-1, patients diabétiques de type-1; DT-2, patients diabétiques de type-2; HETE, acide hydroxy-eicosatétraénoïque; HODE, acide hydroxy-octadécadiénoïque; SM, volontaires ayant un syndrome métabolique; V, volontaires sains.

III.2. Dialdéhyde malonique :

Les concentrations en MDA augmentent dans les LDL du groupe SM (+91%), DT-1 (+69%) et DT-2 (+96%) comparativement à celle des LDL du groupe témoin (**Figure 37**).

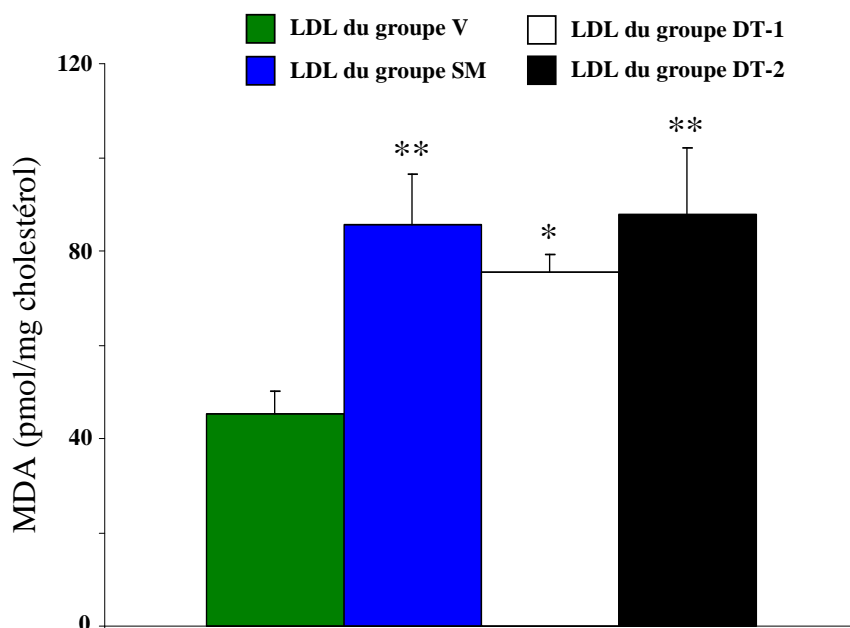


Figure 37 : Concentration en dialdéhyde malonique des LDL des volontaires ECLIPSE.
 Les LDL ont été incubées avec de l'acide thiobarbiturique en milieu acide. Le complexe formé avec le dialdéhyde malonique a été extrait avant d'être quantifié suite à l'analyse par HPLC couplée à un détecteur fluorimétrique. Les résultats, exprimés en pmol/mg cholestérol, représentent les moyennes \pm S.E.M. de 9 à 10 sujets par groupe. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparativement aux volontaires sains. V, volontaires sains; SM, volontaires ayant un syndrome métabolique; DT-1, patients diabétiques de type-1; DT-2, patients diabétiques de type-2; MDA, dialdéhyde malonique.

III.3. Vitamine E :

L' α -tocophérol est l'isomère majoritaire et le γ -tocophérol représente environ 10% de l' α -tocophérol dans les LDL (**Tableau 23**). Les résultats ont été exprimés classiquement par mg de protéines mais aussi par rapport aux lipides, du fait du caractère lipophile de la vitamine E.

Dans les LDL du groupe SM, nous voyons une augmentation du γ -tocophérol (+50%) exprimé en nmol/mg protéine ainsi qu'une augmentation des concentrations des deux isomères de tocophérol exprimées en nmol/mol cholestérol (respectivement +29% et +67%) comparativement à leurs concentrations dans les LDL du groupe témoin. Il n'y a aucune modification de concentration de vitamine E dans les LDL des groupes DT-1 et DT-2. Cependant, la concentration d' α -tocophérol, exprimée en nmol/mg TG, tend ($P=0,14$) à diminuer dans les LDL du groupe DT-2.

		V	SM	DT-1	DT-2
α -tocophérol	nmol/mg protéine	5,9 ± 0,3	6,7 ± 0,5	6,6 ± 0,4	6,0 ± 0,3
	nmol/mg cholestérol	2,8 ± 0,2	3,6 ± 0,2*	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,3
	nmol/mg TG	21,6 ± 2,1	23,3 ± 3,8	22,9 ± 2,6	16,2 ± 1,5
γ -tocophérol	nmol/mg protéine	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1*	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
	nmol/mg cholestérol	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1*	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
	nmol/mg TG	2,3 ± 0,4	3,0 ± 0,6	2,4 ± 0,4	1,8 ± 0,2

Tableau 23 : Concentrations des différents isomères de vitamine E dans les LDL des volontaires ECLIPSE.

Les isomères de tocophérol des LDL ont été quantifiés suite à l'analyse par HPLC couplée à un détecteur fluorimétrique. Les augmentations significatives sont signalées en jaune. Les résultats, exprimés en nmol/mg protéine, nmol/mg cholestérol ou nmol/mg triacylglycérol, représentent les moyennes ± S.E.M. de 10 sujets par groupe. * $P < 0,05$ comparativement aux volontaires sains.

DT-1, patients diabétiques de type-1; DT-2, patients diabétiques de type-2; SM, volontaires ayant un syndrome métabolique; V, volontaires sains.

IV. Effet des LDL sur les plaquettes :

Dans le but d'étudier l'impact des LDL sur l'activation plaquettaire, nous avons incubé les LDL des différents groupes avec des plaquettes isolées de donneurs de l'EFS. D'une part, nous avons déterminé les effets des LDL sur la cascade de signalisation de l'AA, en évaluant par immuno-détection la phosphorylation des p38 MAPK et cPLA₂, ainsi qu'en déterminant la concentration basale de thromboxane B₂. D'autre part, nous avons évalué les effets directs de ces LDL sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène.

IV.1. Effet des LDL sur la p38 MAPK plaquettaire :

La p38 MAPK est une protéine clé dans l'activation plaquettaire. Sa phosphorylation lui permet de phosphoryler la cPLA₂ et ainsi, d'activer la cascade conduisant *in fine* à la production de TxA₂. Suite à l'incubation des plaquettes en absence ou en présence des LDL (1mg/mL) pendant 2h à 37°C, aucun effet des LDL du groupe V n'est observable sur la phosphorylation de la p38 MAPK plaquettaire comparativement à des plaquettes incubées avec le véhicule (PBS) (**Figure 38**). En revanche, les LDL du groupe SM augmentent cette phosphorylation (+21%), de même que les LDL des groupes DT-1 (+31%) et DT-2 (+55%).

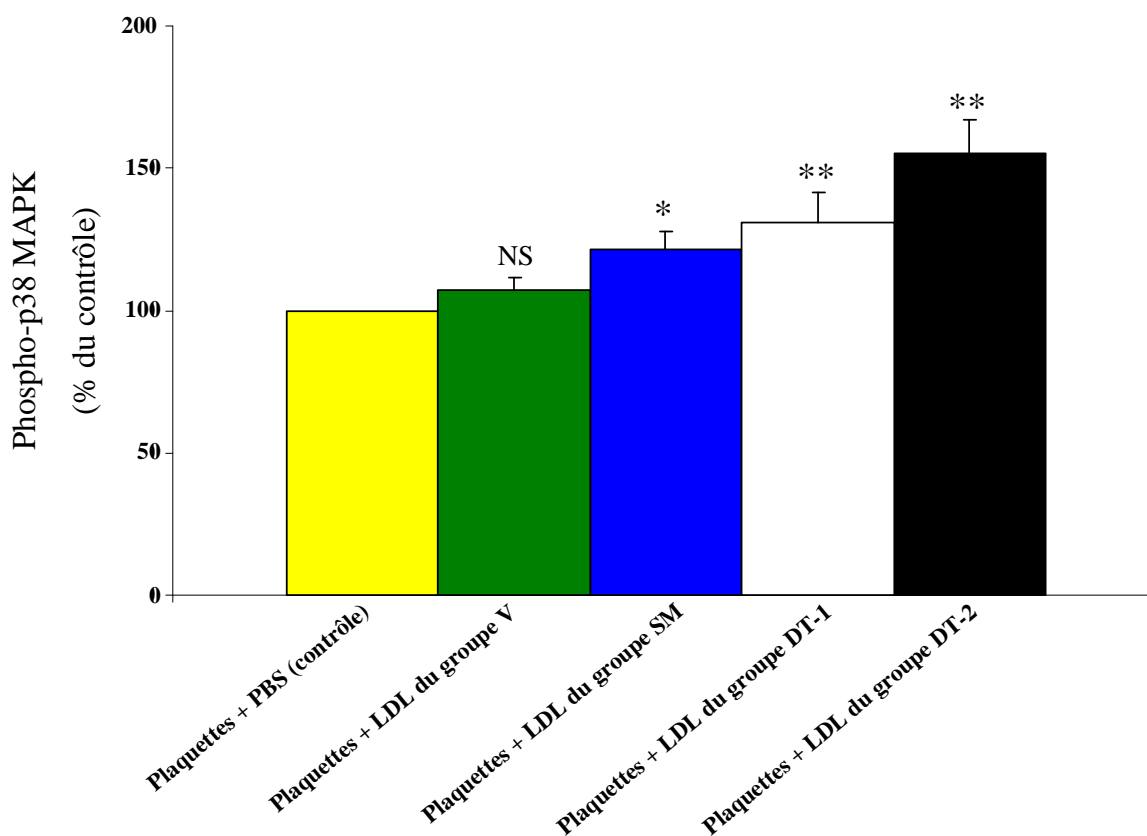


Figure 38 : Phosphorylation de la p38 MAPK plaquettaire en absence ou en présence des LDL de volontaires ECLIPSE.

Des plaquettes isolées de donneurs de l'EFS ont été incubées pendant 2h à 37°C en absence (contrôle) ou en présence de LDL de chacun des quatre groupes de volontaires. La phosphorylation de la p38 MAPK a été évaluée par immuno-détection. Les résultats, exprimés en pourcentage du contrôle, représentent les moyennes \pm S.E.M. de 8 sujets par groupe. NS non significatif, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparativement aux volontaires sains.

DT-1, patients diabétiques de type-1; DT-2, patients diabétiques de type-2; MAPK, « mitogen activated protein kinase »; PBS, « phosphate buffer saline »; SM, volontaires ayant un syndrome métabolique; V, volontaires sains.

IV.2. Effet des LDL sur la cPLA₂ plaquettaire :

La cPLA₂ a un rôle crucial dans la libération de l'AA estérifié dans les PL membranaires, servant ensuite de substrat à la COX-1. Nous voyons que l'incubation des plaquettes avec des LDL du groupe V est sans effet sur la phosphorylation de la cPLA₂ des plaquettes de volontaires sains comparativement à des plaquettes incubées en absence de LDL (**Figure 39**). Il en est de même pour les LDL du groupe DT-1 qui sont sans effet. En revanche, les LDL des groupes SM et DT-2 augmentent cette phosphorylation respectivement de +23% et +24%.

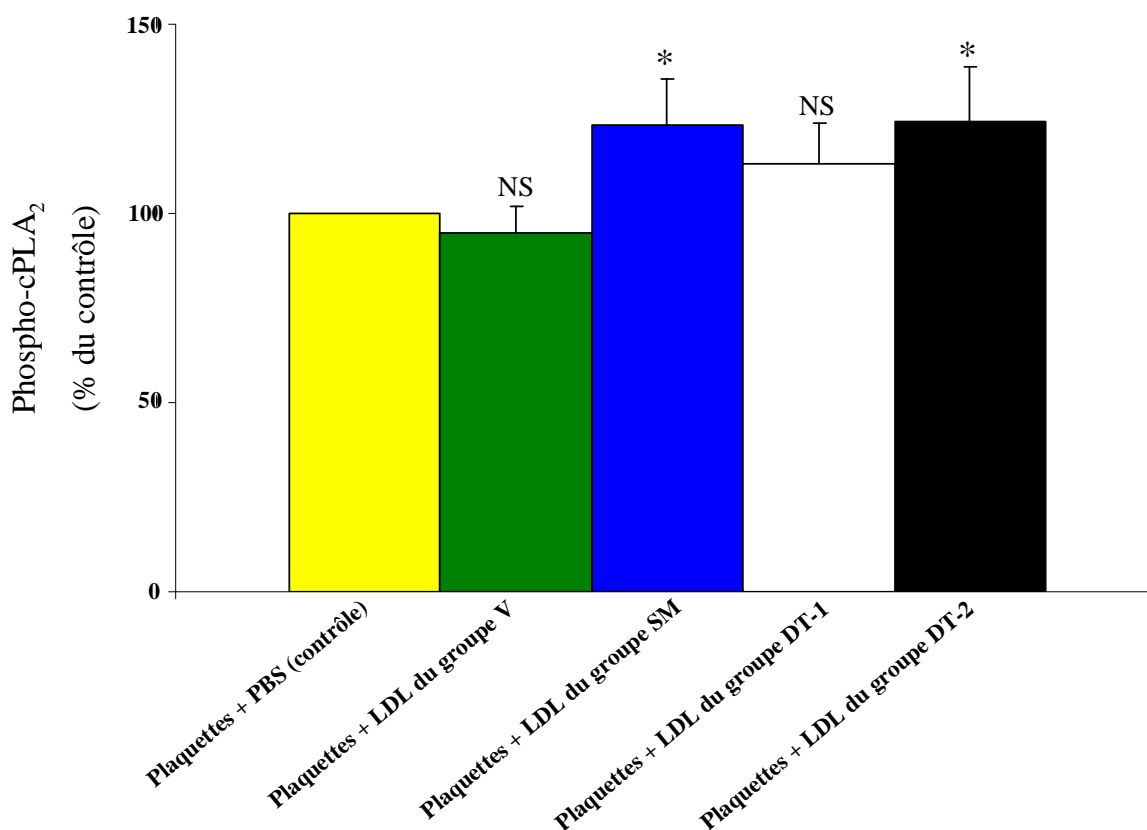


Figure 39 : Phosphorylation de la cPLA₂ plaquettaire en absence ou en présence des LDL de volontaires ECLIPSE.

Des plaquettes isolées de donneurs de l'EFS ont été incubées pendant 2h à 37°C en absence (contrôle) ou en présence de LDL de chacun des quatre groupes de volontaires. La phosphorylation de la cPLA₂ a été évaluée par immuno-détection. Les résultats, exprimés en pourcentage du contrôle, représentent les moyennes \pm S.E.M. de 7 sujets par groupe. NS non significatif, * $P < 0,05$ comparativement aux volontaires sains.

cPLA₂, phospholipase A₂ cytosolique; PBS, « phosphate buffer saline »; DT-1, patients diabétiques de type-1; DT-2, patients diabétiques de type-2; SM, volontaires ayant un syndrome métabolique; V, volontaires sains.

IV.3. Effet des LDL sur la production basale de TxB₂ plaquettaire :

Le TxB₂ est le catabolite stable et inactif du TxA₂ plaquettaire. Sa concentration basale dans les plaquettes incubées seules est de 187 ± 37 pmol/10⁹ plaquettes. Nous voyons que les LDL du groupe V sont sans effet sur la production basale de TxB₂ de plaquettes de volontaires sains comparativement à des plaquettes incubées en absence de LDL (**Figure 40**). En revanche, les LDL du groupe SM augmentent sa production (+90%), de même que les LDL du groupe DT-1 (+110%) et DT-2 (+111%).

