



HAL
open science

Etude comparative de l'effet des microalgues marines et des huiles d'argan et de poisson sur le métabolisme lipidique et la fonction plaquettaire chez le rat et chez des patients dyslipidémiques : recherche de l'effet antiagrégant et exploration du mécanisme d'action dans le but de prévenir les maladies cardiovasculaires

Adil Haimeur

► **To cite this version:**

Adil Haimeur. Etude comparative de l'effet des microalgues marines et des huiles d'argan et de poisson sur le métabolisme lipidique et la fonction plaquettaire chez le rat et chez des patients dyslipidémiques : recherche de l'effet antiagrégant et exploration du mécanisme d'action dans le but de prévenir les maladies cardiovasculaires. Biologie végétale. Université du Maine; Université Hassan II (Mohammedia, Maroc). Faculté des sciences et techniques, 2014. Français. NNT : 2014LEMA1033 . tel-01295306

HAL Id: tel-01295306

<https://theses.hal.science/tel-01295306>

Submitted on 30 Mar 2016

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

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

Thèse de Doctorat

Adil HAIMEUR

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université du Maine et de l'Université Hassan II de Casablanca
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans et de l'Université Hassan II de Casablanca*

Écoles doctorales : VENAM (Végétal - Environnement - Nutrition - Agroalimentaire - Mer) – Université du Maine
STI & 2D (Sciences, Techniques et Développement Durable) – Université Hassan II de Casablanca

Discipline : BIOLOGIE

Spécialité : *Biologie des organismes*
Biochimie

Unité de recherche : **Laboratoire MMS** (Mer, Molécules, Santé), EA 2160)
Laboratoire Virologie, Microbiologie, Qualité, Ecotoxicologie et Biodiversité

Soutenu le : 22/11/2014

Etude comparative de l'effet des microalgues marines et des huiles d'argan et de poisson sur le métabolisme lipidique et la fonction plaquettaire chez le rat et chez des patients dyslipidémiques : recherche de l'effet antiagrégant et exploration du mécanisme d'action dans le but de prévenir les maladies cardiovasculaires

JURY

Rapporteurs :	Bernadette DELPLANQUE , CRI-HDR, Université Paris Sud (France) Hassane MEKHF I, Professeur, Université Mohamed Premier, Oujda (Maroc) Ahmed ADLOUNI , Professeur, Université Hassan II de Casablanca (Maroc)
Examinateur :	Hafida MESSAOURI , Maître de conférence HDR, Université Hassan II de Casablanca (Maroc)
Directeur de Thèse :	Gérard TREMBLIN , Professeur émérite, Université du Maine (France)
Co-directeur de Thèse :	Nadia MESKINI , Professeur, Université Hassan II de Casablanca (Maroc)
Co-encadrants :	Virginie MIMOUNI , Maître de conférence, Université du Maine (France) Lionel ULMANN , Maître de conférence, Université du Maine (France)

Remerciements

Après quatre années d'efforts, d'enthousiasme, de surprises bonnes ou mauvaises, je tiens tout particulièrement à remercier l'ensemble des personnes qui ont eu une influence, un rôle majeur dans la réalisation de ce projet de thèse, et tous ceux qui m'ont soutenu dans les moments difficiles. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury et les remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Madame **Bernadette Delplanque**, Professeur à l'Université Paris-Sud 11, Centre de Neurosciences Paris-Sud, France a accepté d'être rapporteur de ce travail en tant que spécialiste en nutrition et en métabolisme des lipides. Qu'elle soit assurée de mes remerciements et de ma très sincère reconnaissance.

Monsieur **Hassan Mekhfi**, Professeur à l'Université Mohammed Premier, Oujda, Maroc a bien voulu donner sur cette thèse l'avis d'un spécialiste de la fonction plaquettaire, en acceptant d'être rapporteur de ce travail. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements.

Monsieur **Ahmed Adlouni**, Professeur à l'Université Hassan 2, Casablanca-Maroc, spécialiste de l'athérosclérose et maladies cardiovasculaires a accepté de juger ce travail. Je le remercie de l'intérêt qu'il a bien voulu y porter.

Madame **Nadia Meskini**, Professeur à l'Université Hassan 2, Mohammedia-Maroc qui m'a proposé ce sujet de thèse et a assuré la diriger ce travail. Il m'est très agréable de la remercier pour ses qualités humaines, morales et scientifiques, ainsi que pour sa confiance qui n'a fait que se renforcer au cours des ans. Ses conseils, son soutien et sa disponibilité m'ont été d'une aide cruciale. Qu'elle soit assurée de mes remerciements et de ma plus profonde gratitude.

Monsieur **Gérard Tremblin**, Professeur à l'Université du Maine, qui a dirigé ce travail. Je le remercie de m'avoir accueilli au sein de l'équipe, Ecophysiologie et Métabolisme des Microalgues, EA 2160 « Mer, Molécules, Santé », où une partie de ce travail a été réalisée. Ses conseils scientifiques m'ont été très bénéfiques. Sa disponibilité et surtout sa patience ont été des éléments essentiels au bon déroulement de ce travail.

Madame **Virginie Mimouni** et Monsieur **Lionel Ulmann**, Maîtres de conférences à l'Université du Maine, ont co-dirigé cette thèse. Je tiens à les remercier pour leurs qualités humaines, et scientifiques, ainsi que pour leur soutien et leur disponibilité permanente qui m'ont été d'une aide crucial pour le bon déroulement de ce travail. Qu'ils soient tous les deux assurés de mes remerciements et de ma plus profonde gratitude.

Je tiens à remercier également Madame **Hafida Messaouri**, Professeur à l'Université Hassan 2 Mohammedia-Maroc pour ses conseils scientifiques pour la valorisation de la partie histologique dans ce travail.

Je pense également à tous mes collègues du **département Génie Biologique de l'IUT de Laval**, avec qui j'ai partagé travail, pause-café, repas, etc. Leurs expériences et conseils avisés m'ont été d'une aide précieuse tant dans mon activité d'enseignement que de recherche. Toujours disponibles et de bonne humeur, je leur fais part de ma plus sincère amitié.

Sommaire

Résumé

Avant-propos

Liste des tableaux et figures

Introduction générale

I- Rappels bibliographiques

1. Généralités sur les lipides.....	12
1.1. Les acides gras.....	13
1.1.1. Généralités sur les acides gras polyinsaturés.....	13
1.2. Principales voies métaboliques des acides gras polyinsaturés.....	15
1.2.1. Catabolisme oxydatif des acides gras polyinsaturés.....	15
1.2.2. Biosynthèse des AGPI à longue chaîne.....	17
1.2.3. Conversion des AGPI en médiateurs oxygénés actifs.....	19
1.3. Données de consommation en acides gras polyinsaturés.....	20
1.4. Mécanismes d'action des acides gras polyinsaturés.....	21
1.4.1. Les AGPI : précurseurs de médiateurs bioactifs.....	21
2. Les plaquettes sanguines.....	23
2.1. Origine et structure.....	23
2.1.1. Membranes.....	24
2.1.2. Cytoplasme.....	24
2.2. Signalisation plaquettaire.....	25
2.2.1. Agonistes de l'agrégation plaquettaire.....	27
2.2.2. Antagonistes.....	29
2.3. Activation plaquettaire.....	30

2.3.1. Changement de la forme.....	30
2.3.2. Sécrétion.....	30
2.3.3. Agrégation.....	30
2.3.4. La cascade de l'acide arachidonique.....	31
2.3.4.1. Libération de l'acide arachidonique.....	31
2.3.4.2. Voie de la cycloxygénase.....	31
2.3.4.3. Voie de la lipoxygénase.....	34
2.3.4.4. Voie des époxygénases ou cytochrome P450.....	36
2.4. Implication des plaquettes dans les maladies cardiovasculaires.....	36
2.4.1. Plaquettes et athérosclérose.....	36
2.4.2. Plaquettes et diabète.....	37
2.4.3. Plaquettes et stress oxydant.....	38
3. Le stress oxydant.....	41
3.1. Notion des radicaux libres.....	41
3.2. Production des radicaux libres.....	42
3.3. Rôle physiologique des espèces réactives.....	43
3.4. Les cibles des dérivés actifs du dioxygène.....	43
3.4.1. Les cibles lipidiques.....	43
3.4.1.1. La peroxydation non enzymatique.....	43
3.4.1.2. La peroxydation enzymatique.....	44
3.4.2. Les cibles non lipidiques.....	44
3.5. Le rôle du stress oxydatif dans le développement des maladies cardiovasculaires.....	45
3.6. Le système de défense antioxydant	45

3.6.1. Les antioxydants enzymatiques.....	46
3.6.1.1. Les superoxyde dismutases (SOD)	46
3.6.1.2. La catalase.....	46
3.6.1.3. Les Glutathion peroxydase.....	47
3.6.2. Les molécules antioxydantes.....	47
3.6.2.1. Antioxydants liposoluble.....	48
3.6.2.2. Les antioxydants hydrosolubles.....	48
4. Le syndrome métabolique.....	50
4.1. Définition.....	50
4.2. Epidémiologie du syndrome métabolique.....	51
4.3. Physiopathologie du syndrome métabolique.....	52
4.3.1. Syndrome métabolique et la résistance à l'insuline.....	52
4.3.2. Syndrome métabolique et dyslipidémies.....	54
4.3.3. syndrome métabolique et l'hypertension artérielle.....	56
4.3.4. Syndrome métabolique et stress oxydant.....	56
4.3.5. Syndrome métabolique et inflammation.....	57
4.3.6. Syndrome métabolique et stéatose hépatique.....	58
4.3.7. Syndrome métabolique et hyperactivité plaquettaire.....	59
4.4. Le rôle de l'alimentation comme facteur déterminant dans le développement du syndrome métabolique.....	60
4.4.1. Le rôle d'un régime riche en lipides sur l'installation du syndrome métabolique.....	60
4.4.2. Le rôle d'un régime riche en sucre dans l'installation du syndrome métabolique.....	66
4.5. Approche nutritionnelle dans la prévention et le traitement du syndrome métabolique.....	68
4.5.1. Oméga 3 et 6 : nutrition et syndrome métabolique.....	69

4.5.1.1.	Sources alimentaires d'acides gras oméga 3.....	70
4.5.1.2.	Effet de la consommation des huiles de poisson, comme source d'EPA et de DHA sur les composantes du syndrome métabolique.....	70
4.5.2.	Les microalgues marines: une source potentielle d'oméga 3.....	72
4.5.2.1.	Généralités sur les microalgues.....	72
4.5.2.2.	Intérêt des lipides des microalgues.....	73
4.5.2.2.1.	Généralités.....	73
4.5.2.2.2.	Nutrition animale et humaine.....	75
4.5.3.	L'huile d'argan comme source d'AGPI n-6.....	76
4.5.3.1.	Rôle nutritionnel de l'huile d'argan.....	78
4.6.	Model d'étude du syndrome métabolique.....	79

II- Matériel et methodes

1.	Matériel.....	81
1.1.	Réactifs.....	81
1.2.	Appareils.....	81
2.	Méthodes.....	82
2.1.	Expériences animales.....	82
2.1.1.	Animaux.....	8
	2	
2.1.2.	Régimes.....	83
2.1.2.1.	Expérience 1.....	83
2.1.2.2.	Expérience 2.....	84
2.1.2.3.	Expérience 3.....	85
2.1.2.4.	Expérience 4.....	86
2.1.2.5.	Manipulation sur l'animal.....	87

2.2. Etude clinique sur l'effet de l'huile d'argan sur le bilan lipidique, la fonction des plaquettes et leur état rédox chez des patients dyslipidémiques.....	87
2.2.1. Les patients.....	87
2.2.2. Protocole de l'étude clinique.....	88
2.2.3. Prélèvements sanguins.....	89
2.2.4. Isolement des plaquettes sanguines.....	89
2.2.4.1. Chez le rat.....	89
2.2.4.2. Chez l'homme.....	90
2.2.5. Numération plaquettaire.....	90
2.2.6. Mesure de l'agrégation plaquettaire.....	91
2.2.6.1. Principe.....	91
2.2.6.2. Test d'agrégation plaquettaire chez le rat.....	91
2.2.6.3. Test d'agrégation plaquettaire chez l'homme.....	91
2.2.7. Dosage du thromboxane B ₂	92
2.2.8. Analyse de la composition lipidique.....	93
2.2.8.1. Extraction des lipides totaux.....	93
2.2.8.2. Séparation des classes lipidiques.....	94
2.2.8.3. Dérivation des acides gras en esters méthyliques d'acides gras.....	95
2.2.8.4. Analyse de la composition en acides gras des phospholipides des plaquettes..	96
2.2.8.5. Analyse des esters méthyliques d'acide gras par CPG.....	97
2.2.9. Dosage des paramètres biochimiques.....	98
2.2.9.1. Dosage des paramètres lipidiques et de la glycémie chez le rat.....	98
2.2.9.2. Dosage du cholestérol total et des TG hépatiques chez le rat.....	99
2.2.9.3. Dosage de l'insuline plasmatique chez le rat.....	99
2.2.9.4. Détermination du bilan lipidique chez l'homme.....	99
2.2.10. Dosage des marqueurs du stress oxydatif.....	100

2.2.10.1.	Dosage du MDA.....	100
2.2.10.2.	Mesure de l'activité enzymatique de GPx.....	101
2.2.11.	Dosage des protéines.....	103
2.2.12.	Etude histologique du foie et du tissu adipeux.....	103
2.2.12.1.	Préparation des échantillons.....	103
2.2.12.2.	Coloration histologique.....	104
2.3.	Analyse statistique des données.....	104

III- Résultats

1.	Effet-dose d' <i>Odontella aurita</i> sur certains paramètres biochimiques et sur l'enrichissement des phospholipides plasmatiques et hépatiques en n-3 AGPI.....	105
2.	The role of <i>Odontella aurita</i> , a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats.....	115
3.	A comparative study on the effect of two omega-3 rich food supplements (fish oil and <i>Odontella aurita</i>) on some risk factors for metabolic syndrome in high-fat fed rats.....	130
4.	A comparative study on the effect of argan oil vs fish oil on some risk factors for metabolic syndrome in high-fat fed rats.....	169
5.	Argan oil prevents prothrombotic complications by lowering lipid levels and platelet aggregation, enhancing oxidative status in dyslipidemic patients from the area of Rabat (Morocco).....	206

IV-	Conclusion générale et perspectives.....	217
------------	---	------------

V-	Références bibliographiques.....	221
-----------	---	------------

Liste des figures et tableaux

Les figures

Figure 1 : Réaction d'estérification.....	12
Figure 2 : Représentation schématique de certains acides gras polyinsaturés naturels de la série n-3 et n-6.....	13
Figure 3 : Catabolisme oxydatif des acides gras dans la mitochondrie.....	16
Figure 4 : Schéma général des voies de synthèse des AGPI-LC des séries n-7, n-9, n-6, et n-3.....	18
Figure 5 : Voies d'oxydation enzymatique de l'acide arachidonique	19
Figure 6 : Morphologie des plaquettes sanguines humaines.....	23
Figure 7 : Récepteurs et voies de signalisation impliquées dans l'activation plaquettaire.....	26
Figure 8 : Etapes de l'activation plaquettaire.....	31
Figure 9 : Cascade du métabolisme de l'acide arachidonique par la voie de la cyclooxygénase.....	33
Figure 10 : Cascade du métabolisme de l'acide arachidonique par la voie de la 12-lipoxygénase.....	35
Figure 11 : Principales anomalies lipidiques au cours du diabète de type 2.....	55
Figure 12 : Stress oxydant et insulino-résistance, les bases moléculaires impliquées.....	57
Figure 13 : Mécanisme hypothétique de l'interaction entre insulino-résistance du tissu adipeux et développement de la stéatose hépatique.....	59
Figure 14: Conséquence de la surproduction des ROS lors de la consommation d'un régime hyperlipidique.....	65
Figure 15 : L'arganier.....	77
Figure 16 : Fruit de L'arganier.....	77
Figure 17: protocole expérimentale de l'étude clinique.....	88
Figure 18: Différentes étapes de l'isolement des plaquettes chez le rat.....	89
Figure 19: schéma récapitulatif du dosage de TXB 2	92
Figure 20: réaction de saponification et de méthylation des acides gras.....	95

Figure 21: schéma du principe de la chromatographie en phase gazeuse.....	98
Figure 22: réaction du MDA avec l'acide thiobarbiturique.....	100
Figure 23: principe du dosage de l'activité enzymatique de GPx.....	101
Figure 24 : Effet de différentes doses de <i>Odontella aurita</i> supplémentées à un régime standard sur le poids corporel des rats durant les 7 semaines de régime.....	106
Figure 25 : Effet de différentes doses de <i>Odontella aurita</i> supplémentées à un régime standard sur la prise alimentaire journalière des rats durant les 7 semaines de régime.....	107

Les tableaux

Tableau I : Nomenclature usuel et systématique des principaux acides gras naturels.....	14
Tableau II : Principaux récepteurs couplés aux protéines G exprimés à la surface des plaquettes impliqués dans l'activation ou l'inhibition des fonctions plaquettaires.....	29
Tableau III: Définitions du syndrome métabolique.....	50
Tableau IV : Classification des principales classes de microorganismes photosynthétiques.....	73
Tableau V : Composition en acides gras (% des acides gras totaux) de quelques espèces de microalgues.....	74
Tableau VI: Composition détaillée des différents régimes testés au cours de l'expérience	
1.....	84
Tableau VII : Composition détaillée des différents régimes testés au cours de l'expérience	
2.....	85
Tableau VIII : Composition détaillée des différents régimes testés au cours de l'expérience	
3.....	86
Tableau IIX : Effet de différentes doses de <i>O. aurita</i> supplémentées à un régime standard sur le poids des organes après 7 semaines de régime.....	108
Tableau IX : Effet de différentes doses de <i>O. aurita</i> supplémentées à un régime standard sur les taux de glucoses, de triglycérides et du cholestérol total plasmatiques après 7 semaines de régime.....	109
Tableau X : Effet de différentes doses de <i>O. aurita</i> supplémentées à un régime standard sur la composition en acides gras des lipides plasmatiques après 7 semaines de régime (en % molaire).....	112

Tableau IX : Effet de différentes doses de *O. aurita* supplémentées à un régime standard sur la composition en acides gras des lipides hépatiques après 7 semaines de régime (en % molaire).....113

Avant-propos

Le travail présenté dans ce mémoire a fait l'objet de publications parues et sous presse. Ces résultats ont également été présentés par communications affichées ou orales lors de congrès scientifiques. En voici les références :

Articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture :

Haimeur A., Ulmann L., Mimouni V., Guéno F., Pineau-Vincent F., Meskini N., Tremblin G. The role of *Odontella aurita*, a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats. *Lipids Health Dis.*, 2012, 11:147.

Haimeur A., Messaouri H., Ulmann L., Mimouni V., Masrar A., Chraïbi A., Tremblin G., Meskini N. Argan oil prevents prothrombotic complications by lowering lipid levels, preventing platelet aggregation, and enhancing oxidative status in Moroccan dyslipidemic patients. *Lipids Health Dis.*, 2013, 12:107.

Articles soumis à des revues internationales à comité de lecture :

Haimeur A., Mimouni V., Ulmann L., Martineau A.S., Mesaouri H., Pineau-Vincent F., Tremblin G., Meskini N. A comparative study on the effect of two omega-3 rich food supplements (fish oil and *Odontella aurita*) on some risk factors for metabolic syndrome in high-fat fed rats. 2014.

Haimeur A., Ulmann L., Mimouni V., Mesaouri H., Abouakil N., Tremblin G., Meskini N. A comparative study on the effect of argan oil vs fish oil on some risk factors for metabolic syndrome in high-fat fed rats. 2014

Communications orales dans des congrès internationaux :

Haimeur A., Mimouni V., Ulmann L., Meskini N., Tremblin G. Etude comparative des effets des oméga-3 présents dans un lyophilisat d'*Odontella aurita* et dans de l'huile de poisson sur l'agrégation plaquettaire et certains paramètres biochimiques liés au syndrome métabolique

chez des rats dyslipidémiques. 6^{èmes} JIEL (Journées Internationales d'Etudes sur les Lipides) - 5-7 décembre 2013- Casablanca (Maroc).

Haimeur A., Messaouri H., Ulmann L., Mimouni V., Masrar A., Chraïbi A., Tremblin G., Meskini N. Effet hypolipémiant et antiagrégant de l'huile d'argan chez des patients dyslipidémiques. 6^{èmes} JIEL (Journées Internationales d'Etudes sur les Lipides) - 5-7 décembre 2013- Casablanca (Maroc).

Masmoudi S., **Haimeur A.**, Caruso A., Ulmann L., Ayadi H., Meskini N., Schoefs B., Tremblin G., Morant-Manceau A., Les microalgues comme source de lipides, d'oméga 3 et de pigments. 1^{ères} Journées Internationales Phototrophes Aquatiques et Biotechnologie - 1-2 Avril 2012- Sousse (Tunisie).

Haimeur A., Mimouni V., Ulmann L., Meskini N., Tremblin G., Effet d'une supplémentation en *Odontella aurita*, microalgue marine riche en EPA sur l'agrégation plaquettaire et certains paramètres biochimiques chez des rats soumis à un régime hyperlipidique. 5^{èmes} JIEL (Journées Internationales d'Etudes sur les Lipides) - 8-10 décembre 2011- Casablanca (Maroc).

Communications affichées dans des congrès internationaux :

Haimeur A., Martineau A-S., Ulmann L., Mimouni V., Meskini N., Tremblin G., Comparative effects of microalgae, *Odontella aurita*, and fish oil on risk factors of metabolic syndrome in high fat-fed rats. 9th GERLI Lipidomics Meeting - 17-19 octobre 2012- Paris (France). **Prix du meilleur Poster.**

Haimeur A., Meskini N., Messaouri H., Abouakil N., Masrar A., Chraïbi A., Mimouni V., Ulmann L., Tremblin G., Hypolipidemic and platelet antiaggregation effects of Argan oil in Moroccan dyslipidemic patients. 10th Euro Fed Lipid Congress - 23-26 septembre 2012- Cracovie (Pologne).

Haimeur A., Meskini N., Mimouni V., Ulmann L., Tremblin G., Benefits of Moroccan argan oil on platelet aggregability and dyslipidemia in high fat diet fed rats. 10th Euro Fed Lipid Congress - 23-26 septembre 2012- Cracovie (Pologne).

Haimeur A., Ulmann L., Mimouni V., Braud G., Guéno F., Meskini N., Tremblin G., Effects of different doses of *Odontella aurita*, a marine diatom rich in EPA, administered as a dietary supplement, on biochemical markers linked to lipid metabolism in male Wistar rats. *4th International Symposium Health Molecules & Ingredients* - 25-26 mai 2011- Quimper (France).

Haimeur A., Effet d'un lyophilisat d'*Odontella aurita* sur l'hyperagrégabilité plaquettaire et les paramètres sériques impliqués dans le syndrome métabolique chez des rats nourris avec un régime hyperlipidique. *Journées de l'ED VENAM 20* - 21 octobre 2011- Angers (France).

Résumé

Certains facteurs de risque, comme l'hyperlipidémie, l'hyper-agrégabilité des plaquettes sanguines et le stress oxydant favorisent la progression des maladies cardiovasculaires. L'objectif de ce travail est de comparer les effets des AGPI-LC issus de sources différentes (microalgue marine, huile d'argan et de poisson) sur l'installation du syndrome métabolique chez des rats soumis à un régime hyperlipidique. Les effets de l'huile d'argan sur la fonction plaquettaire et sur le bilan lipidique ont aussi été testés chez des patients dyslipidémiques. Une étude préliminaire a été réalisée afin de rechercher la dose minimale de la microalgue (*Odontella aurita*) à incorporer dans le régime pour obtenir un effet positif sur les différents paramètres mesurés. Nous avons ensuite étudié l'effet du lyophilisat d'*O. aurita* sur les facteurs de risque cardiovasculaire induits par un régime hyperlipidique chez le rat. Les résultats ont montré, que l'apport d'*O. aurita* induit une diminution de la glycémie et des teneurs en lipides plasmatiques ainsi qu'une réduction de l'agrégation plaquettaire. Nous avons ensuite comparé les effets de cette microalgue avec l'huile de poisson. Pour cela une étude nutritionnelle a été réalisée chez des rats soumis à un régime hyperlipidique (HF) supplémenté ou non avec du lyophilisat d'*O. aurita* (HFOA) ou de l'huile de poisson (HFFO). La supplémentation en lyophilisat d'*O. aurita* et en huile de poisson diminue l'agrégation plaquettaire et le stress oxydatif.

Nous avons par la suite comparé les effets de l'huile de poisson riche en oméga-3, et de l'huile d'argan riche en oméga-6 et oméga-9. Nos résultats montrent que les 2 sources diminuent l'agrégation plaquettaire et les facteurs de risque du syndrome métabolique mais leur mécanisme d'action semble être différent.

Nous avons par ailleurs sur l'huile d'argan, réalisé au Maroc une étude clinique pour rechercher l'effet antiagrégant et hypolipémiant chez des patients dyslipidémiques. Les résultats obtenus montrent une amélioration significative des lipides athérogènes chez les patients consommant de l'huile d'argan. Cette amélioration consiste en une baisse très significative des taux de cholestérol total et de LDL-cholestérol sériques auxquels s'ajoutent une diminution de l'agrégation plaquettaire et du stress oxydatif chez les patients consommant de l'huile d'argan.

Mots clés : agrégation plaquettaire, *Odontella aurita*, huile de poisson, huile d'argan, syndrome métabolique.

Abstract

Some risk factors, such as hyperlipidemia, hyperaggregability of blood platelets and oxidative stress promotes the progression of cardiovascular disease. The objective of this study was to compare the effects of LC-PUFA from different sources (marine microalgae, argan oil and fish oil) on installing the metabolic syndrome in rats fed high fat diet. The effects of argan oil on platelet function and lipid profiles were also tested in dyslipidemic patients. A preliminary study was conducted to find the minimum dose of microalgae (*Odontella aurita*) to be incorporated in the diet for a positive effect on the different parameters measured. We then studied the effect of lyophilized *O. aurita* on cardiovascular risk factors induced by a high fat diet in rats. The results showed that the addition of *O. aurita* induces a reduction in blood glucose and plasma lipid levels and a reduction in platelet aggregation. We then compare the effects of microalgae with fish oil. For this, a nutritional study was conducted in rats subjected to a high fat diet (HF) supplemented or not with the freeze-dried *O. aurita* (HFOA) or fish oil (HFFO). Supplementation lyophilized *O. aurita* and fish oil decreases platelet aggregation and oxidative stress.

We subsequently compared the effects of fish oil rich in omega-3, and argan oil which is rich in omega-6 and omega-9. Our results show that 2 sources of LC-PUFA decrease platelet aggregation and the risk factors of metabolic syndrome, but their mechanism of action appears to be different.

We have also conducted a clinical study in Morocco to investigate the antiplatelet and lipid-lowering effect of argan oil in patients with dyslipidemia. The results show a significant improvement in atherogenic lipids in patients consuming argan oil for 3 weeks. This improvement consists in a very significant reduction in total cholesterol and serum LDL cholesterol, with a decreased platelet aggregation and oxidative stress in patients consuming argan oil.

Keywords: platelet aggregation, *Odontella aurita*, fish oil, argan oil, metabolic syndrome.

Introduction

Introduction

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde sans doute en raison d'une augmentation de la prévalence des différents facteurs de risque cardiovasculaires tels que l'obésité abdominale, l'insulino-résistance, la dyslipidémie, l'hypertension artérielle et l'hyperactivité plaquettaire conduisant à la thrombose. L'association de ces facteurs de risque chez un même individu a fait émerger le concept de syndrome métabolique. Ce syndrome est associé à un risque accru de diabète et de maladies cardiovasculaires.

Le syndrome métabolique est un désordre complexe et multifactoriel dont l'origine est due à l'interaction entre facteurs génétiques et environnementaux. L'obésité abdominale et l'insulino-résistance font partie intégrante des mécanismes incriminés dans la genèse et l'évolution du syndrome métabolique vers les complications cardiovasculaires et le diabète de type 2. L'obésité abdominale semble être l'hypothèse la plus retenue puisqu'elle apparaît selon plusieurs études comme l'élément central du syndrome métabolique et comme la meilleure prédictrice de la dégradation d'un ou plusieurs autres composants du syndrome métabolique (Maison *et al.*, 2001; Palaniappan *et al.*, 2004 ; Hillier *et al.*, 2006).

Les modifications progressives du mode de vie favorisant la sédentarité et les excès caloriques, notamment la consommation d'aliments riches en graisses et en glucides, se traduisent par une progression épidémique du syndrome métabolique, en particulier dans les pays occidentaux. Les déséquilibres nutritionnels liés à une surcharge en acides gras saturés sont de plus en plus fréquemment observés dans notre société et plusieurs études suggèrent un rôle du gras saturé dans l'émergence du syndrome métabolique. Ces déséquilibres conduisent à des dérèglements du métabolisme aboutissant à l'obésité, à la dyslipidémie et au diabète de type 2. Ces maladies métaboliques constituent un réel problème de santé publique du fait de leur prévalence, dont l'augmentation dans les pays développés et en voie de développement, entraîne un accroissement du coût de prise en charge. De plus, la multitude des complications associées à ces pathologies en font également une maladie à morbidité très élevée. Ainsi, les facteurs environnementaux liés à l'hygiène de vie sont actuellement considérés comme un déterminant majeur et sociétal de la genèse de la prise pondérale, de l'insulino-résistance et de la dyslipidémie. La mise en place de mesures préventives et thérapeutiques efficaces représente donc un enjeu incontournable en termes de santé publique. En complément des

modifications de l'hygiène de vie, il paraît donc indispensable d'identifier de nouvelles cibles moléculaires capables d'inhiber ou de limiter la progression du syndrome métabolique.

De nombreuses études ont montré l'effet protecteur d'une alimentation riche en acides gras polyinsaturés de la série oméga 3 contre certains facteurs de risque du syndrome métabolique telles que l'hyperlipidémie, l'obésité, le diabète et l'hyper-agrégation plaquettaire (Dyerberg *et al.*, 1982; Sakai *et al.*, 1990, Din *et al.*, 2004 et 2008). Les deux principaux acides gras qui caractérisent les huiles d'origine marine, l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3), possèdent de nombreux effets biologiques. Ils sont connus pour avoir une influence sur le métabolisme des lipoprotéines, la fonction plaquettaire et endothéliale, la coagulation du sang, et la tension artérielle. L'EPA remplit aussi de nombreuses fonctions vis-à-vis des membranes biologiques et sert de précurseur à la synthèse de plusieurs messagers régulateurs du métabolisme cellulaire. De plus, les effets des acides gras n-3 peuvent être associés, dans une certaine mesure, à la présence de troubles sous-jacents tels que la dyslipidémie, l'hypertension, le diabète, et les maladies cardiovasculaires (Rousseau *et al.*, 2003). Chez les animaux et les humains, la supplémentation en acides gras n-3 du régime alimentaire se traduit par l'augmentation substantielle des teneurs en EPA et en DHA dans le plasma et les organes; et par la variabilité de leur incorporation dans les classes de phospholipides. Ces variations peuvent donc jouer un rôle important vis-à-vis du métabolisme de l'EPA et du DHA, et de leur utilisation ultérieure par l'organisme. En raison de la prédominance de l'EPA dans les huiles de poisson, la plupart des études ont mis l'accent sur leur utilisation dans la prévention des maladies cardiovasculaires.

Après avoir montré leur effet bénéfique contre les maladies cardiovasculaires, la demande en oméga-3 sous forme de compléments alimentaires ne cesse d'augmenter. Dans l'agro-alimentaire, les huiles de poissons constituent la principale source commerciale d'oméga-3. Cependant, l'accumulation de polluants, les problèmes d'odeur, et la diminution des ressources halieutiques obligent les chercheurs à développer d'autres sources de production d'huiles riches en oméga-3. De par leur diversité taxinomique et biochimique, les microalgues représentent une source potentiellement intéressante de composés ayant des applications dans les domaines de l'alimentation et la santé. Elles sont particulièrement connues pour leurs teneurs élevées en acides gras n-3 (EPA et/ou DHA) et constituent donc une alternative possible aux huiles de poissons.

De par leur richesse en acides gras oméga-3 et d'autres molécules bioactives, les microalgues marines sont largement utilisées en nutrition sous forme de compléments alimentaires. En France, la seule microalgue marine commercialisée pour sa richesse en acides gras n-3 (EPA et DHA), et utilisée comme complément alimentaire est *Odontella aurita*. Récemment, Moreau *et al.* (2006) ont montré que cette microalgue avait des effets anti-prolifératifs sur des lignées de cellules broncho-pulmonaires et épithéliales cancéreuses. À notre connaissance, aucune étude nutritionnelle n'a encore été menée avec cette espèce. Dans ce contexte, la question est de savoir si les acides gras oméga-3 (en particulier l'EPA et le DHA) issus des microalgues ont les mêmes effets bénéfiques sur la santé que ceux obtenus à partir des huiles de poisson.

Des études antérieures ont montré que les coûts de production d'acides gras n-3 issus des microalgues sont moins élevés que ceux obtenus dans le cas du poisson (Molina Grima *et al.*, 2003). De plus, par opposition aux huiles de poisson, les extraits d'acides gras n-3 de microalgues n'ont pas d'odeur, ne sont pas susceptibles d'être contaminés par les métaux lourds et ne contiennent pas de cholestérol. Enfin, au Laboratoire, notre équipe avait montré que lorsque les microalgues sont cultivées dans des conditions contrôlées de température, d'éclairage, de disponibilité des éléments nutritifs, puis récoltées au même stade de développement (âge de la culture, phase de croissance), aucune variation saisonnière n'est observée sur leur composition en acides gras (Guihneuf, 2008).

L'objectif principal de notre travail a été de déterminer, chez le rat sain et présentant des facteurs de risque du syndrome métabolique, l'effet d'une consommation d'un lyophilisat d'*O. aurita* sur la fonction plaquettaire et sur certains facteurs de risque du syndrome métabolique induit par un régime hyperlipidique. A titre de comparaison, nous avons également étudié les effets de l'huile de poisson, riche en oméga-3 et de l'huile d'argan, riche en acide oléique et en acide linoléique et dépourvue d'acide gras oméga-3. En revanche, la fraction insaponifiable de l'huile d'argan est composée de tocophérols, stérols, polyphénols, carotènes et autres composés connus pour leurs propriétés antioxydantes. Cette composition particulière confère à l'huile d'argan des propriétés thérapeutiques en matière de prévention et de traitement des maladies cardiovasculaires et de l'athérosclérose. En effet, plusieurs études ont mis en évidence ses effets hypolipidémiant, hypocholestérolémiant et antioxydant (Berrougui *et al.*, 2003 et 2004 ; Drissi *et al.*, 2004 ; Berrougui *et al.*, 2005 ; Derouiche *et al.*, 2005). Une étude clinique récente réalisée par Mohamedou yezid *et al.* (2011) a montré que la

consommation journalière d'huile d'argan, à raison de 15 g/jour, diminue le cholestérol-LDL plasmatique ainsi que la susceptibilité des LDL à la peroxydation, par rapport à des sujets témoins non consommateurs.