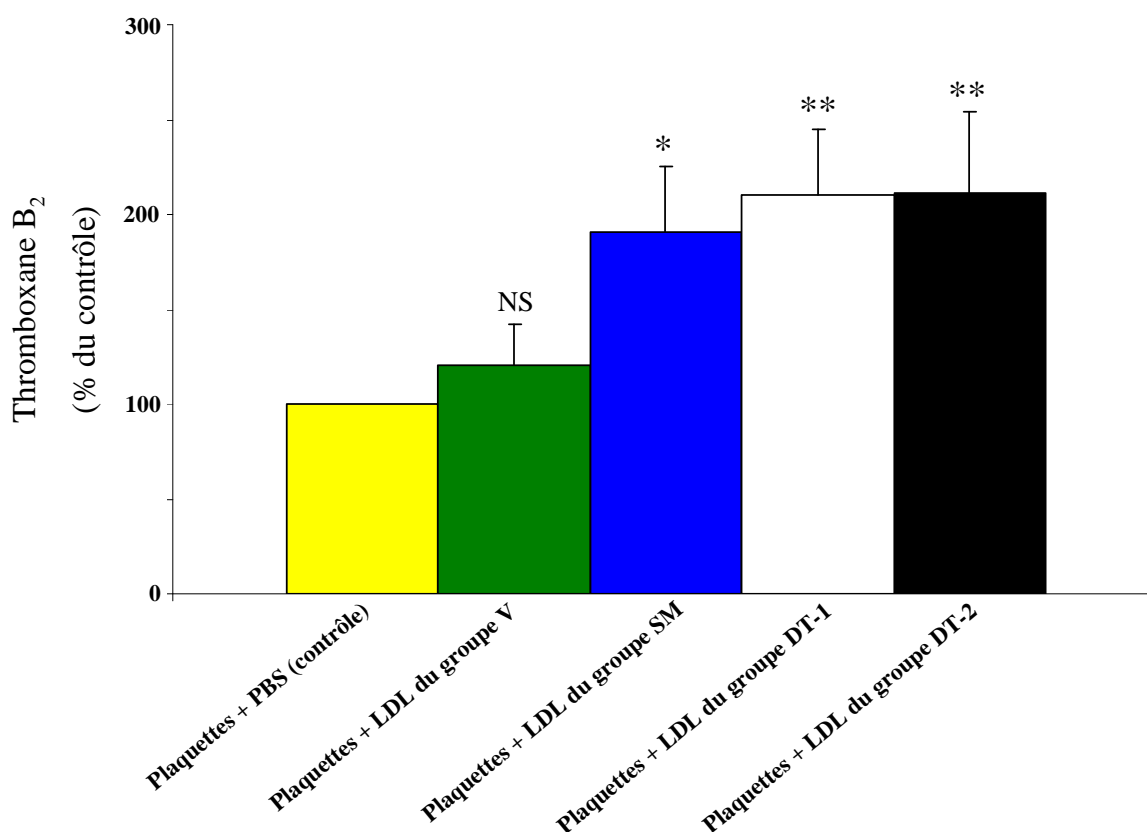


Figure 40 : Concentration de TxB₂ plaquettaire en absence ou en présence des LDL de volontaires ECLIPSE.

Des plaquettes isolées de donneurs de l'EFS ont été incubées pendant 2h à 37°C en absence (contrôle) ou en présence de LDL de chacun des quatre groupes de volontaires. Le thromboxane B₂ plaquettaire a été quantifié par dosage immuno-enzymatique. Les résultats, exprimés en pourcentage du contrôle, représentent les moyennes ± S.E.M. de 10 sujets par groupe. NS non significatif, * P<0,05, ** P<0,01 comparativement aux volontaires sains.

DT-1, patients ayant un diabète de type-1; DT-2, patients ayant un diabète de type-2 et un syndrome métabolique; PBS, « phosphate buffer saline »; SM, volontaires ayant un syndrome métabolique; TxB₂, thromboxane B₂; V, volontaires sains.

IV.4. Effet des LDL sur l'agrégation plaquettaire :

Physiologiquement, le collagène est un agoniste primaire conduisant à l'adhésion et à l'agrégation des plaquettes. En utilisant des concentrations de collagène induisant seulement une faible agrégation plaquettaire, nous avons pu tester l'impact des LDL (100µg/mL) sur la réponse des plaquettes au collagène. Nous observons que la pré-incubation des plaquettes en présence de LDL du groupe V pendant 5 minutes est sans effet sur l'agrégation des plaquettes en réponse au collagène comparativement à des plaquettes pré-incubées en absence de LDL (**Figure 41**). Il en est de même pour les LDL du groupe DT-1 qui sont sans effet sur l'agrégation plaquettaire dans les conditions testées. En revanche, l'incubation des plaquettes

en présence des LDL des groupes SM et DT-2 induit leur agrégation (respectivement +197% et +251%).

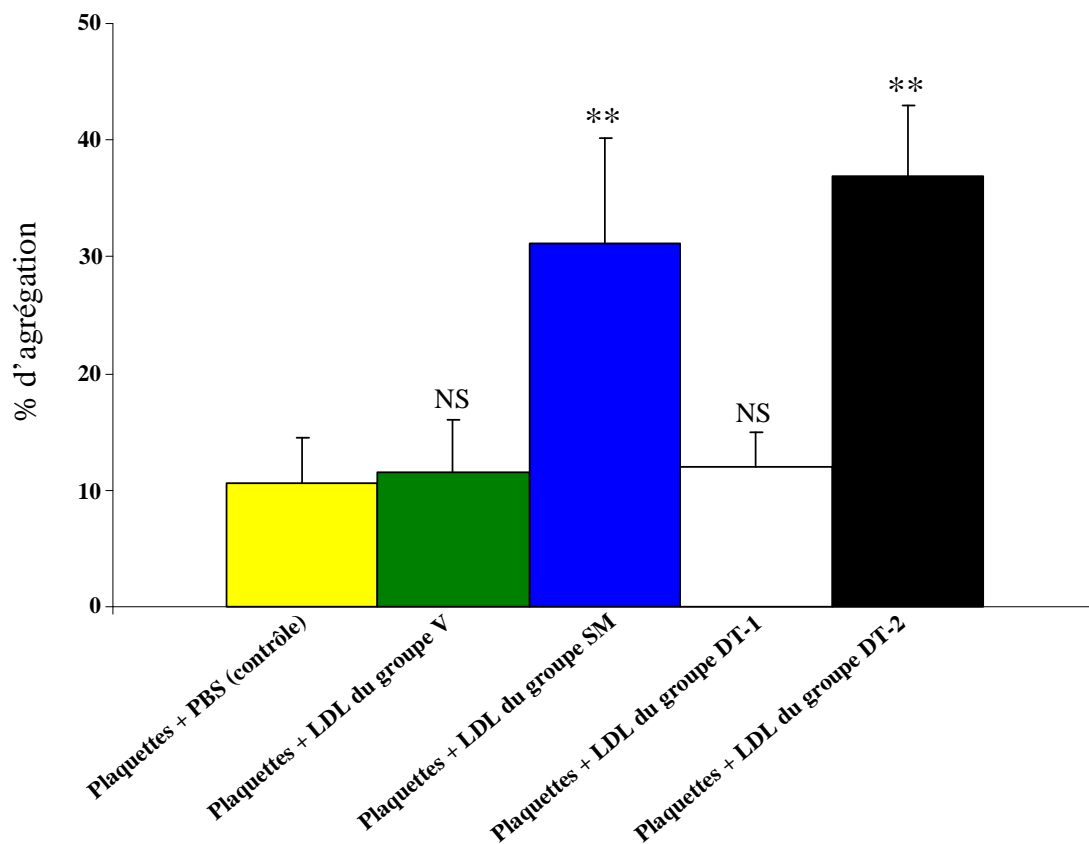


Figure 41 : Agrégation plaquettaire induite par le collagène en absence ou en présence des LDL de volontaires ECLIPSE.

Suite à la pré-incubation des plaquettes isolées de donateurs de l'EFS en absence ou en présence des LDL de chacun des quatre groupes pendant 5 minutes à 37°C, les plaquettes ont été stimulées par le collagène puis incubées pendant 4 minutes et la cinétique d'agrégation a été suivie. Les résultats, exprimés en pourcentage d'agrégation, représentent les moyennes \pm S.E.M. de 5 sujets par groupe. NS non significatif, ** $P < 0,01$ comparativement aux volontaires sains.

DT-1, patients ayant un diabète de type-1; DT-2, patients ayant un diabète de type-2 et un syndrome métabolique; PBS, phosphate buffer saline; SM, volontaires ayant un syndrome métabolique; V, volontaires sains.

V. Corrélations :

Le tour de taille est corrélé positivement à l'HbA1c, au MDA et aux TG des LDL. Il est corrélé négativement à la taille des LDL et aux plasmalogènes. Le pourcentage d'HbA1c est corrélé positivement au MDA et aux TG des LDL et négativement aux plasmalogènes. Il n'existe pas de corrélation entre l'HbA1c et les AGOH ou la taille des LDL (**Figure 42**).

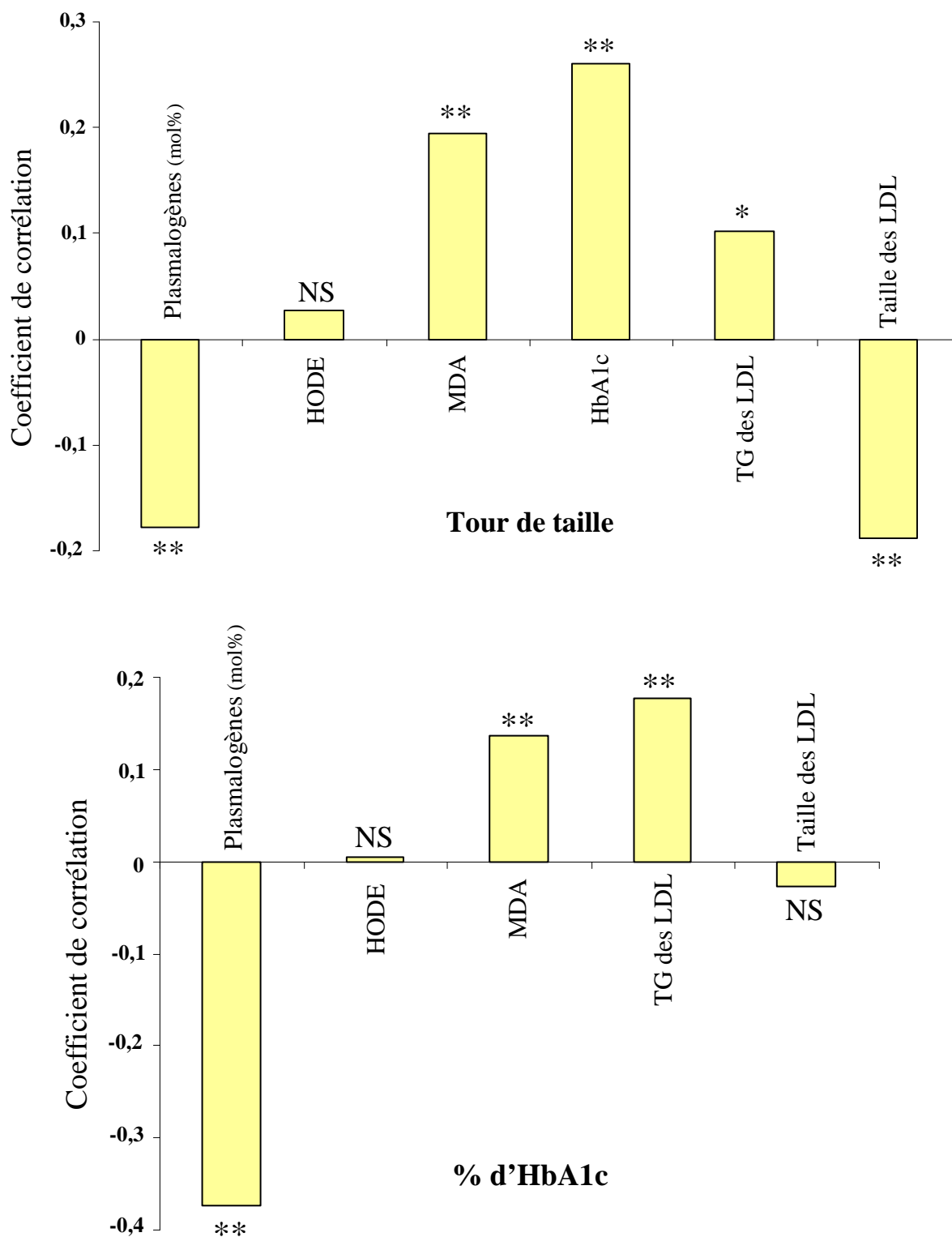


Figure 42 : Corrélations entre paramètres du syndrome métabolique et du diabète de type-2 et état d'oxydation des LDL.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. NC non corrélé.

HbA1c, hémoglobine glyquée; HODE, acides hydroxy-octadécadiénoïques; LDL, « Low density Lipoproteins »; MDA, dialdéhyde malonique; TG, triacylglycérols.

La concentration plaquettaire de TxB_2 , reflet de celle du TxA_2 , est corrélée positivement aux concentrations de MDA, d'HODE et de TG des LDL. Aucune corrélation n'est mise en évidence entre le TxB_2 et les plasmalogènes ou l'HbA1c (**Figure 43**).

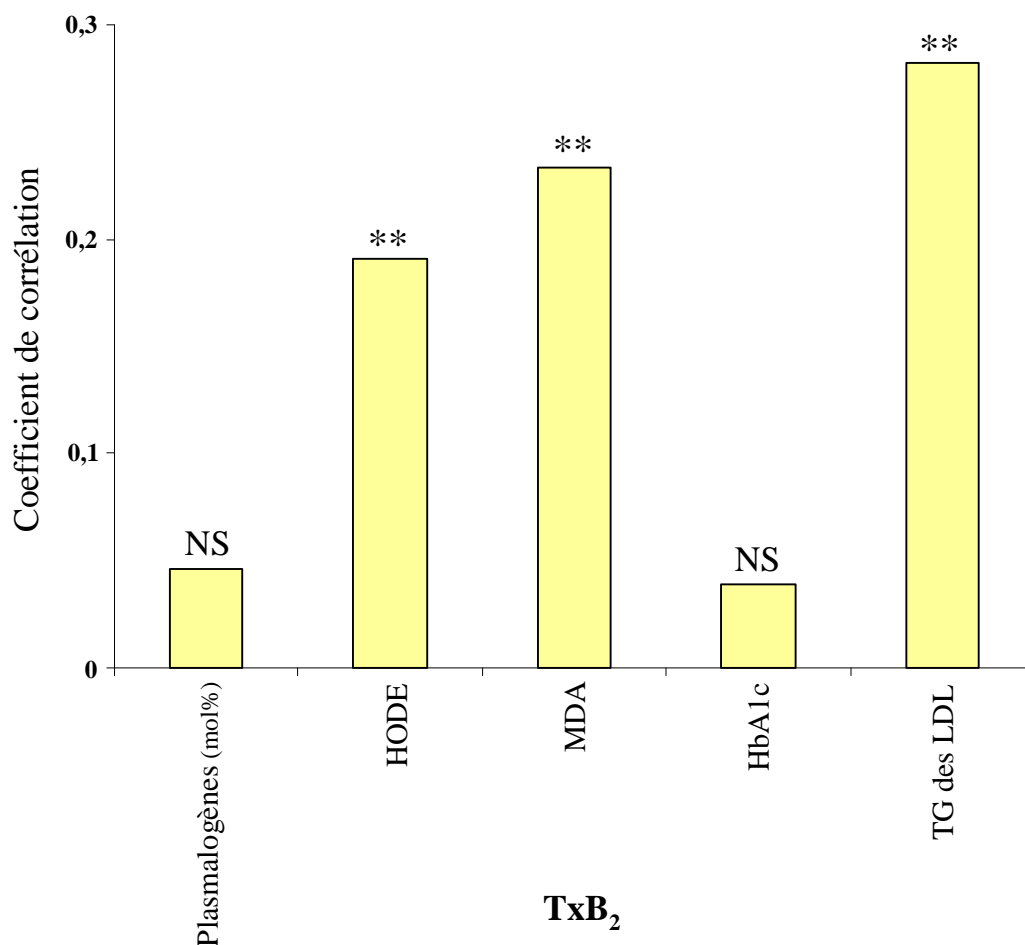


Figure 43 : Corrélation entre l'état d'oxydation des LDL et le thromboxane A_2 plaquettaire.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. NC non corrélé.