Dans une première partie ce mémoire comporte une synthèse bibliographique présentant les données nécessaires à la compréhension du travail. Elle comporte quatre chapitres. Le premier est consacré à la structure chimique et les fonctions biochimiques des lipides. Le deuxième chapitre fait l'état des connaissances actuelles sur les plaquettes sanguines et leur rôle dans le développement de l'athérosclérose. Le troisième chapitre est consacré au stress oxydatif et aux systèmes anti-oxydants naturels. Finalement, le quatrième chapitre présente un état des travaux concernant le rôle des acides gras polyinsaturés oméga-3 et de l'huile d'argan dans la prévention des facteurs de risque du syndrome métabolique.

Dans une deuxième partie, nous avons réalisé une étude préliminaire afin de rechercher les effets d'un régime standard supplémenté avec différentes doses de lyophilisat de la microalgue *Odontella aurita*, riche en acides gras polyinsaturés de la série oméga-3, sur certains paramètres biochimiques plasmatiques et tissulaires associés au syndrome métabolique chez des rats Wistar.

Dans une troisième partie nous avons étudié l'effet du lyophilisat d'*O.aurita* apporté à la dose minimale efficace (3 %) choisie dans l'étude préliminaire, sur la fonction plaquettaire et les facteurs de risque cardiovasculaire induits par un régime hyperlipidique chez le rat Wistar.

La quatrième partie est consacrée à comparer les effets biologiques observés d'*O. aurita* avec ceux de l'huile de poisson sur la fonction plaquettaire et les facteurs de risque cardiovasculaire induits par un régime hyperlipidique chez le rat Wistar. Vu la différence de la forme des deux compléments alimentaires (la microalgue en poudre et l'huile de poisson), nous avons fixé le taux d'EPA, l'acide gras majoritaire de la microalgue, apporté par les deux compléments alimentaires pour pouvoir comparer les effets biologiques des deux compléments.

Dans une cinquième partie, Nous avons comparé les effets de l'huile de poisson, comme une source animale d'AGPI-LC oméga-3, et de l'huile d'argan qui présente une source végétale riche en AGPI-LC oméga-6, sur la fonction plaquettaire et certains facteurs de risque

cardiovasculaire. Pour cela une étude nutritionnelle a été réalisée chez des rats Wistar soumis à un régime hyperlipidique supplémenté ou non avec soit de l'huile d'argan soit avec de l'huile de poisson.

Sur un plan plus appliqué, une sixième et dernière partie consiste en une étude clinique réalisée pour mettre en évidence l'intérêt nutritionnel de l'huile d'argan dans la prévention de la dyslipidémie et l'hyper-activité plaquettaire chez des patients ayant un taux de lipides athérogènes circulants élevé.

Rappels bibliographiques

1. Généralités sur les lipides

Les lipides représentent une famille hétérogène de molécules organiques insolubles dans l'eau et dans les solvants polaires et solubles dans les solvants apolaires tels que le chloroforme ou l'éther. Leur fonction biologique est diverse tout comme leur structure chimique. Les lipides sont présents dans l'alimentation animale et humaine sous deux formes principales : les glycérides (qui représentent plus de 95 % des lipides alimentaires) et les phospholipides. Les glycérides ou acylglycérols font partie de la classe des lipides simples (tout comme les esters de stérols et les cires). Ils sont obtenus par estérification d'un glycérol HOCH₂-CHOH-CH₂OH par des acides gras R-COOH linéaires à longue chaîne. Les acylglycérols sont appelées des mono, di ou triacylglycérols (MAG, DAG, TAG, respectivement) selon que l'estérification porte sur 1,2 ou 3 groupes hydroxyles du glycérol (**Figure 1**).

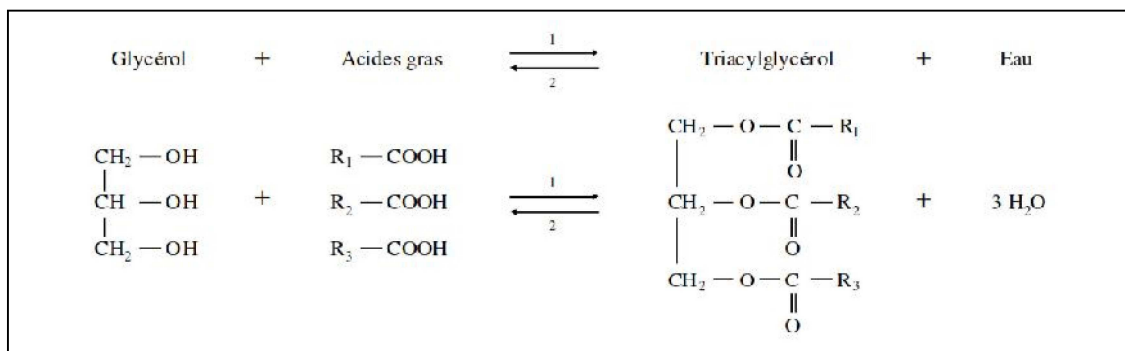


Figure 1 : Réaction d'estérification (1) des fonctions alcools du glycérol par trois acides gras ou d'hydrolyse (2) d'un triglycéride.

La deuxième grande classe de lipides s'agit des lipides complexes. Elle comporte des lipides simples liés à des molécules polaires telles que des sucres (glycolipides), des acides aminés ou des radicaux contenant du phosphore (phospholipides) ou du soufre. Les phospholipides (PL) et les glycolipides (GL), sont des constituants majeurs des membranes biologiques. Les lipides complexes sont donc des molécules amphiphiles qui forment naturellement une bicouche lipidique, les queues hydrophobes s'orientent vers l'intérieur de la bicouche, alors que les têtes hydrophiles s'orientent vers les milieux extra et intra-cellulaires aqueux. Les PL sont présents sous différentes structures dont le squelette correspond à une molécule de glycérol estérifiée par deux acides gras et un groupement phosphate formant une

tête polaire. La structure des PL prend son nom du composé polaire lié au phosphate du squelette (phosphatidyl - choline, sérine, éthanolamine ou inositol).

Les glycolipides représentent le second groupe de lipide membranaire, ils prédominent dans les cellules végétales. Les glycolipides ou glycosyl-diacylglycérols résultent de la fixation d'une ou de plusieurs molécules de sucre sur la fonction alcool libre d'un diacylglycérol. Par exemple, les galactolipides sont constitués de un ou deux résidus galactoses connectés par une liaison glycosidique à un diacylglycérol.

1.1. Les acides gras

1.1.1. Généralités sur les acides gras polyinsaturés

Les d'acides gras se composent d'une chaîne hydrocarbonée, dont la longueur varie le plus souvent entre 12 et 22 atomes de carbone, avec un groupement méthyle (CH_3) à l'une des extrémités et un groupement carboxyle (COOH) à l'autre. Lorsque l'acide gras (AG) ne comporte aucune double liaison dans sa chaîne hydrocarbonée, on dit qu'il est saturé (AGS). Si l'acide gras comporte une seule double liaison, il est dit monoinsaturé (AGMI), et s'il en comporte deux ou plus, polyinsaturé (ou AGPI). Deux familles d'AGPI se distinguent : la famille de l'acide linoléique ou oméga 6 (première double liaison située en 6^{ème} position en comptant à partir de l'extrémité méthyle, également dénommée n-6) et celle de l'acide α -linoléique ou oméga 3 (3^{ème} position en comptant à partir de l'extrémité méthyle, ou n-3) (Figure 2).

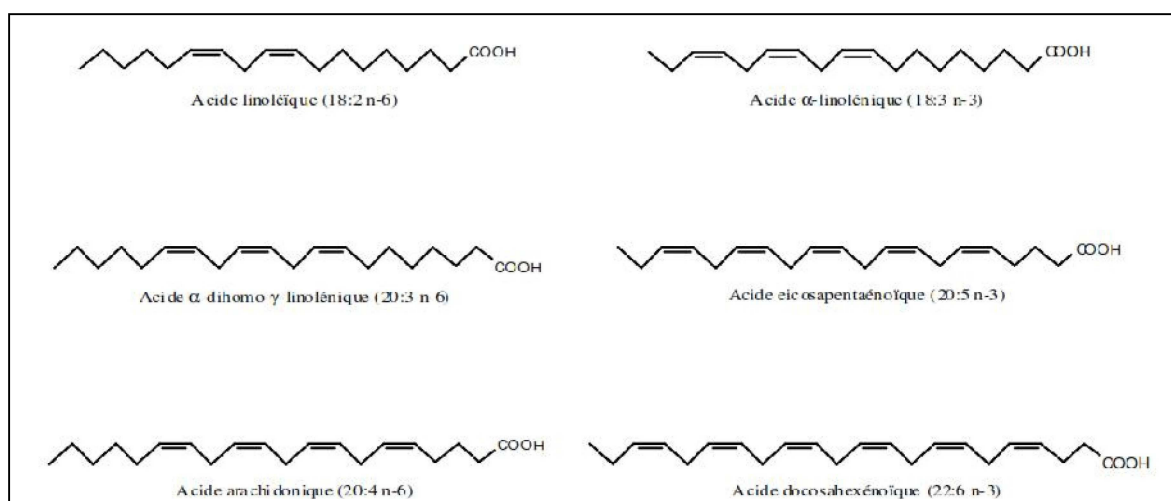


Figure 2 : Représentation schématique de certains acides gras polyinsaturés naturels de la série n-3 et n-6.

Il est à noter que les nutritionnistes utilisent la nomenclature « oméga », dans laquelle apparaissent successivement le nombre d'atomes de carbone, le nombre de doubles liaisons et la position de la première double liaison numérotée à partir de l'extrémité méthyle terminale. Cette nomenclature se distingue de la nomenclature « delta » des chimistes, dans laquelle la position des doubles liaisons est numérotée en comptant les atomes de carbone à partir de l'extrémité carboxyle (Tableau I).

Tableau I : Nomenclature usuel et systématique des principaux acides gras naturels

Nom usuel	Nom systématique	Abréviations
Acides gras saturés		
Myristique	Tétradécanoïque	14:0
Palmitique	Hexadécanoïque	16:0
Stéarique	Octadécanoïque	18:0
Acides gras monoinsaturés		
Palmitoléique	Δ 9-hexadécénoïque	16:1 n-7
Oléique	Δ 9-octadécénoïque	18:1 n-9
Acides gras polyinsaturés		
Linoléique (LA)	Δ 9, Δ 12-octadécadiénoïque	18:2 n-6
α-linoléique (ALA)	Δ 9, Δ 12, Δ 15-octadécatriénoïque	18:3 n-3
Arachidonique (AA)	Δ 5, Δ 8, Δ 11, Δ 14-eicosatétraénoïq	20:4 n-6
Eicosapentaénoïque (EPA)	Δ 5, Δ 8, Δ 11, Δ 14, Δ 17- eicosapentaénoïque	20:5 n-3
Docosahexaénoïque (DHA)	Δ 4, Δ 7, Δ 10, Δ 13, Δ 16, Δ 19-docosahexaaénoïque	22:6 n-3

Les précurseurs métaboliques des deux familles d'AGPI, l'acide linoléique (18:2 n-6, LA) pour la famille n-6 et l'acide α -linoléique (18:3 n-3, ALA) pour la famille n-3, sont des acides gras essentiels. Le caractère « indispensable » des AGPI n-6 a été démontré au début du 20^{ème} siècle par les expériences de Burr et Burr (1929) qui décrivent des symptômes caractéristiques (retard de croissance, chute de poils, dessèchement de la peau, desquamation, altérations de la reproduction, etc.) chez des rats recevant une alimentation totalement dépourvue d'acides gras. L'addition de LA à l'alimentation de ces animaux fait disparaître les symptômes précédents (Burr et Burr, 1930), suggérant que cet acide gras est indispensable. Chez l'Homme, le caractère indispensable des AGPI n-6 n'est admis qu'au début des années 60 chez des adultes alimentés (par voie parentérale) avec des préparations dépourvues de lipides et chez des nouveaux nés allaités avec des laits infantiles également dépourvus de graisse (Soderhjelm *et al.*, 1970). En revanche, la possibilité que les AGPI n-3 puissent également exercer un rôle physiologique spécifique, distinct des AGPI n-6, n'est envisagée que plus tard. Ainsi, Holman *et al.* (1982) ont montré qu'une carence en ALA provoque des

troubles neurologiques des systèmes sensoriels et moteurs (engourdissement, faiblesse musculaire, tristesse, problèmes de vu, etc.) qui peuvent être corrigés par l'introduction d'ALA dans la solution nutritive. Le caractère indispensable des AGPI n-3 est alors admis en 1985. Des travaux plus récents ont permis d'approfondir la connaissance du métabolisme des AGPI, contribuant ainsi à la mise en évidence du caractère « essentiel » des acides gras dérivés des deux précurseurs (ALA et LA).

1.2. Principales voies métaboliques des acides gras polyinsaturés

La digestion des lipides alimentaires (essentiellement TG, PL et stérols) est sous la dépendance des enzymes pancréatiques (triglycéride lipase et phospholipases) et des sels biliaires qui conduisent à la formation de micelles mixtes contenant des acides gras libres et des 2-mono-acylglycérols après leur absorption (passive) par les entérocytes (intestin grêle), ils sont acheminés vers le réticulum endoplasmique où ils sont recombinaés en triacylglycérols. Les chylomicrons, lipoprotéines synthétisées dans les entérocytes, transportent alors les triglycérides vers les tissus utilisateurs et le tissu adipeux. Les TG situés dans le cœur des chylomicrons sont hydrolysés par une lipoprotéine lipase conduisant à la formation de remnants qui sont eux-mêmes captés via des récepteurs spécifiques situés au niveau du foie. Le foie synthétise alors des lipoprotéines de très basse densité (Very Low Density Lipoproteins) (VLDL), riches en TG et possédant une molécule d'apoB-100 comme apolipoprotéine. Dans la circulation, les TG des VLDL sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase, ce qui donne naissance à des lipoprotéines à densité intermédiaire (Intermediate Density Lipoproteins) (IDL). Ces derniers sont en partie recaptés par le foie ou hydrolysés par la lipase hépatique donnant naissance à des lipoprotéines de basse densité (Low Density Lipoproteins) (LDL). Les LDL sont ensuite captés par les cellules cibles via des récepteurs spécifiques. Le retour du cholestérol des cellules vers le foie s'effectue via les lipoprotéines à haute densité (High Density Lipoproteins) (HDL).

1.2.1. Catabolisme oxydatif des acides gras polyinsaturés

Le catabolisme des AGPI s'effectue par la voie de la β -oxydation, principalement dans les mitochondries. Auparavant, les TG sont activés, pour cela ils sont hydrolysés par des lipases qui libèrent les acides gras du glycérol. Ces acides gras sont ensuite thio-estérifiés en acyl-CoA qui vont réagir avec la carnitine pour donner l'acyl-carnitine grâce à une enzyme : la carnitine acyl transférase I (CAT-I). L'acyl-carnitine traverse la membrane mitochondriale

(interne) et sous l'action de la CAT-II, l'acyl-CoA est reconstitué. Il devient alors le substrat de réactions qui vont se dérouler dans la matrice mitochondriale : c'est la β -oxydation proprement dite, dont un tour va conduire à un raccourcissement de deux carbones de l'acyl-CoA initial et à la libération d'un acétyl-CoA (Alessandri *et al.*, 2009) (Figure 3). En général, les acétyl-CoA entrent ensuite dans le cycle de Krebs où ils sont complètement oxydés en CO_2 . Dans le foie et dans certaines situations physiologiques particulières (jeûne, diabète) où la production d'acétyl-CoA excède les capacités du cycle de Krebs, les corps cétoniques sont synthétisés.

Le catabolisme représente le principal devenir métabolique des AGPI indispensables (Cunnane, 2004). Il a même été montré que le LA et l'ALA sont plus activement dégradés (plus de 50 %) par β -oxydation mitochondriale que ne le sont les AGS et les AGMI, du fait de leur plus forte affinité pour la CAT-I (Clouet *et al.*, 1989). Ainsi, le catabolisme représente une voie quantitativement 200 fois plus importante que la voie de bioconversion qui conduit à la synthèse des AGPI à très longue chaîne à partir de leurs précurseurs.

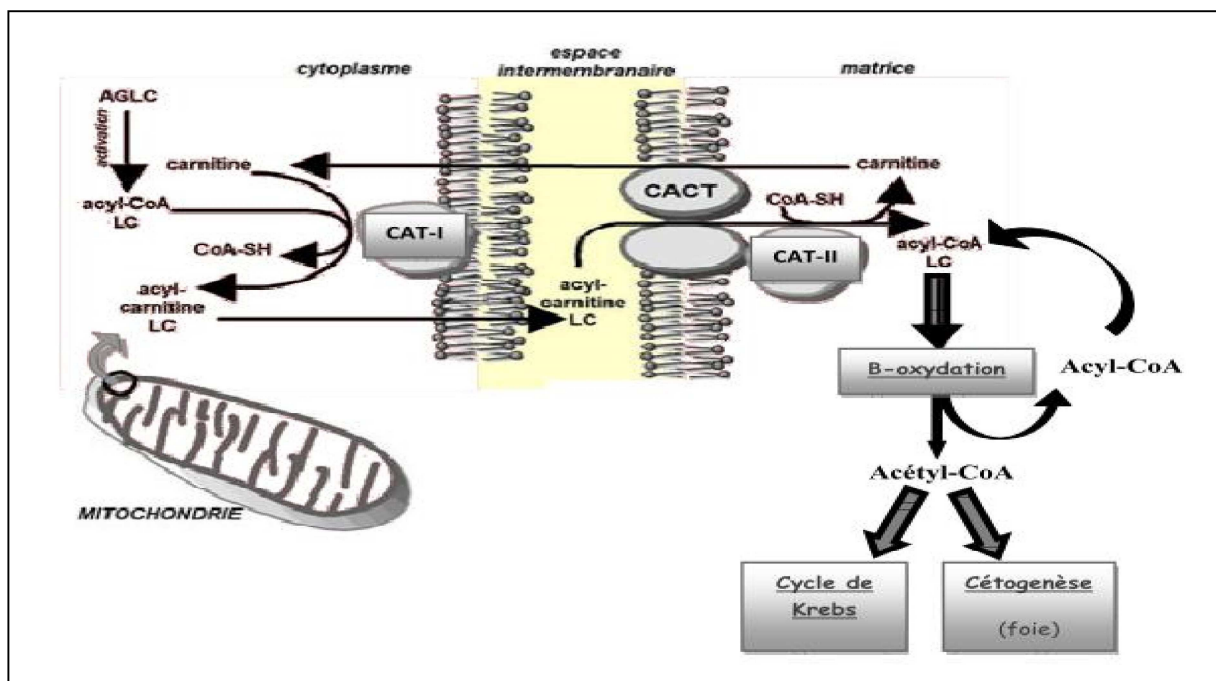


Figure 3 : Catabolisme oxydatif des acides gras dans la mitochondrie. (Richard, 2006). CAT-I : carnitine acyl transférase 1 ; CAT-II : carnitine acyl transférase 2 ; AGLC : acide gras à longue chaîne.

1.2.2. Biosynthèse des AGPI à longue chaîne

Les précurseurs métaboliques des deux familles d'AGPI, le LA pour la famille oméga 6 et l'ALA pour la famille oméga 3, sont des acides gras dits indispensables. En effet, les cellules des mammifères sont dans l'incapacité métabolique de les synthétiser car elles ne possèdent pas, contrairement aux cellules végétales, la machinerie enzymatique (les désaturases) permettant d'introduire des doubles liaisons à l'extrémité méthyle, à savoir les $\Delta 12$ et $\Delta 15$ désaturases qui génèrent successivement le 18:2 n-6 et le 18:3 n-3 à partir de l'acide oléique (18:1 n-9). Ensuite, ces deux acides gras précurseurs conduisent à la synthèse de dérivés à plus longue chaîne par une succession de désaturations et d'élongations localisées dans le réticulum endoplasmique de la cellule. Les doubles liaisons et atomes de carbone supplémentaires sont ajoutés du côté de l'extrémité carboxyle, conservant ainsi la structure n-6 et n-3 des précurseurs d'origine végétale (Figure 4). Les principaux AGPI dérivés à longue chaîne ainsi formés dans les organismes animaux sont les acides dihomométhyl- γ -linoléique (20:3 n-6, ou DGLA) et arachidonique (20:4 n-6, ou ARA) pour la famille des oméga 6, et les acides eicosapentaénoïque (20:5 n-3, ou EPA) et docosahexaénoïque (22:6 n-3, ou DHA) pour la famille des oméga 3. Il est maintenant admis qu'une étape de rétroconversion peroxysomale (β -oxydation) est requise pour la synthèse du DHA (Voss *et al.*, 1991 ; Sprecher, 2000). Cette étape consiste à l'allongement de l'acide docosapentaénoïque (22:5 n-3, ou DPA) en acide tétracosapentaénoïque (24:5 n-3, ou TPA), lequel est désaturé en position 6 à partir de l'extrémité carboxyle (action de la $\Delta 6$ désaturase), ce qui produit l'acide tétracosahexaénoïque (24:6 n-3, ou THA). Le THA est ensuite transféré dans les peroxysomes pour y subir un seul cycle de β -oxydation générant ainsi une molécule raccourcie de deux atomes de carbone, le DHA.

Les deux familles d'AGPI, n-6 et n-3, ne sont pas inter-convertibles mais elles entrent en compétition pour la voie de désaturation-élongation, ce qui implique un équilibre métabolique entre ces deux familles (Barcelo-coblijn et Murphy, 2009). De plus, en situation d'apport alimentaire équilibré, la voie de biosynthèse des oméga 6 s'arrête à l'ARA. Elle se poursuit au-delà lorsque cet apport est déficient en oméga 3, conduisant à la synthèse d'acide docosapentaénoïque (22:5 n-6, ou DPA) en compensation de la diminution de la synthèse du DHA. L'importance relative de ces deux voies de synthèse dans l'organisme est donc largement contrôlée par l'apport nutritionnel et la disponibilité relative de chaque précurseur (Nakamura et Nara, 2004).

Des données ont ainsi montré que l'ALA a un effet inhibiteur sur la conversion du LA, et vice versa (Lemarchal, 1989). Cependant signalons que la $\Delta 6$ désaturase possède une plus forte affinité pour l'ALA, qui est ainsi préférentiellement désaturé en dérivés à longue chaîne (Bézar *et al.*, 1994).

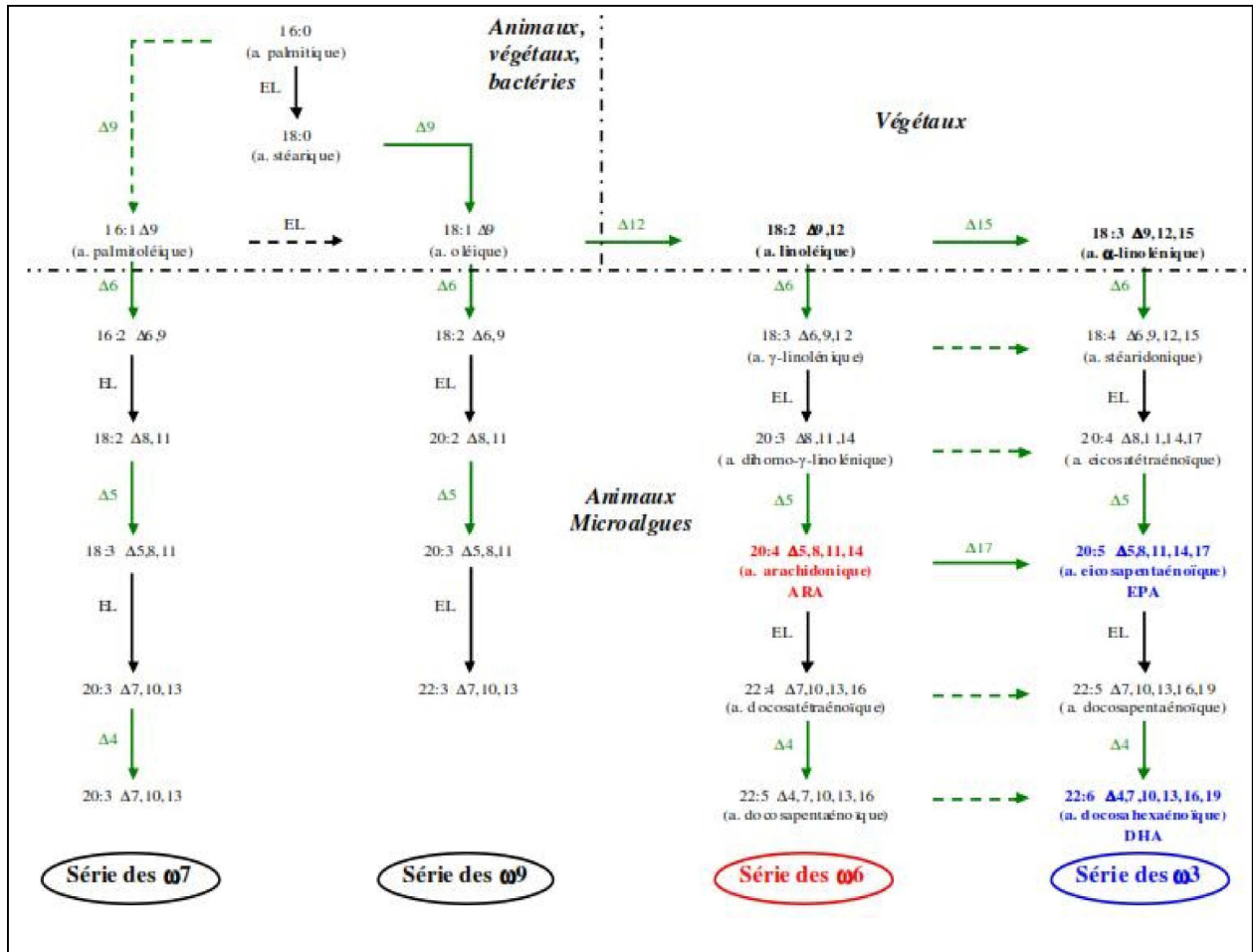


Figure 4 : Schéma général des voies de synthèse des AGPI-LC des séries n-7, n-9, n-6, et n-3 (Guihneuf, 2008).

Par ailleurs, il a été montré chez le rat, qu'un régime riche en EPA et DHA administré pendant 3 semaines, diminue d'environ 50 % l'activité $\Delta 6$ -désaturase hépatique vis à vis du LA, mais influence peu la conversion de l'ALA (Christiansen *et al.*, 1991). De nombreux travaux montrent que le taux de conversion de l'ALA en DHA est très faible chez l'Homme (< 1 %), suggérant que le précurseur est une source trop limitée pour satisfaire la totalité des besoins en DHA des tissus humains (Burdge et Calder, 2005 ; Arterburn *et al.*, 2006 ; Williams et Burdge, 2006 ; Plourde et Cunnane, 2007). D'autre part, des études cliniques ont mis en évidence qu'une supplémentation alimentaire avec des doses croissantes d'ALA induit

l'accumulation des dérivés intermédiaires (EPA et DPA) dans le plasma sans élever pour autant la teneur plasmatique en DHA (Arterburn *et al.*, 2006). Enfin précisons que chez la femme, comparée à l'homme, une plus faible proportion d'ALA est utilisée pour la β -oxydation (effet probable de la différence de masse musculaire), tandis que la fraction convertie en dérivés à longue chaîne EPA et DHA est supérieure (effet probable du statut hormonal et des œstrogènes), et ce d'autant plus lors de la grossesse (Alessandri *et al.*, 2009 ; Burdge, 2004 ; Williams et Burdge, 2006). Ceci permettrait de répondre à des besoins physiologiques spécifiques, notamment pendant la grossesse et l'allaitement, et aux besoins en oméga 3 du fœtus puis du nouveau né (Guesnet *et al.*, 2013).

1.2.3. Conversion des AGPI en médiateurs oxygénés actifs

Les AGPI formés par la voie de désaturation-élongation peuvent entrer dans les voies enzymatiques d'oxygénation, d'hydroxylation et de peroxydation conduisant à la formation de puissants médiateurs dénommés eicosanoïdes. Il s'agit du DGLA et de l'ARA pour la famille des oméga-6, et l'EPA et DHA pour la famille des oméga-3. L'action de la phospholipase A₂ au niveau des phospholipides membranaires libère ces AGPI dans le cytoplasme, qui peuvent alors entrer dans deux voies métaboliques distinctes : (i) la voie des cyclo-oxygénases (ou COX) générant les prostanoides, c'est à dire les prostaglandines (PG), les prostacyclines (PGI) et les thromboxanes (TX), (ii) la voie des lipoxygénases (ou LOX) produisant les leucotriènes (LT) et les acides gras hydroperoxydés et hydroxylés (Figure 5).

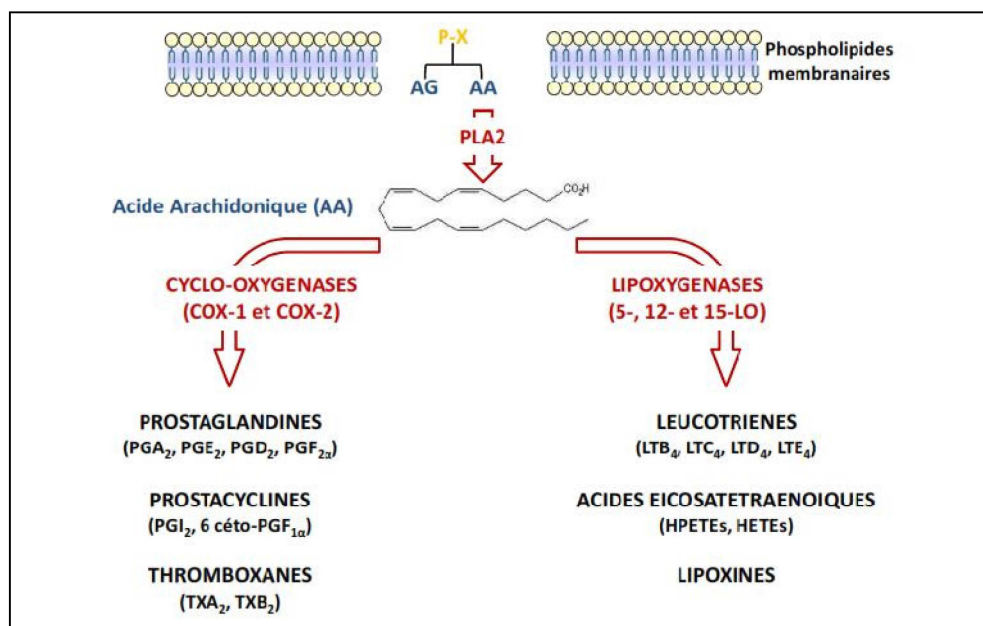


Figure 5 : Voies d'oxydation enzymatique de l'acide arachidonique

Les prostanoides sont des AGPI cyclisés et hydroxylés, renfermant un cycle constitué de 5 ou 6 atomes de carbone sur lequel sont fixés des groupes carbonyle ou époxyde. Ces AGPI sont synthétisés dans la plupart des tissus tels que le cœur, les poumons, le rein, l'endothélium vasculaire, les plaquettes, le cerveau, le tissu adipeux etc. Les leucotriènes sont des molécules portant toujours 3 doubles liaisons conjuguées (triènes), 1 ou 2 groupes hydroxyles (LTA et LTC) ou 1 groupement époxyde (LTB) et pour les plus complexes, un groupement sulfure sur lequel est fixé un acide aminé (LTC, LTD et LTE). Les leucotriènes sont principalement synthétisés par les cellules participant au processus inflammatoire : monocytes, macrophages, basophiles, mastocytes, neutrophiles. Pour chaque famille de molécule, on distingue trois séries selon la nature de l'AGPI qui en est la source. Ainsi, pour les prostanoides, les séries 1, 2 et 3 dérivent respectivement du DGLA, de l'ARA et de l'EPA ; pour les leucotriènes, les séries 3, 4 et 5 dérivent également de ces trois AGPI, respectivement. Chaque tissu possède l'équipement enzymatique conduisant à la synthèse de l'une ou l'autre de ces molécules. Signalons également que le DHA n'est pas un substrat des cyclo-oxygénases, mais un inhibiteur puissant de ces enzymes. Par contre, il peut être métabolisé par les lipoxygénases, conduisant ainsi à la production de docosanoïdes. Ces dérivés oxygénés à partir du DHA comprennent les docosatriènes, résolvines et protectines (Serhan, 2005). L'étude des docosanoïdes a permis notamment l'identification de la neuroprotectine D1 (NPD1), produit de la catalyse du DHA par la 15-LOX, et qui joue des rôles dans le système nerveux central (SNC) sur les processus d'apoptose et d'inflammation (Niemoller et Bazan, 2010).

1.3. Données de consommation en acides gras polyinsaturés

Dans l'alimentation, les AGPI n-6 et n-3 peuvent être apportés par des sources végétales et animales. Les huiles végétales sont particulièrement riches en AGPI précurseurs : LA et ALA. Ainsi, les huiles de tournesol et d'arachide sont particulièrement riches en LA (respectivement 64 % et 30 % en moyenne des acides gras totaux (AGT), l'huile de tournesol étant même qualifiée de « linoléique » compte tenu de sa forte teneur en LA. L'ALA est majoritairement retrouvée dans les huiles de noix, colza et soja (respectivement 12, 10 et 8 % en moyenne des AGT) qui sont qualifiées d'huiles « linoléiques ». Ainsi, les huiles « linoléiques » possèdent un ratio n-6/n-3 très élevé, tandis que le ratio des huiles « linoléiques » est plus faible (< 10). En outre, signalons que les produits animaux terrestres (viande, lait, œuf) fournissent des quantités plus ou moins importantes de LA et d'ALA. De plus, certains

légumes verts feuillus (épinard, mâche, pourpier) sont également des sources d'ALA. En ce qui concerne les AGPI à longue chaîne (AGPI-LC) de la famille oméga 6, dans notre alimentation courante ils sont apportés par la consommation de produits animaux terrestres (viande, œuf, lait) et de lait maternel. Les AGPI-LC oméga 3 quant à eux, sont issus principalement des poissons gras (hareng, maquereau, saumon, thon, sardines) et autres produits animaux marins, ainsi que du lait maternel. Notons que les produits animaux d'origine terrestre (viande, volaille, œufs et lait) contiennent majoritairement des dérivés n-6 et des quantités variables de n-3 selon le régime de ces animaux (Simopoulos, 2001).

La composition en acides gras des lipides du lait maternel n'échappe pas à l'influence de l'alimentation maternelle. Ainsi la composition lipidique du lait humain varie à l'intérieur et entre les populations, de moins de 0,1 % à un peu plus de 1,0 % de DHA, du fait de la différence de consommation en poissons et fruits de mer (Innis, 2004). Le lait maternel assure la couverture des besoins en AGPI n-3 (DHA essentiellement) pendant les premiers mois de la vie : le statut en AGPI n-3 du nouveau né est donc très dépendant de celui de sa mère. Concernant les laits infantiles en France, leur composition doit obéir à l'Arrêté du 11 Avril 2008. Celui-ci stipule que le ratio LA/ALA doit être compris entre 5 et 15 ; en revanche, la présence d'AGPI-LC (20 et 22 carbones) n'est pas obligatoire. Ainsi, seulement certains laits infantiles contiennent du DHA, en dépit du rôle primordial de cet acide gras dans les fonctions cérébrales.

1.4. Mécanismes d'action des acides gras polyinsaturés

Les différents mécanismes d'action identifiés pour les AGPI illustrent la grande diversité des fonctions régulées par ces nutriments. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les AGPI, actuellement présentés dans la littérature (Alessandri *et al.*, 2004), font l'objet des paragraphes suivants.

1.4.1. Les AGPI : précurseurs de médiateurs bioactifs

Cette voie d'action des AGPI se déclenche avec la libération des AG depuis les phospholipides membranaire suite à l'action de la phospholipase A₂. Une fois libérés de la membrane, les AGPI à 20 atomes de carbone (ARA, EPA et DGLA) engendrent par oxygénation des médiateurs bioactifs : les eicosanoïdes. Rappelons que les prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes des séries 1, 2 et 3 sont produit par la voie COX à partir

respectivement, du DGLA de l'ARA et de l'EPA. La 5-LOX conduit aux leucotriènes de la série 4 à partir de l'ARA et à ceux de la série 5 à partir de l'EPA. Il existe donc une compétition entre les différentes séries vis-à-vis des enzymes COX et 5-LOX. Ainsi, les précurseurs des endoperoxydes des séries 1 et 3 entrent en compétition avec leur homologue de la série 2, et le précurseur des leucotriènes de la série 5 s'oppose à celui de la série 4. L'équilibre alimentaire entre les acides gras n-6 et n-3 détermine donc la balance métabolique, qui influe sur la synthèse de molécules bioactives dont les propriétés sont généralement opposées (Calder, 2002 ; Schmitz et Ecker, 2008).

En effet, l'ARA génère des médiateurs proagrégants, vasoconstricteurs (endoperoxydes de la série 2) et pro-inflammatoires (leucotriènes de la série 4). A l'opposé, les eicosanoïdes dérivés de l'EPA ont des propriétés anti-agrégantes, vasodilatatrices (endoperoxydes de la série 3) et non inflammatoires (leucotriènes de la série 5). Notons également que les eicosanoïdes dérivés de l'ARA sont capables d'activer des facteurs de transcription tels que les récepteurs aux proliférateurs de peroxydome (PPAR). Enfin, le DHA est également le précurseur de docosanoïdes bioactifs (résolvines, docosatriènes, neuroprotectines et neuroprostanes), particulièrement importants dans le cerveau où ils ont une action anti-inflammatoire et neuroprotectrice (Bazan, 2006 ; Laye, 2010).

2. Les plaquettes sanguines

2.1. Origine et structure

Les plaquettes, également appelées thrombocytes sont de petites cellules anucléées de forme discoïde (2 à 3 μm de diamètre pour 1 μm d'épaisseur), circulant dans le sang et participant à l'hémostase (Figure 6). Les plaquettes sanguines jouent un rôle important dans la coagulation en permettant de stopper le sang après une lésion vasculaire. Elles se forment dans la moelle osseuse par fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes (Behnke et Forer, 1998). Elles sont dépourvues d'ADN mais contiennent des ARNm provenant des mégacaryocytes ainsi que la machinerie nécessaire à la traduction (Kieffer *et al.*, 1987). La numération plaquettaire de référence chez l'homme adulte est de 150000 à 400000 par μL de sang. D'une durée de vie comprise entre 7 et 12 jours, les plaquettes sont ensuite éliminées par phagocytose grâce au système monocytaire macrophagique de la rate, du foie et de la moelle osseuse principalement. La forme discoïdale des plaquettes au repos est assurée par la présence d'un réseau microtubules à la périphérie (White, 1968). En plus du réseau de microtubules périphérique, les plaquettes possèdent un cytosquelette dense, riche en actine et en protéines contractiles, telles que la myosine, qui leur permet de changer de forme et d'étendre leurs pseudopodes lors de leur activation (Bearer *et al.*, 2002).

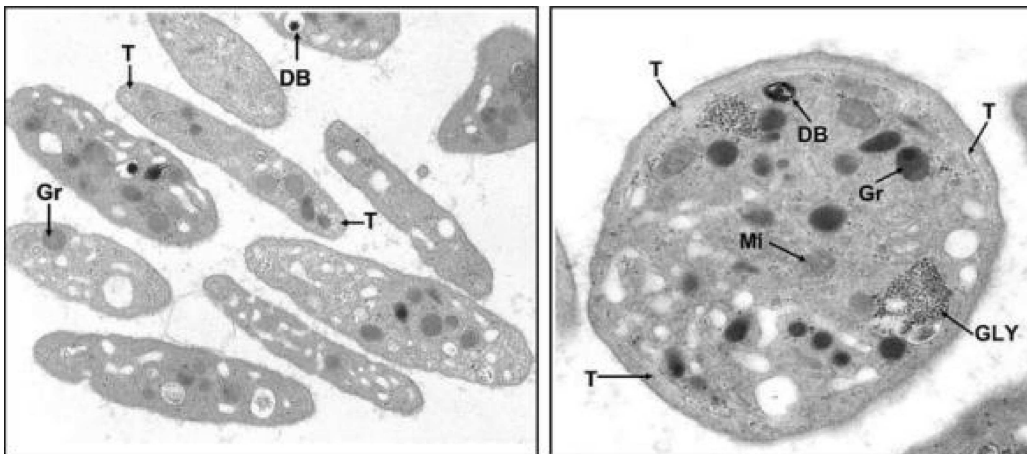


Figure 6 : Morphologie des plaquettes sanguines humaines.

Microscopie électronique à transmission de plaquette au repos. Grossissement : 17 000x (gauche) et 37 000x (droite). Les plaquettes au repos ont une forme discoïdale. Elles sont caractérisées par la présence d'un réseau de microtubules (T) en périphérie, d'organelles, telles que les mitochondries (M), de granules appelés corps denses (DB) et de granules alpha (Gr). Des amas de glycogène (Gly) sont aussi très facilement visibles en microscopie. Illustration tirée de (White et Krumwiede, 2007).

2.1.1. Membranes

La membrane plasmique des plaquettes est majoritairement composée de phospholipides (65 à 70 %). Parmi les phospholipides on distingue 4 classes majeures : les phosphatidylcholine (PC) (55 %), les phosphatidylethanolamine (PE) (21 %), les phosphatidylinositol (PI) (15 %) et les phosphatidylsérine (PS) (7 %). La position sn-1 est généralement occupée par un acide gras saturé comme l'acide palmitique ou l'acide stéarique ou un acide gras monoinsaturé (AGMI). Contrairement à la position sn-1, la position sn-2 des phospholipides plaquettaires est occupée par un acide gras polyinsaturé (AGPI), principalement l'acide arachidonique (ARA), qui représente l'un des substrats les plus importants dans la synthèse des médiateurs biologiques, ou l'acide linoléique. Au niveau des lipides membranaires, sont représentés dans une moindre mesure des lipides neutres (20 à 25 % formés par du cholestérol et des acides gras non estérifiés), et des glycolipides (2 à 5 %).

La membrane plasmique comporte un réseau de profondes invaginations constituant le système canaliculaire ouvert (SCO), permettant la libération du contenu des granules denses lors de l'activation plaquettaire (Beretz et Cazenave, 1982). Parmi les autres systèmes membranaires, le système tubulaire dense (STD) qui est l'équivalent du réticulum endoplasmique lisse dans les autres types cellulaires. Il contient des réserves de calcium ainsi que les enzymes impliquées dans la synthèse de prostaglandines.

De plus, la membrane plasmique contient différents récepteurs glycoprotéiques qui assurent l'adhésion des plaquettes au tissu sous-endothélial ou qui interagissent avec des ligands spécifiques (agonistes ou antagonistes) (George, 2000). Ainsi la glycoprotéine GP Ib-V-IX est un récepteur pour le "van Willebrand factor" (vWF) et la thrombine (Lopez et Dong, 2004), la glycoprotéine GP Ia-IIa est un récepteur pour le collagène (Santoro et Zutter, 1995 ; Santoso et *al.*, 1999), la glycoprotéine GP IIb- IIIa est un récepteur pour le fibrinogène (Shattil et *al.*, 1998).

2.1.2. Cytoplasme

Sous la membrane plasmique s'étend le cytosquelette, composé de microtubules et de microfilaments d'actine et de myosine. Il stabilise la bicouche lipidique et maintient la forme

discoïde des plaquettes quiescentes et permet le changement de forme des plaquettes durant l'activation.

Le cytoplasme contient également un grand nombre d'organites incluant des granules, des mitochondries, des particules de glycogène, des lysosomes et de peroxysomes. Les granules α ainsi que les granules denses sont des granules de stockage spécifique 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 et le vWF. Les granules denses sont riches en sérotonine, en adénosine diphosphate (ADP), en adénosine triphosphate (ATP), et en cations Ca^{2+} et Mg^{2+} .

2.2. Signalisation plaquettaire

Suite à l'interaction d'un ligand avec son récepteur, une ou plusieurs voie(s) métabolique(s) est (sont) mise(s) en jeu (Figure 7). Ce ligand peut être un agoniste comme il peut être un antagoniste.

Les agonistes, en stimulant leurs récepteurs, activent une ou plusieurs protéine(s) G (G_i , G_q , $G_{12/13}$). Chaque protéine G réagit avec son effecteur pour donner la réponse appropriée. La protéine G_i inhibe l'adénylate cyclase ce qui induit une inhibition de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) favorisant l'augmentation des taux de calcium intracellulaire grâce à une diminution de l'effet de compétition de l'AMPC avec l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) activateur des canaux calciques et stimulateur de la mobilisation du Ca^{2+} dans le cytosol. La protéine G_q active la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le phosphatidyl inositol 4,5-diphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et IP3 ce qui active la protéine kinase C (PKC) et la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire respectivement.

Les protéines G_i et G_q ont pour effet final la sécrétion du contenu plaquettaire et l'agrégation des plaquettes. Ainsi, suite à l'augmentation des taux du Ca^{2+} intracellulaire, la phospholipase A2 (PLA2) subit une translocation vers la membrane plasmique. Sa phosphorylation par des kinases entraîne son activation, et par la suite les phospholipides sont hydrolysés, et l'acide arachidonique situé à la position sn-2 est libéré et constitue un substrat pour deux enzymes spécifiques, la cyclooxygénase (COX) et la lipooxygénase (LOX). Grâce

à la COX, l'ARA est transformé en prostaglandines (PGs) et par la suite en plusieurs molécules d'importance biochimique dont le thromboxane A2 (TXA₂). En revanche, sous l'effet de la 12-LOX, l'ARA est transformé en acide 12 hydroperoxyeicosatétraénoïque (12-HpETE). Les PGs, le TXA₂ et le 12-HpETE sont des régulateurs majeurs de l'activité plaquettaire. Les protéines G_{12/13} interagissent avec des petites protéines G ("Small G protein") ce qui a pour conséquence le changement de la forme des plaquettes. En revanche, les antagonistes provoquent une interaction avec une protéine G_s qui a l'effet inverse de la protéine inhibitrice G_i.

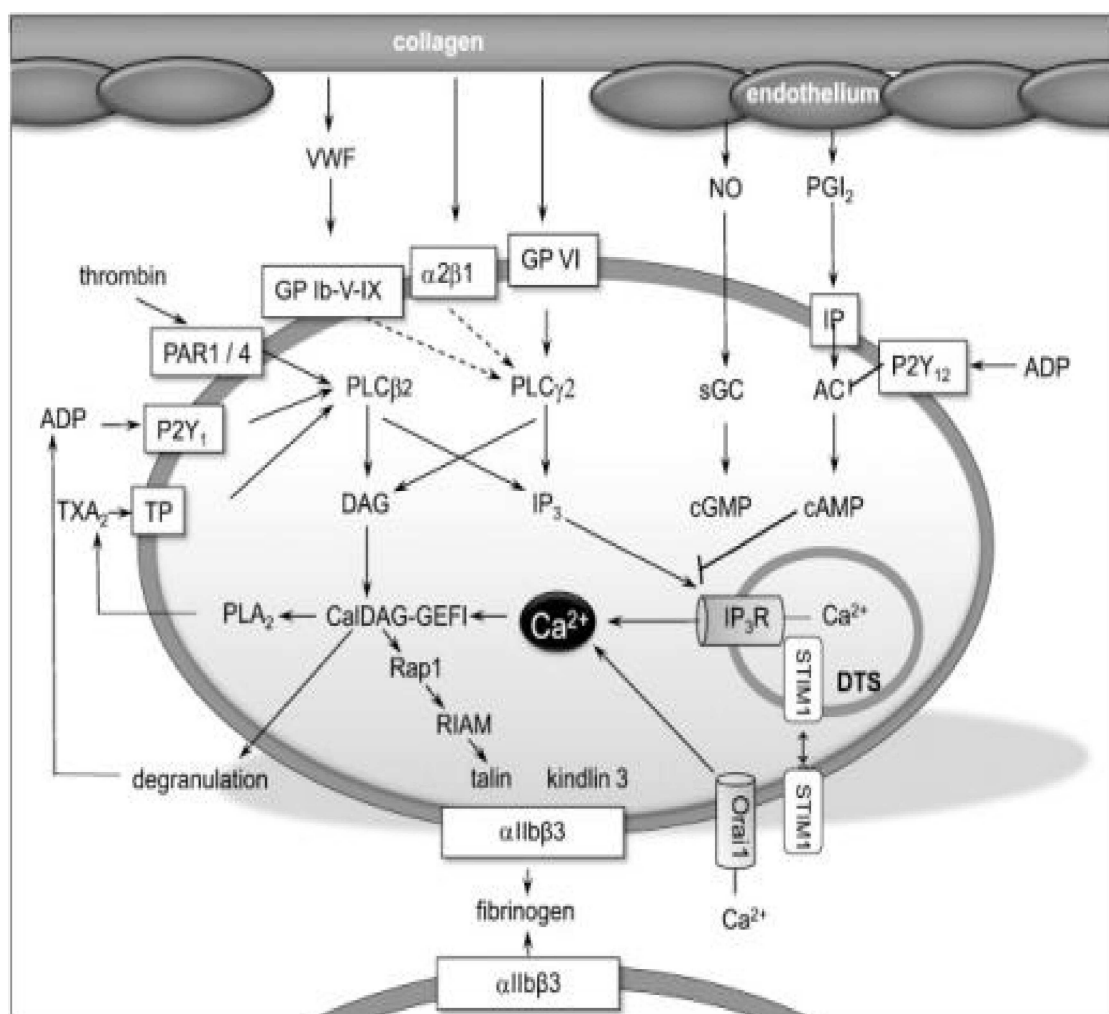


Figure 7 : Récepteurs et voies de signalisation impliqués dans l'activation plaquettaire.

L'ancrage initial de la plaquette sur la matrice sous-endothéliale est réalisé par le complexe GPIb/V/IX. L'immobilisation sur la matrice permet la liaison du récepteur GPVI, qui induit une cascade de signalisation plaquettaire. Celle-ci aboutit, d'une part, à la sécrétion de messagers secondaires (ADP et TXA₂) qui renforcent l'activation et permettent

l'activation des plaquettes environnantes. D'autre part, les intégrines impliquées dans l'adhérence ($\alpha2\beta1$) et l'agrégation ($\alpha\text{IIb}\beta3$) sont activées, en passant d'une forme de basse affinité à haute affinité. Illustration tirée de (Broos et al., 2012).

2.2.1. Agonistes de l'agrégation plaquettaire (Tableau II)

- vWF et collagène

A la suite d'une lésion d'un vaisseau sanguin, l'exposition des plaquettes au collagène entraîne leur adhésion au niveau du vaisseau endommagé et leur activation.

Le collagène pourrait interagir avec les glycoprotéines GP IaIIa (intégrine $\alpha2\beta1$), GP IV, GP VI. Ainsi, l'interaction du collagène avec son récepteur GP VI conduit à l'activation d'une voie tyrosine kinase impliquant de nombreux messagers, tout comme la voie de la PLC, ce qui active d'une manière « Inside-Out » l'intégrine $\alpha2\beta1$ capable de fixer ensuite le collagène. La stimulation par le collagène se traduit par un changement de la forme des plaquettes, et induit une sécrétion granulaire. L'agrégation dépend plutôt de la sécrétion de TXA2 et de prostaglandines H2 (PGH2) (Gibbins, 2004).

Le facteur vWF synthétisé dans les mégacaryocytes et les cellules endothéliales, lié au collagène et exposé à partir du tissu sous-endothélial des vaisseaux endommagés, active son récepteur (GP Ib/IX) couplé à une signalisation tyrosine kinase avec la contribution de plusieurs messagers, ce qui conduit à une activation d'intégrines et notamment l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta3$ ou glycoprotéine GP IIbIIIa qui peut interagir ensuite avec le vWF, le fibrinogène, la fibronectine, et la thrombospondine.

- La sérotonine, le thromboxane A₂ et le PAF

La Sérotonine ou 5-Hydroxytryptamine (5-HT) via son récepteur spécifique, le TXA2 et le PGH2 via le récepteur TXA2/PGH2, le PAF « platelet aggregating factor » via son propre récepteur activent la voie PLC grâce à leurs récepteurs couplés à la protéine Gq. La conséquence est une augmentation des taux du Ca²⁺ intracellulaire, une agrégation plaquettaire, un changement de la forme et une sécrétion du contenu des granules (Takahara et al., 1990 ; Hourani et Cusack, 1991 ; Blockmans et al., 1995 ; Saltzman et al., 1991).

- L'épinéphrine

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

- L'ADP

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

- La thrombine

La thrombine est une sérine-protéase qui joue un rôle crucial dans le processus de la coagulation, et qui stimule les plaquettes par l'intermédiaire des récepteurs appartenant à la famille des « Protease activated receptors » (PARs) ou récepteurs activés par une protéase. Les PARs, sont des récepteurs non classiques qui possèdent aussi un ligand ou bien un agoniste non classique et non circulant dans le plasma. En fait, l'agoniste est constitué par une "séquence cachée" N-terminale et qui s'expose suite au clivage par la protéase. Tous les PARs ne sont pas stimulés par la thrombine. Les PARs 1, 3 et 4 sont exprimés au niveau des plaquettes et stimulés par la thrombine, ils sont connus d'ailleurs comme récepteurs pour la thrombine. Par contre le PAR2 est stimulé par la trypsine (Hollenberg et Compton, 2002). La thrombine est la protéase principale lors de la coagulation, transformant le fibrinogène en fibrine. Le PAR1, principal représentant de sa famille, est activé suite au clivage d'une partie de son extrémité N-terminale extracellulaire, ce qui démasque une nouvelle extrémité N-terminale capable de lier le domaine actif du récepteur déclenchant ainsi une signalisation intracellulaire. Le PAR1 peut être couplé à plusieurs protéines G (Gq, Gi, G12/13) constituant ainsi l'agoniste type des plaquettes, provoquant par différents signaux une agrégation, une sécrétion et un changement de forme des plaquettes (Coughlin, 2000).

De plus, plusieurs études ont montré que la thrombine peut stimuler les plaquettes par l'intermédiaire d'une voie dépendante de la GP Ib. Cette voie a été révélée suite à la

persistance d'une activité résiduelle de la thrombine après inhibition de PAR1 et de GP IIbIIIa (Soslau et al., 2001).

2.2.2. Antagonistes

L'adénosine, la prostaglandine D2 (PGD2) via leurs propres récepteurs, ainsi que les prostaglandines I2 (PGI2) et E1 (PGE1) par l'intermédiaire des récepteurs PGI2/PGE1, tous couplés à la protéine Gs inhibent l'agrégation, le changement de la forme et la sécrétion induits par les agonistes. (Marcus et Safier, 1993).

Enfin, la prostaglandine E2 (PGE2) possède deux effets différents selon les conditions: inhibition (via le récepteur PGI2/PGE1) ou activation (via le récepteur PGE2) (Blockmans et al., 1995).

Tableau II : Principaux récepteurs couplés aux protéines G exprimés à la surface des plaquettes impliqués dans l'activation ou l'inhibition des fonctions plaquettaires.

Ligand	Récepteur	Couplage
Activation		
Thrombine	PAR ₁ , PAR ₄	Gq, G ₁₂₋₁₃
ADP	P ₂ Y ₁	Gq
	P ₂ Y ₁₂	Gi
Sérotonine	5-HT _{2A}	Gq
Adrénaline	α _{2A}	Gz
TxA2	TP _α , TP _β	Gq, G ₁₂₋₁₃
Vasopressine	V _{1A}	Gq
PGE2	EP ₃	Gi
Inhibition		
Adénosine	A _{2A}	Gs
PGI 2 /PGE 1	IP	Gs
PGD2	DP	Gs

2.3. Activation plaquettaire

L'activation plaquettaire implique plusieurs cascades métaboliques complexes. Elle se traduit tout d'abord par la sécrétion de différentes substances stockées dans les plaquettes et de métabolites provenant des réactions intra-plaquettaires suivie par un changement de la forme plaquettaire et en fin par l'agrégation (Figure 8).

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

2.3.1. Changement de la forme

Au repos, les plaquettes circulent sous une forme discoïde, due au cytosquelette. Lors de l'activation, les plaquettes deviennent sphériques. Le changement de la forme est un processus très rapide, basé sur la réorganisation du cytosquelette (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 .

2.3.2. Sécrétion

Suite à la stimulation des plaquettes et de la voie PLC, et grâce à un rôle probable des DAG et de l'acide phosphatidique (PA) produit suite à l'action de la phospholipase D, des vésicules vont fusionner à la membrane plasmique ce qui permet la sécrétion du contenu des granules (fibrinogène, fibronectine, ADP, Ca^{2+} , sérotonine, etc), par le système canaliculaire ouvert. Le cytosquelette est fortement impliqué dans ce processus (Flaumenhaft, 2003).

2.3.3. Agrégation

L'agrégation plaquettaire résulte de la libération du fibrinogène qui se fixe sur son récepteur et crée un pont inter-plaquettaire. Deux types d'agrégation plaquettaire sont rencontrés chez les plaquettes activées. L'agrégation primaire réversible qui se déroule en

présence de faible concentration d'agoniste et en présence de Ca^{2+} et Mg^{2+} , et l'agrégation secondaire irréversible qui nécessite une forte concentration d'agoniste et un phénomène d'amplification de l'activation suite à la sécrétion de TXA_2 et d'épinéphrine qui stimulent à leur tour leurs propres récepteurs.

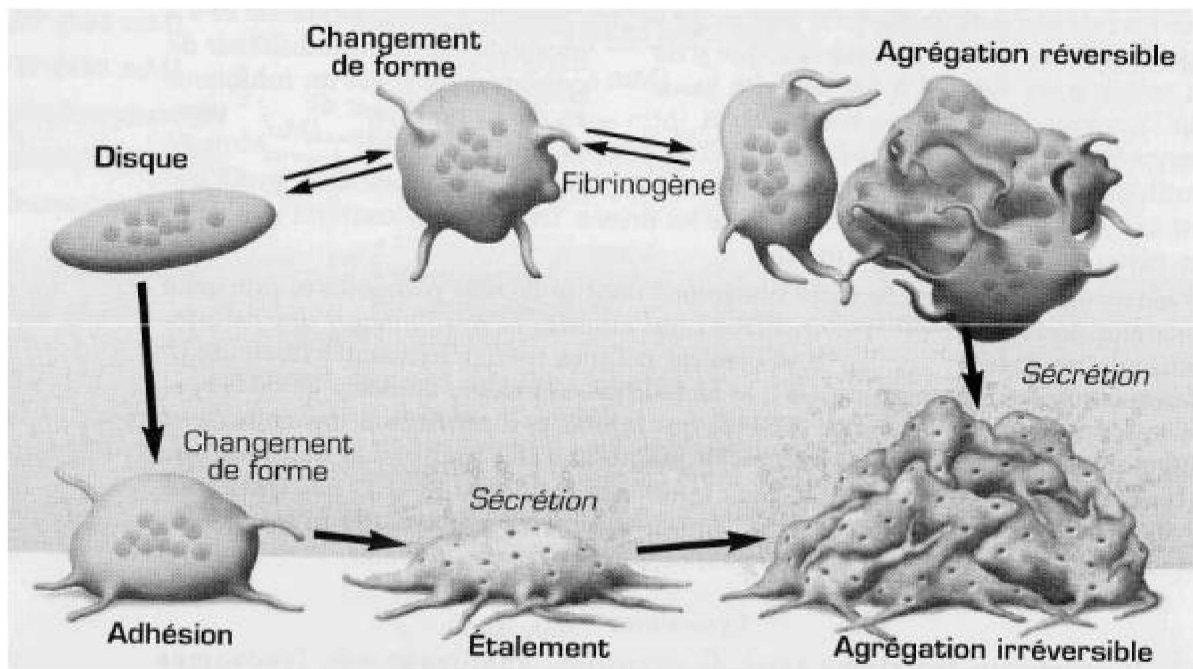


Figure 8 : Etapes de l'activation plaquettaire (Broos et al., 2012).

2.3.4. La cascade de l'acide arachidonique

2.3.4.1. Libération de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique est l'AGPI le plus abondant de la membrane plaquettaire. Il joue un rôle important dans l'hémostase en tant que précurseur des eicosanoïdes. Une fois libéré par les phospholipases, principalement la PLA_2 ou la PLC, l'ARA peut être métabolisé par l'une des deux enzymes majeures; COX ou la prostaglandine H synthase (PGH synthase) et la LOX, ou par la voie mineure des époxygénases (ou cytochrome P450).

2.3.4.2. Voie de la cycloxygénase

La transformation de l'ARA en prostanoides par la voie des COX implique une oxygénation en deux étapes par ajout de deux molécules d'oxygène (Lagarde, 1988). La

première étape est catalysée par une activité COX produisant ainsi la prostaglandine G₂ (PGG₂), un intermédiaire instable qui se transforme en PGH₂ suite à l'action d'une activité peroxydase, une étape clé dans la synthèse des PGs et du TXA₂ sous l'effet des PG synthases et de la thromboxane synthase respectivement (Figure 9). Le TXA₂ étant un métabolite instable à faible durée de vie, est transformé ensuite en TXB₂ plus stable. Les deux activités enzymatiques, COX et peroxydase, sont portées par une seule enzyme, la prostaglandine endoperoxyde H synthase (PGHS). Les deux réactions procèdent de deux sites différents de l'enzyme. En fait, la réaction catalysée par la COX se produit dans un canal hydrophobe au sein de l'enzyme. Quant à celle de la peroxydase, elle se produit dans un site actif contenant un groupe hème. L'activité COX de la PGHS est inhibée par l'aspirine et d'autres médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Seibold *et al.*, 2000).

- Effet biologique

Les cellules du système immunitaire produisent des cytokines en réponse à une attaque virale ou bactérienne. Ces cytokines sécrétées dans la circulation atteignent le cerveau où elles franchissent la barrière sang-cerveau. A l'interface et en réponse à la stimulation par les cytokines, les cellules vasculaires produisent des prostaglandines (PGE₂) par la voie COX-2 dont l'expression augmente en cas d'inflammation. Cette production de PG est à l'origine d'un groupe complexe de réactions rencontrées au cours de la réponse inflammatoire englobant la fièvre, l'inactivité, l'anorexie et l'hyperalgésie (Engblom *et al.*, 2003). Quant au TXA₂, et dans le cas particulier des plaquettes, il exerce un effet autocrine via son récepteur aboutissant à l'activation plaquettaire. Les fonctions de la COX et la place qu'elle occupe dans l'inflammation a poussé l'industrie pharmaceutique à la considérer comme une cible contre laquelle il est important de développer des inhibiteurs. Parmi ceux-ci, il existe des inhibiteurs non spécifiques qui inhibent aussi bien la COX-1 que la COX-2. Cependant, l'inhibition simultanée de la COX-1 et 2 entraîne des problèmes gastro-intestinaux, les deux formes de l'enzyme étant exprimées dans le tractus digestif (Satoh *et al.*, 2012). Ces effets secondaires ont été fortement atténués grâce au développement d'inhibiteurs sélectifs pour la COX-2, forme induite par l'inflammation (Flower, 2003). Cependant, il semble que les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 soient à l'origine de problèmes cardio-vasculaires, peut-être en créant une perturbation de l'équilibre entre la production de thromboxane pro-thrombotique et la prostacycline (PGI₂) antithrombotique (McAdam *et al.*, 1999).

Dans les plaquettes sanguines, on décrit essentiellement la prédominance de la forme COX-1, bien que certaines études montrent la présence de la forme COX-2 (Weber *et al.*, 1999). L'aspirine est un inhibiteur non sélectif irréversible de la COX. L'administration de faibles doses d'aspirine (30-150 mg/jour) pourrait avoir un rôle protecteur contre les accidents thrombotiques en diminuant la production de TXA₂ plaquettaire malgré une inhibition partielle concomitante de la production endothéliale de prostacycline (Patrono *et al.*, 2001).

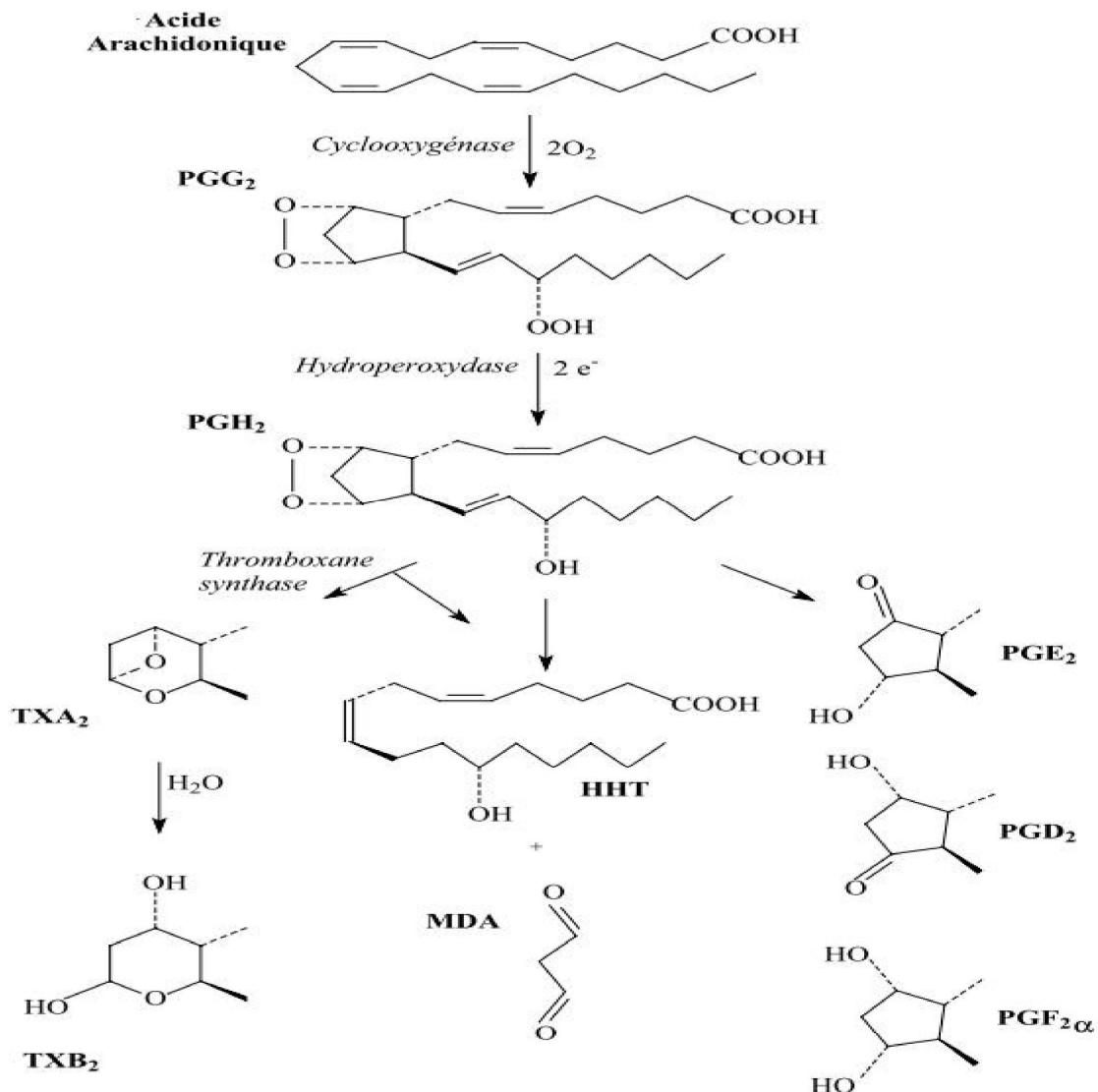


Figure 9 : Cascade du métabolisme de l'acide arachidonique par la voie de la cyclooxygénase (Coulon, 2004). PGG₂ : prostaglandine G₂; PGH₂ : prostaglandine H₂; PGE₂ : prostaglandines E₂; PGD₂ : prostaglandines D₂; TXA₂ : thromboxane A₂; TXB₂ : thromboxane B₂; MDA : malondialdéhyde ; HHT : acide 12-hydroxyheptadécatrioïque

2.3.4.3. Voie de la lipoxgénase

Le métabolisme de l'ARA par la LOX induit la formation de différents produits. L'acide hydroperoxy-eicosatétraénoïque (HpETE) peut être transformé sous l'action de la glutathion peroxydase en sa forme hydroxy, l'acide hydroxy-eicosatétraénoïque (HETE). (Figure 10). En outre, une autre famille moléculaire importante sur le plan inflammatoire est produite, les leukotriènes (LT). On distingue la LTB₄ et son intermédiaire époxyde la LTA₄, ainsi que d'autres types de leukotriènes (Rådmark et Samuelsson, 2009).