HbA1c, hémoglobine glyquée; HODE, acides hydroxy-octadécadiénoïques; LDL, « Low density Lipoproteins »; MDA, dialdéhyde malonique; TG, triacylglycérols; Tx, Thromboxane.

VI. Discussion :

VI.1. Caractérisation des LDL :

Le diabète de type 2 est associé à une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires. Par ailleurs, il est établi que le stress oxydant et la modification oxydative des LDL jouent un rôle crucial dans le développement de l'athérosclérose (Witztum and Steinberg, 1991) et contribuent aux complications cardiovasculaires du diabète (Rosen *et al.*,

2001). Bien que démontré dans le DT-2, le stress oxydant a surtout été mis en évidence dans le plasma et la preuve de l'oxydation des LDL dans le DT-2 est essentiellement basée sur le taux plus élevé d'anticorps dirigés contre les résidus lysine de l'apoB modifiée par des aldéhydes (Njajou *et al.*, 2009).

Nous avons sélectionné des DT-2 présentant tous un SM (comme 86% des DT-2) (Alexander *et al.*, 2003) et un contrôle glycémique médiocre (HbA1c = 10,4%). Nos résultats montrent que les LDL de DT-2 ont une composition lipidique et un niveau de peroxydes lipidiques modifiés comparativement aux LDL de V. Concernant les classes lipidiques, les LDL des DT-2 montrent une augmentation des TG et une diminution des EC. Ce profil est représentatif des sdLDL (Packard, 2003; Verges, 2009), sous-classe de LDL augmentée dans le DT-2 (Mora *et al.*, 2010) et sensible à l'oxydation (Tribble *et al.*, 1992). La diminution du diamètre des LDL de DT-2 comparativement à celui des LDL de V, confirme la présence de sdLDL chez les DT-2. Nous montrons pour la première fois une diminution de moitié des plasmalogènes des PE qui constitueraient une cible préférentielle des attaques oxydatives. Il est en effet connu que cette sous-classe de PL contribue à la résistance des LDL à l'oxydation *in vitro* et pourrait agir comme un antioxydant (Engelmann *et al.*, 1994; Jurgens *et al.*, 1995). La composition en acides gras des principales classes lipidiques des LDL de DT-2 est modifiée avec une diminution du 18:2n-6 et une augmentation du 20:4n-6 dans les EC et PC des LDL de DT-2. A notre connaissance, une seule étude a montré une diminution du 18:2n-6 associée à une augmentation du 20:4n-6 dans les PL plasmatiques de diabétiques de type 2 (Pelikanova *et al.*, 2001). L'augmentation paradoxale du 20:4n-6 (dans un contexte de peroxydation lipidique accrue) et la diminution conjointe du 18:2n-6 pourraient être le résultat de l'hyperactivation des $\Delta 6$ -désaturase (catalysant la désaturation du 18:2n-6 en 18:3n-6) et $\Delta 5$ -désaturase (catalysant la désaturation du 20:3n-6 en 20:4n-6) dans le DT-2. Il est en effet connu que l'insuline augmente l'activité de ces désaturases (Brenner, 2003) et que le diabète de type-2 entraîne de longues périodes d'hyperinsulinémie chronique. Nos résultats montrent également une augmentation de différents index de peroxydation lipidique dans les LDL de DT-2 comparativement aux LDL de V. En accord avec la diminution du 18:2n-6, principal AGPI des LDL, les HODE (estérifiés et libres), produits primaires stables de peroxydation du 18:2n-6, augmentent de 50 %. Parmi les AGOH dérivés du 20:4n-6, seul le 15-HETE augmente significativement. Les concentrations de MDA, index global de peroxydation lipidique, doublent dans les LDL de DT-2 comparativement aux LDL de V et confirment

l'augmentation des TBARS dans le plasma de patients diabétiques (Griesmacher *et al.*, 1995). L'augmentation des peroxydes lipidiques dans les LDL n'est pas associée à une diminution de la vitamine E dans les LDL de diabétiques, comme on aurait pu s'y attendre. L'absence de diminution de la vitamine E dans les LDL, déjà décrite dans le plasma (Feillet-Coudray *et al.*, 1999; Griesmacher *et al.*, 1995), pourrait refléter une réponse adaptative de la vitamine E à un environnement pro-oxydant. Celle-ci pourrait être régénérée par d'autres antioxydants tels que la vitamine C (Wen *et al.*, 2000) qui est diminuée dans le plasma de patients diabétiques caucasiens.

Pour établir si le stress oxydant avéré chez les diabétiques de type-2 est associé au syndrome métabolique et déjà présent avant l'apparition de la maladie, nous avons analysé les mêmes paramètres biochimiques chez des volontaires présentant un syndrome métabolique. De nombreuses études prospectives montrent que le syndrome métabolique est un indicateur prédictif du diabète de type-2 (Lorenzo *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2005) et de la survenue de maladies cardiovasculaires (Alexander *et al.*, 2003; Ford, 2005; Lakka *et al.*, 2002). Cependant, la présence d'un stress oxydant lors du syndrome métabolique est encore débattue. Selon les études, les concentrations plasmatiques de 8-isoPGF_{2α}, marqueur de peroxydation lipidique, sont soit augmentées (Gopaul *et al.*, 2001; Hansel *et al.*, 2004), soit inchangées (Seet *et al.*, 2010; Sjogren *et al.*, 2005) chez des sujets présentant un syndrome métabolique comparativement à des volontaires sains. En ce qui concerne les LDL de volontaires ayant un syndrome métabolique, les concentrations sériques de LDL oxydées sont soit plus élevées (Holvoet *et al.*, 2004; Sigurdardottir *et al.*, 2002) et associées à davantage de sdLDL, soit similaires à celles de témoins (Sjogren *et al.*, 2005).

Les SM inclus dans notre protocole clinique présentaient une insulino-résistance, attestée par l'hyperinsulinémie et l'augmentation du HOMA-IR, une obésité (BMI > 30) mais étaient modérément dyslipidémiques (cholestérol total et LDL-cholestérol normaux, hyperTG modérée). L'augmentation des TG et la diminution du diamètre des LDL de SM sont en faveur de la présence de sdLDL. Nos résultats mettent en évidence un stress oxydant accru dans les LDL issues de SM. En attestent l'augmentation des HODE, l'augmentation du MDA, ainsi que la diminution des plasmalogènes. La diminution du 18:2n-6, principal AGPI des LDL, dans les principales classes lipidiques (EC et PC) est en accord avec l'augmentation des concentrations en HODE. Par contre, aucune modification des concentrations en HETE ni en AA n'a été notée dans les LDL de SM, en accord avec une étude très récente ne montrant

aucune modification des produits d'oxydation de l'AA, HETE totaux et 8-isoPGF_{2α}, dans le plasma d'une population asiatique présentant un syndrome métabolique (Seet *et al.*, 2010). Ces résultats pourraient signifier que l'AA, plus sensible à l'oxydation que le 18:2n-6, est converti en produits plus avancés de peroxydation comme des aldéhydes, les HETE ne représentant que des intermédiaires (Wiswedel *et al.*, 2002). Nos résultats montrent également une augmentation des concentrations d'α- et de γ-tocophérols exprimés en nmoles par mg de cholestérol, dans les LDL de SM comparativement à celles de V. Cette augmentation paradoxale de la vitamine E reste à être expliquée en quantifiant d'autres antioxydants endogènes qui auraient pu régénérer la vitamine E. L'identification de la contribution individuelle de chaque facteur de risque du syndrome métabolique dans le stress oxydant des LDL est impossible à ce stade puisque chacun d'entre eux, i.e. l'insulino-résistance (Urakawa *et al.*, 2003), l'obésité (Urakawa *et al.*, 2003) et l'hypertension artérielle (Boden, 2008), est reconnu être associé à un stress oxydant.

Afin de définir le rôle de l'hyperglycémie dans l'augmentation du stress oxydant, nous avons réalisé les mêmes analyses chez des diabétiques de type-1 à évolution lente. La plupart des études publiées indiquent que le diabète de type-1 est associé à un stress oxydant accru. Une augmentation du MDA plasmatique (Dominguez *et al.*, 1998; Erciyas *et al.*, 2004) et une augmentation de la susceptibilité des LDL à une oxydation induite par le cuivre (Tsai *et al.*, 1994) en font état. Cependant, un groupe n'a pas mis en évidence de différence de composition en lipides et acides gras, antioxydants et glycation dans les LDL de diabétiques de type-1 (Jenkins *et al.*, 1996) ni de susceptibilité particulière des LDL à l'oxydation *in vitro* (Jenkins *et al.*, 2004). Les DT-1 recrutés dans notre protocole présentaient globalement une hyperglycémie mais un bon contrôle glycémique (HbA1c = 7.7%), étaient de poids normal et normolipidémiques. Du fait de la difficulté de recrutement de DT-1 relativement âgés, ils ne sont pas appariés pour l'âge avec les témoins (-8 ans en moyenne). Aucune modification de la composition en lipides et acides gras ni de la vitamine E n'a été observée dans les LDL de DT-1, comparativement aux LDL de V. Par contre, une augmentation des concentrations en peroxydes lipidiques a été mise en évidence. La plus notable concerne les concentrations d'HODE qui augmentent similairement à celles des DT-2 (+50%). Une augmentation du MDA et une diminution des plasmalogènes sont observées mais les pourcentages de variation sont inférieurs à ceux des LDL de DT-2 et SM.

Les études préliminaires de corrélation indiquent qu'il existe une relation entre l'augmentation de tour de taille, présente chez les DT-2 ou SM, et divers index de peroxydation lipidique (augmentation du MDA et diminution des plasmalogènes) ainsi que la présence de sdLDL (augmentation des TG et diminution de la taille des LDL). De même, le pourcentage d'HbA1c, décrit comme fortement corrélé à la glycation des LDL (Lyons *et al.*, 1986) est corrélé négativement aux plasmalogènes et positivement au MDA et aux TG des LDL. Ceci indique et confirme (Hunt *et al.*, 1990) que les LDL de diabétiques de type-1 et 2 sont glycoxydées.

VI.2. Effet des LDL sur les plaquettes :

Le diabète de type-2 est associé à une hyperactivation plaquettaire (Véricel *et al.*, 2004), impliquée dans le processus d'athérombose. Les mécanismes moléculaires sous-tendant la plus grande réactivité plaquettaire ne sont pas entièrement élucidés. Les lipoprotéines circulantes interagissent avec les plaquettes, notamment lorsqu'elles subissent des modifications oxydatives comme c'est le cas lors du diabète de type-2. Bien que les interactions entre LDL oxydées et plaquettes ont fait l'objet de nombreuses études, peu d'études existent sur l'impact des LDL issues de diabétiques ou de sujets ayant un syndrome métabolique, sur l'activation des plaquettes sanguines humaines. Nous avons montré que des LDL de diabétiques de type-2 étaient capables d'activer des plaquettes de volontaires sains alors que des LDL de volontaires sains sont sans effet (Calzada *et al.*, 2007). Comme la plupart des diabétiques de type-2 ont un syndrome métabolique associé, nous avons aussi déterminé dans le présent travail les effets des LDL provenant de sujets ayant un syndrome métabolique sans diabète, ou un diabète sans syndrome métabolique associé, sur leur propension à activer les plaquettes. En effet, le syndrome métabolique et le diabète de type-1 sont associés à une augmentation des risques cardio-vasculaires (Brindisi *et al.*, 2010; Ford, 2005) et à une hyperactivation plaquettaire (Udvardy *et al.*, 1998; Vaidya *et al.*, 2009; Véricel *et al.*, 2004).

Nos résultats confirment que les LDL de V n'ont pas d'effet sur la cascade de l'AA (phospho-p38 MAPK, phospho-cPLA₂ et TxA₂) ni sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène. Ils confirment que les LDL de DT-2 activent les p38 MAPK et cPLA₂ et

augmentent d'un facteur 2 la formation de TxA₂ plaquettaire (Calzada *et al.*, 2007). Ils montrent de plus que des concentrations très faibles de LDL (1/10^{ème} de la concentration physiologique) de DT-2 potentialisent fortement l'agrégation de plaquettes stimulées par de faibles concentrations de collagène.

Nous montrons que des LDL de SM activent les plaquettes, comme en atteste l'augmentation des phospho-p38 MAPK, phospho-cPLA₂ et TxA₂ et potentialisent l'agrégation plaquettaire. L'amplitude des augmentations observées est semblable à celle observée avec les LDL de DT-2. L'hyperglycémie et le syndrome métabolique, tous les deux présents chez les DT-2, ne semble donc pas avoir d'effets synergiques sur l'activation plaquettaire. A notre connaissance, aucune étude n'a encore décrit l'effet activateur des LDL issues de sujets ayant un syndrome métabolique sur les plaquettes. Une étude récente a cependant montré que l'incubation de plaquettes de volontaires sains avec des LDL de sujets obèses conduit à une activation des plaquettes, similaire à celle obtenue avec des plaquettes de sujets obèses (Raffaelli *et al.*, 2009).

Nos résultats montrent que les LDL de DT-1 augmentent la phosphorylation de la p38 MAPK et la formation de TxA₂ mais n'augmentent pas significativement la phosphorylation de la cPLA₂. Par contre, les LDL de DT-1 n'ont aucun effet sur l'agrégation plaquettaire dans les conditions expérimentales testées. L'explication de ces résultats contradictoires est difficile à ce stade. Il n'est pas exclu que les récepteurs aux LDL impliqués dans l'activation de la cascade de l'AA et dans celle de l'agrégation induite par le collagène diffèrent. Une autre explication pourrait être liée à l'absence ou à la présence plus faible de sdLDL comparativement aux LDL de SM et DT-2. Quelques études ont montré que les LDL de DT-1 (dont l'état redox n'a pas été défini) potentialisent l'agrégation de plaquettes témoins stimulées par un agoniste (Watanabe *et al.*, 1988) et augmentent les concentrations intracellulaires de calcium (Ferretti *et al.*, 2002).

L'ensemble de nos résultats nous donne quelques pistes sur les molécules présentes dans les LDL responsables de l'activation plaquettaire. En effet, le TxA₂, puissant agent pro-agrégant, est corrélé positivement au MDA et aux HODE ainsi qu'aux TG des LDL. Aucune association entre TxA₂ et les autres molécules quantifiées dans notre étude (plasmalogènes, AG, vitamine E, HbA1c) n'a été mise en évidence. Il est tentant de spéculer que l'activation

plaquettaire induite par les LDL de sujets ayant un syndrome métabolique avec ou sans diabète associé pourrait être attribuable aux produits de peroxydation lipidique (dont certains acides gras hydroxylés et aldéhydes) localisés préférentiellement dans les sdLDL. De plus, nos résultats corroborent les études *in vitro* montrant l'implication des produits de peroxydation lipidique et notamment des PL oxydés (Ashraf *et al.*, 2008) dans l'activation plaquettaire. Parmi les plus récentes, des glycérophosphocholines oxydés (Podrez *et al.*, 2007) ainsi que des lipoprotéines enrichies en PC oxydées (Hartwich *et al.*, 2002) s'avèrent être des ligands préférentiels du CD36, activent les plaquettes et s'accumulent dans le plasma de patients hyperlipidémiques (Podrez *et al.*, 2007). Des PL oxydés tronqués de type lysoPAF potentialisent l'agrégation plaquettaire *via* le récepteur du PAF (Chen *et al.*, 2009).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La première partie analytique de notre travail nous a permis de montrer que la séparation des LDL par ultracentrifugation était équivalente à celle par FPLC en termes de composition en lipides et peroxydes lipidiques. La quantification, inédite à notre connaissance, des acides gras hydroxylés et plasmalogènes dans les LDL de volontaires sains, nous a permis d'obtenir des valeurs qui pourraient servir de référence pour attester un stress oxydant chez des personnes souffrant de diverses pathologies dont le diabète.

La seconde partie clinique de notre travail nous a conduit à caractériser précisément le contenu en lipides et peroxydes lipidiques de LDL provenant de personnes susceptibles de développer un diabète de type-2 ou ayant développé un diabète de type-1 ou 2. Nous avons parallèlement déterminé le potentiel activateur de ces LDL sur des plaquettes de volontaires sains. Nous avons obtenu des résultats originaux sur les LDL de sujets ayant un syndrome métabolique en montrant que ces LDL ont déjà subi des modifications de leur composition en lipides et peroxydes lipidiques, et activent les plaquettes. D'autre part, nous avons vu que, seule, l'hyperglycémie caractéristique du diabète de type-1, est associée à une modification oxydative des LDL sans altération de leurs lipides, lesquelles activent la cascade de l'AA. Nous avons mis en évidence une altération du profil lipidique ainsi qu'une augmentation des peroxydes lipidiques des LDL de diabétiques de type 2 et confirmons que ces LDL activent la cascade de signalisation de l'AA (p38 MAPK, cPLA₂, TXB₂) et stimulent l'agrégation plaquettaire. Toutefois, nos résultats obtenus avec des LDL de diabétiques de type 2 montrent que l'hyperglycémie et les anomalies métaboliques associées au syndrome métabolique n'agissent pas de manière synergique pour amplifier le stress oxydant subi par les LDL ou leurs capacités à activer les plaquettes. En conclusion, dans le syndrome métabolique et le diabète de type-1 ou 2, les peroxydes lipidiques au sein des LDL pourraient être le dénominateur commun conduisant à l'activation plaquettaire.

Les résultats les plus originaux de notre travail sont la mise en évidence d'une part d'un stress oxydant dans les LDL de sujets ayant un syndrome métabolique et d'autre part d'un effet activateur de ces LDL sur les plaquettes, comparable à celui induit par des LDL de diabétiques de type-2. Ces résultats donnent corps à l'utilité de dépister cette « pathologie » de manière précoce afin de prévenir les complications thrombotiques ultérieures. Toutefois, de nombreux points restent à approfondir. Le syndrome métabolique en tant que tel est une constellation d'anomalies métaboliques causales (insulino-résistance, obésité viscérale) et

consécutives (dyslipidémie, hypertension) du désordre métabolique. Bien que nos résultats suggèrent que l'obésité abdominale est le facteur de risque davantage associée à l'oxydation des LDL, la détermination du profil lipidomique au sein de cohortes présentant exclusivement un des facteurs de risque associé au SM permettrait idéalement de discriminer le rôle de chaque anomalie et de cibler à terme plus efficacement les personnes à risque.

La caractérisation du profil en lipides et peroxydes lipidiques des LDL n'a pas permis d'incriminer spécifiquement une molécule responsable de l'activation plaquettaire et de définir *a fortiori* un marqueur du risque athérotrombotique. Néanmoins, la détection inédite des différents acides gras hydroxylés estérifiés et libres dans les LDL nous a permis de montrer pour la première fois l'augmentation nette de ceux dérivés de l'acide linoléique (HODE) dans les groupes SM, DT1 et DT2. De plus, les concentrations plus élevées d'acides gras hydroxylés ainsi que de MDA dans les LDL sont associées à la formation accrue de thromboxane A₂, métabolite pro-agrégant. Etant donné que les HODE totaux comprennent ceux estérifiés aux phospholipides, une piste importante à explorer sera celle des phospholipides oxydés. Il a d'ailleurs été montré que des glycérophosphocholines oxydées synthétiques se lient aux plaquettes *via* CD36 et induisent l'activation plaquettaire *via* $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Podrez, Nat. Med. 2007). Les phospholipides oxydés notamment dérivés du 18:2n-6 et/ou leurs produits de fragmentation, seront identifiés et quantifiés dans les LDL de patients et la capacité des dérivés d'oxydation des PL à activer les plaquettes sera ensuite déterminée afin de voir s'ils pourraient constituer des marqueurs prédictifs mais aussi pronostiques du risque athérotrombotique.

Un autre point essentiel à élucider est le mécanisme de l'activation des plaquettes par les LDL oxydées (et des molécules activatrices associées). Il est probable que des récepteurs éboueurs comme CD36, SR-A ou LOX-1 entrent en jeu puisqu'ils possèdent une forte affinité de liaison pour les LDL oxydées. Des anticorps bloquant les récepteurs CD36, SR-A ou LOX-1 seront utilisés puis éventuellement complétés par des souris knock-out pour ces récepteurs. De simples échanges lipidiques entre LDL et plaquettes pourraient également contribuer à l'activation, un transfert accru de phospholipides oxydés (comparativement aux phospholipides natifs) des lipoprotéines aux plaquettes ayant été mis en évidence dans notre équipe (Ibrahim *et al.*, 2009).

Ce travail a été orienté vers les LDL isolément afin d'identifier leur rôle spécifique dans l'activation plaquettaire. Afin de se rapprocher d'une situation *in vivo*, les HDL, décrites inhiber l'agrégation plaquettaire (Calkin *et al.*, 2009), doivent aussi être prises en compte. L'état redox des HDL des différents groupes d'ECLIPSE et leur impact sur l'agrégation des plaquettes sont d'ailleurs déterminés dans une étude ancillaire. Il reste à éclaircir les contributions respectives des différentes classes de lipoprotéines dans les fonctions plaquettaires sachant que les HDL diminuent et les LDL oxydées augmentent chez des patients dyslipidémiques.

Dans le but de nous placer dans des conditions physiologiques, seules les LDL dans leur totalité ont été testées. Cependant, l'augmentation des TG dans les LDL de patients ayant un syndrome métabolique ou un diabète de type-2, indicatrice de la présence de LDL petites et denses, ainsi que la corrélation positive des TG avec la formation accrue de TXB₂, nous questionne sur le rôle de cette sous-classe de LDL dans l'activation plaquettaire. Il nous faudrait déterminer si les peroxydes lipidiques des LDL ne sont pas davantage localisés dans cette sous-classe et déterminer leur impact sur les fonctions plaquettaires.

L'étude ECLIPSE aurait besoin d'être complétée en déterminant l'effet des LDL de chaque groupe de volontaires sur des plaquettes autologues, notamment pour le groupe des sujets présentant un SM. En effet, bien que de nombreuses études montrent que les plaquettes de diabétiques de type-1 et 2 sont hyperactives, seules quelques études récentes (Vaduganathan *et al.*, 2008; Vaidya *et al.*, 2009) indiquent que les plaquettes de sujets ayant un SM présentent une hyper-réactivité plaquettaire associée à une moindre réponse à l'aspirine. Il reste à vérifier que ces plaquettes sont hyperagrégables et que la présence avérée de LDL modifiées oxydativement contribue à leur activation.

Nos résultats sur la composition en AG des LDL ouvrent des perspectives très intéressantes sur des études métaboliques *in vivo*. La diminution du 18:2n-6 et l'augmentation simultanée de l'AA dans les principales classes lipidiques des LDL pourraient refléter l'hyperactivation des $\Delta 6$ et $\Delta 5$ désaturases dans les cellules hépatiques. Pour tester cette hypothèse, nous envisageons d'étudier le métabolisme compartimental du 18:2n-6 *in vivo*

chez l'Homme. L'ingestion d'une dose traceuse de [¹³C]-18:2n-6 par des volontaires sains, ayant un SM ou un DT-2, nous permettrait de suivre la cinétique d'incorporation de l'acide gras et de ses métabolites (AA et produits de peroxydation) dans divers compartiments (lipoprotéines, albumine et plaquettes) *via* l'analyse par « Gas Chromatography Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry » (GCC-IRMS) (en collaboration avec le CRNH RA). Ainsi, nous serions en mesure de mettre en évidence l'hyperactivation potentielle de certaines désaturases tout en déterminant l'importance du transfert d'acides gras et des peroxydes lipidiques entre les classes de lipoprotéines plasmatiques mais aussi entre lipoprotéines et plaquettes.

A terme, une meilleure compréhension des altérations oxydatives subies par les LDL en conditions pré-diabétiques ou diabétiques et de leur impact sur l'activation plaquettaire facilitera leur prévention, évitant ainsi potentiellement de nombreux accidents cardiovasculaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (2001). Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285, 2486-2497.
- (2002). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106, 3143-3421.
- Abordo, E. A., and Thornalley, P. J. (1997). Synthesis and secretion of tumour necrosis factor-alpha by human monocytic THP-1 cells and chemotaxis induced by human serum albumin derivatives modified with methylglyoxal and glucose-derived advanced glycation endproducts. *Immunol Lett* 58, 139-147.
- Aiken, M. L., Ginsberg, M. H., Byers-Ward, V., and Plow, E. F. (1990). Effects of OKM5, a monoclonal antibody to glycoprotein IV, on platelet aggregation and thrombospondin surface expression. *Blood* 76, 2501-2509.
- Akanji, A. O., Abdella, N., and Mojiminiyi, O. A. (2002). Determinants of glycated LDL levels in nondiabetic and diabetic hyperlipidaemic patients in Kuwait. *Clin Chim Acta* 317, 171-176.
- Akkerman, J. W. (2008). From low-density lipoprotein to platelet activation. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 2374-2378.
- Alberti, K. G., Zimmet, P., and Shaw, J. (2005). The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 366, 1059-1062.
- Alberti, K. G., and Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15, 539-553.
- Alexander, C. M., Landsman, P. B., Teutsch, S. M., and Haffner, S. M. (2003). NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes* 52, 1210-1214.
- Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W., and Fu, P. C. (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20, 470-475.
- Ambrosio, G., Golino, P., Pascucci, I., Rosolowsky, M., Campbell, W. B., DeClerck, F., Tritto, I., and Chiariello, M. (1994). Modulation of platelet function by reactive oxygen metabolites. *Am J Physiol* 267, H308-318.
- Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., and Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6858-6862.
- Anfossi, G., Russo, I., and Trovati, M. (2009). Platelet dysfunction in central obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19, 440-449.
- Armoni, M., Harel, C., Bar-Yoseph, F., Milo, S., and Karnieli, E. (2005). Free fatty acids repress the GLUT4 gene expression in cardiac muscle via novel response elements. *J Biol Chem* 280, 34786-34795.

- Armutcu, F., Ataymen, M., Atmaca, H., and Gurel, A. (2008). Oxidative stress markers, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 46, 785-790.
- Asch, A. S., Barnwell, J., Silverstein, R. L., and Nachman, R. L. (1987). Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest* 79, 1054-1061.
- Asch, A. S., Silbiger, S., Heimer, E., and Nachman, R. L. (1992). Thrombospondin sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding. *Biochem Biophys Res Commun* 182, 1208-1217.
- Ashraf, M. Z., Kar, N. S., Chen, X., Choi, J., Salomon, R. G., Febbraio, M., and Podrez, E. A. (2008). Specific oxidized phospholipids inhibit scavenger receptor bi-mediated selective uptake of cholesteryl esters. *J Biol Chem* 283, 10408-10414.
- Ashraf, M. Z., Kar, N. S., and Podrez, E. A. (2009). Oxidized phospholipids: biomarker for cardiovascular diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1241-1244.
- Azizi, F., Salehi, P., Etemadi, A., and Zahedi-Asl, S. (2003). Prevalence of metabolic syndrome in an urban population: Tehran Lipid and Glucose Study. *Diabetes Res Clin Pract* 61, 29-37.
- Bacot, S., Bernoud-Hubac, N., Chantegrel, B., Deshayes, C., Doutheau, A., Ponsin, G., Lagarde, M., and Guichardant, M. (2007). Evidence for in situ ethanolamine phospholipid adducts with hydroxy-alkenals. *J Lipid Res* 48, 816-825.
- Bae, Y. S., Kang, S. W., Seo, M. S., Baines, I. C., Tekle, E., Chock, P. B., and Rhee, S. G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272, 217-221.
- Barnes, M. J., and Farndale, R. W. (1999). Collagens and atherosclerosis. *Exp Gerontol* 34, 513-525.
- Baron, A. D. (2002). Insulin resistance and vascular function. *J Diabetes Complications* 16, 92-102.
- Barre, E. (2003). A more detailed fatty acid composition of human lipoprotein(a)--a comparison with low density lipoprotein. *Chem Phys Lipids* 123, 99-105.
- Bedwell, S., Dean, R. T., and Jessup, W. (1989). The action of defined oxygen-centred free radicals on human low-density lipoprotein. *Biochem J* 262, 707-712.
- Behnke, O., and Forer, A. (1998). From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol Suppl* 61, 3-23.
- Bellomo, G., Maggi, E., Poli, M., Agosta, F. G., Bollati, P., and Finardi, G. (1995). Autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoproteins in NIDDM. *Diabetes* 44, 60-66.
- Bensoussan, D., Levy Toledano, S., Passa, P., Caen, J., and Caniver, J. (1975). Platelet hyperaggregation and increased plasma level of Von Willebrand factor in diabetics with retinopathy. *Diabetologia* 11, 307-312.
- Berridge, M. J., and Irvine, R. F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315-321.