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

- Rôle biologique

Les leukotriènes synthétisés par les leucocytes à partir de l'ARA et suite à l'action de la 5-LOX jouent un rôle important dans l'inflammation, ils agissent via leurs récepteurs membranaires.

Le LTB₄ est un le plus fort médiateur chémo-attractant dans le processus inflammatoire. Les LTC₄, D₄, et E₄ sont connus par leurs effets broncho-constricteurs, jouant ainsi un rôle essentiel dans le développement de l'asthme (Sharma *et al.*, 2006).

D'autre part, le 12-HpETE pourrait avoir un rôle important dans le contrôle des taux de l'ARA libre dans certaines cellules. Des études ont montré que le 12-HpETE favorise l'augmentation de la libération d'ARA dans les plaquettes, probablement par stimulation de l'activité PLA₂, ce qui entraîne une augmentation de la formation de TXB₂ et d'autres métabolites plaquettaires (Calzada *et al.*, 2001).

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

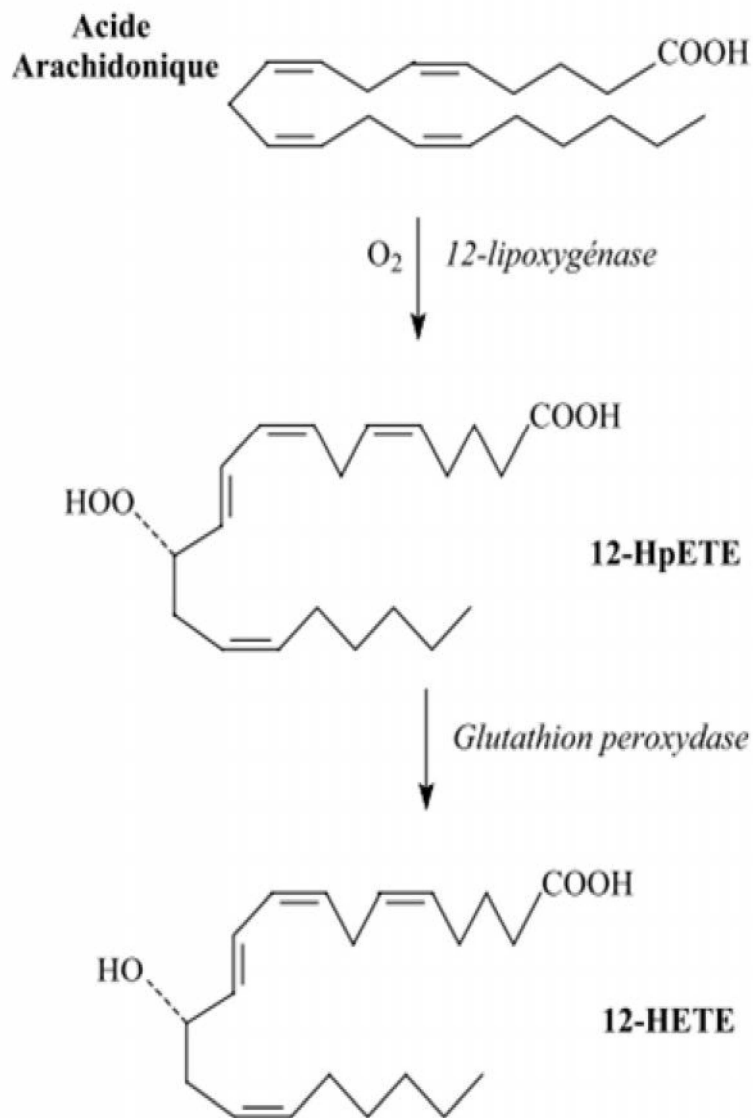


Figure 10 : Cascade du métabolisme de l'acide arachidonique par la voie de la 12-lipoxygénase (Coulon, 2004). *12-HpETE* : acide 12-hydroperoxy-eicosatétraénoïque ; *12-HETE* : acide 12-hydroxy-eicosatétraénoïque.

2.3.4.4. Voie des époxygénases ou cytochrome P450

Des produits d'époxygénase à cytochrome P450 sont formés par l'addition d'un atome d'oxygène au niveau d'une double liaison conduisant à la formation d'époxydes, les HpETE, qui sont ensuite hydrolysés en HETE. Les métabolites formés sont impliqués dans la régulation du transport ionique, dans la sécrétion d'hormones (insuline, glucagon...) et ont des propriétés vasoactives. Ils favorisent la vasorelaxation (Imig *et al.*, 1996) et inhibent l'agrégation plaquettaire (Heizer *et al.*, 1991).

2.4. Implication des plaquettes dans les maladies cardiovasculaires

Les plaquettes sont impliquées dans de multiples pathologies. Les défauts plaquettaires, que ce soit de numération (thrombocytopénie) ou de réactivité, induisent un temps de saignement prolongé et un risque d'hémorragie élevé, ou un risque accru de thrombose occlusive.

L'implication des plaquettes dans les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques, qui demeure la première cause de mortalité mondiale, est l'une des principales raisons de l'intensité des recherches réalisées sur les plaquettes, notamment dans la recherche de nouveaux traitements antiplaquettaires.

2.4.1. Plaquettes et athérosclérose

L'athérosclérose est aujourd'hui considérée comme une maladie inflammatoire chronique (Ross, 1999). Dans ce processus, les plaquettes sont impliquées à la fois dans l'initiation, la propagation et la phase finale de formation du thrombus occlusif (Kaplan et Jackson, 2011). L'athérosclérose est caractérisée par le dépôt, à l'intérieur de la paroi vasculaire, d'une plaque riche en lipides, notamment en LDL et cholestérol, suite à l'inflammation du vaisseau. Contrairement aux cellules endothéliales au repos, l'endothélium inflammé expose des récepteurs et sécrète des médiateurs favorisant son interaction avec les plaquettes ainsi que leur adhérence (Massberg *et al.*, 2002). De plus, cette interaction plaquette/endothélium favorise le maintien de l'activation endothéliale et plaquettaire (Henn *et al.*, 1998), ce qui induit le recrutement de leucocytes par la libération de médiateurs plaquettaires pro-inflammatoires et chimiotactiques, tels que l'inter-leukine-1, le PF4 (Gawaz *et al.*, 2000; von Hundelshausen et Shmitt, 2014). L'adhérence des plaquettes à l'endothélium

induit donc le recrutement de leucocytes et leur activation. Les monocytes activés ainsi que les lymphocytes T migrent au travers de l'endothélium jusqu'à la plaque athérosclérotique, où ils favoriseront sa croissance. Les monocytes se différencient en macrophages, qui se transforment en cellules spumeuses caractéristiques des lésions athérosclérotiques (Aqel *et al.*, 1984). La croissance de cette plaque obstrue peu à peu le vaisseau sanguin et le rigidifie par la formation de cap fibreux (Hatsukami *et al.*, 2000). Lorsque cette plaque se rompt, elle expose une surface et libère dans la circulation son contenu, tout deux pro-thrombogéniques, dans une série d'événements qui induisent la formation rapide d'un thrombus obstruant le vaisseau sanguin. La rupture de cette plaque est donc l'élément déclencheur provoquant l'ischémie des tissus (infarctus) (e.g., infarctus du myocarde) et lors d'incidents cérébro-vasculaires, les deux principales causes de mortalité associées aux maladies cardiovasculaires. Du fait de leur participation à la croissance de la plaque ainsi qu'à la formation finale du thrombus, les plaquettes sont une cible majeure dans le traitement des maladies athérosclérotiques.

2.4.2. Plaquettes et diabète

Le diabète sucré est une maladie qui peut se définir par un excès de glucose dans le sang, entraînant une polyurie. En fait, on distingue deux types de diabètes sucrés. Le type 1 résulte d'une carence majeure de la production d'insuline par les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas. Le diabète de type 2 est caractérisé par une résistance à l'insuline (Rodger, 1991). Il s'accompagne initialement d'une hyperinsulinémie plasmatique qui évolue progressivement vers une hypoinsulinémie par épuisement du pancréas. Le diabète de type 2 est une maladie très répandue qui s'accompagne d'un risque cardiovasculaire élevé. C'est un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés et aussi en voie de développement. Bien que le haut risque cardiovasculaire associé au diabète de type 2 soit multifactoriel, trois causes essentielles peuvent être soulignées : les phénomènes de glycation et d'oxydation, les dyslipoprotéïnémies et l'hyperactivité plaquettaire. L'hyperglycémie entraîne une glucosylation non enzymatique (ou glycation) des protéines par condensation d'une molécule de glucose sur les fonctions amines libres des résidus d'acides aminés (amine N-terminale et amine epsilon des résidus lysine). Les bases de Schiff ainsi formées peuvent subir un réarrangement d'Amadori. Les produits résultants subissent alors de lentes recombinaisons chimiques aboutissant à la formation d'une grande variété de molécules

appelées produits de glycation avancée (Advanced Glycation End-products), doués de différentes propriétés délétères.

Le diabète de type 2 est aussi une situation de stress oxydant dans laquelle on observe une forte oxydation des acides gras polyinsaturés, libres ou estérifiés dans les TG et les PL des cellules. Cette oxydation aboutit à une scission des molécules et entre autres à la production de malone dialdéhyde (MDA) qui peut former des bases de Schiff avec les résidus lysine des protéines selon une réaction similaire à celle décrite ci-dessus pour le glucose. On peut ainsi parler de phénomènes de glycoxydation. Le glucose lui-même peut d'ailleurs s'autoxyder en formant des entités carbonylées (glyoxal, methylglyoxal) capables de réagir avec les protéines, aboutissant ainsi directement à des produits glycoxidés (Jakuš et Rietbrock, 2004). Ces phénomènes de glycoxydation peuvent affecter directement les lipoprotéines et les plaquettes sanguines et ainsi modifier profondément leur métabolisme. Chez les diabétiques de type 1 comme de type 2, les plaquettes sanguines présentent une hyperactivité chronique (production élevée de TXB₂), même en l'absence de complications cardiovasculaires. Cette hyperactivité est associée à un état de stress oxydant (élévation du MDA et diminution de la Vitamine E et de la Glutathion peroxydase), en particulier dans le diabète de type 2. De plus, les plaquettes présentent des défauts d'adhésion et d'agrégation, et une hypersensibilité aux agonistes. Les LDL glyquées sont capables de stimuler les voies d'activation plaquettaire (Takeda *et al.*, 1992 ; Ferretti *et al.*, 2002 ; Véricel *et al.*, 2004 ; Watala *et al.*, 2005).

2.4.3. Plaquettes et stress oxydant

Les plaquettes, à leur tour, sont capable de produire, dans un état de stress (e.g..diabète, dyslipidémie) des dérivés réactifs de l'oxygène ou « Reactive Oxygen Species (ROS) ». L'activation des plaquettes par des agonistes s'accompagne d'une consommation accrue d'oxygène et une augmentation transitoire du glutathion oxydé (Burch et Burch, 1990). Les plaquettes quiescentes ou activées génèrent des anions superoxyde (Pignatelli *et al.*, 1998) et des radicaux HO (Pratico *et al.*, 1999). Les sources des ROS incluent la cycloxygénase, 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 ROS modulent les fonctions plaquettaires. Il a été montré que les plaquettes exposées aux ROS générés par le système xanthine/xanthine oxydase s'activent 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, l'enzyme anti oxydante super oxyde dismutase inhibe l'adhésion et l'agrégation de plaquettes stimulées par la thrombine (Salvemini *et al.*, 1989).

Des concentrations micromolaires de H₂O₂ stimulent l'agrégation plaquettaire en augmentant la formation de GMPc via la guanylate cyclase, alors que des concentrations millimolaires de H₂O₂ l'inhibent (Rodevin *et al.*, 1976 ; Ambrosio *et al.*, 1994). D'ailleurs, l'agrégation plaquettaire induite par le collagène est associée à une production de H₂O₂ plaquettaire qui pourrait agir comme un messenger 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 GPIIbIIIa indispensable à l'adhésion et l'agrégation plaquettaire (Irani *et al.*, 1998). Des concentrations nanomolaires de 12-HpETE potentialisent l'agrégation des plasuettaires stimulées par le collagène et activent la cascade enzymatique de l'ARA (p38 MAPK, cPLA₂, PGHS) (Calzada *et al.*, 2001 ; Coulon *et al.*, 2003).

Du fait de leur participation à la croissance de la plaque ainsi qu'à la formation finale du thrombus, les plaquettes sont une cible majeure dans le traitement des maladies athérosclérotiques. En effet, les traitements antiplaquettaires associés aux traitements anticoagulants sont très couramment utilisés, de manière préventive et continue, chez les personnes à haut risque, ou pour la dissolution du thrombus formé suite à un accident cardiovasculaire. Les traitements antiplaquettaires essentiellement utilisés sont l'aspirine et les thienopyridines. L'aspirine inhibe de façon irréversible les cyclooxygénases par acétylation, notamment la Cox-1, qui est nécessaire à la biosynthèse de TXA₂ par les plaquettes. Les inhibiteurs de P2Y₁₂, notamment le Clopidogrel (Hollopeter *et al.*, 2001), bloquent ce récepteur de manière irréversible (Savi et Herbert, 2005). Cependant, le Clopidogrel est une pro-drogue, qui doit d'abord être métabolisée par le foie pour être active, ce qui leur confère une efficacité très variable d'un individu à l'autre (Savi et Herbert, 2005; Tantry *et al.*, 2012). Les intolérances et la résistance à ces deux types de traitements,

observées chez certains patients (Linden *et al.*, 2012), démontre le besoin de mettre au point d'autres inhibiteurs de la fonction plaquettaire.

3. Le stress oxydant

Au sein des systèmes biologiques, un déséquilibre entre des systèmes oxydants et antioxydants en faveur des pro-oxydants peut survenir, conduisant à ce que l'on appelle communément le stress oxydant. Il en résulte des processus d'oxydo-réduction mettant en jeu l'oxygène, et conduisant à la production excessive d'intermédiaires réactionnels appelés espèces réactives du dioxygène (ROS).

3.1. Notion des radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires ou non appariés sur leurs orbitales électroniques externes. La présence de cet électron célibataire non compensé, confère souvent à ces espèces, une grande instabilité. Elles vont tenter de récupérer des électrons sur d'autres molécules biologiques en entrant en réaction avec ces molécules dans des processus le plus souvent non spécifiques, ce qui rend, donc, leur durée de vie en solution très courte (Halliwell et Chirico, 1993). Ces propriétés chimiques rendent les radicaux libres fortement réactifs. La réactivité varie d'un radical libre à un autre et dépend de leur environnement. Il existe majoritairement trois grandes classes des espèces réactives :

- Les dérivés réactifs du dioxygène (reactive oxygen species, ROS) sont pour la plupart des radicaux chimiques issus de la réduction incomplète du dioxygène, ils regroupent : des radicaux oxygénés caractérisés par un électron non apparié (l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, les radicaux hydroxyle HO^{\cdot} , peroxyde ROO^{\cdot} et alkoxyde RO^{\cdot}) ; et des dérivés du dioxygène non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2) ou l'ozone (O_3) fortement oxydants et/ou facilement convertis en radicaux libres.

- Les espèces réactives de l'azote (reactive nitrogen species, RNS) qui donnent entre autre des peroxynitrites ($ONOO^-$) et du monoxyde d'azote (NO^{\cdot}).

- Les espèces réactives du chlore (reactive chlorine species, RCS) comme l'acide hypochlorique ($HOCl$).

Les ROS, en particulier représentent une très forte réactivité vis-à-vis de certaines molécules biologiques. Ils sont capables d'oxyder les protéines, l'ADN et les lipides

membranaires des cellules (peroxydation des lipides membranaires). Ils sont associés à plusieurs pathologies notamment l'athérosclérose et les complications métaboliques du diabète.

3.2. Production des radicaux libres

Les ROS sont généralement produites par le métabolisme aérobie des cellules. Ils sont principalement formés d'une manière endogène, comme des sous-produits des chaînes de transport des électrons de la respiration cellulaire dans les mitochondries (Halliwell et Chirico, 1993). Le précurseur des ROS, l'anion superoxyde, est formé après réduction de l'oxygène par un électron et en présence d'un cofacteur, le NADPH. Cet anion est très instable et peut traverser la membrane plasmique (Mao et Poznanky, 1992). Les différentes enzymes impliquées dans la production des ROS sont :

- la NAD(P)H oxydase et d'autres enzymes d'oxydation localisées dans les cellules phagocytaires, les fibroblastes, les cellules musculaire lisse et les cellules endothéliales (Halliwell et Cross 1994) ;
- la xanthine oxydase qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine ainsi que l'oxydation de la xanthine en acide urique;
- les cycloxygénases et les lipoxygénases impliquées dans la synthèse des leucotriènes et des prostaglandines, qui ont des fonctions dans la médiation de l'inflammation et la régulation de la tonicité vasculaire et l'activation des plaquettes sanguines; certains d'entre eux sont capables de participer au phénomène de l'oxydation des LDL (Stocker *et al.*, 1991) ;
- les oxydes nitriques synthases qui synthétisent l'oxyde nitrique, un radical libre présent dans la circulation sanguine ;
- les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450) et celles de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie (Cai et Harrison, 2000). Les réactions d'auto-oxydation de certaines molécules actives comme les catécholamines, tétrahydrofolates, quinones, ou les flavines produisent aussi des radicaux libres capables d'initier des réactions oxydatives (Halliwell et Cross, 1994).

3.3. Rôle physiologique des espèces réactives

Les espèces réactives générées par les cellules vasculaires ont longtemps été considérées comme des produits toxiques. Cependant, il est apparu plus récemment que les ROS, lorsqu'elles sont formées en faibles concentrations, elles protègent, régulent la cellule et permettent de maintenir une certaine homéostasie de l'état redox de l'organisme. Lorsqu'elles sont produites dans un compartiment cellulaire spécifique, elles peuvent participer au fonctionnement de certaines enzymes, intervenir dans la défense immunitaire, agir en tant que second messager cellulaire, ou bien intervenir dans des voies de transduction du signal et ainsi réguler les fonctions cellulaires (Griendling *et al.*, 2000 ; Dikalov *et al.*, 2011).

3.4. Les cibles des dérivés actifs du dioxygène

3.4.1. Les cibles lipidiques

Les acides gras polyinsaturés représentent les cibles privilégiées des ROS radicalaires en raison de leurs hydrogènes bis-allyliques facilement oxydables. Plus l'acide gras présente des insaturations, plus il est susceptible d'être peroxydé, c'est à dire dégradé par un processus oxydant non enzymatique.

3.4.1.1. La peroxydation non enzymatique

La lipoperoxydation non enzymatique est un processus oxydatif portant essentiellement sur les acides gras insaturés. Le mécanisme radicalaire comporte trois étapes: la phase d'initiation, la propagation et la terminaison. La phase d'initiation consiste en la formation d'un radical d'acide gras R^\bullet à partir d'un acide gras RH par départ d'un atome d'hydrogène (H^\bullet). Cette désydrégénéation peut être provoquée par une molécule oxydée sous forme radicalaire tel que HO^\bullet ou HOO^\bullet . Le radical lipidique R^\bullet subit ensuite un réarrangement moléculaire pour donner un radical avec une structure de diène conjuguée, plus stable, qui peut réagir avec une molécule d' O_2 et former un radical peroxy (ROO^\bullet). Ce radical est suffisamment réactif pour amorcer une nouvelle désydrégénéation à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction. L'hydroperoxyde lipidique ROOH formé au cours de la réaction peut également être oxydé en présence de fer ferreux Fe^{2+} ou d'ions cuivrique Cu^{2+} et entraîner la formation d'alcanes volatiles rapidement éliminés au cours de la respiration (Favier, 2003) ou des aldéhydes comme le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal

(4-HNE). Ces agents alkylants très puissants peuvent former des adduits avec les protéines, les acides nucléiques et les lipides. L'attaque des lipides concerne les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. L'oxydation des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation des LDL oxydés qui peuvent être captés par les macrophages et former des dépôts lipidiques responsables de la formation de la plaque d'athérome, tandis que l'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane et perturbe le fonctionnement des récepteurs et transporteurs se trouvant à leur surface (Favier, 2003). La réaction en chaîne peut être heureusement interrompue (phase de terminaison) par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radicalaire avec une molécule antioxydante.

3.4.1.2. La peroxydation enzymatique

Les acides gras polyinsaturés sont libérés des phospholipides membranaires grâce à des phospholipase A et subissent une réaction enzymatique de lipooxygénases ou de cyclooxygénase pour former, en combinaison avec l'oxygène, des hydroperoxydes d'acides gras (Delarue, 2000). Le mécanisme de la formation de ces hydroperoxydes et leurs fonctions biologiques ont été détaillés précédemment dans le chapitre 2 (paragraphe 2.3.4).

3.4.2. Les cibles non lipidiques

La production excessive de radicaux libres est responsable de lésions directes de plusieurs autres molécules biologiques (l'ADN, les protéines et les glucides). Les dommages médiés par le stress oxydant au niveau de l'ADN sont de cinq types : l'oxydation des bases, la formation des sites abasiques, des adduits intra-caténaux, des cassures des brins et des pontages ADN-protéines (Cadet *et al.*, 2002).

L'oxydation des protéines passe par l'ajout d'un groupement carbonyle sur la protéine (Levine, 2002). Ces groupements carbonyle peuvent être générés soit par oxydation directe des acides aminés, soit par conjugaison avec des produits de peroxydation lipidique ou encore par glycation. Ces modifications conformationnelles induisent des pertes de fonctions et stimulent l'activité protéolytique du protéasome (Levine, 2002).

3.5. Le rôle du stress oxydatif dans le développement des maladies cardiovasculaires

Une production importante des ROS dans les cellules conduit à des perturbations qui se répercutent au niveau tissulaire. Plusieurs études ont montré l'implication des ROS dans l'installation et le développement de certaines pathologies, notamment la dysfonction endothéliale, l'hypertension artérielle, l'athérogénèse, le diabète, l'obésité et l'hyperagrégation plaquettaire (Coulon, 2004 ; Furukawa *et al.*, 2004 ; Mueller *et al.*, 2005). Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré, dans le cas d'hypertension, que la formation en excès des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote est associée à la formation de lésion vasculaire et à des défauts fonctionnels (Zafari *et al.*, 1998 ; Wattanapitayakul et Bauer, 2001). Dans le cas de l'athérosclérose, la 15-lipoxygénase est impliquée dans l'oxydation des LDL dans les premiers stades de l'athérogénèse (Kuhn *et al.*, 1994), alors que l'oxydation non enzymatique de l'acide arachidonique devient plus importante dans les derniers stades de la formation de la plaque fibreuse (Kuhn *et al.*, 1994). Ensuite, des éléments thrombogènes de la plaque sont libérés et activent les plaquettes circulantes. Il en résulte la formation d'un thrombus par la cascade de l'activation des plaquettes sanguines (Sorg, 2004). Coulon (2004), a montré que l'accumulation du 12-HpETE, hydroperoxyde lipidique majeur des plaquettes, est responsable à l'hyperfonctionnement plaquettaire observé dans certaines situations physiopathologiques telles que le diabète et le vieillissement.

3.6. Le système de défense antioxydant

Le stress oxydatif est impliqué dans un large spectre de pathologies qui ont un impact élevé sur la santé des populations. Il est souvent initié et propagé par une surproduction d' $O_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 et par leur conversion en de puissants oxydants qui sont très dommageables pour les cellules. Cependant, en guise de protection, les cellules possèdent des systèmes de défense endogènes enzymatiques et exogènes non-enzymatiques qui, de manière générale, suffisent à renverser le stress oxydant résultant du métabolisme aérobie et appelés antioxydants.

Un antioxydant désigne toute substance, qui quand elle est présente en des concentrations faibles, comparées à ceux d'un substrat oxydable, retarde de façon significative, ou empêche, l'oxydation de ce substrat (Halliwell et Gutteridge, 1995 ; Gutteridge et Halliwell, 2000). Les antioxydants biologiques sont des substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères possibles des processus ou

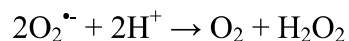
réactions engendrant une oxydation excessive (Ostrakhovitch et Afanas'ev, 2001 ; Boldyrev, 2005).

Pour assurer sa défense contre les attaques de radicaux libres, l'organisme possède deux grands systèmes de protection : les enzymes détoxifiantes et des antioxydants non enzymatiques intra et extracellulaires qui interviennent selon un ordre hiérarchique (Buettner, 1993).

3.6.1. Les antioxydants enzymatiques

3.6.1.1. Les superoxyde dismutases (SOD)

Les SOD sont des métallo-enzymes catalysant l'élimination par dismutation de l'anion superoxyde avec comme produit le peroxyde d'hydrogène, composé stable et moins toxique, et l'oxygène moléculaire selon la réaction suivante : (Krinsky, 1992)



Elles constituent une première ligne de défense très efficace en empêchant l'accumulation cellulaire de superoxyde. Le peroxyde d'hydrogène généré peut être ultérieurement catabolisé par la catalase et les glutathion peroxydases. Trois isoenzymes ont été décrites chez le mammifères (Fridovich, 1995) catalysant la même réaction mais différent par leurs poids moléculaire: SOD à cuivre/zinc présente dans le cytoplasme, la SOD à manganèse présente dans les mitochondries et une SOD extracellulaire caractérisée au niveau de la Lymphe et du plasma: c'est aussi une SOD à cuivre/zinc.

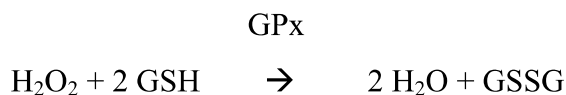
3.6.1.2. La catalase

La catalase est une protéine hémique présente principalement dans les peroxysomes [riches en oxydases génératrices de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)] et les hématies. Cette compartimentation l'empêche d'être un accepteur pour l' H_2O_2 formé dans le cytosol et les mitochondries. Son rôle dans l'élimination de l' H_2O_2 peut être limité dans certaines conditions; elle sert d'appoint à l'action de la glutathion peroxydase (GSH-Px) et catalyse la transformation de H_2O_2 en oxygène et en eau.

Ces catalases permettent de soustraire l'H₂O₂ à la réaction d'Haber-Weiss et d'éviter ainsi la genèse du radical hydroxyle. L'activité de la catalase est très faible dans le myocarde (Scholz *et al.*, 1997).

3.6.1.3. Les Glutathion peroxydases

Les systèmes enzymatiques liés au GSH s'avèrent une ligne de défense qui complète les catalases pour éliminer le H₂O₂. De plus, ils permettent l'élimination de divers peroxydes lipidiques en leurs composés hydroxyles correspondants en utilisant du glutathion ou des agents réducteurs équivalents (Gladyshev *et al.*, 1999 ; Arthur, 2000) comme co-substrats. La réaction mise en jeu est la suivante:



Plusieurs types de GPx ont été décrits:

- Deux GPx intracellulaire, la GPx1 ou cGPx pour l'enzyme cellulaire cytosolique et la GPx4 ou PHGPx (Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxydase) spécifique des hydroperoxyde contenus dans les phospholipides.
- Une Gpx plasmatique ou GPx3.
- Une forme tissulaire spécifique gastro-intestinale ou GPx2.

3.6.2. Les molécules antioxydantes

Dans le paragraphe précédent a été présenté le fait que les antioxydants enzymatiques, endogènes, sont absolument essentiels pour maintenir la vie cellulaire optimale. Cependant, exposé à un nombre de facteurs de risque, provoquant le stress oxydatif, (alcool, médicaments, froid, infections, mal nutrition, toxines, radiations...) le système de protection enzymatique seul est insuffisant pour neutraliser le stress oxydatif, dans ce cas, la protection dépend de l'adéquation de certaines substances qui ont la propriété de piéger et de détruire les ROS. Il s'agit de composés facilement oxydables présents dans le cytoplasme (glutathion, acide ascorbique): hydrosolubles, ou dans les membranes cellulaires (α -tocophérol, caroténoïdes): liposolubles.

3.6.2.1. Antioxydants liposolubles

- **Vitamine E:** regroupe l'ensemble des différents tocophérols (la molécule de tocol constituant la structure de base), et différents tocotriénols (Feki *et al.*, 2001). Elle est constituée d'un noyau 6-chromanol sur lequel est fixée une chaîne phytyle entièrement saturée ou insaturée pour le tocotriénols. Les différentes formes de Vitamine E représentent une activité antioxydante relativement similaire, cependant l'organisme préfère l' α -tocophérol qui est l'isomère le plus abondant. Les différents tocophérols (α , β , δ , γ) se distinguent entre eux par le nombre et la situation des groupements méthyle fixés sur le cycle phénolique. La chaîne aliphatique confère à la Vitamine E sa liposolubilité et permet son incorporation dans les membranes cellulaires. La Vitamine E n'est synthétisée que dans les plantes. Parce que l'être humain n'est pas capable de synthétiser sa propre Vitamine E, celle-ci doit être apportée par l'alimentation. Elle est présente dans les huiles végétales, les pépins, le germe de blé. Les huiles végétales (huile de tournesol, huile d'argan, huile d'olive) représentent une source importante de cette molécule antioxydante naturelle. L'activité antioxydante de la Vitamine E intervient par sa capacité à piéger les radicaux peroxydes et alkoxydes en interrompant la propagation de la chaîne des réactions radicalaires. Les travaux de Wu *et al.* (2005) ont montré que la Vitamine E joue ainsi un rôle clé dans la disponibilité de l'ARA en régulant l'activité de la PLA₂ cytosolique.

- **Les caroténoïdes:** sont des composés pigmentés présents dans certains fruits et légumes. Les caroténoïdes, dont la vitamine A, forment une grande famille de polyènes conjugués pigmentaires aux capacités antioxydantes similaires à celle des tocophérols. Ils sont d'excellents piègeurs d'espèces radicalaires (peroxydes et oxygène singulet) grâce à leur système conjugué de doubles liaisons (Krinshy et Yeum, 2003).

3.6.2.2. Les antioxydants hydrosolubles

- **La Vitamine C (acide ascorbique):** apportée par l'alimentation chez l'Homme, est présente dans la cellule au niveau du cytoplasme et des lysosomes. Elle peut directement agir avec les ROS comme HO \cdot et O₂ \cdot^- et former le radical semidésydroascorbate peu réactif, qui est rapidement oxydé en acide désydroascorbique. La Vitamine C inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la Vitamine E. Cependant, à forte dose et en présence de quantités importantes de fer, elle peut devenir pro-oxydante.

- **Le Glutathion:** un tripeptide qui joue un rôle important comme antioxydant endogène et dans le maintien de l'équilibre d'oxydo-réduction. En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant résulte principalement de sa fonction de cosubstrat des GPx et des GSH-S-transférases. Mais, il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydant comme la Vitamine C, la Vitamine E et les SOD.

4. Le syndrome métabolique

4.1. Définition

Le syndrome métabolique associe des anomalies morphologiques, physiologiques et biochimiques qui évoluent en fonction du temps, prédisposant le sujet atteint à des complications cardiaques, notamment l'athérosclérose. Décrit dans la première partie du XX^{ème} siècle, sa définition et sa sémantique ont évolué en fonction des connaissances, avec d'une part une caractérisation précise du « syndrome X » par Reaven, en 1988 qui regroupait pour la première fois sous un même terme un ensemble d'altérations représentant des facteurs de risque cardiovasculaires incluant une résistance à l'insuline, une hyperinsulinémie, une intolérance au glucose ou un diabète, une hypertension artérielle et une hypertriglycéridémie.

Depuis, plusieurs définitions (Tableau III) se sont succédées, qui mettent chacune en avant des paramètres différents, l'hyperinsulinémie, l'obésité androïde ou encore l'insulinorésistance. Parmi les nombreuses définitions proposées, deux, très différentes, font référence : celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (revue en 1999) et celle du *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III) (2001).

Tableau III: Définitions du syndrome métabolique

Etude	Définition
Organisation Mondiale de la Santé	Diabète de type 2 ou tolérance au glucose diminuée + Au moins 2 des 4 anomalies suivantes :
(Alberti et Zimmet, 1998)	<ul style="list-style-type: none"> - Obésité : IMC > 30 ou ratio taille/hanche > 0,9 pour les hommes et > 0,85 pour les femmes - Dyslipidémie : TG ≥ 1,7 mM ou HDL < 0,9 mM - Hypertension : PA ≥ 160/90 mm Hg - Microalbuminurie : taux d'excrétion d'albumine > 20 mg/min
National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel (ATP) III (2001)	Au moins 3 des 5 anomalies suivantes: <ul style="list-style-type: none"> - Obésité abdominale : tour de taille ≥ 102 cm chez l'homme et 88 cm chez la femme - Hypertriglycéridémie : TG ≥ 1,7 mM - HDL < 1 mM chez l'homme et 1,3 chez la femme - Hypertension : PA ≥ 130/85 mm Hg - Glycémie à jeun > 6,1 mM

American Heart Association (Grundy <i>et al.</i>, 2004)	Au moins 3 des 5 anomalies suivantes: - Obésité abdominale : tour de taille ≥ 102 cm chez l'homme et 88 cm chez la femme - Hypertriglycéridémie : TG $\geq 1,7$ mM - HDL < 1 mM chez l'homme et 1,3 chez la femme - Hypertension : PA $\geq 130/85$ mm Hg - Glycémie à jeun $> 5,6$ mM
Fédération Internationale du Diabète (Alberti <i>et al.</i>, 2005)	Obésité abdominale : tour de taille ≥ 94 cm chez l'homme et 80 cm chez la femme + Au moins 2 des 4 anormalités suivantes : - Hypertriglycéridémie : TG $\geq 1,7$ mM - HDL < 1 mM chez l'homme et 1,3 chez la femme - Hypertension : PA $\geq 130/85$ mm Hg - Glycémie à jeun $> 5,6$ mM
Définition unifiée (Eckel <i>et al.</i>, 2010)	Au moins 3 des anormalités suivantes : - Obésité abdominale : dépendante des populations et des pays - Hypertriglycéridémie : TG $\geq 1,7$ mM - HDL < 1 mM chez l'homme et 1,3 chez la femme - Hypertension : PA $\geq 130/85$ mm Hg - Glycémie à jeun $> 5,5$ mM

4.2. Epidémiologie du syndrome métabolique

La suralimentation et la sédentarité sont les deux principaux facteurs à l'origine du syndrome métabolique et l'augmentation de leur incidence explique la prévalence croissante du syndrome métabolique. Les données disponibles à l'échelle mondiale indiquent que 20 à 30% de la population adulte présente un syndrome métabolique (Grundy, 2008). La prévalence de ce syndrome augmente de façon continue en parallèle avec la prévalence croissante de l'obésité. Il touche 10 % des adultes en France, et sa prévalence croissante (Huang., 2009) en fait un enjeu majeur de santé publique. Toutefois, la prévalence varie selon la définition utilisée, l'âge de groupe étudié, la localisation géographique et les caractéristiques de la population étudiée.

En 2003, l'OMS estimait à 171 millions le nombre de personnes adultes atteintes de syndrome métabolique dans le monde, soit 2,8 % de la population. Les données épidémiologiques obtenues en utilisant les différentes définitions montrent que le syndrome métabolique est très fréquent, il touche environ une cinquième de la population adulte, il

affecte de la même façon des deux sexes et les différents groupes dans les pays développés et les pays en voie de développement.

4.3. Physiopathologie du syndrome métabolique

L'insulino-résistance semble présente le cœur des anomalies liées au syndrome métabolique parce qu'elle prédispose au diabète de type 2, aux dyslipidémies qui lui sont associées et à un état pro-inflammatoire, elle n'est toutefois pas directement corrélée à l'hypertension. En revanche, l'obésité représente le facteur important dans l'étiologie du syndrome métabolique, contribuant à l'hyperglycémie, l'hypertension et l'hypercholestérolémie (Stern *et al.*, 2004). Les troubles du métabolisme des lipides sont, quant à eux, à l'origine de l'accumulation de graisse viscérale associée à un excès d'acides gras libres provenant d'une lipolyse élevée dans le tissu adipeux ; la recapture et le stockage d'acides gras libres au niveau hépatique entretient l'évolution du syndrome métabolique en favorisant la résistance périphérique à l'insuline, la production de VLDL et la néoglucogenèse. Ces perturbations du métabolisme des acides gras provoquent également un dysfonctionnement endothélial à l'origine du processus d'athérogenèse (Lau *et al.*, 2005). Au-delà de ses rôles de stockage de lipides neutres et de source d'acides gras, le tissu adipeux est un organe endocrine et paracrine qui sécrète de nombreuses protéines, les adipokines (TNF α , IL6, adiponectine, leptine...), qui jouent un rôle majeur dans l'homéostasie énergétique et l'inflammation vasculaire, et constituent probablement le lien moléculaire entre obésité et syndrome métabolique : un tel lien pourrait être à l'origine de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans la partie suivante, le rôle de chaque pathologie dans le développement et les complications du syndrome métabolique seront traités.

4.3.1. Syndrome métabolique et la résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline se définit comme étant une diminution de la réponse des tissus cibles à l'hormone, nécessitant des concentrations plus importantes que la normale pour qu'elle exerce son activité.

L'insuline a trois tissus cibles majeurs: le foie, le muscle et le tissu adipeux. L'action de l'insuline est médiée par son récepteur tetramérique exprimé sur les cellules de ces tissus.

La fixation de l'insuline sur son récepteur, à activité tyrosine kinase, permet de déclencher une série de réactions, notamment la phosphorylation des résidus tyrosines situés sur des protéines intracellulaires cibles de type IRS 1-6 (*insulin receptor substrate*). Les protéines IRS, une fois phosphorylés, vont recruter d'autres protéines comme la phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) qui va phosphoryler des lipides membranaires. Cette phosphorylation va permettre l'activation de la phosphatidyl-inositol dépendant kinase I (PKB), qui à son tour va activer la protéine kinase C et la protéine kinase B. Ces deux protéines vont permettre la translocation à la membrane plasmique des vésicules intracellulaires portant les transporteurs de glucose insulino-dépendant (GLUT).

Les mécanismes moléculaires de l'insulino-résistance sont encore mal connus. Plusieurs mécanismes ont été proposés, tels que : la production de l'insuline inactive, des mutations au niveau du récepteur de l'insuline et ses protéines substrats, l'action des antagonistes de l'insuline, mais les défauts de signalisation post-récepteur paraissent être la cause majeure de l'insulino-résistance au niveau des tissus cibles (Meshkani et Adeli, 2009). Des études menées sur des souris IRS-1 KO ont montré l'insulino-résistance chez ce modèle, avec une glycémie normale (Tamemoto *et al.*, 1994). Cependant, le modèle de souris IRS-2 KO développe une hyperglycémie chronique due à une insulino-résistance au niveau hépatique et une défaillance de la sécrétion de l'insuline par les cellules β -Langherans (Withers *et al.*, 1998).

Le foie, un organe cible de l'insuline, joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre énergétique de l'organisme. L'insulino-résistance au niveau hépatique pourra donc avoir des conséquences majeures sur la balance énergétique et le métabolisme lipidique. Au niveau hépatique, l'insuline agit en inhibant la néoglucogenèse et la glycogénolyse tout en favorisant le stockage de glucose sous forme de glycogène (Boden, 2004). Chez les sujets diabétiques, une baisse de l'efficacité de l'insuline au niveau hépatique est observée conduisant à un excès de production de glucose. En outre, l'insulino-résistance se traduit aussi par une dérégulation de la synthèse et du stockage hépatique des triglycérides. Les personnes atteintes de syndrome métabolique et/ou de diabète de type 2 présentent des taux élevés d'acides gras libres au niveau hépatique en raison d'une diminution de l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production et la sécrétion des VLDL (Taghibiglou *et al.*, 2000 ; Kraegen *et*

al., 2001). De plus, l'action de la LPL (Lipoprotéine Lipase) chargée d'hydrolyser les triglycérides contenus dans les VLDL est diminuée chez les sujets obèses (Taskinen, 2003).

4.3.2. Syndrome métabolique et dyslipidémies

Le diabète de type 2 et le syndrome métabolique sont caractérisés par une très grande fréquence des anomalies lipidiques (Laakso, 1996). Il est observé des anomalies quantitatives et qualitatives des lipides (Vergès, 2005). Les principales anomalies quantitatives sont l'hypertriglycémie et la baisse du HDL cholestérol. Les anomalies qualitatives comprennent essentiellement des VLDL de grande taille, un enrichissement des LDL et HDL en triglycérides, une oxydation des LDL et, en cas de diabète, une glycation des apolipoprotéines.

Lorsque les LDL sont en nombre important dans l'organisme, elles ne sont plus catabolisées correctement, ce qui prolonge leur durée de vie dans la circulation. Elles deviennent plus sensibles à l'oxydation par radicaux libres. Ce changement de composition (lipides oxydés) et de forme des LDL permet leur élimination par les macrophages et par conséquent, la formation des cellules spumeuses qui se déposent sur la paroi artérielle.

Lors d'un syndrome métabolique, l'hypertriglycémie peut s'expliquer d'une part par l'augmentation de la production hépatique des VLDL, et plus particulièrement des VLDL à grande taille. Celle-ci semble être liée chez les personnes atteintes du syndrome métabolique et les diabétiques de type 2 à l'excès d'acides gras libres au niveau hépatique et à une résistance à l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production et la sécrétion des VLDL (Figure 11) (Taghibiglou *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'hypertriglycémie pourrait être due au ralentissement du catabolisme des VLDL chez les personnes diabétiques de type 2. D'après Taskinen *et al.* (1992) l'activité de catabolisme de l'enzyme lipoprotéine lipase sur les VLDL diminuerait chez les personnes diabétiques et obèses.

La diminution des HDL en charge du transport du cholestérol retrouvée chez les personnes atteintes du syndrome métabolique et du diabétiques de type 2, est liée à l'accroissement de son catabolisme. D'après Vergès (2007), l'augmentation du catabolisme des HDL-C serait expliquée pour 43% à la réduction de l'adiponectine, hormone sécrétée par le tissu adipeux et pour 19% à l'enrichissement des HDL-C en triglycérides. Même si les

mécanismes d'action de l'adiponectine ne sont pas encore bien connus, sa diminution dans le syndrome métabolique pourrait directement intervenir dans l'accélération du catabolisme du HDL-C. En effet, les études de Vergès (2007) ont montré une forte corrélation négative entre le catabolisme des apolipoprotéines A-I des HDL et le taux plasmatique de l'adiponectine. L'augmentation des lipoprotéines riches en triglycérides (VLDL principalement) chez les personnes atteintes du syndrome métabolique et les diabétiques de type 2 accroît l'activité de la protéine transfert des triglycérides (la Cholesteryl Ester Transfer Protein) entraînant l'enrichissement en triglycérides des HDL et des LDL. Il s'en suit une augmentation de l'activité catabolique de la triglycéride lipase hépatique, expliquant la diminution des HDL et l'apparition des petites et denses LDL (Felber *et al.*, 1987).

Tous ces mécanismes sont à l'origine d'un profil lipoprotéinique hautement athérogène avec des VLDL enrichies en esters de cholestérol, des LDL petites et denses et une diminution des HDL qui vont être facilement éliminées de la circulation.

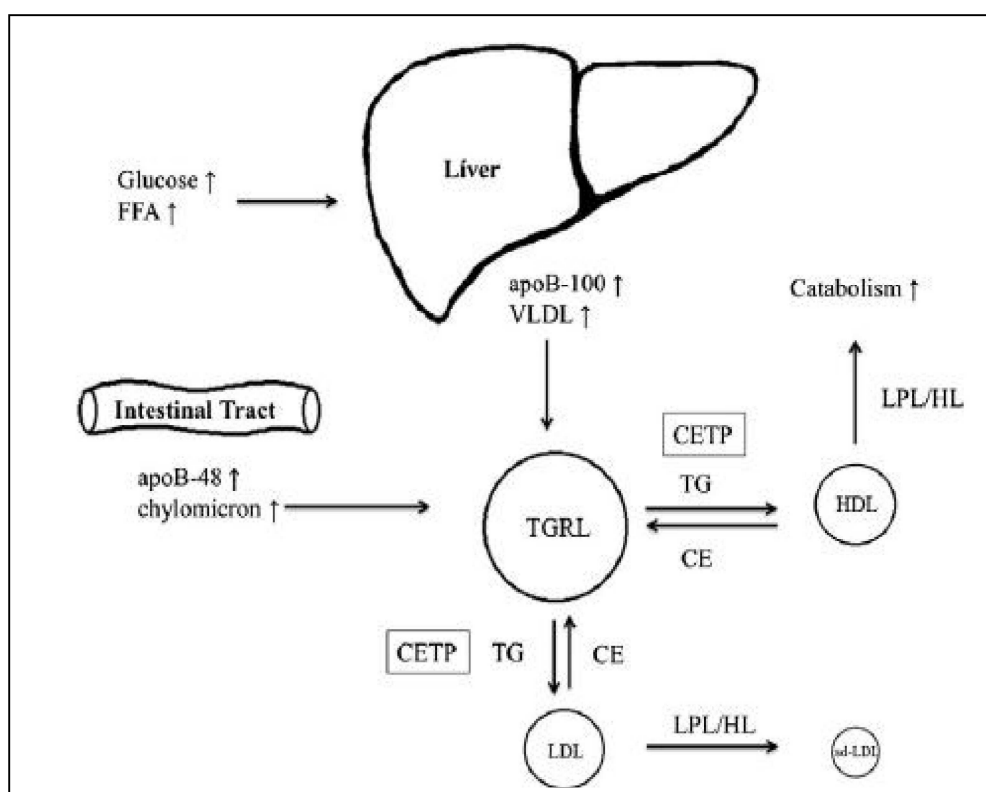


Figure 11 : Principales anomalies lipidiques au cours du diabète de type 2 (Wu et Parhofer, 2014). apoB : apolipoprotéine ; CE : cholesteryl ester ; CETP : cholesterol ester transfert protein ; FFA : acides gras libres ; HDL : lipoprotéine à haute densité ; HL : lipase hépatique ; LDL : lipoprotéine à basse densité ; LPL : lipoprotéine lipase ; TG : triglycérides ; TGRL : lipoprotéine riche en triglycéride.

4.3.3. syndrome métabolique et l'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle est prise en compte dans de nombreuses définitions du syndrome métabolique. l'hyper-insulinémie résultant de la résistance à l'insuline peut rendre compte des mécanismes physiopathologiques conduisant à l'hypertension.

Trois mécanismes, agissant probablement en synergie, sont proposés pour expliquer l'augmentation de la pression artérielle induite par l'insulino-résistance et l'augmentation de l'adiposité: l'activation du système nerveux adrénergique, l'altération du passage ionique transmembranaire, et la stimulation de la réabsorption tubulaire de sodium (De Fronzo *et al.*, 1991).

4.3.4. Syndrome métabolique et stress oxydant

Le stress oxydant est également un facteur de l'apparition d'une insulino-résistance. Il a ainsi été montré qu'un stress oxydant inhibe la captation du glucose dans le muscle et le tissu adipeux via GLUT 4 (Ogihara *et al.*, 2004). Récemment, l'implication des ROS en tant que facteur causal de l'insulino-résistance a été clairement établie (Houstis *et al.*, 2006).

Une élévation de la concentration en insuline, en AGL et/ou en glucides dans le sang augmente la production des ROS, induit un stress oxydant, et active les voies métaboliques génératrices des ROS, ce qui en retour aggrave à la fois l'action et la sécrétion d'insuline, et, de ce fait, accélère l'installation du diabète de type 2 (Figure 12). Enfin, l'attaque radicalaire modifie la transcription des transporteurs du glucose, et la teneur en GLUT-1 est augmenté alors que celle en GLUT-4 est réduite (Bloch-Damti et Bashan, 2005). L'activation de la PKC par des ROS pourrait aussi être impliquée dans l'insulino-résistance. L'activation de la PKC entraîne une phosphorylation des résidus sérine/thréonine des IRS, conduisant à l'inactivation des récepteurs hormonaux (Berti *et al.*, 1994 ; Shulman, 2000 ; Yu *et al.*, 2002) et, inhibant ainsi la transmission du signal insulinique et la capture cellulaire du glucose qui en découle (Kahn, 1992 ; Shulman, 2000 ; Yu *et al.*, 2002). La capacité des ROS à oxyder et endommager l'ADN, les protéines et les lipides ne serait donc pas le seul mécanisme en cause dans la toxicité des ROS, puisque ces derniers seraient aussi capables de fonctionner comme des messagers secondaires et ainsi d'induire des voies de signalisation cellulaires redox-sensibles. L'activation de ces voies de signalisation a été mise en cause dans l'insulino-

résistance, la diminution de sécrétion de l'insuline et les dommages cellulaires responsables des complications cliniques du diabète. Ainsi, la production des ROS, induite par l'élévation de la glycémie et l'hyperlipidémie, joue un rôle clé dans l'insulino-résistance et le dysfonctionnement des cellules β -pancréatiques, par leur capacité à induire l'activation des voies de signalisation redox-sensibles.

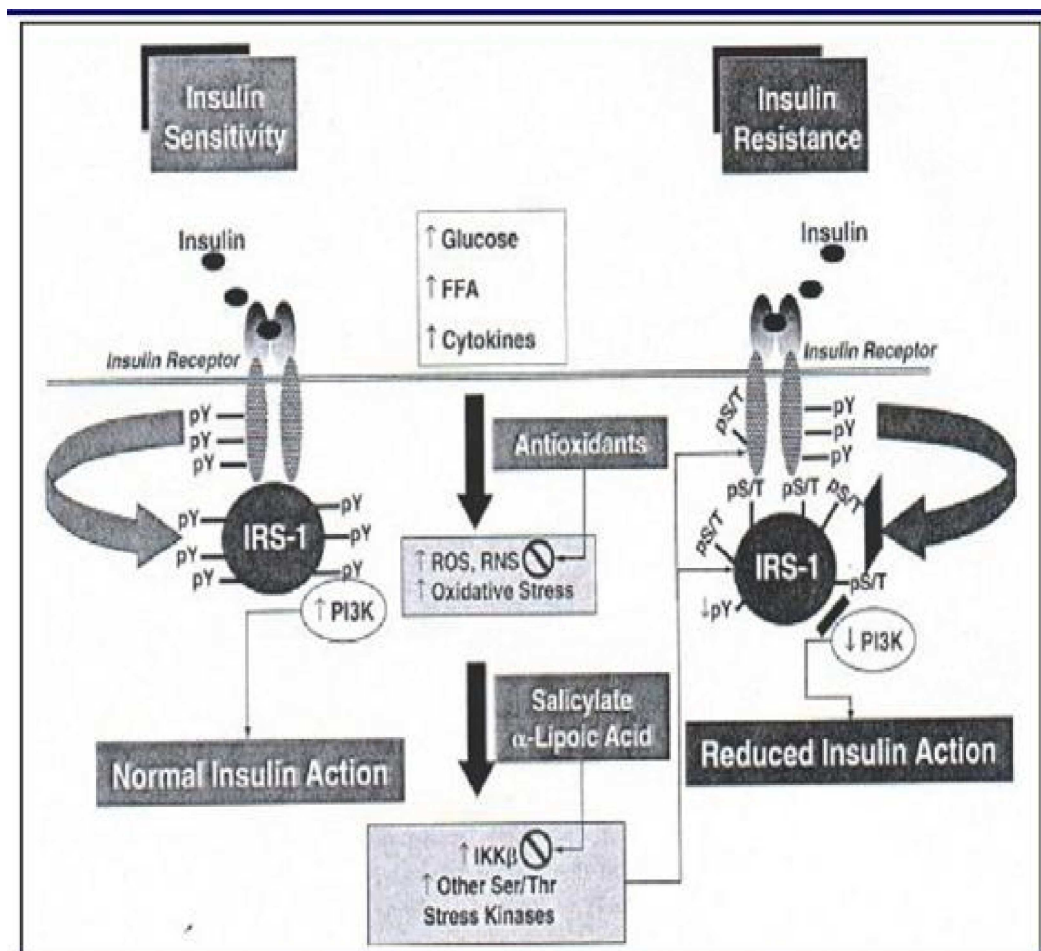


Figure 11 : Stress oxydant et insulino-résistance, les bases moléculaires impliquées (Evans *et al.*, 2005).

4.3.5. Syndrome métabolique et inflammation

De nombreux éléments ont montré que l'activation chronique de voies pro-inflammatoires dans des tissus cibles à l'insuline peut favoriser l'obésité et la résistance à l'insuline. Des niveaux élevés de cytokines ou molécules inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6 et la CRP ont été retrouvés chez des sujets insulino-résistants et diabétiques de type 2

(Shoelson *et al.*, 2006 ; De Luca *et al.*, 2008). En outre, les teneurs de TNF- α sont élevés dans les tissus adipeux et le sang de rongeurs obèses et la neutralisation du TNF- α améliore la sensibilité à l'insuline chez ces animaux (Hotamisligil *et al.*, 1993). Par ailleurs, les acides gras, l'hypoxie du tissu adipeux, le stress au niveau du réticulum endoplasmique, et certaines cytokines peuvent initier des réponses pro-inflammatoires par l'activation des voies de signalisation de type c-Jun N-terminal Kinases (JNK). Ces serine kinases phosphorylent les facteurs de transcription AP1, ce qui active la transcription d'une série de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et, aboutit à une diminution de la sensibilité à l'insuline. En effet, la déficience ou l'inhibition de JNK1 prévient la résistance à l'insuline dans différents modèles murins (Arkan *et al.*, 2005 ; Solinas *et al.*, 2007).

4.3.6. Syndrome métabolique et stéatose hépatique

Dans le cas du syndrome métabolique, la présence d'une stéatose soit simple, soit associée à des signes de fibrose, d'inflammation et de nécrose pouvant évoluer vers la cirrhose, est une observée fréquemment. Cette stéatose a été individualisée sous le terme de NASH (non alcoholic steato-hepatitis). La physiopathologie de la stéatose reste mal connue. L'accumulation des triglycérides intra-hépatocytaires résulte d'un déséquilibre entre les capacités de synthèse des triglycérides (soit à partir du glucose par la voie de lipogénèse soit à partir des lipoprotéines circulantes) et les capacités d'oxydation des acides gras dans l'hépatocyte. L'état d'hyper-insulinémie résultant de l'insulino-résistance et d'hyper-triglycéridémie pourrait être responsable en partie de ce déséquilibre métabolique. Alors que la stéatose simple est un état réversible considéré comme bénin, son évolution vers la fibrose et la cirrhose conduit à une détérioration de la fonction hépatique qui devient irréversible (Figure 13) (Ratziu *et al.*, 2000).

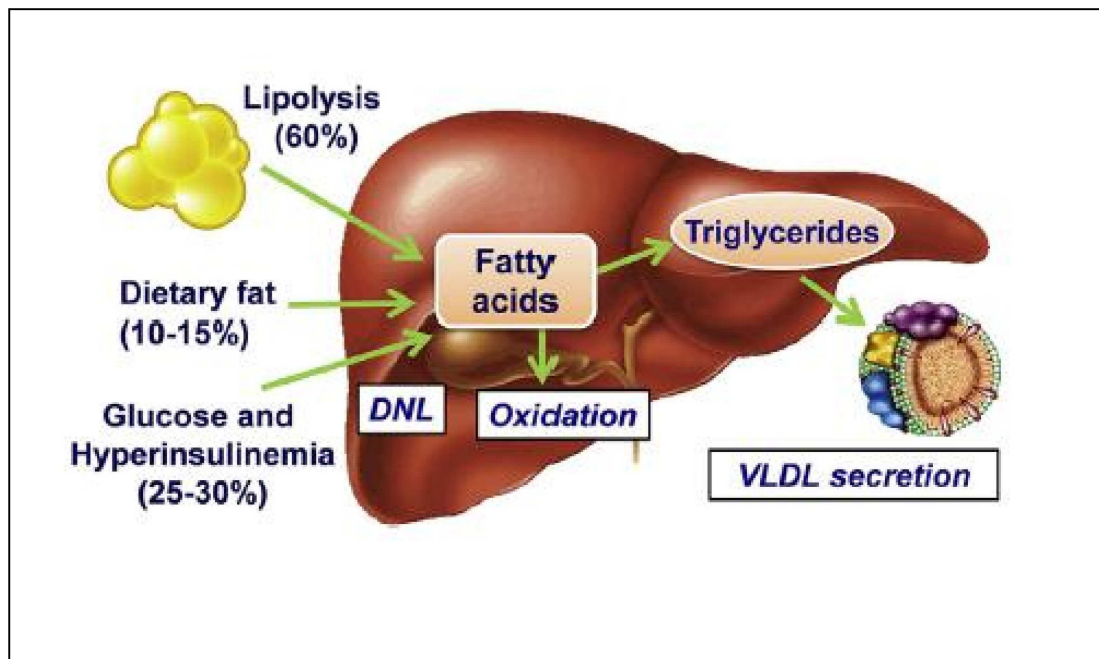


Figure 13 : Mécanisme hypothétique de l'interaction entre insulinorésistance du tissu adipeux et développement de la stéatose hépatique (Ferre et Fougère, 2010).

4.3.7. Syndrome métabolique et hyperactivité plaquettaire

Le rôle des plaquettes sanguines dans le développement des maladies cardiovasculaires, notamment l'athérosclérose a été détaillé précédemment. Dans le cas du syndrome métabolique les plaquettes sanguines présentent une hyperactivité à laquelle contribuent divers facteurs. Il a en effet été démontré que l'insuline *in vivo* diminue l'interaction entre les plaquettes et le collagène. Cet effet bénéfique est absent chez le sujet obèse (Westerbacka *et al.*, 2002). L'hyper-leptinémie présente chez le sujet obèse, augmente l'agrégation plaquettaire (Konstantinides *et al.*, 2001). La dysfonction endothéliale favorise l'activation plaquettaire de même que la dyslipidémie typique du syndrome métabolique. Il a été démontré que le niveau des VLDL typiquement élevés dans le syndrome métabolique induit la libération par les plaquettes de thromboxane A₂ (Englyst *et al.*, 2003). Les LDL oxydés ont un rôle primordiale dans l'hyperactivité des plaquettes Une étude a montré que l'incubation des plaquettes des sujets sains avec les LDL des patients diabétiques augmente l'activité plaquettes (Calzada *et al.*, 2013).

4.4. Le rôle de l'alimentation comme facteur déterminant dans le développement du syndrome métabolique

L'incidence du syndrome métabolique a augmenté à un rythme spectaculaire au cours des dernières décennies dans les pays occidentaux et les pays en voie de développement. Les raisons de cette situation sont complexes, mais le mode de vie moderne et la diminution de l'activité physique sont soupçonnés d'avoir joué un rôle majeur (Zimmet *et al.*, 2001). Les maladies métaboliques induites par une alimentation riche en graisses et/ou en sucres raffinés, constituent aujourd'hui un problème de santé publique majeur. Il est important de souligner qu'un apport en lipides élevé est associé à une augmentation des risques cardiovasculaires. Au cours des dernières décennies, la proportion de la population touchée par l'obésité et les maladies métaboliques qui lui sont associées (diabète, dyslipidémie, etc.) a augmenté de manière importante dans la majeure partie du monde. Cette augmentation rapide ne pouvant correspondre à des modifications génétiques seules, la cause doit être cherchée dans des changements environnementaux. La sédentarité, une alimentation riche en graisses ou en sucres simples sont parmi les causes envisageables. Une augmentation de consommation de lipides est effectivement observée au cours de la dernière partie du XX^{ème} siècle.

4.4.1. Le rôle d'un régime riche en lipides sur l'installation du syndrome métabolique

Le rôle de la qualité et de la quantité des lipides dans le développement des facteurs de risques associés au syndrome métabolique est actuellement bien établi. La première conséquence visible d'un régime hyper-lipidique se manifeste par une surcharge pondérale pouvant aller jusqu'à l'obésité. Les régimes alimentaires contenant plus de 30 % des apports énergétiques sous forme de lipides entraînent en effet le développement d'une obésité chez les rats, les souris, les chiens et les primates, dû à une augmentation de la prise calorique (West et York, 1998 ; Hill *et al.*, 2000). Ainsi, des rats Wistar soumis pendant 4 semaines à un régime composé de lipides comptant pour 60 % des calories totales, ont une masse corporelle 20 % supérieure à celle des rats soumis à un régime standard (< 12 % de lipides) (Bartness *et al.*, 1992).

D'autres études ont montré que la nature des graisses consommées a un impact plus important sur le risque cardiovasculaire que la quantité totale de matières grasses. En effet, les

résultats de la “Nurses Health Study“ ont révélé que l'apport total en matières grasses n'était pas associé à un risque accru de maladies cardiovasculaires (Hu *et al.*, 1997). Cependant, en étudiant seulement les acides gras saturés, ils ont démontré que ce type de matières grasses était corrélé positivement au risque de développer certaines pathologies. Chaque augmentation de 5 % de l'apport énergétique provenant des acides gras saturés est associée à une augmentation de 17 % du risque de maladie coronarienne (Hu *et al.*, 1997). D'autres études ont démontré que l'ingestion chronique d'acides gras saturés est associée à une altération des voies intracellulaires régulant l'action de l'insuline dans différents tissus comme le muscle squelettique et le foie (Shulman, 2000 ; Yki-Jarvinen, 2001). De plus, il a été rapporté que la consommation d'acides gras saturés est associée à une diminution de sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques, induisant ainsi une hyperglycémie (Yki-Jarvinen, 2001). D'autre part, il a été démontré qu'une alimentation riche en acide gras saturés entraîne également une augmentation des taux plasmatiques du cholestérol total et du LDL-C (Kris-Etherton *et al.*, 1997). Par ailleurs, d'autres études ont également mis en évidence une augmentation importante des taux plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires TNF- α (+56 %) et IL-6 (+75 %), après ingestion d'un repas hyper-lipidique riche en acide gras saturés (Nappo *et al.*, 2002). L'ensemble de ces études nous montre que la consommation d'acides gras saturés représente un élément clé dans le développement des facteurs de risques cardiovasculaires en augmentant la cholestérolémie et l'inflammation, ce qui peut participer au développement prématuré de l'athérosclérose.

L'accumulation des triglycérides, issus d'un régime hyperlipidique, dans le tissu adipeux stimule la lipolyse et augmente ainsi la concentration en acides gras libres dans le sang (Nurjhan *et al.*, 1992 ; Lewis *et al.*, 2002). Cette teneur accrue d'acides gras libres plasmatiques provoque alors de nombreux désordres métaboliques dont : i) une dyslipidémie et une stéatose hépatique, ii) une perturbation du métabolisme glucidique et une diminution de la sensibilité à l'insuline dans les tissus cibles, conduisant à la mise en place d'une résistance à cette hormone, iii) une diminution de l'élimination de l'insuline, aggravant l'hyperinsulinémie et, iiiii) un dysfonctionnement des cellule β -pancréatiques (Reaven, 1988 ; Lewis *et al.*, 2002).

Une consommation excessive de lipides va donc induire un déséquilibre du contenu plasmatique en acides gras libres et favoriser l'hyperglycémie. Ces désordres métaboliques ont pour conséquence, une augmentation du stress oxydant dans les tissus cibles (Paolisso *et al.*,

1996 ; Bakker et Gibbons, 2000 ; Rösen *et al.*, 2001 ; Brownlee, 2001 ; Bonnefont-Rousselot, 2002 ; Evans *et al.*, 2005). La teneur accrue d'acides gras libres plasmatiques s'accompagne d'une accumulation d'acyl-CoA à chaîne longue (LC-CoA) dans les tissus, due à une altération de l'oxydation des lipides (Prentki et Corkey, 1996 ; Laybutt *et al.*, 1999 ; Perez-Carreras *et al.*, 2003). Différentes études montrent que les LC-CoA inhibent l'ANT "Adenine Nucleotide Translocator", entravant l'entrée d'ADP dans la mitochondrie (Paulson *et al.*, 1984). La faible concentration en ADP intra-mitochondriale ralentit alors le processus d'oxydation phosphorylante avec pour conséquence une diminution de la respiration mitochondriale et une augmentation de la production de ROS (Boveris et Chance, 1973 ; Korshunov *et al.*, 1997 ; Barja, 2002). Dans le muscle squelettique et le foie de rats soumis à un régime hyperlipidique, la respiration mitochondriale (état 4 et 3) est ainsi diminuée comparativement à celle de rats nourris avec un régime standard (Iossa *et al.*, 2000 ; Iossa *et al.*, 2003). Cette diminution de la capacité d'oxydation phosphorylante est également révélée par la réduction de l'expression de gènes des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I, II, III et IV) ainsi que de leur activité (Simoneau *et al.*, 1999 ; Perez-Carreras *et al.*, 2003 ; Sparks *et al.*, 2005).

Parallèlement, la concentration élevée en glucose plasmatique due à l'augmentation des teneurs en acides gras libres plasmatiques, active la glycolyse et stimule l'oxydation du pyruvate qui s'accompagne d'une augmentation du potentiel redox (NADH/NAD⁺), et donc de la production de ROS. Une étude a montré que l'incubation des cellules endothéliales aortiques dans un milieu hyperglycémique (30 mM de glucose) augmente de 3 fois la production de ROS par rapport aux mêmes cellules incubées dans un milieu normoglycémique (5 mM de glucose) (Nishikawa *et al.*, 2000). De plus, il est admis que la surproduction mitochondriale de ROS induite par la dyslipidémie et l'hyperglycémie déclenche une cascade de réactions amplifiant le niveau de stress oxydant à travers l'augmentation : i) de l'auto-oxydation du glucose, ii) de la glycation des protéines, iii) de la voie des polyols, iiiii) de l'activité de la Protéine Kinase C (PKC), ainsi que iiiiii) l'inhibition de la voie des pentoses phosphates.

Différentes études ont montré que les ROS favorisent l'auto-oxydation du glucose et la glycation des protéines (Wolff et Dean, 1987 ; Hunt *et al.*, 1988). Mais ils altèrent également le métabolisme du glucose en inhibant la glycolyse par un rétrocontrôle négatif sur la

glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Leverve, 2003). Cette diminution d'activité de la GAPDH entraîne une accumulation des trioses phosphates qui va augmenter la formation d'AGEs (Advanced Glycation End) et de diacylglycérol (DAG) (Brownlee, 2001). Les AGEs sont impliqués dans divers processus aggravant le stress oxydant, notamment l'activation de la NADPH oxydase (Wautier *et al.*, 2001) et la peroxydation lipidique (Yan *et al.*, 1994). Le DAG, quant à lui, active différentes réactions en chaîne dont celle de la PKC qui, entre autre, stimule la NADPH oxydase (Inoguchi *et al.*, 2000). Les résultats de Nishikawa *et al.* (2000) confirment ce lien entre la production mitochondriale de ROS, la glycation des protéines et l'activation de la voie PKC-dépendente. L'inhibition de la voie glycolytique par les ROS décrite précédemment engendre également une accumulation du glucose intracellulaire. Or, une concentration élevée de glucose active la voie des polyols (Brownlee, 2001) et inhibe la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) qui est la première étape de la voie des pentoses phosphates (Zhang *et al.*, 2000). L'inhibition de la voie des pentoses phosphates entraîne également une réduction de la production de NADPH. Ainsi, la quantité de NADPH disponible pour régénérer le GSSG en GSH est largement diminuée, réduisant considérablement le système de défense antioxydante non enzymatique (GSH) (Paolisso *et al.*, 1996 ; Lee et Chung, 1999 ; Maddux *et al.*, 2001 ; Dincer *et al.*, 2002). Des diminutions en α -tocopherol (vitamine E) et en enzymes antioxydantes (GPx, GR et Cu/Zn SOD, Mn-SOD) sont également observées (Dincer *et al.*, 2002 ; Sreekumar *et al.*, 2002 ; Roberts *et al.*, 2002 ; Aliciguzel *et al.*, 2003).

La consommation d'un régime hyperlipidique, engendre des dégâts cellulaires comparables à ceux provoqués par les ROS, à savoir une augmentation de la peroxydation lipidique, de l'oxydation des protéines et des dommages de l'ADN (Paolisso *et al.*, 1996 ; Lee et Chung, 1999 ; Sreekumar *et al.*, 2002 ; Roberts *et al.*, 2002 ; Evans *et al.*, 2003). Cependant, Ochoa *et al.* (2003) montrent que le degré de peroxydation lipidique dépend de la composition lipidique du régime. La peroxydation lipidique est en effet plus marquée chez des rats soumis à un régime riche en huile de tournesol (principalement constituée d'acides gras polyinsaturés) que chez ceux nourris avec un régime riche en huile d'olive (acides gras monoinsaturés). Ceci s'explique par le fait que la composition membranaire est modifiée en fonction de la nature des acides gras proposés (Barzanti *et al.*, 1994 ; Mataix *et al.*, 1998 ; Quiles *et al.*, 2001 ; Andersson *et al.*, 2002 ; Ochoa *et al.*, 2003). De ce fait, un régime riche en acides gras polyinsaturés augmente le degré d'insaturation des membranes mitochondriales

qui deviennent alors plus sensible aux attaques radicalaires (Ochoa *et al.*, 2003). Le système antioxydant semble également varier avec la composition lipidique du régime. Le contenu en α -tocopherol (vitamine E) et l'activité de la catalase sont en effet plus faibles chez les rats soumis au régime riche en huile de tournesol qu'au régime riche en huile d'olive (Ochoa *et al.*, 2003).