- Bjorntorp, P., Bergman, H., and Varnauskas, E. (1969). Plasma free fatty acid turnover rate in obesity. *Acta Med Scand* 185, 351-356.
- Blake, G. J., Otvos, J. D., Rifai, N., and Ridker, P. M. (2002). Low-density lipoprotein particle concentration and size as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy as predictors of cardiovascular disease in women. *Circulation* 106, 1930-1937.
- Blake, R. A., Schieven, G. L., and Watson, S. P. (1994). Collagen stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 2 but not phospholipase C-gamma 1 in human platelets. *FEBS Lett* 353, 212-216.
- Boden, G. (2005). Free fatty acids and insulin secretion in humans. *Curr Diab Rep* 5, 167-170.
- Boden, G. (2008). Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37, 635-646, viii-ix.
- Boden, G., Chen, X., Ruiz, J., White, J. V., and Rossetti, L. (1994). Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 93, 2438-2446.
- Boden, G., Cheung, P., Stein, T. P., Kresge, K., and Mozzoli, M. (2002). FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E12-19.
- Boden, G., Homko, C., Mozzoli, M., Showe, L. C., Nichols, C., and Cheung, P. (2005). Thiazolidinediones upregulate fatty acid uptake and oxidation in adipose tissue of diabetic patients. *Diabetes* 54, 880-885.
- Bogardus, C., Lillioja, S., Nyomba, B. L., Zurlo, F., Swinburn, B., Esposito-Del Puente, A., Knowler, W. C., Ravussin, E., Mott, D. M., and Bennett, P. H. (1989). Distribution of in vivo insulin action in Pima Indians as mixture of three normal distributions. *Diabetes* 38, 1423-1432.
- Born, G. V. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194, 927-929.
- Börsch-Haubold, A. G., Bartoli, F., Asselin, J., Dudler, T., Kramer, R. M., Apitz-Castro, R., Watson, S. P., and Gelb, M. H. (1998). Identification of the phosphorylation sites of cytosolic phospholipase A2 in agonist-stimulated human platelets and HeLa cells. *J Biol Chem* 273, 4449-4458.
- Börsch-Haubold, A. G., Ghomashchi, F., Pasquet, S., Goedert, M., Cohen, P., Gelb, M. H., and Watson, S. P. (1999). Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in platelets is mediated by multiple stress-activated protein kinase pathways. *Eur J Biochem* 265, 195-203.
- Bowie, A., Owens, D., Collins, P., Johnson, A., and Tomkin, G. H. (1993). Glycosylated low density lipoprotein is more sensitive to oxidation: implications for the diabetic patient? *Atherosclerosis* 102, 63-67.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brass, L. F., Shaller, C. C., and Belmonte, E. J. (1987). Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C

- mediated by platelet thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin. *J Clin Invest* 79, 1269-1275.
- Brenner, R. R. (2003). Hormonal modulation of delta6 and delta5 desaturases: case of diabetes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68, 151-162.
 - Bressler, N. M., Broekman, M. J., and Marcus, A. J. (1979). Concurrent studies of oxygen consumption and aggregation in stimulated human platelets. *Blood* 53, 167-178.
 - Brindisi, M. C., Bouillet, B., Verges, B., and Halimi, S. (2010). Cardiovascular complications in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab*.
 - Brown, A. J., Leong, S. L., Dean, R. T., and Jessup, W. (1997). 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J Lipid Res* 38, 1730-1745.
 - Brown, B. E., Rashid, I., van Reyk, D. M., and Davies, M. J. (2007). Glycation of low-density lipoprotein results in the time-dependent accumulation of cholesteryl esters and apolipoprotein B-100 protein in primary human monocyte-derived macrophages. *FEBS J* 274, 1530-1541.
 - Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1979). Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3330-3337.
 - Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625.
 - Bucala, R., Makita, Z., Koschinsky, T., Cerami, A., and Vlassara, H. (1993). Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6434-6438.
 - Bugaud, F., Nadal-Wollbold, F., Levy-Toledano, S., Rosa, J. P., and Bryckaert, M. (1999). Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets. *Blood* 94, 3800-3805.
 - Bunn, H. F., and Higgins, P. J. (1981). Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science* 213, 222-224.
 - Burch, J. W., and Burch, P. T. (1990). Glutathione disulfide production during arachidonic acid oxygenation in human platelets. *Prostaglandins* 39, 123-134.
 - Burgoyne, R. D., and Morgan, A. (1990). The control of free arachidonic acid levels. *Trends Biochem Sci* 15, 365-366.
 - Burke, J. E., and Dennis, E. A. (2009). Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther* 23, 49-59.
 - Byrne, M. M., Sturis, J., and Polonsky, K. S. (1995). Insulin secretion and clearance during low-dose graded glucose infusion. *Am J Physiol* 268, E21-27.
 - Calkin, A. C., Drew, B. G., Ono, A., Duffy, S. J., Gordon, M. V., Schoenwaelder, S. M., Sviridov, D., Cooper, M. E., Kingwell, B. A., and Jackson, S. P. (2009). Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux. *Circulation* 120, 2095-2104.

- Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Lasuncion, M. A., and Vega, M. A. (1997). CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2341-2349.
- Calzada, C., Coulon, L., Halimi, D., Le Coquil, E., Pruneta-Deloche, V., Moulin, P., Ponsin, G., Vericel, E., and Lagarde, M. (2007). In vitro glycoxidized low-density lipoproteins and low-density lipoproteins isolated from type 2 diabetic patients activate platelets via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 1961-1964.
- Calzada, C., Vericel, E., and Lagarde, M. (1997). Low concentrations of lipid hydroperoxides prime human platelet aggregation specifically via cyclo-oxygenase activation. *Biochem J* 325 (Pt 2), 495-500.
- Calzada, C., Vericel, E., Mitel, B., Coulon, L., and Lagarde, M. (2001). 12(S)-Hydroperoxy-eicosatetraenoic acid increases arachidonic acid availability in collagen-primed platelets. *J Lipid Res* 42, 1467-1473.
- Cameron, A. J., Boyko, E. J., Sicree, R. A., Zimmet, P. Z., Soderberg, S., Alberti, K. G., Tuomilehto, J., Chitson, P., and Shaw, J. E. (2008). Central obesity as a precursor to the metabolic syndrome in the AusDiab study and Mauritius. *Obesity (Silver Spring)* 16, 2707-2716.
- Cameron, A. J., Shaw, J. E., and Zimmet, P. Z. (2004). The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am* 33, 351-375, table of contents.
- Campos, H., Arnold, K. S., Balestra, M. E., Innerarity, T. L., and Krauss, R. M. (1996). Differences in receptor binding of LDL subfractions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 794-801.
- Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S., Vasson, M., Hasselman, M., and Leverve, X. (2007). *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*, 3 edn).
- Canobbio, I., Reineri, S., Sinigaglia, F., Balduini, C., and Torti, M. (2004). A role for p38 MAP kinase in platelet activation by von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 91, 102-110.
- Carnevale, R., Pignatelli, P., Lenti, L., Buchetti, B., Sanguigni, V., Di Santo, S., and Violi, F. (2007). LDL are oxidatively modified by platelets via GP91(phox) and accumulate in human monocytes. *FASEB J* 21, 927-934.
- Carr, D. B., Utzschneider, K. M., Hull, R. L., Kodama, K., Retzlaff, B. M., Brunzell, J. D., Shofer, J. B., Fish, B. E., Knopp, R. H., and Kahn, S. E. (2004). Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes* 53, 2087-2094.
- Ceriello, A., dello Russo, P., Amstad, P., and Cerutti, P. (1996). High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes* 45, 471-477.
- Ceriello, A., and Motz, E. (2004). Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 816-823.

- Chan, D. C., Barrett, P. H., and Watts, G. F. (2004). Lipoprotein kinetics in the metabolic syndrome: pathophysiological and therapeutic lessons from stable isotope studies. *Clin Biochem Rev* 25, 31-48.
- Chap, H. J., Zwaal, R. F., and van Deenen, L. L. (1977). Action of highly purified phospholipases on blood platelets. Evidence for an asymmetric distribution of phospholipids in the surface membrane. *Biochim Biophys Acta* 467, 146-164.
- Chapman, M. J., Laplaud, P. M., Luc, G., Forgez, P., Bruckert, E., Goulinet, S., and Lagrange, D. (1988). Further resolution of the low density lipoprotein spectrum in normal human plasma: physicochemical characteristics of discrete subspecies separated by density gradient ultracentrifugation. *J Lipid Res* 29, 442-458.
- Charonis, A. S., Reger, L. A., Dege, J. E., Kouzi-Koliakos, K., Furcht, L. T., Wohlhueter, R. M., and Tsilibary, E. C. (1990). Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. *Diabetes* 39, 807-814.
- Chen, K., Febbraio, M., Li, W., and Silverstein, R. L. (2008). A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxidized low-density lipoprotein. *Circ Res* 102, 1512-1519.
- Chen, M., Kakutani, M., Naruko, T., Ueda, M., Narumiya, S., Masaki, T., and Sawamura, T. (2001). Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 153-158.
- Chen, R., Chen, X., Salomon, R. G., and McIntyre, T. M. (2009). Platelet activation by low concentrations of intact oxidized LDL particles involves the PAF receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 363-371.
- Clark, J. D., Lin, L. L., Kriz, R. W., Ramesha, C. S., Sultzman, L. A., Lin, A. Y., Milona, N., and Knopf, J. L. (1991). A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* 65, 1043-1051.
- Cockcroft, S., and Thomas, G. M. (1992). Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochem J* 288 (Pt 1), 1-14.
- Cosemans, J. M., Iserbyt, B. F., Deckmyn, H., and Heemskerk, J. W. (2008). Multiple ways to switch platelet integrins on and off. *J Thromb Haemost* 6, 1253-1261.
- Coulon, L., Calzada, C., Moulin, P., Vericel, E., and 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.
- Croset, M., and Lagarde, M. (1985). Enhancement of eicosaenoic acid lipoxygenation in human platelets by 12-hydroperoxy derivative of arachidonic acid. *Lipids* 20, 743-750.
- Dahle, L. K., Hill, E. G., and Holman, R. T. (1962). The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys* 98, 253-261.
- Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D., and Nicotera, T. (1996). Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 347, 444-445.

- Dangelmaier, C., Jin, J., Daniel, J. L., Smith, J. B., and Kunapuli, S. P. (2000). The P2Y1 receptor mediates ADP-induced p38 kinase-activating factor generation in human platelets. *Eur J Biochem* 267, 2283-2289.
- Davi, G., Ciabattini, G., Consoli, A., Mezzetti, A., Falco, A., Santarone, S., Pennese, E., Vitacolonna, E., Bucciarelli, T., Costantini, F., *et al.* (1999). In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 99, 224-229.
- Davi, G., Falco, A., and Patrono, C. (2005). Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 7, 256-268.
- Davi, G., Guagnano, M. T., Ciabattini, G., Basili, S., Falco, A., Marinopiccoli, M., Nutini, M., Sensi, S., and Patrono, C. (2002). Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *JAMA* 288, 2008-2014.
- Davidsson, P., Hulthe, J., Fagerberg, B., Olsson, B. M., Hallberg, C., Dahllof, B., and Camejo, G. (2005). A proteomic study of the apolipoproteins in LDL subclasses in patients with the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *J Lipid Res* 46, 1999-2006.
- de Ferranti, S., and Mozaffarian, D. (2008). The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* 54, 945-955.
- de Graaf, J., Hak-Lemmers, H. L., Hectors, M. P., Demacker, P. N., Hendriks, J. C., and Stalenhoef, A. F. (1991). Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb* 11, 298-306.
- de Graaf, J., Hendriks, J. C., Demacker, P. N., and Stalenhoef, A. F. (1993). Identification of multiple dense LDL subfractions with enhanced susceptibility to in vitro oxidation among hypertriglyceridemic subjects. Normalization after clofibrate treatment. *Arterioscler Thromb* 13, 712-719.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., and Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324 (Pt 1), 1-18.
- Dominguez, C., Ruiz, E., Gussinye, M., and Carrascosa, A. (1998). Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* 21, 1736-1742.
- Dorsam, R. T., and Kunapuli, S. P. (2004). Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J Clin Invest* 113, 340-345.
- Du, X. L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I. G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., and Brownlee, M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12222-12226.
- Eckel, R. H., Alberti, K. G., Grundy, S. M., and Zimmet, P. Z. (2010). The metabolic syndrome. *Lancet* 375, 181-183.
- Egan, B. M. (2003). Insulin resistance and the sympathetic nervous system. *Curr Hypertens Rep* 5, 247-254.
- Elstad, M. R., Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., and Zimmerman, G. A. (1989). Platelet-activating factor acetylhydrolase increases during macrophage

- differentiation. A novel mechanism that regulates accumulation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 264, 8467-8470.
- Engelmann, B., Brautigam, C., and Thiery, J. (1994). Plasmalogen phospholipids as potential protectors against lipid peroxidation of low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 204, 1235-1242.
 - Engelmann, B., Kogl, C., Kulschar, R., and Schaipp, B. (1996). Transfer of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin from low- and high-density lipoprotein to human platelets. *Biochem J* 315 (Pt 3), 781-789.
 - Erciyas, F., Taneli, F., Arslan, B., and Uslu, Y. (2004). Glycemic control, oxidative stress, and lipid profile in children with type 1 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 35, 134-140.
 - Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., and Jurgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13, 341-390.
 - Esterbauer, H., Jurgens, G., Quehenberger, O., and Koller, E. (1987). Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res* 28, 495-509.
 - Esterbauer, H., Schaur, R. J., and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11, 81-128.
 - Evans, J. H., Spencer, D. M., Zweifach, A., and Leslie, C. C. (2001). Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes. *J Biol Chem* 276, 30150-30160.
 - Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., and Grodsky, G. M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23, 599-622.
 - Evans, P., and Halliwell, B. (1999). Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci* 884, 19-40.
 - Febbraio, M., Hajjar, D. P., and Silverstein, R. L. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 108, 785-791.
 - Feillet-Coudray, C., Rock, E., Coudray, C., Grzelkowska, K., Azais-Braesco, V., Dardevet, D., and Mazur, A. (1999). Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. *Clin Chim Acta* 284, 31-43.
 - Ferrannini, E., Buzzigoli, G., Bonadonna, R., Giorico, M. A., Oleggini, M., Graziadei, L., Pedrinelli, R., Brandi, L., and Bevilacqua, S. (1987). Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med* 317, 350-357.
 - Ferretti, G., Rabini, R. A., Bacchetti, T., Vignini, A., Salvolini, E., Ravaglia, F., Curatola, G., and Mazzanti, L. (2002). Glycated low density lipoproteins modify platelet properties: a compositional and functional study. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2180-2184.
 - Fogelman, A. M., Shechter, I., Seager, J., Hokom, M., Child, J. S., and Edwards, P. A. (1980). Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl

- ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2214-2218.
- Ford, E. S. (2005). Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care* 28, 1769-1778.
 - Fossati, P., and Prencipe, L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 28, 2077-2080.
 - Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114, 1752-1761.
 - Galeano, N. F., Milne, R., Marcel, Y. L., Walsh, M. T., Levy, E., Ngu'yen, T. D., Gleeson, A., Arad, Y., Witte, L., al-Haideri, M., and *et al.* (1994). Apoprotein B structure and receptor recognition of triglyceride-rich low density lipoprotein (LDL) is modified in small LDL but not in triglyceride-rich LDL of normal size. *J Biol Chem* 269, 511-519.
 - Gami, A. S., Witt, B. J., Howard, D. E., Erwin, P. J., Gami, L. A., Somers, V. K., and Montori, V. M. (2007). Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol* 49, 403-414.
 - Garvey, W. T., Kwon, S., Zheng, D., Shaughnessy, S., Wallace, P., Hutto, A., Pugh, K., Jenkins, A. J., Klein, R. L., and Liao, Y. (2003). Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes* 52, 453-462.
 - Ghosh, J., and Myers, C. E. (1998). Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13182-13187.
 - Gopaul, N. K., Manraj, M. D., Hebe, A., Lee Kwai Yan, S., Johnston, A., Carrier, M. J., and Anggard, E. E. (2001). Oxidative stress could precede endothelial dysfunction and insulin resistance in Indian Mauritians with impaired glucose metabolism. *Diabetologia* 44, 706-712.
 - Gotto, A. M., Jr., Pownall, H. J., and Havel, R. J. (1986). Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol* 128, 3-41.
 - Griesmacher, A., Kindhauser, M., Andert, S. E., Schreiner, W., Toma, C., Knoebl, P., Pietschmann, P., Prager, R., Schnack, C., Scherthaner, G., and *et al.* (1995). Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 98, 469-475.
 - Grundy, S. M., Hansen, B., Smith, S. C., Jr., Cleeman, J. I., and Kahn, R. A. (2004). Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Circulation* 109, 551-556.
 - Guichardant, M., and Lagarde, M. (1983). Phospholipid analysis and fatty acid content in platelets by the combination of high-performance liquid chromatography and glass capillary gas-liquid chromatography. *J Chromatogr* 275, 400-406.