Le régime riche en lipides modifie également la composition protéique des membranes, l'augmentation des acides gras libres entraînant l'induction de la protéine découplante 3 (UCP3) dans le muscle squelettique (Brun *et al.*, 1999 ; Chou *et al.*, 2001 ; Schrauwen *et al.*, 2001). Cependant, dans le muscle squelettique des personnes diabétiques, les UCP3 sont diminuées de 50 % par rapport à celles de personnes saines (Krook *et al.*, 1998 ; Schrauwen *et al.*, 2001). Sachant que les UCP3 sont reconnus pour améliorer l'oxydation des lipides et ainsi détoxifier les mitochondries en acides gras anioniques (Himms-Hagen et Harper, 2001 ; Schrauwen et Hesselink, 2002 ; Hesselink *et al.*, 2003), un défaut de leur expression peut donc faciliter la production de ROS (Vidal-Puig *et al.*, 2000) s'accompagnant d'une peroxydation lipidique accrue.

De nombreuses études mettent en exergue une relation entre l'augmentation du stress oxydant et le développement de la résistance à l'insuline (Figure 14) (Paolisso *et al.*, 1996 ; Ceriello, 2000 ; Maddux *et al.*, 2001 ; Evans *et al.*, 2005). Ceci se caractérise par des altérations au niveau : i) des récepteurs à l'insuline et de ses substrats (IRS), ii) des transporteurs du glucose stimulés par l'insuline (notamment GLUT-4 dans le muscle) et iii) des fonctions des cellules β -pancréatiques. Plus précisément, l'activation de la PKC entraîne une phosphorylation de résidus sérine/thréonine des IRS qui conduit à l'inactivation des récepteurs hormonaux (Berti *et al.*, 1994 ; Shulman, 2000 ; Yu *et al.*, 2002), inhibant ainsi la transmission du signal insulinémique et la capture cellulaire du glucose qui en découle (Kahn, 1992 ; Shulman, 2000 ; Yu *et al.*, 2002). Ceci est conforté par Maddux *et al.* (2001) qui observent sur des myotubes L6 surexprimant GLUT-4 une inhibition du transport du glucose stimulé par l'insuline après exposition de ces cellules à un stress oxydant. Enfin, dans les cellules β -pancréatiques, l'augmentation de la production de ROS induite par l'hyperglycémie est associée à une diminution de la sécrétion de l'insuline (Maechler et Wollheim, 1999 ; Sakai *et al.*, 2003). Par ailleurs, les cellules β -pancréatiques ont un faible pouvoir antioxydant avec des enzymes antioxydantes dont les activités sont de 70 % à 95 % inférieures à celles du

foie, ce qui les rend plus vulnérables aux ROS (Tiedge *et al.*, 1997 ; Robertson *et al.*, 2003). De plus, la diminution de GSH observée chez les sujets diabétiques peut contribuer à l'altération de la sécrétion de l'insuline. En effet, la modification du rapport GSH/GSSG plasmatique affecte la réponse des cellules-β (Ammon *et al.*, 1989). Ainsi, une concentration plasmatique élevée en acides gras libres et en glucose peut entraîner la destruction des cellules β-pancréatiques (Evans *et al.*, 2003).

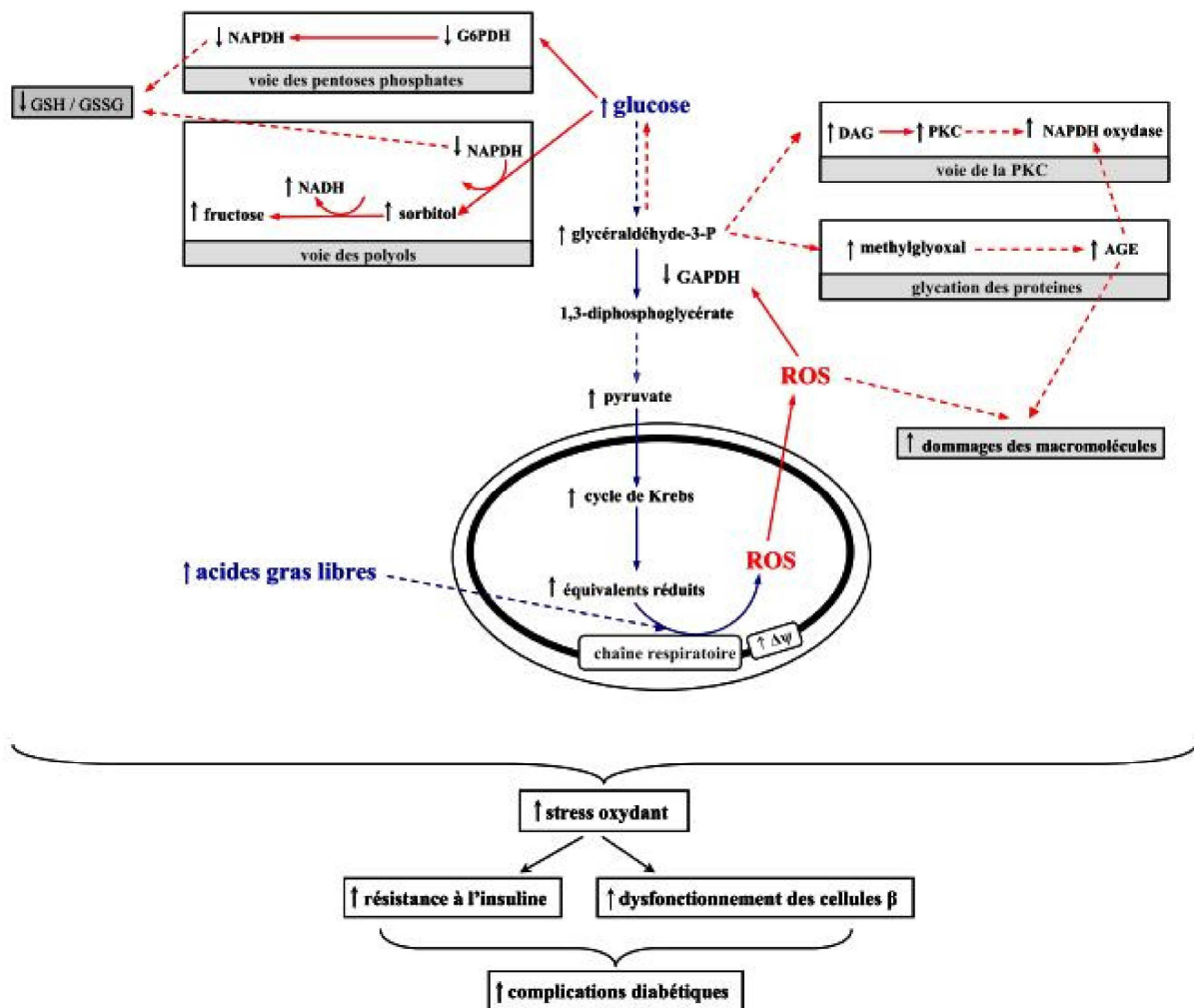


Figure 14: Conséquence de la surproduction des ROS lors de la consommation d'un régime hyperlipidique.

(→ bleu): réactions induites par la dyslipidémie et l'hyperglycémie, (→ rouge): réactions induites par les ROS. (AGE): Advanced Glycation End ; (DAG): diacylglycérol; (GAPDH): glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase, (G6PDH): glucose-6-phosphate déshydrogénase, (PKC): Pyruvate Kinase C.

4.4.2. Le rôle d'un régime riche en sucre dans l'installation du syndrome métabolique

Depuis quelques années, la proportion de glucides dans l'alimentation ne cesse d'augmenter et plus particulièrement celle en saccharose. Aux Etats-Unis, la consommation de glucides est passée en 25 ans de 42,4 % à 49 % en kcal pour les hommes et de 44,8 % à 49,7 % en kcal pour les femmes, ceci s'accompagnant d'une diminution de la consommation de lipides (d'environ 37 % à 33 %) (Griel *et al.*, 2006). Or, un tel régime engendre des désordres métaboliques associés au syndrome métabolique (Reaven, 1988).

Le sucre le plus utilisé dans la nutrition est le saccharose. Le saccharose est un disaccharide constitué d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose ; et c'est le fructose qui semble conditionner les désordres métaboliques. Cette spécificité du fructose est mise en évidence chez l'animal et plus précisément chez le rat (Thoburn *et al.*, 1989 ; Thresher *et al.*, 2000). Dans leur étude, Thoburn *et al.* (1989) comparent un régime contenant 35 % de fructose avec un autre contenant 35 % de glucose : après 4 semaines de traitement, seuls les rats soumis au régime riche en fructose développent une résistance à l'insuline. Thresher *et al.* (2000), quant à eux, comparent 4 régimes avec une composition en glucides différente : un régime standard n'ayant comme source de glucides que de l'amidon, un régime avec 68 % de saccharose, un régime avec 34 % de fructose + 34 % de glucose et un régime avec 34 % de fructose + 34 % d'amidon. Après 5 semaines de traitement, le régime fructose + amidon est capable de produire une intolérance au glucose similaire à celle induite par les régimes saccharose et fructose + glucose. Ainsi, le fructose est bien le principal médiateur de l'intolérance au glucose et de la résistance à l'insuline induite par le saccharose.

Le fructose est un hexose, de même formule chimique brute que le glucose : $C_6H_{12}O_6$. Il diffère du glucose par la présence d'un groupement cétone en position 2 de la molécule, alors que le glucose présente un groupement aldéhyde en position 1.

Le métabolisme du fructose, à la différence de celui du glucose, est indépendant de l'insuline jusqu'à son entrée dans ces deux voies métaboliques (Touati *et al.*, 2005). Malgré la parenté des deux molécules, le fructose suit des voies métaboliques très différentes de celles du glucose. Il est absorbé à travers la muqueuse digestive par un transporteur spécifique, GLUT 5. Puis, il est presque complètement extrait par les tissus splanchniques où ont lieu les

étapes initiales de son métabolisme et, seule une portion négligeable parvient dans la circulation systémique. Une faible proportion du fructose ingéré est métabolisée par la muqueuse digestive et aboutit à la formation de lactate. L'importance de ce métabolisme intestinal n'est pas connue chez l'homme mais représente 10-20 % du métabolisme total du fructose chez l'animal. La majeure partie représentant les 80-90 % restants est métabolisée dans le foie, où le fructose est initialement dégradé en DHAP et GAD, pour être ensuite soit converti en glucose ou en glycogène, soit encore transformé en acides gras et en triglycérides. La synthèse de glucose et de glycogène hépatique représente cependant la voie largement majoritaire lors de conditions physiologiques (Mayes, 1993).

Le fructose présente deux caractéristiques métaboliques essentielles : i) sa rapide captation par le foie qui possède un système enzymatique très actif pour le catabolisme du fructose (fructokinase, aldolase B et triokinase), et ii) son entrée au niveau des triose-phosphates en évitant l'étape de régulation de la phosphofructokinase (Mayes, 1993). Toutes les voies métaboliques peuvent ainsi être sollicitées mais c'est celle de la néoglucogenèse qui est particulièrement activée (Pagliassotti *et al.*, 1994 ; Bizeau *et al.*, 2001a et 2001b ; Commerford *et al.*, 2002). Ce qui suggère que l'augmentation du stress oxydant observée lors d'un régime riche en fructose serait liée, comme pour le régime riche en lipides, à une augmentation de la concentration plasmatique en glucose. Cependant, malgré une néoglucogenèse stimulée, la glycémie est maintenue dans un premier temps, probablement grâce à l'augmentation de l'insulinémie. L'hyperglycémie ne s'installe qu'après 15 semaines de régime et semble être la conséquence d'une détérioration de la sécrétion d'insuline (Chicco *et al.*, 2003). L'augmentation du stress oxydant durant les 15 premières semaines de régime riche en saccharose/fructose ne peut donc être attribuée à l'hyperglycémie. Comme pour le régime riche en lipides, ce stress oxydant peut contribuer à la mise en place de la résistance à l'insuline. Il suffit respectivement d'une semaine et de 2 semaines de régime à 68 % de saccharose pour induire une insulino-résistance dans le foie puis dans le muscle squelettique (Pagliassotti *et al.*, 1996). Ce lien entre la résistance à l'insuline et le stress oxydant induits par le régime riche en saccharose/fructose est confirmé par différentes études utilisant la metformine, un antidiabétique (Faure *et al.*, 1999 ; Srividhya et Anuradha, 2002). Les rats soumis à un régime riche en fructose et traités à la metformine ont simultanément une amélioration de leur sensibilité à l'insuline et de leurs défenses antioxydantes. De plus, il est montré que, si la metformine n'a pas un pouvoir anti-radicalaire "ROS scavenger", elle inhibe

partiellement (- 40 %) le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale permettant ainsi de diminuer la production de ROS issue du flux inverse d'électrons (El-Mir *et al.*, 2000 ; Batandier *et al.*, 2006). Par ailleurs, Horton *et al.* (1997) observent une absence de résistance à l'insuline chez les rats femelles même après 8 semaines de régime riche en saccharose (68 %). Or, les rats femelles sont mieux protégés des effets pro-oxydants d'un tel régime que les rats mâles probablement en raison de leur statut hormonal (Busserolles *et al.*, 2002), l'oestrogène ayant un effet antioxydant de part sa similarité de structure avec celle de la vitamine E (en particulier par la présence d'un groupe hydroxyle) (Sugioka *et al.*, 1987 ; Mendelsohn et Karas, 1999). Enfin, il est montré que l'apport en vitamine E améliore les systèmes de défense antioxydante et la sensibilité à l'insuline chez les rats soumis à un régime riche en fructose (Faure *et al.*, 1997).

4.5. Approche nutritionnelle dans la prévention et le traitement du syndrome métabolique

La prise en charge du syndrome métabolique vise à réduire les facteurs de risque associés à ce syndrome, et par voies de conséquences les risques d'apparition d'accidents cardiovasculaires. Elle peut se faire de manière globale en modifiant les habitudes de vie ou bien de manière plus spécifique en intervenant sur différents composants du syndrome métabolique à l'aide de médicaments.

Il est conseillé aux personnes atteintes du syndrome métabolique de modifier leurs habitudes de vie. Un régime alimentaire sain et la reprise d'une activité physique régulière sont des solutions efficaces pour le traitement du syndrome métabolique (Anderssen *et al.*, 2002). La demande se fait donc de plus en plus pressante envers la communauté scientifique, qui est appelée à proposer des solutions nouvelles pour prévenir ces maladies, les traiter et limiter leurs dommages. Dans ce contexte, les molécules bioactives issus d'animaux ou de végétaux constituent une alternative très prometteuse. La prévalence et l'incidence du diabète de type 2 liées à la dyslipidémie du syndrome métabolique augmentent de manière très rapide à l'heure actuelle dans le monde entier. L'intégration de différentes stratégies et/ou produits nutritionnels pourrait aider à prévenir et à gérer les composantes du syndrome métabolique. En procurant une alternative accessible et peu coûteuse par rapport aux médicaments, les molécules bioactives pourraient jouer un rôle important sur la santé des populations. La prévention repose sur l'association de mesures diététiques visant à prévenir ou à réduire

l'obésité et l'activité physique. Il est démontré que la perte de poids améliore la sensibilité à l'insuline. Les travaux de Reaven (2005) ont montré qu'un des marqueurs pertinent, bien que non parfait, de l'insulinorésistance et du risque cardiovasculaire pouvait être le rapport TG/HDL (g/L) supérieur ou égal à 3. La perte de poids s'accompagne aussi d'une diminution des teneurs en triglycérides et de la CRP, considérée comme un marqueur de risque cardiovasculaire (Reaven, 2005). Les recommandations de l'«American Heart Association» (AHA) concernant le traitement de la dyslipidémie au cours du syndrome métabolique sont de réduire les teneurs en LDL cholestérol et en triglycérides, et enfin d'augmenter celles en HDL cholestérol (Grundy *et al.*, 2004).

Sur le plan diététique, la réduction de l'apport lipidique au profit de l'apport glucidique (60 %) aggrave le syndrome métabolique (Reaven, 2005). L'alimentation que l'on peut recommander est celle de type méditerranéen qui a la particularité d'être riche en acides gras insaturés et de biomolécules actives telles que les antioxydants et les pigments. Parallèlement à la perte de poids (ou au maintien d'un poids normal) et à l'activité physique, il a été montré que les acides gras polyinsaturés à longue chaîne n-3 et n-6, essentiellement contenus dans les aliments d'origine marine et dans certaines huiles végétales, respectivement, ont une forte potentialité pour prévenir et traiter certains facteurs de risque du syndrome métabolique.

4.5.1. Oméga 3 et 6 : nutrition et syndrome métabolique

Le syndrome métabolique résulte de déséquilibres quantitatifs et/ou qualitatifs des apports énergétiques (surconsommation d'énergie, de glucides simples et d'acides gras saturés) (Reaven, 2005). Quelques études ont évalué l'impact des facteurs sociétaux sur la prévalence du syndrome métabolique. Ainsi, une alimentation riche en glucides et/ou en lipides est associée à une augmentation du risque de syndrome métabolique (Park *et al.*, 2003). A l'inverse, certains nutriments, tels que les acides gras polyinsaturés n-3 et n-6, sont bien connus pour leur capacité à prévenir et/ou améliorer les dérégulations métaboliques associées au syndrome métabolique (Vessby, 2003). C'est pourquoi les recommandations concernant les apports nutritionnels sont non seulement une réduction de l'apport d'acides gras saturés (< 12 % de l'apport énergétique total), mais aussi une augmentation de l'apport des acides gras polyinsaturés n-3, conduisant à un meilleur équilibre entre les familles d'AGPI

n-6 et n-3, et plus spécifiquement à un rapport entre les précurseurs, acide linoléique (18:2 n-6) et acide α -linoléique (18:3 n-3) ≤ 5 (AFSSA, 2010).

4.5.1.1. Sources alimentaires d'acides gras oméga 3

Les principales sources alimentaires d'AGPI des séries n-3 sont d'origine végétale (huiles végétales), mais aussi d'origine animale (chairs de poissons gras et produits de la mer). Les AGPI n-3 ne dépassant pas les 18 atomes de carbone, tel que l'acide α -linoléique (ALA) sont principalement présents dans certaines huiles végétales telles que l'huile de soja, de canola, de noix, et de lin (Li *et al.*, 2003 ; Gunstone, 2007). Tandis que les AGPI à longue chaîne (20 atomes de carbone et plus) tels que les acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA) sont principalement issus des poissons gras comme le saumon, le hareng, le maquereau, les anchois et les sardines (Li *et al.*, 2002 ; Nichols, 2007), ou issus de l'utilisation, comme complément alimentaire, de certaines microalgues marines riches en EPA et en DHA.

4.5.1.2. Effet de la consommation des huiles de poisson, comme source d'EPA et de DHA sur les composantes du syndrome métabolique

L'intérêt d'étudier l'effet de la consommation des oméga 3 issus de l'huile de poisson dans la prévention des maladies cardiovasculaires provient d'études épidémiologiques révélant une plus faible incidence de ces pathologies dans la population des Esquimaux du Groenland consommant de grandes quantités de poissons et de mammifères marins.

Les oméga-3 marins ont une potentialité indiscutable dans la prévention et le traitement du syndrome métabolique par leur effet insulino-sensibilisateur (Delarue *et al.*, 2006), leur effet modulateur du stress (Accinni *et al.*, 2006), leur effet hypotriglycéridémiant (Chan *et al.*, 2002, 2003 ; Faeh *et al.*, 2005), leurs effets sur les processus d'athérogenèse (Seierstad *et al.*, 2005) et, probablement aussi leur effet antihypertenseur (Dickinson *et al.*, 2006). Les données obtenues chez les Esquimaux reprenant une alimentation traditionnelle riche en produits d'origine marine confortent l'intérêt des oméga-3 d'origine marine pour l'amélioration des paramètres du syndrome métabolique et la prévention du diabète de type 2. La plupart des données physiopathologiques disponibles suggèrent qu'un apport en oméga-3

voisin de 2 g/j pourrait apporter un bénéfice sur les différents constituants du syndrome métabolique.

L'introduction d'huile de poisson dans le régime alimentaire diminue l'hypertriglycéridémie, la production de VLDL au niveau du foie, la stéatose et l'insulinorésistance (Peyron-Caso *et al.*, 2002 ; Rossi *et al.*, 2005). La diminution de la production des TG et de la stéatose résulte à la fois d'une diminution de la lipogenèse *de novo*, d'un accroissement de l'oxydation hépatique des acides gras et d'une diminution de la synthèse et de l'exportation des VLDL. Les oméga-3 d'origine marine diminuent l'expression des gènes de la lipogenèse *de novo* (acétyl CoA carboxylase, acides gras synthase, $\Delta 9$ -désaturase, enzyme malique, ATP citrate lyase), et de la glycolyse (L-pyruvate kinase) qui génère de l'acétyl CoA précurseur de la lipogenèse *de novo* (Sampath et Ntambi, 2005). L'augmentation de l'expression et de l'activité des enzymes de l'oxydation intra-hépatique des acides gras, tels que la carnitine palmitoyl transférase 1 et 2 et oxydase réoriente les acides gras vers leur oxydation aux dépens de leur ré-estérification en triglycérides. De plus, les oméga-3 marins diminuent la production des VLDL en diminuant leur assemblage et leur sécrétion (Baker et Gibbons, 2000). Le contrôle de la sécrétion par les oméga-3 marins résulterait d'une inhibition de la synthèse d'apo B100 et CIII.

Le métabolisme lipidique, mettant en jeu les voies de lipogenèse, de désaturation-élongation des acides gras, de synthèse des triglycérides et de sécrétion des VLDL, ainsi que de β -oxydation et de céto-genèse des acides gras, est régulé par les AGPI n-3 au niveau du foie via la voie des récepteurs nucléaires "Peroxisome Proliferator-activated receptor" (PPAR) et "Sterol Response Element Binding Protein" (SREBP). Il a cependant été montré que les oméga-3 répriment plus efficacement que les oméga-6 les voies de synthèse des triglycérides et d'assemblage des VLDL, réduisant ainsi la sécrétion de ces lipoprotéines dans la circulation sanguine et le risque d'hypertriglycéridémie qu'elles représentent (Clarke, 2001). Ainsi chez l'Homme, la consommation d'oméga-3 à longue chaîne entraîne une baisse notable de la triglycéridémie, en particulier chez les sujets hyper-triglycéridémiques (Bays *et al.*, 2008).

Les dérivés oxygénés de l'ARA favorisent les processus de thrombose, d'allergie et d'inflammation. De plus, ces dérivés sont synthétisés en plus grande quantité que ceux issus

de la famille oméga-3 et possèdent une grande efficacité biologique à des faibles concentrations. L'ingestion d'un régime équilibré en AGPI oméga-3 a des effets bénéfiques (i) en réduisant par inhibition compétitive l'incorporation de l'ARA dans les membranes cellulaires ainsi que la synthèse de ses médiateurs bioactifs ; et (ii) en produisant des dérivés oxygénés (issus de l'EPA ou du DHA), qui exercent des propriétés antagonistes à ceux issus de l'ARA, ou sont biologiquement moins actifs. Ainsi l'apport alimentaire en AGPI peut avoir une influence sur l'incidence des maladies cardiovasculaires (athérosclérose, maladies coronaires et maladies cérébrovasculaires) et inflammatoires (Barcelo-Coblijn et Murphy, 2009). Dans la population Inuit, où la consommation de graisses animales se fait exclusivement par l'apport d'animaux marins, très riches en EPA et DHA, l'incidence de maladies cardiovasculaires et inflammatoires est très faible.

4.5.2. Les microalgues marines: une source potentielle d'oméga 3

4.5.2.1. Généralités sur les microalgues

Au regard des phycologistes, le terme « algue » est utilisé pour désigner l'ensemble des végétaux possédant de la chlorophylle a et un thalle, appareil végétatif simple non différencié en racines, tiges et feuilles (Lee, 1989).

Les microalgues sont définies comme des micro-organismes photosynthétiques unicellulaires, de quelques dizaines à quelques centaines de micromètres. Elles sont ubiquistes et ont colonisé la totalité des écosystèmes aquatiques d'eau douce et d'eau salée, des plus extrêmes (murs, sols, etc.) aux plus communs (océans, mers, lacs, ruisseaux, etc.). En étant à la base de nombreuses chaînes alimentaires (producteurs primaires), elles constituent un des compartiments majeurs des écosystèmes marins. Les cyanobactéries, bactéries photosynthétiques, sont incluses dans cette définition bien qu'elles soient des organismes procaryotes.

La classification des microalgues présentée dans le Tableau IV a été établie à partir des données de De Reviers (2003), Andersen (2004) et Tomaselli (2004). Les micro-organismes photosynthétiques sont séparés en deux groupes polyphylétiques : les Eucaryotes et les Procaryotes. Les Cyanophytes ou «algues bleues», avec la classe des Cyanophycées, constituent l'unique embranchement ou « phylum » du groupe des Procaryotes, tandis que le

groupe des Eucaryotes est divisé en plusieurs embranchements tels que les Rhodophytes, les Chlorophytes, les Dynophytes, les Cryptophytes, les Haptophytes, les Ochrophytes, etc. Le groupe des Eucaryotes et les différents embranchements qui les constituent sont divisés en plusieurs classes dont les principales sont les Rhodophycées, Chlorophycées, Dinophycées, Chrysophycées, Pavlovophycées, Prymnésiophycées et Bacillariophycées.

Tableau IV : Classification des principales classes de micro-organismes photosynthétiques

Groupes	Phylums	Classes	Exemples d'espèces
<i>Procaryotes</i>	Cyanophytes	Cyanophycées	<i>Microcystis</i> sp., <i>Spirulina platensis</i>
	Rhodophytes	Rhodophycées	<i>Porphyridium cruentum</i>
	Chlorophytes	Chlorophycées	<i>Chlorella</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp., <i>Dunaliella</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp.
		Prasinophycées	<i>Tetraselmis</i> sp.
	Dynophytes = Dinoflagellées	Dinophycées	<i>Dinophysis</i> sp., <i>Alexandrium</i> sp., <i>Cryptecodinium cohnii</i> ,
<i>Eucaryotes</i>	Cryptophytes	Cryptophycées	<i>Cryptomonas</i> sp.
	Haptophytes	Prymnésiophycées	<i>Isochrysis galbana</i>
		Pavlovophycées	<i>Pavlova lutheri</i>
	Ochrophytes =	Bacillariophycées	<i>Skeletonema costatum</i> , <i>Odontella aurita</i>
	Heterokontophytes =	Chrysophycées	<i>Ochromonas</i> sp.
		Xantophycées	<i>Monodus subterraneus</i>
	Chrysophycophytes	Eustigmatophycées	<i>Nannochloropsis</i> sp.
		Raphidophycées	<i>Heterosigma</i> sp.

4.5.2.2. Intérêt des lipides des microalgues

4.5.2.2.1. Généralités

De par leur diversité taxonomique et biochimique, les microalgues représentent une source potentiellement intéressante de composés ayant des applications dans les domaines de l'alimentation, la santé, la cosmétique, l'environnement et les énergies renouvelables. Les lipides, les protéines, les polysaccharides, les pigments et les enzymes représentent les principales molécules d'intérêt des microalgues.

La production de lipides par les microalgues marines peut atteindre des rendements par unité de surface supérieurs de 30 fois à ceux des oléagineux terrestres, pouvant représenter plus de 30 à 80 % de leur poids de matière sèche dans certaines conditions (Chisti *et al.*, 2007). Les microalgues présentent également des teneurs élevées en AGPI-LC de la série n-3, plus particulièrement en EPA et DHA (Tableau V) (Volkman *et al.*, 1989; Apt et Behrens, 1999).

Tableau V : Composition en acides gras (% des acides gras totaux) de quelques espèces de microalgues.

Acides gras	Espèce		
	<i>Odontella aurita</i> (1)	<i>Chlorella Sp</i> (2)	<i>Pavlova lutheri</i> (3)
14:0	13,0	2,0	11,5
15:0	1,1	2,4	-
16:0	20,9	19,6	22,8
16:1 n-7	21,0	6,2	23,3
16:2 n-6	8,0	3,6	-
16:2 n-4	-	0,4	-
16:3 n-3	-	12	-
16:4 n-1	-	0,3	-
17:00	2,2	0,3	-
17:1 n-7	3,6	-	-
18:0	1,4	3,3	-
18:1 n-9	2,0	5,7	4,2
18:1 n-7	-	1,6	-
18:2 n-6	1,3	11,8	-
18:3 n-6	0,6	0,3	-
18:3 n-3	0,6	22,3	-
18:4 n-3	-	0,1	4,5
20:4 n-6	-	0,5	-
20:5 n-3	25,6	1,3	14,7
22:6 n-3	2,5	-	6,8
Autres	4,1	6,3	12,2

1 : (Braud, 1997) ; 2 : (Renaud *et al.*, 1999) ; 3 : (Tonon *et al.*, 2003)

Ces acides gras essentiels sont bien connus pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine (Dyerberg et Bang, 1979; Babcock *et al.*, 2000; Din *et al.*, 2004; Bourre, 2007a et 2007b). De nombreuses études ont également montré l'importance de la composition en acides gras des microalgues fourrages en aquaculture (Brown *et al.*, 1997; Harel *et al.*, 2002; Knuckey *et al.*, 2002; Ponis *et al.*, 2006a et 2006b). Les microalgues sont donc au cœur de nombreux projets industriels comme source d'intérêt nutritionnel du fait de leur richesse en oméga-3 (Apt et Behrens, 1999 ; Ward et Singh, 2005 ; Spolaore *et al.*, 2006 ; Cardozo *et al.*, 2007), et constituent de par leur teneur en lipides, des modèles biologiques de choix pour la production de biodiesel (Chisti *et al.*, 2007). Aujourd'hui, dans l'agro-alimentaire, les lipides marins sont principalement apportés sous forme d'huiles de poisson (Barnathan, 2007; Gunstone, 2007; Nichols, 2007). L'accumulation de polluants, les problèmes d'odeur et de goût, la diminution des ressources halieutiques et la faible stabilité à l'oxydation des huiles de poisson (Certik et Shimizu, 1999; Barnathan, 2007), obligent les chercheurs à développer d'autres sources de production d'huiles riches en AGPI telles que les microalgues (Ward et Singh, 2005).

4.5.2.2.2. Nutrition animale et humaine

De par leur composition biochimique, les microalgues sont capables d'améliorer le contenu nutritionnel des produits alimentaires, et de jouer un rôle positif sur la santé humaine et animale (Spolaore *et al.*, 2006). Actuellement, les microalgues commercialisées comme complément alimentaire sont principalement vendues sous la forme de tablettes, de gélules et liquide (Becker, 2004). Elle peuvent également être incluse de manière directe ou sous la forme d'extraits dans des produits alimentaires tels que les pâtes, les biscuits, le pain, les confiseries et certaines boissons afin d'améliorer leur valeur nutritionnelle (Liang *et al.*, 2004). En plus de leur utilisation dans la nutrition humaine, les microalgues peuvent être incorporées dans l'alimentation d'une large variété d'animaux, du poisson (aquaculture), aux animaux de compagnie et de ferme (Spolaore *et al.*, 2006). La première installation industrielle de production de microalgues a été mise en service au Japon dans les années soixante (Muller-Feuga, 1997). Il s'agissait de produire une microalgue verte, *Chlorella*, commercialisée comme complément alimentaire (diététique) sous la forme de gélules. En 1974, la production industrielle de la cyanophycée *Spirulina*, a également démarré au Mexique. Parallèlement à leur composition globale (protéines, glucides, lipides, acides aminés, vitamines), les microalgues sont utilisées comme source de molécules à haute valeur ajoutée.

Les lipides et les acides gras représentent certaines de ces molécules d'intérêt majeur impliquées dans la nutrition et la santé humaine et animale. En effet, les teneurs en AGPI, EPA et DHA, sont particulièrement élevées chez certaines microalgues (Volkman *et al.*, 1989). Depuis 1990, de nombreux organismes de santé recommandent l'ajout de DHA dans la formulation des laits infantiles (Spolaore *et al.*, 2006). Dans cette optique, l'entreprise Martek Biosciences Corporation produit une huile riche en DHA (DHASCO, Martek, Colombia, MD, États-Unis) à partir de la microalgue *Cryptocodinium cohnii* qui peut contenir 40-50 % de DHA mais pas d'EPA (Jiang *et al.*, 1999; Ward et Singh, 2005). En France, la microalgue, *Odontella aurita*, a été agréée en novembre 2002, pour l'alimentation humaine, par l'AFSSA (Agence Française pour la Sécurité Sanitaire des Aliments). Elle est produite par l'entreprise INNOVALG (Bouin, France) pour sa teneur en EPA qui peut atteindre 35 % des acides gras totaux (Braud, 1997). Les huiles riches en oméga 3 sont couramment employées dans la supplémentation de l'alimentation des adultes (fromages, yaourts, pâtes à tartiner, etc.), des animaux, et des produits utilisés en aquaculture (Spolaore *et al.*, 2006).

4.5.3. L'huile d'argan comme source d'AGPI n-6

L'huile d'argan est extraite de l'amandon de l'arganier «*Argania spinosa L.*» (Skeels) qui est un arbre endémique du sud-ouest marocain. L'arganier est un arbuste épineux pouvant atteindre six à huit mètres de haut (Figure 15). Son aspect rappelle celui de l'olivier. Son tronc est noueux, souvent formé de plusieurs tiges entrelacées ; la ramification commence à environ un mètre du sol. La floraison a lieu au mois de mai. Les fleurs hermaphrodites ont une couleur jaune verdâtre. Les fruits sont des drupes ovoïdes vertes, striées de rouge, de la taille d'une grosse olive. Le noyau contient une seule amande oblongue (Figure 16).

Figure 15 : L'arganier**Figure 16 : amandes d'arganier**

L'analyse de la composition en AG de l'huile d'argan montre une prédominance des acides oléique et linoléique. L'acide palmitique est l'AGS majoritaire. L'acide linoléique est présent à moins de 0,25 %. D'après sa composition, l'huile d'argan est une huile de type oléique/linoléique constituée de presque 80 % d'AGI. Une telle composition la rapproche de l'huile d'arachide (par sa teneur en acides gras insaturés : 80 %) et de l'huile d'olive (par sa teneur en acides oléique et palmitique). Cette composition intermédiaire entre l'huile d'olive et l'huile d'arachide confère à l'huile d'argan une bonne absorption. La fraction insaponifiable de l'huile d'argan possède des caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques spécifiques, en particulier une odeur de noisette et une couleur brune. Elle représente approximativement 1 % de la totalité de l'huile. L'analyse qualitative et quantitative de cette fraction a révélé la présence de tocophérols (α -tocophérol, β -tocophérol, γ -tocophérol et δ -tocophérol), de stérols (spinastérol, schotténol), de carotènes, d'alcools triterpéniques et de xanthophylles. La composition de l'huile d'argan peut présenter quelques variations en fonction des conditions de culture et des méthodes d'extraction.

4.5.3.1. Rôle nutritionnel de l'huile d'argan

L'huile d'argan est une huile d'excellente valeur alimentaire. Elle est consommée soit fraîche ou cuite mais jamais dans les fritures. Sa composition particulière (80 % d'AGI) lui confère des valeurs nutritionnelles et diététiques intéressantes et ne pose aucun problème de digestibilité et d'absorption intestinale par l'organisme humain. Cette huile est aussi utilisée pour les soins corporels, dans le traitement de l'acné juvénile, de la varicelle et des rhumatismes. Grâce à ces propriétés hypocholestérolémiantes, elle est également indiquée en prévention de l'athérosclérose. L'utilisation traditionnelle de l'huile d'argan contre le dessèchement cutané et le vieillissement physiologique de la peau a motivé certains laboratoires à l'incorporer aux produits cosmétiques.

Bien que l'huile d'argan soit connue depuis longtemps pour ses vertus pharmaceutiques et nutritionnelles (Charrouf et Guillaume, 1999), les études réalisées sur cette huile ont porté surtout sur ses propriétés physicochimiques (Charrouf et Guillaume, 1999 ; Khallouki *et al.*, 2003 ; Hilali *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'étude nutritionnelle réalisée *in vivo* par Belcadi (1994), a montré que l'ingestion de l'huile d'argan conduit à une modification des AGPI membranaires comparable à celle due à l'huile d'arachide. Récemment, des études pharmacologiques ont été entreprises afin de valoriser l'huile d'argan dans le domaine de la prévention et du traitement des maladies cardiovasculaires et de l'athérosclérose (Berrada *et al.*, 2000 ; Berrougui *et al.*, 2003 ; Drissi *et al.*, 2004 ; Berrougui *et al.*, 2004 et 2006 ; Derouiche *et al.*, 2005, Haimeur *et al.*, 2013). Une étude nutritionnelle réalisée sur des modèles d'animaux hypertendus, a montré que le gavage quotidien des animaux avec de l'huile d'argan, à raison de 5ml /kg /j durant 8 semaines, diminue significativement les pressions artérielles systolique et diastolique (Berrada *et al.*, 2000). Cet effet hypotenseur est associé à une diminution du taux de cholestérol total et des LDL et à une augmentation des HDL plasmatiques. Une autre étude nutritionnelle conduite chez le rat a eu pour objectif de rechercher l'effet d'une consommation régulière d'huile d'argan sur le profil lipidique et lipoprotéique plasmatique (Mahmoud *et al.*, 2012). D'autres études ont montré que l'ingestion d'huile d'argan, à raison de 1ml/ 100g/ j pendant 7 semaines, diminue de 37 % le cholestérol total, de 68 % les LDL et de 31 % les triglycérides plasmatiques, tandis que le taux des HDL reste inchangé par rapport au groupe témoin (Berrougui *et al.*, 2003). Une étude clinique conduite par Drissi *et al.* (2004) chez des sujets sains a montré que l'ingestion d'huile d'argan

(15g/j) réduit significativement la susceptibilité des LDL à l'oxydation et le taux de cholestérol total comparé au groupe non-consommateur. Ces auteurs ont suggéré que grâce à teneur en antioxydants, l'huile d'argan protège les LDL contre l'oxydation qui représente une étape clé dans l'athérosclérose. L'huile d'argan a ainsi montré son effet bénéfique sur la prolifération des thymocytes chez le rat (Benzaaria *et al.*, 2006)

4.6. Model d'étude du syndrome métabolique

Le recours à des modèles expérimentaux simplifiés mimant les différents désordres physiopathologiques est une nécessité pour étudier le syndrome métabolique et ses complications graves, ainsi que pour tester des nutriments pouvant avoir un effet bénéfique sur ces désordres.

Les études visant la mise au point des modèles adéquats du syndrome métabolique chez l'animal ont abouti à différents types de modèles obtenus essentiellement chez le rat. L'exploitation de ces modèles de syndrome métabolique apporte des confirmations en faveur de l'idée selon laquelle les anomalies de l'insulino-sécrétion et de la sensibilité à l'insuline seraient secondaires à une réduction plus ou moins marquée de la population des cellules β de Langerhans du pancréas. L'installation du syndrome métabolique chez les modèles animaux se fait soit spontanément soit par l'administration des régimes enrichis en lipides ou en fructose. Les rats nourris avec un régime riche en lipides constituent un modèle animal satisfaisant de syndrome métabolique (Yokozawa *et al.*, 2008). Le rat soumis à un régime hyperlipidique est donc utilisé comme un modèle animal pour la résistance à l'insuline et peut être considéré comme un modèle mimant de multiples facteurs de risque du syndrome métabolique observés chez les humains (Bezerra *et al.*, 2000). Les rongeurs sont largement utilisés pour mimer les maladies humaines afin d'améliorer la compréhension des causes et la progression des symptômes de la maladie et pour tester le potentiel des interventions thérapeutiques. Les maladies chroniques comme l'obésité, le diabète et l'hypertension, sont à l'origine de l'augmentation de la morbidité et de la mortalité. Un des modèles de rongeurs qui se rapproche le plus pour la réalisation de ce critère est le rat mâle pour lequel une dyslipidémie d'origine nutritionnelle est installée suite à la consommation de régimes riches en glucides et/ou en lipides.

En effet, l'utilisation d'un régime alimentaire à teneur élevée en graisse saturée et en sucre raffiné (régime «high fat high sucrose») chez le rat, représente un excellent modèle expérimental pour caractériser les effets d'un régime de type occidental sur la fonction cardiovasculaire et le métabolisme. Ce régime, utilisé de façon chronique chez des rats normaux, entraîne de l'obésité viscérale et de la résistance à l'insuline, et ce de façon indépendante (Kim et Nolte, 1999, Park *et al.*, 2001). Il a aussi été démontré que l'utilisation d'un régime semblable induit l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6. En effet, des niveaux plus élevés de ces cytokines ont été mesurés dans le tissu adipeux de souris nourries avec un régime de type hyperlipidique (Perreault *et al.*, 2001). Chez des rats normaux, l'utilisation à long terme d'un régime de type occidental a eu pour effet de réduire la biodisponibilité de l'oxyde nitrique, consécutif au stress oxydatif engendré par la production de ROS et d'induire des dysfonctionnements d'ordre endothéliale (Roberts *et al.*, 2000, 2002a,b). D'autres études ont également démontré qu'un tel régime induisait chez le rat, une réduction de la sensibilité corporelle totale à l'insuline accompagnée d'une hyperinsulinémie, hyperglycémie, d'une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique (Barnard et Roberts, 1998, Kim et Nolte, 1999, Park *et al.*, 2001).

Quelques études ont aussi rapporté une élévation de la pression sanguine (Bunnag *et al.*, 1997, Kim *et al.*, 1999, Reil *et al.*, 1999, Yoshioka *et al.*, 2000, Park *et al.*, 2001, Wheatcroft *et al.*, 2003). En résumé, il existe un certain nombre d'évidence confortant l'idée qu'un régime riche en lipide et/ou en saccharose induit chez le rat de nombreux éléments du syndrome métabolique (Reil *et al.*, 1999, Roberts *et al.*, 2002a). Par conséquent, ce modèle animal présente des caractéristiques physiopathologiques se rapprochant étroitement de celles observées chez l'individu obèse et insulino-résistant. Ce modèle animal est donc très pertinent pour élucider les mécanismes de dysfonction endothéliale et vasculaires associés à la résistance à l'insuline induite par le biais d'une alimentation du type occidentale.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Réactifs

Tous les réactifs utilisés au cours de cette étude proviennent de **Sigma Aldrich** à l'exception de ceux spécifiés ci-dessous. Le réactif de Bradford provient de la société **Bio-rad**, France. La solution de collagène provient de la société **Chrono-log**. Les kits de dosage de l'insuline, du cholestérol et des triglycérides sont obtenus chez les sociétés **Eurobio** et **Biomérieux**, France, respectivement. Le kit de dosage EIA du thromboxane B₂ provient de la société **Enzolive**, France.

1.2. Appareils

Balances

Centrifugeuses

Evaporateur rotatif

Lecteur de plaque ELISA

Sonicateur à sonde

Sonicateur à bain

Spectrophotomètres

Chromatographe en Phase Gazeuse (CPG)

Agrégomètres

pH-mètre

Compteur des cellules

Microscope optique

Bain de sable

Bain marie

Microtome

Ultrathurrax

2. Méthodes

2.1. Expériences animales

Quatre différentes expériences nutritionnelles ont été menées au cours de cette étude. La première expérience (expérience 1), a consisté à rechercher l'effet nutritionnel d'un lyophilisat d'une microalgue marine riche en EPA, *Odontella aurita*, supplémentée à un régime standard R-112 (Scientific Animal Food & Engineering: SAFE, Augy, France) à des doses croissantes, sur les paramètres lipidiques ainsi que l'enrichissement des tissus en AGPI. Une deuxième approche (expérience 2) a été ensuite développée en testant l'effet de la dose 3 % de *O.aurita*, supplémentée au régime standard ou à un régime hyperlipidique (HF₁) (Scientific Animal Food & Engineering: SAFE, Augy, France) avec un apport lipidique s'élevant à 25 %, sur la fonction plaquettaire, les paramètres lipidiques, l'enrichissement des tissus en AGPI et sur le stress oxydatif qui pourrait être induit par l'apport élevé de lipides dans le régime hyperlipidique. Dans la mesure où nous ne pouvions pas comparer le lyophilisat de *O.aurita* avec une huile, nous avons scindé l'étude comparative en deux expériences nutritionnelles séparées. Une troisième expérience (expérience 3) a été effectuée dans le but de comparer les effets de la microalgue avec l'huile de poisson, une source habituelle de n-3, apportés comme suppléments alimentaires à un régime hyperlipidique (HF₂) avec un apport de lipides s'élevant à 40 %, sur les différents paramètres évalués dans l'expérience 2. Cependant, la dernière expérience animale (expérience 4) a consisté à comparer les effets de l'huile d'argan, une source naturelle en AGPI de la série n-6, avec l'huile de poisson dans les mêmes conditions utilisés lors de l'expérience 3.

2.1.1. Animaux

Les rats utilisés au cours de cette étude sont des mâles de souche Wistar fournis par le Centre d'Élevage Roger Janvier (CERJ, Le Genest Saint Isle, France). Les animaux, issus de sevrage, sont répartis en cages collectifs par deux et placés dans un environnement contrôlé en température et en lumière (20°C, période jour/nuit 10h/14h). Avant le démarrage de chaque étude nutritionnelle, une période d'adaptation de 3 jours est effectuée, durant laquelle les rats ont été nourris par le régime standard R-112 utilisé

comme régime témoin (Scientific Animal Food & Engineering: SAFE, Augy, France). Les animaux ont eu accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Après la fin d'adaptation, les animaux sont randomisés à des lots (n=6) de poids homogène en fonction de chaque étude. Les différents lots de chaque expérience seront détaillés au fur et à mesure dans la partie régimes.

2.1.2. Régimes

2.1.2.1. Expérience 1

Après la période d'adaptation, les rats ont été randomisés en 5 groupes et nourris pendant 8 semaines avec les régimes suivants :

Le groupe témoin (T) : mis sous régime standard R-112 contenant (5 % lipides, 23 % protéines, 58 % glucides, 6% cellulose, 7 % minéraux et 1 % vitamines).

Le groupe OA1 : mis sous régime standard R-112 supplémenté avec 1 % (poids/poids) de lyophilisat d'*O. aurita* (Innovalg, Bouin, France).

Le groupe OA3 : mis sous régime standard R-112 supplémenté avec 3 % (poids/poids) de lyophilisat d'*O. aurita*.

Le groupe OA9 : mis sous régime standard R-112 supplémenté avec 9 % (poids/poids) de lyophilisat d'*O. aurita*.

Le groupe OA12 : mis sous régime standard R-112 supplémenté avec 12 % (poids/poids) de lyophilisat d'*O. aurita*.

La composition des différents régimes utilisés dans cette expérience est détaillée dans le tableau VI.

Tableau VI: Composition détaillée des différents régimes testés au cours de l'expérience 1

Eléments (g/100g)	Témoin	OA ₁	OA ₃	OA ₉	OA ₁₂
Caséine	23	23	23	23	23
Amidon de maïs	20	20	20	20	20
Glucose monohydrate	38	38	38	38	38
Cellulose	6	6	6	6	6
Saindoux	3	3	3	3	3
Huile de maïs	1	1	1	1	1
Huile de colza	1	1	1	1	1
Minéral 205B SAFE	7	7	7	7	7
Vitamine 200 SAFE	1	1	1	1	1
Lyophilisat de <i>O.aurita</i>	0	1	3	9	12
Apport énergétique Kcal/Kg	3690	3715,5	3766,5	3919,5	3996

Le mélange Minéral 205B SAFE fournis dans les régimes est composé de (mg/kg de régime) : CaHPO₄ : 17,2 ; KCl : 4000 ; NaCl : 4000 ; MgO : 420 ; MgSO₄ : 2000 ; Fe₂O₃ : 120 ; FeSO₄.7 H₂O : 200 ; MnSO₄.7 H₂O : 98 ; CuSO₄.5 H₂O : 20 ; ZnSO₄.H₂O : 80 ; CoSO₄.7 H₂O : 0,1 ; KI : 0,3.

Le mélange Vitamine 200 SAFE fournis dans les régimes est composé de (par kg de régime) : rétinol : 39,6 IU ; cholécalciférol : 5000 IU ; thiamine : 40 mg ; riboflavine : 30 mg ; acide pantothénique : 140 mg ; pyridoxine : 20 mg ; inositol : 300 mg ; cyanocobalamine : 0,1 mg ; acide ascorbique : 1600 mg ; choline : 2,720 mg ; acide folique : 10 mg ; acide p-aminobenzoïque : 100 mg ; biotine : 0,6 mg.

2.1.2.2. Expérience 2

Après avoir testé les effets de différentes doses de la microalgue sur les paramètres plasmatiques et l'incorporation des AGPI n-3 au niveau tissulaire en présence d'un régime standard, nous nous sommes intéressés par la suite, à étudier les effets de *O. aurita* sur l'agrégation plaquettaire, les paramètres lipidiques circulaires et hépatiques et sur le stress oxydatif dans un modèle de dyslipidémie induite par un régime hyperlipidique. Dans ce contexte, 24 rats ont été randomisés en 4 groupes et soumis aux régimes suivants pendant 8 semaines :

Le régime témoin (T): correspond au régime standard R-112 normolipidique composé de 5 % de lipides, 23 % de protéines, 58 % de glucides, 6 % de cellulose, 7 % de minéraux et 1 % de vitamines).

Le régime TOA: correspond au régime standard R-112 supplémenté avec 3 % (poids/poids) de lyophilisat d'*O. aurita*.

Le régime HF₁: correspond au régime hyperlipidique avec un apport de lipides s'élevant à 25 % comprenant 23 % de saindoux, 1 % d'huile de maïs et 1 % d'huile de colza. Ces deux derniers représentent l'apport nécessaire en acides gras essentiels de la série n-6 et

n-3. La composition du régime HF₁ est la suivante: 25 % lipides, 23 % protéines, 38 % glucides, 6 % cellulose, 7 % minéraux et 1 % vitamines.

Le régime HF₁OA: correspond au régime HF₁ supplémenté avec 3 % (poids/poids) de lyophilisat d'*O. aurita*.

La composition des différents régimes utilisés dans cette expérience est détaillée dans le tableau VII.

Tableau VII : Composition détaillée des différents régimes testés au cours de l'expérience 2

Eléments (g/100g)	T	TOA	HF	HFOA
Caséine	23	23	23	23
Amidon de maïs	20	20	8	8
Glucose monohydraté	38	38	30	30
Cellulose	6	6	6	6
Saindoux	3	3	23	23
Huile de maïs	1	1	1	1
Huile de colza	1	1	1	1
Minéral 205B SAFE	7	7	7	7
Vitamine 200 SAFE	1	1	1	1
Lyophilisat de <i>O.aurita</i>	0	3	0	3
Apport énergétique Kcal/Kg	3690	3766,5	4690	4766,5

T : régime témoin ; *TOA* : régime témoin supplémenté avec 3 % de lyophilisat de *O.aurita* ; *HF* : régime hyperlipidique ; *HFOA* : régime hyperlipidique supplémenté avec 3 % de lyophilisat de *O.aurita*.

2.1.2.3. Expérience 3

Au cours de cette expérience, nous avons comparé les effets d'*O. aurita* avec ceux de l'huile de poisson, comme une source habituelle d'AGPI n-3, sur les différents paramètres évalués dans l'expérience 2. Cependant, la qualité et la quantité de lipides apportés au régime hyperlipidique utilisé dans cette expérience ont été changées, par rapport à l'expérience 2, afin d'améliorer l'installation de la dyslipidémie. Vingt-quatre rats ont été randomisés en 4 groupes et soumis aux régimes suivants pendant 8 semaines :

Le régime témoin (T): correspond au régime normolipidique dont la composition est la suivante: 7 % de lipides (5 % de saindoux, 1 % d'huile de colza et 1 % d'huile de maïs), 23 % de protéines, 56 % de glucides, 6 % de cellulose, 7 % de minéraux et 1 % de vitamines.

Le régime HF₂: correspond au régime hyperlipidique avec un apport en lipides s'élevant à 40 % comprenant 5 % de saindoux, 1 % d'huile de colza, 1 % d'huile de maïs, auquel sont ajoutés 33 % d'huile de coprah hydrogénée comme une source riche en AGS.

Le régime HF₂OA: correspond au régime HF₂ précédemment décrit, supplémenté avec 12% (poids/poids) de lyophilisat d'*O. aurita*.

Le régime HF₂FO 0,5 %: correspond au régime HF₂ auquel sont ajouté 0,5 % (poids/poids) d'huile de poisson (Polaris, Pleuven, France) dont la composition est présentée dans l'annexe.

Les régimes HF₂OA et HF₂FO ont été préparés en ajoutant au régime HF₂, 12 % d'*O. aurita* et 0,5% d'huile de poisson, respectivement, de telle sorte qu'on obtient les mêmes apports d'AGPI n-3 (EPA et DHA) dans ces deux régimes. La composition détaillée des différents régimes utilisés au cours de cette expérience est présentée dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Composition détaillée des différents régimes testés au cours de l'expérience 3

Eléments (g/100g)	T	HF ₂	HF ₂ OA	HF ₂ FO 0,5%
Caséine	23	23	23	23
Amidon de maïs	20	8	8	8
Glucose monohydraté	38	15	15	15
Cellulose	6	6	6	6
Saindoux	5	5	5	5
huile de coprah hydrogénée	***	33	33	33
Lyophilisat de <i>O.aurita</i>	***	***	12	***
huile de poisson	***	***	***	0,5
Huile de maïs	1	1	1	1
Huile de colza	1	1	1	1
Minéral 205B SAFE	7	7	7	7
Vitamine 200 SAFE	1	1	1	1
Apport énergétique Kcal/Kg	3870	5440	5746	5485

*T : régime témoin ; HF₂ : régime hyperlipidique ; HF₂OA : régime hyperlipidique supplémenté avec 12 % de lyophilisat de *O.aurita* ; HF₂FO 0,5% : régime hyperlipidique supplémenté avec 0,5 % d'huile de poisson.*

2.1.2.4. Expérience 4

L'expérience 4 a consisté à comparer les effets de l'huile d'argan avec ceux de l'huile de poisson, sur les différents paramètres évalués dans les expériences 2 et 3. À cet effet, 24

rats mâles Wistar ont été randomisés en 4 groupes et nourris pendant 8 semaines avec les régimes suivants :

Le régime témoin (T): le même régime témoin utilisé au cours de l'expérience 3.

Le régime HF₂: le même régime hyperlipidique utilisé dans l'expérience 3.

Le régime HF₂AO: correspond au régime HF₂ auquel les 5 % de saindoux ont été substitués par 5 % d'huile d'argan (Argan oil company, Casablanca, Maroc).

Le régime HF₂FO 5 %: correspond au régime HF₂ auquel les 5 % de saindoux ont été substitués par 5 % d'huile de poisson (Polaris, Pleuven, France).

2.1.3. Manipulation sur l'animal

La prise alimentaire a été évaluée de manière journalière, et les rats ont été pesés deux fois par semaine afin de suivre le gain du poids des animaux au cours de chaque expérience. Après 8 semaines de régime, les rats ont été sacrifiés à jeun. Ils ont été anesthésiés par administration par voie intrapéritonéale de 0,1 mL/100g de masse corporelle d'un mélange diazepam/kétamine 4v/3v. Le sang a été ensuite prélevé au niveau de l'aorte abdominale et collecté dans des tubes en présence d'anticoagulant citraté. Les organes: foie, cœur, tissu adipeux et cerveau sont ainsi prélevés, rincés dans du sérum physiologique, pesés et ensuite conservés à -80 °C.

2.2. Etude clinique sur l'effet de l'huile d'argan sur le bilan lipidique, la fonction des plaquettes et leur état rédox chez des patients dyslipidémiques

Une approche clinique chez l'homme a été développée afin d'étudier l'effet de l'huile d'argan sur les paramètres lipidiques plasmatiques, l'agrégation plaquettaire et le stress oxydatif chez des patients dyslipidémiques.

2.2.1. Les patients

Cette étude a été réalisée sur des patients dyslipidémiques consultant le service d'Endocrinologie, Diabétologie et Nutrition du Centre Hospitalier Universitaire Ibn Sina, Rabat, Maroc. Le critère d'inclusion pris en compte était l'augmentation du taux d'au moins un des lipides athérogènes circulaires (cholestérol total > 2 g/L ; triglycérides > 1,5 g/L ;

LDL-cholestérol $> 1,5$ g/L). En revanche, étaient exclus de l'étude tout patient présentant une complication cardiaque, rénale ou hépatique; prenant des médicaments anti-agrégants (aspirine, thiénoxydines) ou hypolipémiants (statines, fibrates), prenant un régime diététique spéciale ou suivant une thérapie hormonale durant les 6 mois précédent l'étude. Les patients étaient informés de l'objectif et du protocole de l'étude avant d'intégrer l'étude. Leurs habitudes nutritionnelles étaient également investigués à l'aide d'un questionnaire détaillé.

2.2.2. *Protocole de l'étude clinique*

Parmi 78 patients consultés, seulement 39 ont été sélectionnés selon les critères d'inclusion et d'exclusion précédemment décrits. L'étude s'est déroulée en deux périodes (Figure 17). La première correspond à la période de stabilisation, durant laquelle tous les patients sélectionnés consomment 20 g/j de beurre au petit déjeuner pendant 2 semaines. Cette période permet d'équilibrer l'apport lipidique individuel des patients avant de commencer la période d'intervention. À la fin de la période de stabilisation, les 39 patients ont été répartis en deux groupes: groupe témoin (T, 18 patients) et groupe argan (AO, 21 patients) pour ensuite entrer en deuxième période de l'étude, la période d'intervention qui, elle, dure 3 semaines. Au cours de cette période, le groupe témoin continue à recevoir les 20 g/j de beurre, cependant chez le groupe AO, le beurre a été remplacé par 25 mL/j d'huile d'argan.

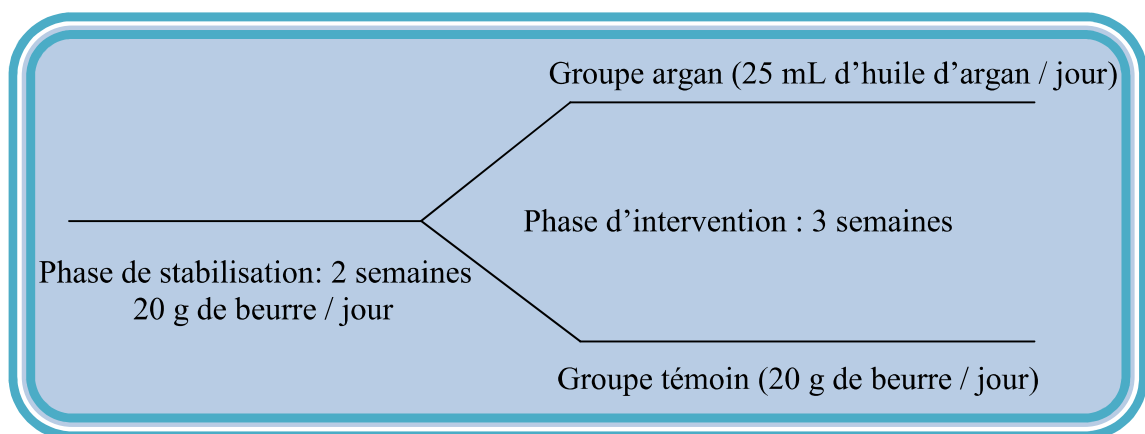


Figure 17: Protocole expérimentale de l'étude clinique. Les patients recrutés dans l'étude consomment 20 g de beurre par jour dans leur petit déjeuner pendant 2 semaines: phase de stabilisation. Après, les 2 semaines de stabilisation, les patients sont randomisés en deux groupes; le premier (groupe argan, 21 patients) consomme 25 mL/j d'huile d'argan dans leur petit déjeuner pendant 3 semaines. Le deuxième groupe (groupe témoin, 18 patients) continue à recevoir les 20 g de beurre / jour dans leur petit déjeuner pendant 3 semaines.

2.2.3. Prélèvements sanguins

Trois prélèvements sanguins, par voie intraveineuse, ont été effectués au cours de cette étude. Le premier a été fait avant la période de stabilisation, dans des tubes à sec après 12 h de jeun. Ces échantillons ont servi pour confirmer la dyslipidémie par une analyse du bilan lipidique avant de commencer l'étude. Le deuxième prélèvement a été effectué au début la période d'intervention (c'est-à-dire à la fin de période de stabilisation). Le sang collecté au cours de ce prélèvement est réparti en 2 tubes différents. Le premier échantillon est collecté dans un tube à sec pour servir à l'analyse du bilan lipidique avant l'intervention. Cependant, le deuxième échantillon est collecté dans un tube en présence d'un anticoagulant citraté et destiné à l'isolement et l'analyse des plaquettes sanguines. À la fin de la période d'intervention, un troisième prélèvement, identique au deuxième, a été effectué afin de comparer les paramètres lipidiques et plaquettaires entre le début et la fin de la période d'intervention.

2.3. Isolement des plaquettes sanguines

2.3.1. Chez le rat

Le sang est prélevé dans des tubes en plastique contenant l'acide citrique, dextrose (ACD) comme anticoagulant à raison de 9 volumes de sang pour 1 volume d'anticoagulant. Les plaquettes sont isolées selon la méthode décrite par Mekhfi *et al.* (2004) avec modification (Figure 18). Brièvement, le sang prélevé est immédiatement centrifugé à 230 g pendant 15 min à température ambiante. Les plaquettes sont ainsi séparées des autres éléments sanguins et retrouvées dans la partie supérieure du tube. Le plasma riche en plaquette (PRP) est prélevé délicatement puis acidifié à pH 6,4 par l'ajout de quelques gouttes d'acide citrique 0,15 M afin d'éviter l'agrégation spontanée des plaquettes. Le PRP est ensuite centrifugé à 900 g pendant 15 min pour sédimenter les plaquettes en culot. Le surnageant, plasma pauvre en plaquette (PPP) est récupéré et servi aux analyses plasmatiques. Le culot plaquettaire est délicatement remis en suspension dans une solution tampon à pH 7,4 (NaCl: 137 mM, KCl: 2,6 mM, MgCl₂: 0,9 mM, Glucose: 5,5 mM, Gélatine: 0,25 %, HEPES: 5 mM, CaCl₂: 1,3 mM).

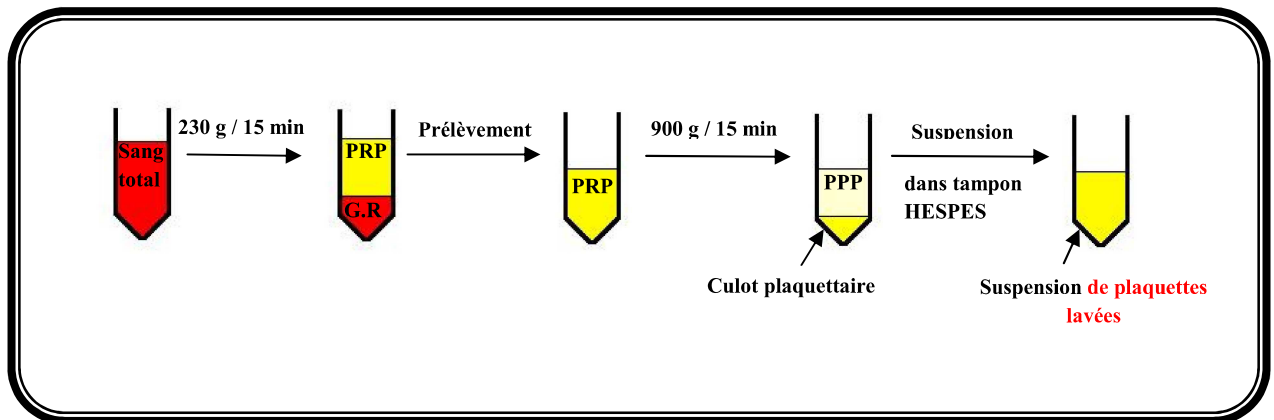


Figure 18: Différentes étapes de l'isolement des plaquettes chez le rat.
 PRP : plasma riche en plaquettes ; G.R. : globules rouges ; PPP : plasma pauvre en plaquettes

2.3.2. Chez l'homme

Les plaquettes humaines sont isolées selon la technique de Lagarde *et al.* (1980), à partir du sang des patients recueilli sur anticoagulant citrate, phosphate, dextrose (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'un volume de CPD pour 7 volumes de sang. Les échantillons de sang sont centrifugés à 200 g pendant 17 min à température ambiante. Le PRP est prélevé puis acidifié à pH 6,4 par l'ajout de quelques gouttes d'acide citrique 0,15 M. Le PRP est aussitôt centrifugé à 900 g pendant 12 min, le surnageant est éliminé et le culot plaquettaire est repris dans une solution Tyrode-HEPES (NaCl: 137 mM, KCl: 2,7 mM, NaHCO₃: 11,9 mM, NaH₂PO₄: 0,41 mM, MgCl₂: 1 mM, glucose: 5,5 mM, HEPES: 5 mM – pH 7,3).

2.4. Numération plaquettaire

Afin de reproduire les mêmes signaux d'agrégation et de pouvoir les comparer, il est impératif de travailler à une concentration constante des plaquettes dans la suspension. À cet effet, une numération plaquettaire est réalisée à l'aide d'un compteur de cellules (coulter) (Beckman coulter, Villepinte, France), sur un aliquote de 100 µL de suspension de plaquettes lavées. La concentration des plaquettes est ajustée à $5 \cdot 10^5$ cellules/mL, par addition d'un volume calculé de la solution tampon.

2.5. Mesure de l'agrégation plaquettaire

2.5.1. Principe

Le principe de l'agrégation repose sur une méthode turbidimétrique développée sur le PRP par Born en 1962 (Born, 1962). La suspension plaquettaire présente une certaine turbidité ce qui diminue la transmission d'un faisceau lumineux à travers cette suspension. L'addition d'un agoniste de l'agrégation dans les conditions d'agitation constante induit l'agrégation des plaquettes et permet une augmentation de la transmission du faisceau lumineux. Ce changement de transmission est détecté par une cellule photoélectrique et la cinétique est retranscrite sur un enregistreur couplé à ce système.

2.5.2. Test d'agrégation plaquettaire chez le rat

Un volume de 225 μL de la suspension plaquettaire est introduit dans une cuve de l'agrégomètre APACT 4004 (LABiTEC, Ahrensburg, Allemagne) en présence de 1,3 mM de CaCl_2 . La suspension est incubée à 37 °C pendant 1 min sous une agitation continue à 1000 tr/min. L'agrégation totale (transmission du faisceau lumineux à 100 %) est calibrée sur la solution tampon et le 0 % de transmission est réglé sur la suspension plaquettaire avant l'ajout de l'agoniste. L'agrégation est ensuite initiée en ajoutant l'ADP (5 μM) ou le collagène (5 $\mu\text{g/mL}$) à la suspension plaquettaire.

2.5.3. Test d'agrégation plaquettaire chez l'homme

Dans la mesure où la quantité des plaquettes isolées à partir du volume de sang prélevé ne permet pas de réaliser la totalité des analyses prévues, nous n'avons utilisé qu'un seul agoniste, la thrombine, pour le test de l'agrégation plaquettaire chez l'homme. Un volume de 400 μL de la suspension plaquettaire est introduit dans une cuve de l'agrégomètre PACKS 4 (HELENA, Texas, USA). L'agrégation totale (transmission du faisceau lumineux à 100 %) est calibrée sur la solution Tyrode-HEPES et le 0 % de transmission est réglé sur la suspension plaquettaire avant l'ajout de l'agoniste. La suspension plaquettaire est incubée à 37 °C pendant 1 min sous une agitation continue à 1000 tr/min. L'agrégation est ensuite initiée en ajoutant la thrombine 0,2 U/mL à la suspension de plaquette lavées.

2.6. Dosage du thromboxane B₂

➤ Principe :

Ce dosage immunoenzymatique (EIA) est basé sur la compétition, entre le TXB₂ dans l'échantillon à doser et le TXB₂ couplé à une peroxydase alcaline, pour un nombre limité de sites de fixation sur un anticorps polyclonal anti-TXB₂ fixé sur un support solide. La peroxydase (couplée au TXB₂) réagit avec son substrat chromogène, le tétraméthylbenzidine (TMB) et le peroxyde d'hydrogène (Figure 19). Après une brève incubation à la température ambiante, la réaction est arrêtée par acidification, et la coloration résultante de la réaction enzymatique est mesurée par spectrophotométrie à 405 nm. La coloration est inversement proportionnelle à la quantité de TXB₂ contenue dans les échantillons. Une gamme étalon est réalisée à l'aide d'une solution de TXB₂ de concentration connue.