- Guy, J., Ogden, L., Wadwa, R. P., Hamman, R. F., Mayer-Davis, E. J., Liese, A. D., D'Agostino, R., Jr., Marcovina, S., and Dabelea, D. (2009). Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth case-control study. *Diabetes Care* 32, 416-420.
- Habib, A., FitzGerald, G. A., and Maclouf, J. (1999). Phosphorylation of the thromboxane receptor alpha, the predominant isoform expressed in human platelets. *J Biol Chem* 274, 2645-2651.
- Hackeng, C. M., Franke, B., Relou, I. A., Gorter, G., Bos, J. L., van Rijn, H. J., and Akkerman, J. W. (2000). Low-density lipoprotein activates the small GTPases Rap1 and Ral in human platelets. *Biochem J* 349, 231-238.
- Hackeng, C. M., Pladet, M. W., Akkerman, J. W., and van Rijn, H. J. (1999). Low density lipoprotein phosphorylates the focal adhesion-associated kinase p125(FAK) in human platelets independent of integrin alphaIIb beta3. *J Biol Chem* 274, 384-388.
- Haffner, S. M. (2003). Management of dyslipidemia in adults with diabetes. *Diabetes Care* 26 Suppl 1, S83-86.
- Halenda, S. P., and Rehm, A. G. (1987). Thrombin and C-kinase activators potentiate calcium-stimulated arachidonic acid release in human platelets. *Biochem J* 248, 471-475.
- Hamberg, M., and Samuelsson, B. (1974). Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 3400-3404.
- Hamberg, M., Svensson, J., and Samuelsson, B. (1975). Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2994-2998.
- Han, D., Handelman, G., Marcocci, L., Sen, C. K., Roy, S., Kobuchi, H., Tritschler, H. J., Flohe, L., and Packer, L. (1997). Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *Biofactors* 6, 321-338.
- Handin, R. I., Karabin, R., and Boxer, G. J. (1977). Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J Clin Invest* 59, 959-965.
- Hanks, S. K., and Polte, T. R. (1997). Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays* 19, 137-145.
- Hansel, B., Giral, P., Nobecourt, E., Chantepie, S., Bruckert, E., Chapman, M. J., and Kontush, A. (2004). Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 4963-4971.
- Hartwich, J., Dembinska-Kiec, A., Gruca, A., Motyka, M., Partyka, L., Skrzeczynska, J., Bzowska, M., Pryjma, J., Huber, J., Leitinger, N., and Schmitz, G. (2002). Regulation of platelet adhesion by oxidized lipoproteins and oxidized phospholipids. *Platelets* 13, 141-151.
- Hartwig, J. H. (1992). Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J Cell Biol* 118, 1421-1442.
- Hashimoto, R., Matsukawa, N., Nariyama, Y., Ogiri, Y., Hamagawa, E., Tanaka, K., Usui, Y., Nakano, S., Maruyama, T., Kyotani, S., *et al.* (2002). Evaluation of

- apolipoprotein B-100 fragmentation and cross-linkage in serum as an index of atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1584, 123-128.
- Haurand, M., and Ullrich, V. (1985). Isolation and characterization of thromboxane synthase from human platelets as a cytochrome P-450 enzyme. *J Biol Chem* 260, 15059-15067.
 - Havel, R. J., Eder, H. A., and Bragdon, J. H. (1955). The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34, 1345-1353.
 - Heemskerk, J. W., Bevers, E. M., and Lindhout, T. (2002). Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* 88, 186-193.
 - Heizer, M. L., McKinney, J. S., and Ellis, E. F. (1991). 14,15-Epoxyeicosatrienoic acid inhibits platelet aggregation in mouse cerebral arterioles. *Stroke* 22, 1389-1393.
 - Hernebring, M., Brolen, G., Aguilaniu, H., Semb, H., and Nystrom, T. (2006). Elimination of damaged proteins during differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7700-7705.
 - Hirata, M., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Yokota, Y., Kageyama, R., Nakanishi, S., and Narumiya, S. (1991). Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A2 receptor. *Nature* 349, 617-620.
 - Hitchcock, I. S., Fox, N. E., Prevost, N., Sear, K., Shattil, S. J., and Kaushansky, K. (2008). Roles of focal adhesion kinase (FAK) in megakaryopoiesis and platelet function: studies using a megakaryocyte lineage specific FAK knockout. *Blood* 111, 596-604.
 - Hodivala-Dilke, K. M., McHugh, K. P., Tsakiris, D. A., Rayburn, H., Crowley, D., Ullman-Cullere, M., Ross, F. P., Coller, B. S., Teitelbaum, S., and Hynes, R. O. (1999). Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest* 103, 229-238.
 - Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahringer, U., and Beutler, B. (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433, 523-527.
 - Holvoet, P., Kritchevsky, S. B., Tracy, R. P., Mertens, A., Rubin, S. M., Butler, J., Goodpaster, B., and Harris, T. B. (2004). The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. *Diabetes* 53, 1068-1073.
 - Hopps, E., Noto, D., Caimi, G., and Averna, M. R. (2010). A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20, 72-77.
 - Huang, M. M., Bolen, J. B., Barnwell, J. W., Shattil, S. J., and Brugge, J. S. (1991). Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7844-7848.
 - Hunt, J. V., Smith, C. C., and Wolff, S. P. (1990). Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39, 1420-1424.

- Ibrahim, S., Guillot, N., Pruneta-Deloche, V., Charriere, S., Calzada, C., Guichardant, M., Moulin, P., Lagarde, M., and Ponsin, G. (2009). Alterations in the transfer of phospholipids from very-low density lipoproteins to activated platelets in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 203, 119-125.
- Imachi, H., Murao, K., Cao, W., Tada, S., Taminato, T., Wong, N. C., Takahara, J., and Ishida, T. (2003). Expression of human scavenger receptor B1 on and in human platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 898-904.
- Irani, K., Pham, Y., Coleman, L. D., Roos, C., Cooke, G. E., Miodovnik, A., Karim, N., Wilhide, C. C., Bray, P. F., and Goldschmidt-Clermont, P. J. (1998). Priming of platelet alphaIIb beta3 by oxidants is associated with tyrosine phosphorylation of beta3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1698-1706.
- Irvine, R. F. (1990). 'Quantal' Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett* 263, 5-9.
- Isomaa, B., Almgren, P., Tuomi, T., Forsen, B., Lahti, K., Nissen, M., Taskinen, M. R., and Groop, L. (2001). Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24, 683-689.
- Jackson, S. P. (2007). The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 109, 5087-5095.
- Jenkins, A. J., Klein, R. L., Chassereau, C. N., Hermayer, K. L., and Lopes-Virella, M. F. (1996). LDL from patients with well-controlled IDDM is not more susceptible to in vitro oxidation. *Diabetes* 45, 762-767.
- Jenkins, A. J., Thorpe, S. R., Alderson, N. L., Hermayer, K. L., Lyons, T. J., King, L. P., Chassereau, C. N., and Klein, R. L. (2004). In vivo glycated low-density lipoprotein is not more susceptible to oxidation than nonglycated low-density lipoprotein in type 1 diabetes. *Metabolism* 53, 969-976.
- Jurgens, G., Fell, A., Ledinski, G., Chen, Q., and Paltauf, F. (1995). Delay of copper-catalyzed oxidation of low density lipoprotein by in vitro enrichment with choline or ethanolamine plasmalogens. *Chem Phys Lipids* 77, 25-31.
- Kahn, M. L., Nakanishi-Matsui, M., Shapiro, M. J., Ishihara, H., and Coughlin, S. R. (1999). Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* 103, 879-887.
- Karlsson, H., Leanderson, P., Tagesson, C., and Lindahl, M. (2005). Lipoproteomics I: mapping of proteins in low-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 5, 551-565.
- Kasirer-Friede, A., Cozzi, M. R., Mazzucato, M., De Marco, L., Ruggeri, Z. M., and Shattil, S. J. (2004). Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors. *Blood* 103, 3403-3411.
- Kawai, Y., Takeda, S., and Terao, J. (2007). Lipidomic analysis for lipid peroxidation-derived aldehydes using gas chromatography-mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 20, 99-107.
- Kieffer, N., Guichard, J., Farcet, J. P., Vainchenker, W., and Breton-Gorius, J. (1987). Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur J Biochem* 164, 189-195.

- Kirstein, M., Aston, C., Hintz, R., and Vlassara, H. (1992). Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest* 90, 439-446.
- Koenig, R. J., Peterson, C. M., Kilo, C., Cerami, A., and Williamson, J. R. (1976). Hemoglobin A1c as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. *Diabetes* 25, 230-232.
- Koller, E., Koller, F., and Doleschel, W. (1982). Specific binding sites on human blood platelets for plasma lipoproteins. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 363, 395-405.
- Korporaal, S. J., Relou, I. A., van Eck, M., Strasser, V., Bezemer, M., Gorter, G., van Berkel, T. J., Nimpf, J., Akkerman, J. W., and Lenting, P. J. (2004). Binding of low density lipoprotein to platelet apolipoprotein E receptor 2¹ results in phosphorylation of p38MAPK. *J Biol Chem* 279, 52526-52534.
- Korporaal, S. J., Van Eck, M., Adelmeijer, J., Ijsseldijk, M., Out, R., Lisman, T., Lenting, P. J., Van Berkel, T. J., and Akkerman, J. W. (2007). Platelet activation by oxidized low density lipoprotein is mediated by CD36 and scavenger receptor-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2476-2483.
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416, 15-18.
- Kramer, R. M., Checani, G. C., Deykin, A., Pritzker, C. R., and Deykin, D. (1986). Solubilization and properties of Ca²⁺-dependent human platelet phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta* 878, 394-403.
- Kramer, R. M., Roberts, E. F., Strifler, B. A., and Johnstone, E. M. (1995). Thrombin induces activation of p38 MAP kinase in human platelets. *J Biol Chem* 270, 27395-27398.
- Krinsky, N. I., and Yeum, K. J. (2003). Carotenoid-radical interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 754-760.
- Kriska, T., Marathe, G. K., Schmidt, J. C., McIntyre, T. M., and Girotti, A. W. (2007). Phospholipase action of platelet-activating factor acetylhydrolase, but not paraoxonase-1, on long fatty acyl chain phospholipid hydroperoxides. *J Biol Chem* 282, 100-108.
- Krotz, F., Sohn, H. Y., Gloe, T., Zahler, S., Riexinger, T., Schiele, T. M., Becker, B. F., Theisen, K., Klauss, V., and Pohl, U. (2002). NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood* 100, 917-924.
- Kuroda, S., Uzu, T., Fujii, T., Nishimura, M., Nakamura, S., Inenaga, T., and Kimura, G. (1999). Role of insulin resistance in the genesis of sodium sensitivity in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 13, 257-262.
- Kylin, E. (1923). Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämiesyndrome. *Zentralblatt für innere Medizin* 44, 105-127.
- Lagarde, M. (1988). Metabolism of fatty acids by platelets and the functions of various metabolites in mediating platelet function. *Prog Lipid Res* 27, 135-152.
- Lagarde, M., Bryon, P. A., Guichardant, M., and Dechavanne, M. (1980). A simple and efficient method for platelet isolation from their plasma. *Thromb Res* 17, 581-588.

- Lakka, H. M., Laaksonen, D. E., Lakka, T. A., Niskanen, L. K., Kumpusalo, E., Tuomilehto, J., and Salonen, J. T. (2002). The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 288, 2709-2716.
- Lee, A. Y., and Chung, S. S. (1999). Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 13, 23-30.
- Lee, S. B., Rao, A. K., Lee, K. H., Yang, X., Bae, Y. S., and Rhee, S. G. (1996). Decreased expression of phospholipase C-beta 2 isozyme in human platelets with impaired function. *Blood* 88, 1684-1691.
- Lenz, M. L., Hughes, H., Mitchell, J. R., Via, D. P., Guyton, J. R., Taylor, A. A., Gotto, A. M., Jr., and Smith, C. V. (1990). Lipid hydroperoxy and hydroxy derivatives in copper-catalyzed oxidation of low density lipoprotein. *J Lipid Res* 31, 1043-1050.
- Li, Y. M., Mitsushashi, T., Wojciechowicz, D., Shimizu, N., Li, J., Stitt, A., He, C., Banerjee, D., and Vlassara, H. (1996). Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11047-11052.
- Lin, M. E., Herr, D. R., and Chun, J. (2010). Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 91, 130-138.
- Long, S. D., and Pekala, P. H. (1996). Regulation of GLUT4 gene expression by arachidonic acid. Evidence for multiple pathways, one of which requires oxidation to prostaglandin E2. *J Biol Chem* 271, 1138-1144.
- Lorenzo, C., Okoloise, M., Williams, K., Stern, M. P., and Haffner, S. M. (2003). The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes: the San Antonio heart study. *Diabetes Care* 26, 3153-3159.
- Lougheed, M., Lum, C. M., Ling, W., Suzuki, H., Kodama, T., and Steinbrecher, U. (1997). High affinity saturable uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages from mice lacking the scavenger receptor class A type I/II. *J Biol Chem* 272, 12938-12944.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lutters, B. C., Derksen, R. H., Tekelenburg, W. L., Lenting, P. J., Arnout, J., and de Groot, P. G. (2003). Dimers of beta 2-glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 2'. *J Biol Chem* 278, 33831-33838.
- Lyons, T. J., Baynes, J. W., Patrick, J. S., Colwell, J. A., and Lopes-Virella, M. F. (1986). Glycosylation of low density lipoprotein in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes: correlations with other parameters of glycaemic control. *Diabetologia* 29, 685-689.
- Ma, Y., Ashraf, M. Z., and Podrez, E. A. (2010). Scavenger receptor BI modulates platelet reactivity and thrombosis in dyslipidemia. *Blood*.
- Ma, Y. Q., Qin, J., and Plow, E. F. (2007). Platelet integrin alpha(IIb)beta(3): activation mechanisms. *J Thromb Haemost* 5, 1345-1352.

- Manduteanu, I., Calb, M., Lupu, C., Simionescu, N., and Simionescu, M. (1992). Increased adhesion of human diabetic platelets to cultured valvular endothelial cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 24, 539-547.
- Manganiello, V. C., Smith, C. J., Degerman, E., Vasta, V., Tornqvist, H., and Belfrage, P. (1991). Molecular mechanisms involved in the antilipolytic action of insulin: phosphorylation and activation of a particulate adipocyte cAMP phosphodiesterase. *Adv Exp Med Biol* 293, 239-248.
- Manzato, E., Zambon, S., Zambon, A., Cortella, A., Sartore, G., and Crepaldi, G. (1993). Levels and physicochemical properties of lipoprotein subclasses in moderate hypertriglyceridemia. *Clin Chim Acta* 219, 57-65.
- Marathe, G. K., Davies, S. S., Harrison, K. A., Silva, A. R., Murphy, R. C., Castro-Faria-Neto, H., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., and McIntyre, T. M. (1999). Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. *J Biol Chem* 274, 28395-28404.
- Marcus, A. J., Silk, S. T., Safier, L. B., and Ullman, H. L. (1977). Superoxide production and reducing activity in human platelets. *J Clin Invest* 59, 149-158.
- Marcus, A. J., Ullman, H. L., and Safier, L. B. (1969). Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. *J Lipid Res* 10, 108-114.
- Martin-Gallan, P., Carrascosa, A., Gussinye, M., and Dominguez, C. (2003). Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med* 34, 1563-1574.
- Marwali, M. R., Hu, C. P., Mohandas, B., Dandapat, A., Deonikar, P., Chen, J., Cawich, I., Sawamura, T., Kavdia, M., and Mehta, J. L. (2007). Modulation of ADP-induced platelet activation by aspirin and pravastatin: role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, nitric oxide, oxidative stress, and inside-out integrin signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 322, 1324-1332.
- Maschberger, P., Bauer, M., Baumann-Siemons, J., Zangl, K. J., Negrescu, E. V., Reininger, A. J., and Siess, W. (2000). Mildly oxidized low density lipoprotein rapidly stimulates via activation of the lysophosphatidic acid receptor Src family and Syk tyrosine kinases and Ca²⁺ influx in human platelets. *J Biol Chem* 275, 19159-19166.
- Maxwell, S. R., Thomason, H., Sandler, D., Leguen, C., Baxter, M. A., Thorpe, G. H., Jones, A. F., and Barnett, A. H. (1997). Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 27, 484-490.
- Meagher, E. A., Barry, O. P., Burke, A., Lucey, M. R., Lawson, J. A., Rokach, J., and FitzGerald, G. A. (1999). Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. *J Clin Invest* 104, 805-813.
- Meigs, J. B., Rutter, M. K., Sullivan, L. M., Fox, C. S., D'Agostino, R. B., Sr., and Wilson, P. W. (2007). Impact of insulin resistance on risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in people with metabolic syndrome. *Diabetes Care* 30, 1219-1225.

- Mora, S., Otvos, J. D., Rosenson, R. S., Pradhan, A., Buring, J. E., and Ridker, P. M. (2010). Lipoprotein particle size and concentration by nuclear magnetic resonance and incident type 2 diabetes in women. *Diabetes* 59, 1153-1160.
- Morrison, W. R., and Smith, L. M. (1964). Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol. *J Lipid Res* 5, 600-608.
- Morrow, J. D., Hill, K. E., Burk, R. F., Nammour, T. M., Badr, K. F., and Roberts, L. J., 2nd (1990). A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9383-9387.
- Mosior, M., Six, D. A., and Dennis, E. A. (1998). Group IV cytosolic phospholipase A₂ binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity. *J Biol Chem* 273, 2184-2191.
- Muller-Nordhorn, J., Binting, S., Roll, S., and Willich, S. N. (2008). An update on regional variation in cardiovascular mortality within Europe. *Eur Heart J* 29, 1316-1326.
- Murphy, R. C., and Johnson, K. M. (2008). Cholesterol, reactive oxygen species, and the formation of biologically active mediators. *J Biol Chem* 283, 15521-15525.
- Murugappa, S., and Kunapuli, S. P. (2006). The role of ADP receptors in platelet function. *Front Biosci* 11, 1977-1986.
- Myant, N. B. (1990). Cholesterol metabolism, LDL and the LDL receptor. San Diego: Academic Press, 99-111.
- Napoli, C., Mancini, F. P., Corso, G., Malorni, A., Crescenzi, E., Postiglione, A., and Palumbo, G. (1997). A simple and rapid purification procedure minimizes spontaneous oxidative modifications of low density lipoprotein and lipoprotein (a). *J Biochem* 121, 1096-1101.
- Needleman, P., Moncada, S., Bunting, S., Vane, J. R., Hamberg, M., and Samuelsson, B. (1976). Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A₂ from prostaglandin endoperoxides. *Nature* 261, 558-560.
- Nègre-Salvayre, A., Salvayre, R., Auge, N., Pamplona, R., and Portero-Otin, M. (2009). Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid Redox Signal* 11, 3071-3109.
- Neuzil, J., and Stocker, R. (1994). Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem* 269, 16712-16719.
- Newman, P. J., Gorski, J., White, G. C., 2nd, Gidwitz, S., Cretney, C. J., and Aster, R. H. (1988). Enzymatic amplification of platelet-specific messenger RNA using the polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 82, 739-743.
- Nicholson, A. C., Frieda, S., Pearce, A., and Silverstein, R. L. (1995). Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 269-275.

- Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J. W., Zirngibl, H., and Fassler, R. (2001). Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 20, 2120-2130.
- Nieswandt, B., and Watson, S. P. (2003). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 102, 449-461.
- Niki, E. (2009). Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med* 47, 469-484.
- Nityanand, S., Pande, I., Bajpai, V. K., Singh, L., Chandra, M., and Singh, B. N. (1993). Platelets in essential hypertension. *Thromb Res* 72, 447-454.
- Njajou, O. T., Kanaya, A. M., Holvoet, P., Connelly, S., Strotmeyer, E. S., Harris, T. B., Cummings, S. R., and Hsueh, W. C. (2009). Association between oxidized LDL, obesity and type 2 diabetes in a population-based cohort, the Health, Aging and Body Composition Study. *Diabetes Metab Res Rev* 25, 733-739.
- Nofer, J. R., Herminghaus, G., Brodde, M., Morgenstern, E., Rust, S., Engel, T., Seedorf, U., Assmann, G., Bluethmann, H., and Kehrel, B. E. (2004). Impaired platelet activation in familial high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *J Biol Chem* 279, 34032-34037.
- Oak, J., Nakagawa, K., and Miyazawa, T. (2000). Synthetically prepared Aamadori-glycated phosphatidylethanolamine can trigger lipid peroxidation via free radical reactions. *FEBS Lett* 481, 26-30.
- Offermanns, S., Laugwitz, K. L., Spicher, K., and Schultz, G. (1994). G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 504-508.
- Packard, C. J. (2003). Triacylglycerol-rich lipoproteins and the generation of small, dense low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 31, 1066-1069.
- Packer, J. E., Slater, T. F., and Willson, R. L. (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278, 737-738.
- Packer, L., Witt, E. H., and Tritschler, H. J. (1995). alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 19, 227-250.
- Palmieri, V. O., Grattagliano, I., Portincasa, P., and Palasciano, G. (2006). Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. *J Nutr* 136, 3022-3026.
- Papkoff, J., Chen, R. H., Blenis, J., and Forsman, J. (1994). p42 mitogen-activated protein kinase and p90 ribosomal S6 kinase are selectively phosphorylated and activated during thrombin-induced platelet activation and aggregation. *Mol Cell Biol* 14, 463-472.
- Park, Y. B., Jahani, M., and Lacko, A. G. (1985). Isolation of high-density lipoproteins by immunoaffinity column chromatography from hog plasma. *Comp Biochem Physiol B* 82, 529-533.
- Park, Y. W., Zhu, S., Palaniappan, L., Heshka, S., Carnethon, M. R., and Heymsfield, S. B. (2003). The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings

in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med* 163, 427-436.

- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- Pedreno, J., de Castellarnau, C., Cullare, C., Sanchez, J., Gomez-Gerique, J., Ordonez-Llanos, J., and Gonzalez-Sastre, F. (1992). LDL binding sites on platelets differ from the "classical" receptor of nucleated cells. *Arterioscler Thromb* 12, 1353-1362.
- Pelikanova, T., Kazdova, L., Chvojkova, S., and Base, J. (2001). Serum phospholipid fatty acid composition and insulin action in type 2 diabetic patients. *Metabolism* 50, 1472-1478.
- Perseghin, G., Price, T. B., Petersen, K. F., Roden, M., Cline, G. W., Gerow, K., Rothman, D. L., and Shulman, G. I. (1996). Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. *N Engl J Med* 335, 1357-1362.
- Pignatelli, P., Pulcinelli, F. M., Lenti, L., Gazzaniga, P. P., and Violi, F. (1998). Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood* 91, 484-490.
- Podrez, E. A., Byzova, T. V., Febbraio, M., Salomon, R. G., Ma, Y., Valiyaveetil, M., Poliakov, E., Sun, M., Finton, P. J., Curtis, B. R., *et al.* (2007). Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nat Med* 13, 1086-1095.
- Podrez, E. A., Poliakov, E., Shen, Z., Zhang, R., Deng, Y., Sun, M., Finton, P. J., Shan, L., Gugiu, B., Fox, P. L., *et al.* (2002). Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 277, 38503-38516.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., and Casini, A. F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 66, 1499-1503.
- Pratico, D., Pasin, M., Barry, O. P., Ghiselli, A., Sabatino, G., Iuliano, L., FitzGerald, G. A., and Violi, F. (1999). Iron-dependent human platelet activation and hydroxyl radical formation: involvement of protein kinase C. *Circulation* 99, 3118-3124.
- Pré, J. (1991). La lipoperoxydation. *Path Biol* 39, 716-736.
- Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., Stafforini, D. M., and McIntyre, T. M. (2000). Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 69, 419-445.
- Proudfoot, J. M., Barden, A. E., Loke, W. M., Croft, K. D., Puddey, I. B., and Mori, T. A. (2009). HDL is the major lipoprotein carrier of plasma F2-isoprostanes. *J Lipid Res* 50, 716-722.
- Pryor, W. A. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 48, 657-667.
- Pryor, W. A., and Stanley, J. P. (1975). Letter: A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids.

- Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem* 40, 3615-3617.
- Rabini, R. A., Fumelli, P., Galassi, R., Dousset, N., Taus, M., Ferretti, G., Mazzanti, L., Curatola, G., Solera, M. L., and Valdiguie, P. (1994). Increased susceptibility to lipid oxidation of low-density lipoproteins and erythrocyte membranes from diabetic patients. *Metabolism* 43, 1470-1474.
 - Raffaelli, F., Nanetti, L., D'Angelo, M., Montecchiani, G., Alidori, A., Montesi, L., Faloia, E., Vignini, A., and Mazzanti, L. (2009). Interactions between lipoproteins and platelet membranes in obesity. *Obesity (Silver Spring)* 17, 1375-1380.
 - Raychowdhury, M. K., Yukawa, M., Collins, L. J., McGrail, S. H., Kent, K. C., and Ware, J. A. (1994). Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A2 receptor. *J Biol Chem* 269, 19256-19261.
 - Reaven, G. M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595-1607.
 - Reaven, G. M. (2005). Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva Med* 47, 201-210.
 - Reed, G. L., Fitzgerald, M. L., and Polgar, J. (2000). Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood* 96, 3334-3342.
 - Relou, A. M., Gorter, G., van Rijn, H. J., and Akkerman, J. W. (2002). Platelet activation by the apoB/E receptor-binding domain of LDL. *Thromb Haemost* 87, 880-887.
 - Relou, I. A., Gorter, G., Ferreira, I. A., van Rijn, H. J., and Akkerman, J. W. (2003). Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) inhibits low density lipoprotein-induced signaling in platelets. *J Biol Chem* 278, 32638-32644.
 - Rhee, S. G., Chae, H. Z., and Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 38, 1543-1552.
 - Rieusset, J., Bouzakri, K., Chevillotte, E., Ricard, N., Jacquet, D., Bastard, J. P., Laville, M., and Vidal, H. (2004). Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53, 2232-2241.
 - Rigotti, A., Acton, S. L., and Krieger, M. (1995). The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 270, 16221-16224.
 - Rodvein, R., Lindon, J. N., and Levine, P. H. (1976). Physiology and ultrastructure of the blood platelet following exposure to hydrogen peroxide. *Br J Haematol* 33, 19-26.
 - Rosen, P., Nawroth, P. P., King, G., Moller, W., Tritschler, H. J., and Packer, L. (2001). The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 17, 189-212.
 - Rosenson, R. S., Wolff, D. A., Huskin, A. L., Helenowski, I. B., and Rademaker, A. W. (2007). Fenofibrate therapy ameliorates fasting and postprandial lipoproteinemia,

- oxidative stress, and the inflammatory response in subjects with hypertriglyceridemia and the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 30, 1945-1951.
- Ruggeri, Z. M. (2000). Role of von Willebrand factor in platelet thrombus formation. *Ann Med* 32 *Suppl 1*, 2-9.
 - Ryeom, S. W., Silverstein, R. L., Scotto, A., and Sparrow, J. R. (1996). Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium may be mediated by the scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 271, 20536-20539.
 - Saelman, E. U., Nieuwenhuis, H. K., Hese, K. M., de Groot, P. G., Heijnen, H. F., Sage, E. H., Williams, S., McKeown, L., Gralnick, H. R., and Sixma, J. J. (1994). Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood* 83, 1244-1250.
 - Saklatvala, J., Rawlinson, L., Waller, R. J., Sarsfield, S., Lee, J. C., Morton, L. F., Barnes, M. J., and Farndale, R. W. (1996). Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue. *J Biol Chem* 271, 6586-6589.
 - Saltiel, A. R., and Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
 - Salvemini, D., de Nucci, G., Sneddon, J. M., and Vane, J. R. (1989). Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation. *Br J Pharmacol* 97, 1145-1150.
 - Santomauro, A. T., Boden, G., Silva, M. E., Rocha, D. M., Santos, R. F., Ursich, M. J., Strassmann, P. G., and Wajchenberg, B. L. (1999). Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes* 48, 1836-1841.
 - Sattar, N., Gaw, A., Scherbakova, O., Ford, I., O'Reilly, D. S., Haffner, S. M., Isles, C., Macfarlane, P. W., Packard, C. J., Cobbe, S. M., and Shepherd, J. (2003). Metabolic syndrome with and without C-reactive protein as a predictor of coronary heart disease and diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 108, 414-419.
 - Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y., Tanaka, T., Miwa, S., Katsura, Y., Kita, T., and Masaki, T. (1997). An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386, 73-77.
 - Schaffer, J. E. (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 14, 281-287.
 - Scheek, L. M., Wiseman, S. A., Tijburg, L. B., and van Tol, A. (1995). Dialysis of isolated low density lipoprotein induces a loss of lipophilic antioxidants and increases the susceptibility to oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 117, 139-144.
 - Schneider, C., Pratt, D. A., Porter, N. A., and Brash, A. R. (2007). Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem Biol* 14, 473-488.
 - Schneider, D. J., Holmes, C. E., Taatjes-Sommer, H. S., and Sobel, B. E. (2008). Contributions of young platelets and of previously activated platelets to platelet reactivity in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 121, 455-462.
 - Schwertz, H., Tolley, N. D., Foulks, J. M., Denis, M. M., Risenmay, B. W., Buerke, M., Tilley, R. E., Rondina, M. T., Harris, E. M., Kraiss, L. W., *et al.* (2006). Signal-

- dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med* 203, 2433-2440.
- Seet, R. C., Lee, C. Y., Lim, E. C., Quek, A. M., Huang, S. H., Khoo, C. M., and Halliwell, B. (2010). Markers of oxidative damage are not elevated in otherwise healthy individuals with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 33, 1140-1142.
 - Seno, T., Inoue, N., Gao, D., Okuda, M., Sumi, Y., Matsui, K., Yamada, S., Hirata, K. I., Kawashima, S., Tawa, R., *et al.* (2001). Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production. *Thromb Res* 103, 399-409.
 - Seppanen-Laakso, T., Laakso, I., Vanhanen, H., Kiviranta, K., Lehtimaki, T., and Hiltunen, R. (2001). Major human plasma lipid classes determined by quantitative high-performance liquid chromatography, their variation and associations with phospholipid fatty acids. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 754, 437-445.
 - Shattil, S. J., and Brass, L. F. (1987). Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J Biol Chem* 262, 992-1000.
 - Shenker, A., Goldsmith, P., Unson, C. G., and Spiegel, A. M. (1991). The G protein coupled to the thromboxane A2 receptor in human platelets is a member of the novel Gq family. *J Biol Chem* 266, 9309-9313.
 - Shinohara, M., Thornalley, P. J., Giardino, I., Beisswenger, P., Thorpe, S. R., Onorato, J., and Brownlee, M. (1998). Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J Clin Invest* 101, 1142-1147.
 - Sies, H., and Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 62, 1315S-1321S.
 - Sigurdardottir, V., Fagerberg, B., and Hulthe, J. (2002). Circulating oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year-old men (AIR study). *J Intern Med* 252, 440-447.
 - Silverstein, R. L., and Febbraio, M. (2000). CD36 and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 11, 483-491.
 - Singh, D., Greenwald, J. E., Bianchine, J., Metz, E. N., and Sagone, A. L., Jr. (1981). Evidence for the generation of hydroxyl radical during arachidonic acid metabolism by human platelets. *Am J Hematol* 11, 233-240.
 - Singh, R. B., Niaz, M. A., Sharma, J. P., Kumar, R., Bishnoi, I., and Begom, R. (1994). Plasma levels of antioxidant vitamins and oxidative stress in patients with acute myocardial infarction. *Acta Cardiol* 49, 441-452.
 - Singh, U., Devaraj, S., Jialal, I., and Siegel, D. (2008). Comparison effect of atorvastatin (10 versus 80 mg) on biomarkers of inflammation and oxidative stress in subjects with metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 102, 321-325.
 - Sjogren, P., Basu, S., Rosell, M., Silveira, A., de Faire, U., Vessby, B., Hamsten, A., Hellenius, M. L., and Fisher, R. M. (2005). Measures of oxidized low-density lipoprotein and oxidative stress are not related and not elevated in otherwise healthy men with the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 2580-2586.

- Smith, W. L., Marnett, L. J., and DeWitt, D. L. (1991). Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther* 49, 153-179.
- Sobal, G., Menzel, J., and Sinzinger, H. (2000). Why is glycated LDL more sensitive to oxidation than native LDL? A comparative study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 63, 177-186.
- Spector, A. A., Fang, X., Snyder, G. D., and Weintraub, N. L. (2004). Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res* 43, 55-90.
- Spector, A. A., Gordon, J. A., and Moore, S. A. (1988). Hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs). *Prog Lipid Res* 27, 271-323.
- Staels, B., and Fruchart, J. C. (2005). Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* 54, 2460-2470.
- Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Carter, M. E., and Prescott, S. M. (1987). Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 262, 4215-4222.
- Stafforini, D. M., Sheller, J. R., Blackwell, T. S., Sapirstein, A., Yull, F. E., McIntyre, T. M., Bonventre, J. V., Prescott, S. M., and Roberts, L. J., 2nd (2006). Release of free F2-isoprostanes from esterified phospholipids is catalyzed by intracellular and plasma platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem* 281, 4616-4623.
- Steinbrecher, U. P., and Witztum, J. L. (1984). Glucosylation of low-density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism. *Diabetes* 33, 130-134.
- Stork, P. J., and Dillon, T. J. (2005). Multiple roles of Rap1 in hematopoietic cells: complementary versus antagonistic functions. *Blood* 106, 2952-2961.
- Subramanian, P., Vora, M., Gentile, L. B., Stahelin, R. V., and Chalfant, C. E. (2007). Anionic lipids activate group IVA cytosolic phospholipase A2 via distinct and separate mechanisms. *J Lipid Res* 48, 2701-2708.
- Surya, II, and Akkerman, J. W. (1993). The influence of lipoproteins on blood platelets. *Am Heart J* 125, 272-275.
- Sutherland, J. P., McKinley, B., and Eckel, R. H. (2004). The metabolic syndrome and inflammation. *Metab Syndr Relat Disord* 2, 82-104.
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., *et al.* (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386, 292-296.
- Tames, F. J., Mackness, M. I., Arrol, S., Laing, I., and Durrington, P. N. (1992). Non-enzymatic glycation of apolipoprotein B in the sera of diabetic and non-diabetic subjects. *Atherosclerosis* 93, 237-244.
- Tandon, N. N., Kralisz, U., and Jamieson, G. A. (1989). Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem* 264, 7576-7583.

- Tavit, Y., Sen, N., Yazici, H. U., Hizal, F., Abaci, A., and Cengel, A. (2007). Mean platelet volume in patients with metabolic syndrome and its relationship with coronary artery disease. *Thromb Res* 120, 245-250.
- Teichert, J., and Preiss, R. (2002). High-performance liquid chromatographic assay for alpha-lipoic acid and five of its metabolites in human plasma and urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 769, 269-281.
- Thattaliyath, B., Cykowski, M., and Jagadeeswaran, P. (2005). Young thrombocytes initiate the formation of arterial thrombi in zebrafish. *Blood* 106, 118-124.
- Therasse, J., and Lemonnier, F. (1987). Determination of plasma lipoperoxides by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 413, 237-241.
- Tibbles, L. A., and Woodgett, J. R. (1999). The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* 55, 1230-1254.
- Tohyama, Y., Takano, T., and Yamamura, H. (2004). B cell responses to oxidative stress. *Curr Pharm Des* 10, 835-839.
- Tong, H., Knapp, H. R., and VanRollins, M. (1998). A low temperature flotation method to rapidly isolate lipoproteins from plasma. *J Lipid Res* 39, 1696-1704.
- Tooke, J. E., and Hannemann, M. M. (2000). Adverse endothelial function and the insulin resistance syndrome. *J Intern Med* 247, 425-431.
- Trayhurn, P., and Wood, I. S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92, 347-355.
- Tribble, D. L., Holl, L. G., Wood, P. D., and Krauss, R. M. (1992). Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis* 93, 189-199.
- Tripathy, D., Mohanty, P., Dhindsa, S., Syed, T., Ghanim, H., Aljada, A., and Dandona, P. (2003). Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 52, 2882-2887.
- Tsai, E. C., Hirsch, I. B., Brunzell, J. D., and Chait, A. (1994). Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes* 43, 1010-1014.
- Tschoepe, D., Roesen, P., Kaufmann, L., Schauseil, S., Kehrel, B., Ostermann, H., and Gries, F. A. (1990). Evidence for abnormal platelet glycoprotein expression in diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 20, 166-170.
- Uchida, K., and Stadtman, E. R. (1992). Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4544-4548.
- Uchida, K., Toyokuni, S., Nishikawa, K., Kawakishi, S., Oda, H., Hiai, H., and Stadtman, E. R. (1994). Michael addition-type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: markers for atherosclerosis. *Biochemistry* 33, 12487-12494.
- Udvardy, M., Kaplar, M., Rejto, L., Tornai, I., Palatka, K., Laszlo, P., and Huszka, M. (1998). Increased in vivo platelet activation and reduced intravascular endothelium-derived relaxing factor and nitrate/nitrite production in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Platelets* 9, 257-260.

- UKPDS (1998). Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352, 837-853.
- Urakawa, H., Katsuki, A., Sumida, Y., Gabazza, E. C., Murashima, S., Morioka, K., Maruyama, N., Kitagawa, N., Tanaka, T., Hori, Y., *et al.* (2003). Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 4673-4676.
- Vaduganathan, M., Alviar, C. L., Arian, M. E., Tellez, A., Guthikonda, S., DeLao, T., Granada, J. F., Kleiman, N. S., Ballantyne, C. M., and Lev, E. I. (2008). Platelet reactivity and response to aspirin in subjects with the metabolic syndrome. *Am Heart J* 156, 1002 e1001-1002 e1007.
- Vaidya, D., Yanek, L. R., Faraday, N., Moy, T. F., Becker, L. C., and Becker, D. M. (2009). Native platelet aggregation and response to aspirin in persons with the metabolic syndrome and its components. *Metab Syndr Relat Disord* 7, 289-296.
- Vaidyula, V. R., Boden, G., and Rao, A. K. (2006). Platelet and monocyte activation by hyperglycemia and hyperinsulinemia in healthy subjects. *Platelets* 17, 577-585.
- Valiyaveetil, M., Kar, N., Ashraf, M. Z., Byzova, T. V., Febbraio, M., and Podrez, E. A. (2008). Oxidized high-density lipoprotein inhibits platelet activation and aggregation via scavenger receptor BI. *Blood* 111, 1962-1971.
- Van Guilder, G. P., Hoetzer, G. L., Greiner, J. J., Stauffer, B. L., and Desouza, C. A. (2006). Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity (Silver Spring)* 14, 2127-2131.
- Vance, J. E. (1990). Lipoproteins secreted by cultured rat hepatocytes contain the antioxidant 1-alk-1-enyl-2-acylglycerophosphoethanolamine. *Biochim Biophys Acta* 1045, 128-134.
- Vane, J. R., Bakhle, Y. S., and Botting, R. M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 97-120.
- Verges, B. (2009). Lipid modification in type 2 diabetes: the role of LDL and HDL. *Fundam Clin Pharmacol* 23, 681-685.
- Véricel, E., Januel, C., Carreras, M., Moulin, P., and Lagarde, M. (2004). Diabetic patients without vascular complications display enhanced basal platelet activation and decreased antioxidant status. *Diabetes* 53, 1046-1051.
- Vincent, H. K., Bourguignon, C. M., Weltman, A. L., Vincent, K. R., Barrett, E., Innes, K. E., and Taylor, A. G. (2009). Effects of antioxidant supplementation on insulin sensitivity, endothelial adhesion molecules, and oxidative stress in normal-weight and overweight young adults. *Metabolism* 58, 254-262.
- Volf, I., Moeslinger, T., Cooper, J., Schmid, W., and Koller, E. (1999). Human platelets exclusively bind oxidized low density lipoprotein showing no specificity for acetylated low density lipoprotein. *FEBS Lett* 449, 141-145.
- Wade, C. R., and van Rij, A. M. (1985). In vivo lipid peroxidation in man as measured by the respiratory excretion of ethane, pentane, and other low-molecular-weight hydrocarbons. *Anal Biochem* 150, 1-7.

- Wassink, A. M., Olijhoek, J. K., and Visseren, F. L. (2007). The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. *Eur J Clin Invest* 37, 8-17.
- Watanabe, J., Wohltmann, H. J., Klein, R. L., Colwell, J. A., and Lopes-Virella, M. F. (1988). Enhancement of platelet aggregation by low-density lipoproteins from IDDM patients. *Diabetes* 37, 1652-1657.
- Wen, Y., Sahni, A., Rea, C. A., Zhang, X. H., Khokher, M. A., and Singh, B. M. (2000). Differential antioxidant status among Indo-Asians compared with caucasians with and without diabetes. *Wolverhampton Diabetes Research Group. Diabetes Care* 23, 254-255.
- Westerbacka, J., Yki-Jarvinen, H., Turpeinen, A., Rissanen, A., Vehkavaara, S., Syrjala, M., and Lassila, R. (2002). Inhibition of platelet-collagen interaction: an in vivo action of insulin abolished by insulin resistance in obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 167-172.
- Weyrich, A. S., Schwertz, H., Kraiss, L. W., and Zimmerman, G. A. (2009). Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost* 7, 241-246.
- Wiesner, P., Leidl, K., Boettcher, A., Schmitz, G., and Liebisch, G. (2009). Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* 50, 574-585.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047-1053.
- Wilson, P. W., D'Agostino, R. B., Parise, H., Sullivan, L., and Meigs, J. B. (2005). Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 112, 3066-3072.
- Winocour, P. D., Watala, C., and Kinglough-Rathbone, R. L. (1992). Membrane fluidity is related to the extent of glycation of proteins, but not to alterations in the cholesterol to phospholipid molar ratio in isolated platelet membranes from diabetic and control subjects. *Thromb Haemost* 67, 567-571.
- Wiswedel, I., Hirsch, D., Nourooz-Zadeh, J., Flechsig, A., Luck-Lambrecht, A., and Augustin, W. (2002). Analysis of monohydroxyeicosatetraenoic acids and F2-isoprostanes as markers of lipid peroxidation in rat brain mitochondria. *Free Radic Res* 36, 1-11.
- Witztum, J. L., and Steinberg, D. (1991). Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88, 1785-1792.
- Wurzinger, L. J. (1990). Histophysiology of the circulating platelet. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 120, 1-96.
- Yacoub, D., Theoret, J. F., Villeneuve, L., Abou-Saleh, H., Mourad, W., Allen, B. G., and Merhi, Y. (2006). Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release. *J Biol Chem* 281, 30024-30035.
- Yamagishi, S. I., Edelstein, D., Du, X. L., and Brownlee, M. (2001). Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 50, 1491-1494.

- Yanai, H., Tomono, Y., Ito, K., Furutani, N., Yoshida, H., and Tada, N. (2008). The underlying mechanisms for development of hypertension in the metabolic syndrome. *Nutr J* 7, 10.
- Yang, J., Wu, J., Kowalska, M. A., Dalvi, A., Prevost, N., O'Brien, P. J., Manning, D., Poncz, M., Lucki, I., Blendy, J. A., and Brass, L. F. (2000). Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9984-9989.
- Yngen, M., Norhammar, A., Hjemdahl, P., and Wallen, N. H. (2006). Effects of improved metabolic control on platelet reactivity in patients with type 2 diabetes mellitus following coronary angioplasty. *Diab Vasc Dis Res* 3, 52-56.
- Younis, N., Charlton-Menys, V., Sharma, R., Soran, H., and Durrington, P. N. (2009). Glycation of LDL in non-diabetic people: Small dense LDL is preferentially glycosylated both in vivo and in vitro. *Atherosclerosis* 202, 162-168.
- Zambon, A., Schmidt, I., Beisiegel, U., and Brunzell, J. D. (1996). Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 37, 2394-2404.
- Zhang, L., Cui, Y., Geng, B., Zeng, X., and Tang, C. (2008). 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid activates the L-arginine/nitric oxide pathway in human platelets. *Mol Cell Biochem* 308, 51-56.
- Zhao, F. Q., and Keating, A. F. (2007). Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics* 8, 113-128.
- Zhou, J. F., Yan, X. F., Guo, F. Z., Sun, N. Y., Qian, Z. J., and Ding, D. Y. (2000). Effects of cigarette smoking and smoking cessation on plasma constituents and enzyme activities related to oxidative stress. *Biomed Environ Sci* 13, 44-55.
- Ziboh, V. A., Maruta, H., Lord, J., Cagle, W. D., and Lucky, W. (1979). Increased biosynthesis of thromboxane A2 by diabetic platelets. *Eur J Clin Invest* 9, 223-228.
- Zoeller, R. A., Morand, O. H., and Raetz, C. R. (1988). A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J Biol Chem* 263, 11590-11596.