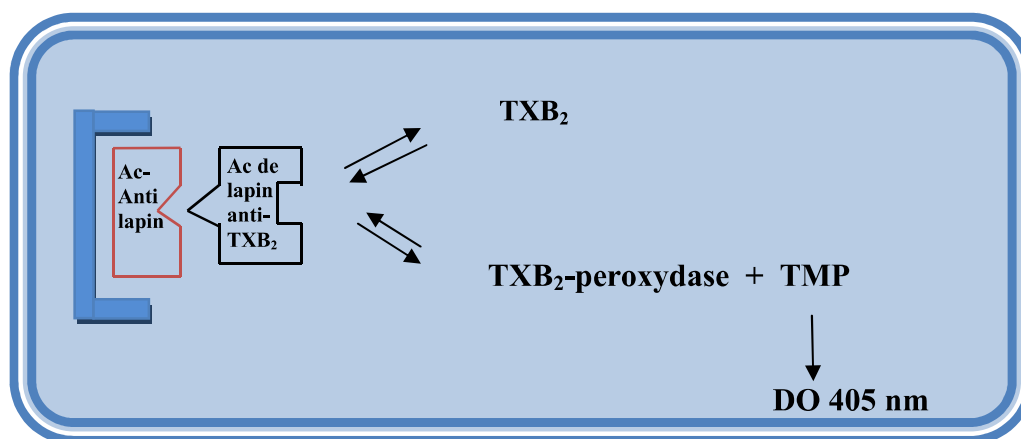


Figure 19: Schéma récapitulatif du dosage de TXB₂

➤ Dosage :

La concentration en TXB₂ des suspensions plaquettaires a été déterminée en utilisant un kit de dosage EIA de commerce (Enzolife sciences, Exeter, GB). Les plaquettes sont préalablement lysées par trois cycles de congélation/décongélation successives. 100 µL d'échantillons dilués, ou de standards, sont déposés dans les puits appropriés, auxquels 50 µL d'anticorps anti-TXB₂ et 50 µL de TXB₂-peroxydase sont ajoutés. La plaque est incubée à température ambiante pendant 2 h sous agitation oscillante. Le contenu de chaque puits est ensuite aspiré et rincé 3 fois avec la solution de rinçage fournie dans le kit. 200 µL de TMP est ajouté, puis la plaque est incubée à température ambiante pendant 45 min sans agitation.

Après l'incubation, la réaction est finalement stoppée en ajoutant 100 μ L de la solution stop fournie dans le kit de dosage. La densité optique est alors mesurée à 405 nm dans un lecteur de plaque ELISA.

2.7. Analyse de la composition lipidique

Les effets des différents régimes testés au cours cette étude, sur la modification de la composition en acides gras des lipides totaux et des différentes classes de lipides (PL et LN) ont été étudiés sur les organes prélevés (foie, cœur et tissu adipeux) ainsi que sur le plasma et les plaquettes sanguines.

2.7.1. Extraction des lipides totaux

➤ À partir des organes

L'extraction des lipides totaux provenant d'organes est réalisée selon la méthode de Folch *et al.* (1957). Un échantillon d'organe, de poids connu, est broyé à l'aide d'un ultrathurrax en présence d'un mélange de solution chloroforme/méthanol (2v/1v) à raison de 20 mL pour 1 g d'échantillon. Le butyl hydroxy-toluène (BHT) a été ajouté au mélange d'extraction à une concentration finale de 50 μ M afin d'éviter l'éventuelle oxydation des lipides. Pour permettre une meilleure extraction, le broyat est fermé sous flux d'azote et laissé décanter une nuit à 4 °C. Après décantation, le broyat est filtré à l'aide de papier filtre sans cendres, et le filtrat ainsi obtenu est récupéré dans un ballon en Pyrex, et ensuite évaporé sous vide partiel à l'aide d'un évaporateur rotatif Heidolph 94200 (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). L'extrait sec ainsi obtenu est repris par 2 fois 1 mL de chloroforme, puis transféré dans un tube à méthyler et conditionné sous azote.

➤ À partir du plasma

L'extraction des lipides totaux plasmatiques est réalisée selon la méthode décrite par Delsal (1944). Après décongélation des échantillons, une aliquote de plasma est prélevée puis ajoutée goutte à goutte dans un tube à centrifuger en verre dans lequel a été introduit au préalable 5 volumes d'un mélange formaldéhyde diméthylacétal/méthanol (4v/1v) et le BHT à

une concentration finale de 50 μM , en agitant au vortex après chaque adjonction. Le contenu du tube ainsi obtenu est centrifugé à 725 g pendant 10 min. Un culot protidique se sépare du surnageant qui représente la phase organique contenant les lipides. Le surnageant est recueilli délicatement et placé dans un ballon en Pyrex. Une deuxième extraction est ensuite réalisée en rajoutant 5 volumes du mélange d'extraction dans le tube à centrifuger. Le culot protidique est cassé à l'aide d'une pipette pasteur, puis le contenu du tube est agité au vortex. Après une nouvelle centrifugation à 1630 g pendant 10 min, le deuxième surnageant obtenu est ajouté au premier dans le ballon. L'extrait lipidique obtenu est évaporé sous vide partiel à l'aide d'un évaporateur rotatif, ensuite l'extrait sec est repris par 2 fois 1 mL de chloroforme et transféré dans un tube à méthyler.

2.7.2. Séparation des classes lipidiques

Les extraits de lipides totaux provenant d'organes ou du plasma sont fractionnés en 2 échantillons de volumes égaux, le premier sert à l'analyse de la composition en acides gras des lipides totaux de ces tissus, le deuxième en revanche, sert à la séparation des principaux classes lipidiques (LN et PL) et à l'analyse de leur composition en acides gras.

➤ Séparation sur micro-colonne de silice

Les classes lipidiques correspondant aux LN et aux PL sont obtenues par chromatographie sur colonne de silice (Sep-Pak, Waters, France) selon la méthode de Sukenik *et al.* (1989). Après lavages successifs de la colonne par 20 mL de méthanol puis 20 mL de chloroforme, un volume de 1 mL d'extrait lipidique total concentré sous flux d'azote puis repris par 100 μL de chloroforme, est déposé sur la colonne. Les LN sont élués par 40 mL de chloroforme et les PL par 60 mL de méthanol. Les fractions ainsi recueillies sont concentrées par évaporation sous vide partiel, et les extraits sec de chaque fraction est repris par 2 fois 1 mL de chloroforme.

➤ Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

Afin de vérifier la pureté des fractions lipidiques obtenues, une CCM de ces fractions est réalisée, en présence des standards correspondants. L'analyse est réalisée grâce à une

double migration en une dimension, selon la méthode décrite par Henderson et Tocher (1992). Lors de la première migration, les lipides polaires sont séparés en présence d'un mélange de solvants composé de: acétate de méthyle/propan-2-ol/chloroforme/méthanol/solution aqueuse de KCl à 0,25 % dans les proportions respectives 25v/25v/25v/10v/9v. La première migration est arrêtée lorsque le solvant atteint le centre de la plaque et le front de solvant est immédiatement marqué, il correspond au front de migration des lipides polaires. Après séchage de la plaque sous hotte ventilée à température ambiante, la deuxième migration est réalisée dans une nouvelle cuve contenant le mélange de solvants suivant: hexane/diéthyl ether/acide acétique glacial dans les proportions respectives 80v/20v/2v, qui permet de séparer les LN. Cette migration est réalisée sur toute la hauteur de la plaque chromatographique. La plaque est ensuite séchée à température ambiante sous une hotte ventilée, puis les différents spots sont révélés en présence d'un milieu saturé en iode. Les différentes classes lipidiques sont identifiées par comparaison de leur rapport frontal avec celui obtenu à partir des standards correspondants.

2.7.3. Dérivation des acides gras en esters méthyliques d'acides gras

La détermination de la composition en acides gras des lipides totaux et de chacune des fractions lipidiques par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) nécessite la dérivation des acides gras de ces lipides sous forme d'esters méthyliques d'acides gras volatils.

Les esters méthyliques d'acides gras sont obtenus par saponification des lipides simples et complexes puis méthylation des sels des acides gras (Figure 20), selon la méthode de Slover et Lanza (1979).

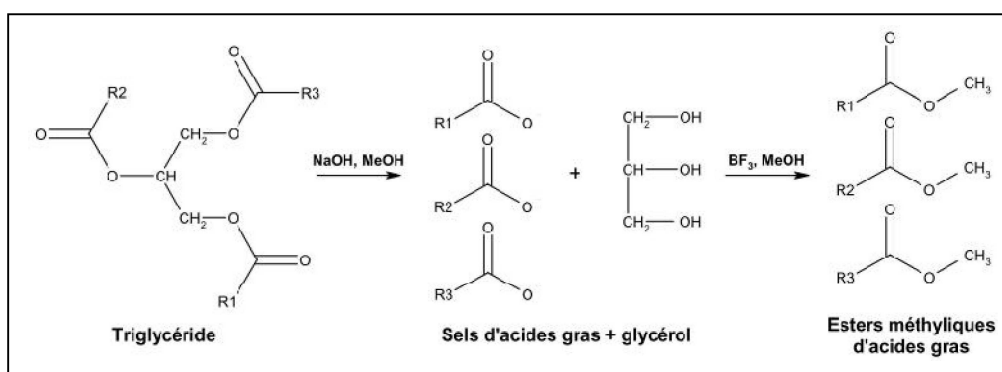


Figure 20: Réaction de saponification et de méthylation des acides gras

Après évaporation sous flux d'azote d'un volume précis d'extrait, de lipides totaux et/ou de chacune des fractions lipidiques, le résidu lipidique sec est repris dans 1 mL d'une solution méthanolique d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 0,5 M, puis le tube à méthyler est fermé sous flux d'azote afin d'éviter les phénomènes d'oxydation. Les lipides sont ensuite saponifiés en chauffant les tubes à 80 °C pendant 20 min au bain de sable. Les sels d'acides gras ainsi obtenus sont ensuite méthylés en ajoutant 2 mL d'une solution méthanolique de trifluorure de bore (BF₃) à 15 % et en chauffant à 80 °C pendant 20 min. Les esters méthyliques d'acides gras ainsi obtenus sont extraits par l'ajout de 1 mL d'isooctane et 1 mL d'une solution de NaCl 35 %. Les tubes sont ensuite centrifugés à 1200 g pendant 2 min pour obtenir une bonne séparation des deux phases; la phase supérieure (isooctane) contenant les esters méthyliques d'acides gras est récupérée puis séchée par passage sur une colonne de sulfate de sodium anhydre. L'extraction est réalisée une deuxième fois et les esters méthyliques d'acides gras sont alors recueillis dans des tubes en verre et peuvent être conservés à -20 °C pendant plusieurs mois après conditionnement sous azote.

2.7.4. Analyse de la composition en acides gras des phospholipides des plaquettes

Les lipides totaux provenant des plaquettes sanguines sont extraits selon la méthode décrite par Bligh et Dyer (1959). Une aliquote de suspension de plaquettes sanguines isolées à partir du sang des rats soumis aux différents régimes testés est mise dans un tube à centrifuger en verre contenant 5 volumes du mélange chloroforme/méthanol (2v/1v) en présence de BHT 50 µM. Après agitation et 30 min de repos, un mélange de NaCl/chloroforme (1v/1v) est ajouté. Le tube est ensuite centrifugé à 700 g pendant 10 min et la phase chloroformique est récupérée dans un ballon en Pyrex. Une deuxième extraction est effectuée et les phases organiques obtenues sont réunies puis évaporées sous vide partiel.

A raison de la faible quantité de lipides dans les plaquettes, nous nous sommes intéressés directement à la composition en acides gras des phospholipides. A cet effet, une autre approche, plus sensible, a été utilisée pour la séparation des lipides et la dérivation des acides gras des phospholipides plaquettaires. Les extraits secs sont repris dans un faible volume du mélange chloroforme/méthanol (2v/1v) et déposés sur plaques de silice G60 préalablement lavées au méthanol et séchées sous la hotte. La séparation des lipides est effectuée par migration en présence d'un mélange de solvants constitué par

l'héxane/l'éther/l'acide acétique dans les proportions suivantes: (70v/30v/1v). Les phospholipides très polaires restent à l'origine ($R_f = 0$), alors que les lipides neutres migrent plus haut. Après la migration, les bandes de silice correspondant aux phospholipides des plaquettes sanguines sont grattées et récupérées dans un tube à méthyler. Les acides gras sont transméthylés en présence de 5% d'acide sulfurique dans le méthanol et en chauffant dans un bain de sable à 100 °C pendant 90 min. La réaction est arrêtée en plongeant les tubes dans la glace et en ajoutant 1,5 mL de carbonate de potassium (K_2CO_3) 5% afin de neutraliser le milieu. Les esters méthyliques d'acides gras ainsi obtenus sont extraits par 2 mL d'isooctane.

2.7.5. Analyse des esters méthyliques d'acide gras par CPG

Les esters méthyliques d'acides gras préparés à partir des lipides totaux et des fractions lipidiques provenant des organes, du plasma et des plaquettes sanguines sont analysés à l'aide d'un chromatographe Focus GC (Thermo Electron Corporation, Les Ulis, France) couplé à un détecteur à ionisation de flamme (FID).

➤ Principe

En CPG, la phase mobile est constituée d'un gaz vecteur (le gaz utilisé lors de cette étude est un gaz inerte: l'azote) et la phase stationnaire est ici une colonne capillaire polaire Chrompack CP SIL 88 de 25 m x 0,25 mm (Varian, Les Ulis, France). Les constituants du mélange sont séparés d'une part en fonction de leur point d'ébullition qui diffère selon le nombre de carbones des AG et d'autre part en fonction de leur polarité, qui varie en fonction du nombre de double liaisons. A la sortie de la colonne, les produits sont détectés à l'aide d'un FID; la combustion des composés fournit un courant ionique qui est mesuré entre deux électrodes. Ce courant constitue le signal de sortie et est fonction du débit massique de carbone donc proportionnel à la masse de carbones présents dans la molécule détectée (Figure 21).

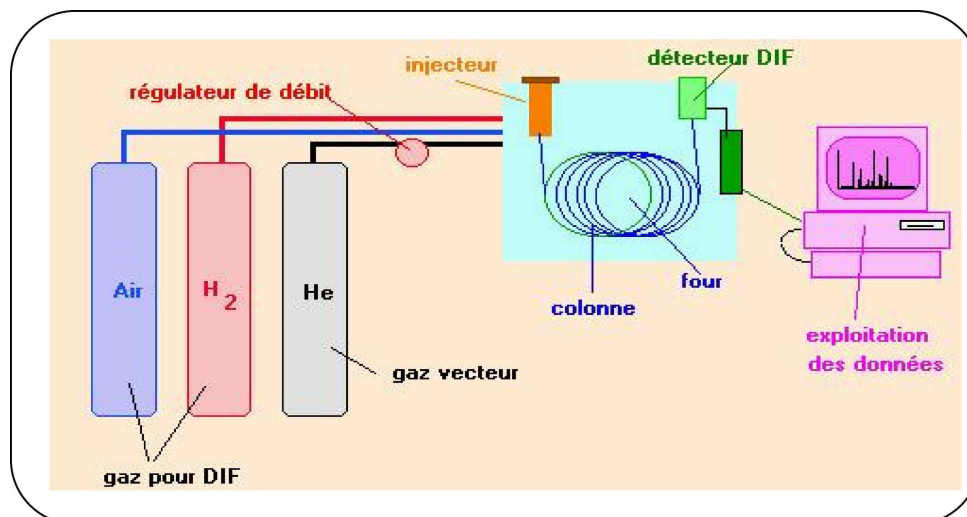


Figure 21: Schéma du principe de la chromatographie en phase gazeuse

➤ Protocole

Un volume de 3 μL est déposé à l'aide d'un injecteur automatique split/splitless AI 3000 (Thermo Electron Corporation, Les Ulis, France) dont la température est fixée à 250 °C. Le gaz vecteur est fixé à un débit de 1 mL min^{-1} . Après l'injection, le four est maintenu à 120 °C pendant 4 min puis un gradient de température de 120 °C à 220 °C est appliqué avec un pas de 6 °C min^{-1} . Le « split » a un ratio de 15 soit un débit de fuite de 15 mL min^{-1} . La température du FID est de 280 °C, il est alimenté par un mélange d'air et d'hydrogène dont les pressions respectives sont de 2 bars et 1 bar. Des mélanges d'esters méthyliques d'acides gras purs (Sigma, St Quentin Fallavier, France) sont utilisés pour déterminer les temps de rétention des principaux acides gras.

Les acides gras sont quantifiés par détermination de leurs pourcentages molaires. Un enregistreur, équipé d'une carte d'acquisition et du logiciel AZUR V.4 (Datalys, Les Ulis, France), conçu pour la CPG et la Chromatographie en Phase Liquide (CPL), analyse les données acquises après réception du signal électrique émis par le détecteur.

2.8. Dosage des paramètres biochimiques

2.8.1. Dosage des paramètres lipidiques et de la glycémie chez le rat

Pour évaluer l'effet des différents régimes testés, sur le taux de glucose, de cholestérol total et des triglycérides circulaires, une analyse des plasmas des rats est effectuée à la fin de chaque expérience nutritionnelle.

Les taux de cholestérol total et des TG sont déterminés à l'aide de kits enzymatiques commerciaux spécifiques (RTUTM et TG PAP 150, respectivement). Le dosage est effectué sur des aliquotes de plasma des rats selon les protocoles fournis par le fournisseur (Biomérieux S.A., Marcy l'Etoile, France).

La glycémie a été mesurée à l'aide d'un glucomètre sur des gouttes de sang prélevées à partir de la queue des animaux.

2.8.2. Dosage du cholestérol total et des TG hépatiques chez le rat

Une aliquote de l'extrait chloroformique de lipides totaux hépatiques est utilisée pour le dosage des taux de cholestérol totale et des TG dans le foie des rats. 100 µL de l'extrait chloroformique de lipides totaux hépatiques sont évaporés sous flux d'azote. L'extrait sec ainsi obtenu est dilué dans une solution d'éthanol, puis les taux de cholestérol et des TG sont déterminés à l'aide des kits enzymatiques commerciaux (Biomérieux S.A., Marcy l'Etoile, France).

2.8.3. Dosage de l'insuline plasmatique chez le rat

La quantité de l'insuline au niveau plasmatique a été déterminée chez les rats soumis aux différents régimes en utilisant un kit de dosage EIA de commerce (Biorad, France). Le dosage est effectué sur des aliquotes de plasma en suivant le protocole fournis par le fournisseur.

2.8.4. Détermination du bilan lipidique chez l'homme

Le bilan lipidique est déterminé sur les sérums préparés à partir des échantillons de sang des patients, prélevés sur des tubes secs. Le taux du cholestérol total et des TG circulaires sont dosés par des kits enzymatiques commerciaux (Randox, Crumlin Co., Antrium, UK) selon le protocole fournis par le fournisseur. Cependant, le HDL-cholestérol est déterminé par précipitation du complexe: chylomicrons, LDL-cholestérol et VLDL-

cholestérol, sous l'action de l'acide phosphotungstique et les ions Mg^{2+} contenus dans le kit commercial pour le dosage de HDL-cholestérol (Randox HDL cholesterol precipitant, Randox, Crumlin Co., Antrium, UK). Quant au taux de LDL cholestérol, il est évalué en utilisant la formule de Friedewald (1972) :

$LDL \text{ cholestérol (g/L)} = \text{cholestérol totale (g/L)} - \text{HDL cholestérol (g/L)} - \text{triglycérides} / 5 \text{ (g/L)}$.

2.9. Dosage des marqueurs du stress oxydatif

2.9.1. Dosage du MDA

➤ Principe

Le dosage du MDA est basé sur la réaction de ce dernier avec 2 molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) en milieu acide et à chaud selon un mécanisme d'addition nucléophile (Figure 22). Le chromophore formé, MDA-TBA de couleur rose, est dosé par spectrophotométrie à 532 nm selon la méthode de Ohkawa *et al.*, (1978).

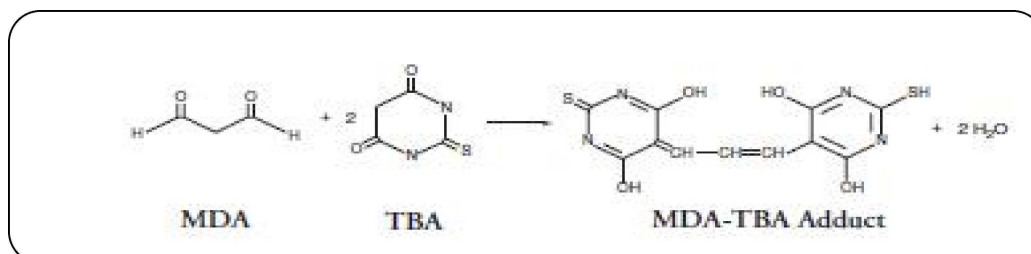


Figure 22: Réaction du MDA avec l'acide thiobarbiturique

➤ Protocole

Le dosage du MDA est effectué directement sur les suspensions plaquettaires après décongélation, ou sur un broyat d'organe (foie ou Cœur). A cet effet, 0,5 g d'organe est broyé dans 4,5 mL d'une solution de KCl (1,15 %) à l'aide d'un ultrathurrax. Le broyat ainsi obtenu est centrifugé à 400 g pendant 10 min, et le dosage des différents marqueurs du stress oxydatif est réalisé sur le surnageant.

Dans un tube à hémolyse en verre contenant une aliquote de suspension plaquettaire ou de broyat d'organe, sont ajoutés: 100 μL d'une solution de SDS à 8,1 %, 750 μL d'acide acétique 20 % à pH 3,5; 300 μL de l'eau distillée et 750 μL d'une solution de TBA à 0,8 %. Après agitation, les tubes sont placés dans un bain-marie à 95 °C pendant 60 min pour favoriser la réaction du MDA avec le TBA présent dans le milieu. La réaction est stoppée en plaçant la préparation 5 min dans la glace. Le complexe MDA-TBA formé durant la réaction est extrait en ajoutant 0.5 mL d'eau distillée et 2,5 mL d'une solution de *n*-butanol/pyridine (15v/1v). Après agitation, le mélange est centrifugé à 400 g pendant 10 min. La phase organique (supérieure) est récupérée, et la quantification du MDA est réalisée par mesure de la densité optique sur un spectrophotomètre-UV à une longueur d'onde de 532 nm. La quantité du MDA dans les échantillons est calculée grâce à une gamme étalon réalisée avec des quantités connues d'un précurseur du MDA, le 1,1,3,3'-tetraméthoxypropane (TMP) dans les conditions expérimentales sus-décrites.

2.9.2. Mesure de l'activité enzymatique de GPx

➤ Principe

L'activité GPx est déterminée selon la méthode de Paglia & Valentine (1967), modifiée par Chaudière & Gérard (1988). Ce dosage est basé sur la mesure indirecte de la vitesse d'oxydation du glutathion (GSH) catalysé par la GPx, par l'intermédiaire de la vitesse d'oxydation du NADPH en NADP^+ , via la GSSG réductase (Figure 23).

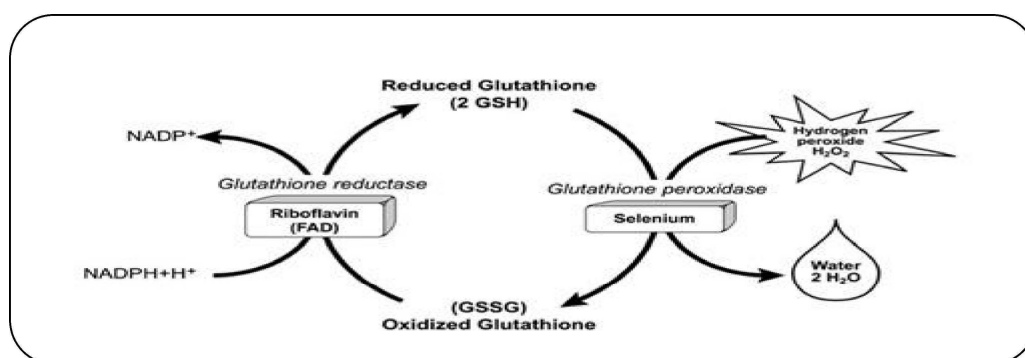


Figure 23: Principe du dosage de l'activité enzymatique de GPx

➤ Protocole

La suspension plaquettaire est lysée auparavant par sonication à une faible intensité pendant 5 min, puis le lysat est centrifugé à 1500 g pendant 10 min à 4 °C. La mesure de l'activité enzymatique de la GPx est réalisée sur le surnageant du lysat plaquettaire ou sur le surnageant du broyat d'organe.

Dans une cuvette de spectrophotomètre thermostatée à 37 °C, sont introduits 1,5 mL de tampon Tris HCl (50 mM), EDTA (0,1 mM), pH 7,6 contenant 0,14 mM de NADPH, 2 mM de GSH, 0,64 U/mL de GSSG-réductase et 100 µL d'échantillon (lysat de suspension plaquettaire ou broyat d'organe). Le mélange est pré-incubé à 37 °C pendant 3 min, puis la réaction est démarrée en ajoutant 50 µL de substrat, le tert-butyl-hydroxyperoxyde (0,2 mM). L'absorbance est mesurée pendant 5 min à la longueur d'onde de 340 nm. Afin d'évaluer la réduction spontanée du NADPH lors de la réaction, un blanc non enzymatique est réalisé en remplaçant l'échantillon par 100 µL de tampon Tris HCL. La vitesse de décroissance du NADPH, $d(\text{NADPH})/dt$, est calculée à partir de la pente de la droite décrivant la variation d'absorbance à 340 nm. La vitesse enzymatique, obtenue après soustraction du blanc correspond à:

$$v = \frac{d(\text{ROOH})}{dt} = \frac{d(\text{NADPH})}{dt} \times \frac{V}{\varepsilon}$$

$$v = 265,3 \times \frac{d(A_{340})}{dt}$$

Où :

V = volume d'incubation.

ε = coefficient d'extinction molaire du NADPH ($\varepsilon = 6,22.106 \text{ mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Définie pour une concentration donnée de GSH, l'activité de la GPx est exprimée en nmol d'hydroperoxydes réduits par min ce qui équivaut à la quantité de NADPH oxydé par min.

2.10. Dosage des protéines

Pour connaître la quantité de protéines dans les échantillons destinés à l'analyse des marqueurs du stress oxydatif, un dosage protéique des échantillons analysés est nécessaire. Le principe repose sur la fixation non covalente à la protéine du bleu de coomassie brillant G250, déplaçant ainsi son maximum d'absorption de 465 nm à 595 nm. La quantification des protéines dans les échantillons est réalisée à l'aide d'une gamme étalon de l'albumine sérique bovine (BSA).

2.11. Etude histologique du foie et du tissu adipeux

Des coupes histologiques du foie et du tissu adipeux sont effectuées, pour chaque groupe de rats, selon la méthode classique d'inclusion sur paraffine (voir GABE 1968).

2.11.1. Préparation des échantillons

Des morceaux du foie et du tissu adipeux sont coupés, rincés au liquide physiologique et aussitôt placés dans des piluliers contenant un volume précis du liquide de Bouin (acide picrique, formol, acide acétique dans les proportions: 3v/1v/0,2v, respectivement). Les échantillons sont ensuite placés sous agitation oscillante pendant 24 h.

Après la fixation chimique, la préparation des échantillons met en jeu les étapes suivantes: la déshydratation, l'imprégnation et l'inclusion en paraffine.

La déshydratation repose sur une succession d'immersion dans des solutions d'éthanol à concentrations croissantes à des durées différentes: un bain de 60 min dans l'eau, un bain de 60 min dans l'éthanol 70 %, trois bains de 60 min dans l'éthanol 95 %, un bain de 60 min dans un mélange d'éthanol/butanol-1 (1v/1v), puis deux bains de 3 h dans le butanol-1.

L'imprégnation est réalisée dans trois incubations de 3 h dans la paraffine fondue à 60 °C. Après la phase d'imprégnation, la paraffine est déposée dans des moules et les échantillons sont disposés de façon parallèle au moule et donc au plan de coupe. Les moules ainsi remplis sont laissés à température ambiante. Une fois séchés, les blocs sont démoulés et prêts à être coupés.

2.11.2. Coloration histologique


A partir des blocs de paraffine, des coupes semi-fines de 10 μm et 5 μm pour les tissus adipeux et les foies, respectivement, sont réalisées à l'aide d'un microtome. Les coupes sont ensuite fixées sur lame de verre, à l'aide d'une solution de gélatine 1 %.

Après séchage des lames, une coloration Hématoxyline-Eosine est réalisée afin de visualiser les coupes histologiques du foie et du tissu adipeux. La coloration Hématoxyline-Eosine permet de constater les cellules en rose, les noyaux en violet et le tissu conjonctif en jaune. Elle est adaptée d'une coloration de base courante en histologie (Bancroft et Stevens, 1990). La coloration Hématoxyline-Eosine se déroule en plusieurs étapes: une incubation de 2 min dans le réactif Hématoxyline de Groat, un lavage d'une minute à l'eau, une incubation de 2 min dans une solution d'éosine et enfin un lavage d'une minute à l'eau. Après déshydratation, les lames sont conservées en appliquant une goutte d'un conservateur, l'Eukitt. A cette stade les coupes peuvent être conservées à température ambiante jusqu'aux acquisitions d'images en microscopie optique.

2.12. Analyse statistique des données

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics Inc, Rockville, MD, USA). Après vérification de la distribution normale des données, des analyses de variance (ANOVA) à plusieurs facteurs (effets des différents régimes testés) ont été effectuées. Des tests *a posteriori* de Student-Newman-Keuls (SNK) ont été appliqués à la suite pour déterminer les données qui diffèrent les unes des autres. Pour chaque régime testé, des lettres différentes ou un astérisque sont affectés pour identifier les valeurs qui sont significativement différentes ($p \leq 0,05$).

Résultats expérimentaux



**Effet-dose d' *Odontella aurita* sur
certains paramètres biochimiques et sur
l'enrichissement des phospholipides
plasmatiques et hépatiques en n-3 AGPI**

Effet-dose de *Odontella aurita* sur certains paramètres biochimiques et sur l'enrichissement des phospholipides plasmatiques et hépatiques en n-3 AGPI

1. Introduction :

Il est actuellement bien admis que les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de la série oméga-3, principalement l'EPA et le DHA, contribuent à la prévention de certains facteurs de risque liés aux pathologies cardiovasculaires. Les recommandations internationales exigent un apport régulier d'oméga-3 dans notre alimentation quotidienne pour maintenir un rapport oméga-6/oméga-3 satisfaisant (proche de 5). En effet, ce rapport est quatre fois trop élevé chez les populations des pays développés. Une des solutions avancées pour rétablir l'équilibre de ce rapport consiste en la supplémentation nutritionnelle à l'aide d'une source riche en oméga-3. Les huiles de poisson représentent la principale source d'AGPI-LC de la série oméga-3. Cependant, la diminution des ressources halieutiques et la génération de déchets polluants au cours du procédé de fabrication de ces huiles entre autres problèmes, contribuent à rechercher des sources alternatives d'oméga-3. De par sa richesse en EPA et en d'autres molécules bio-actives, la microalgue *Odontella aurita* a été autorisée en nutrition humaine en 2003, comme complément alimentaire riche en oméga-3, par l'AFSSA (Agence Française pour la Sécurité Sanitaire des Aliments).

Dans cette étude préliminaire, nous avons testé différentes doses de lyophilisat d'*O. aurita*, supplémentées à un régime standard, sur certains paramètres biochimiques (la glycémie, la triglycéridémie et la cholestérolémie) et sur l'enrichissement des lipides plasmatiques et tissulaires en oméga-3 chez des rats Wistar mâles. Au cours de cette étude, les doses 1%, 3%, 9% et 12% ont été testées afin de déterminer la dose minimale permettant une incorporation significative de l'EPA, et éventuellement sa conversion en DPA et en DHA, dans les lipides plasmatiques et hépatiques des animaux.

2. Résultats et discussion :

2.1. Suivi nutritionnel des animaux

La courbe de l'évolution du poids des animaux durant les 7 semaines de l'étude (Figure 24) nous révèle que les 4 doses de *O. aurita* testées (1%, 3%, 9% et 12%), n'ont aucune influence sur le poids des animaux en comparaison avec le témoin. La microalgue *O. aurita* est une diatomée marine riche en EPA et contient entre autre des biomolécules actives, comme les pigments, en plus faible quantité. Des études épidémiologiques et cliniques ont montré que les n-3 AGPI marins (EPA et DHA) n'ont aucun effet sur le poids chez des sujets sains (Defina *et al.*, 2011). Cependant, plusieurs études ont montré que les n-3 AGPI d'origine marine (EPA et DHA), lorsqu'ils sont administrés dans le cadre d'une pathologie métabolique (obésité, syndrome métabolique), peuvent avoir un effet anti-obésité chez les rats et chez l'homme (Lorente-Cebrián *et al.*, 2013). Dans notre étude, *O. aurita* est supplémentée à un régime standard et est administrée à des animaux sains, ce qui expliquerait que l'EPA apporté par les différentes doses de *O. aurita* n'a pas influencé le poids des animaux.

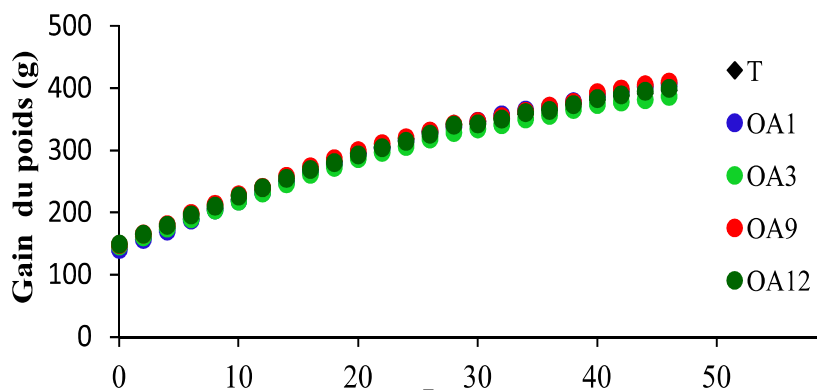


Figure 24 : Effet de différentes doses de *Odontella aurita* supplémentées à un régime standard sur le poids corporel des rats durant les 7 semaines de régime. Les rats ont subi des régimes différents pendant 7 semaines, selon les lots (n=6), T : témoin, un régime normolipidique standard ; OA1 : le régime standard T supplémenté avec 1% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA3 : le régime standard T supplémenté avec 3% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA9 : le régime standard T supplémenté avec 9% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA12 : le régime standard T supplémenté avec 12% de lyophilisat de *O. aurita*.

Afin d'évaluer la quantité de régime moyenne consommée quotidiennement par chaque rat, nous avons suivi la prise alimentaire journalière de chaque lot pendant la durée de l'étude. Les résultats de la prise alimentaire cumulée sont présentés dans la figure 25. Les résultats montrent que les rats des différents lots avaient une prise alimentaire moyenne similaire tout au long de l'étude, ce qui nous permet de conclure que *O. aurita*, à faible comme à moyenne dose, n'influe pas l'appétit des animaux. Cela représente un des avantages de l'utilisation de *O. aurita* comme supplément alimentaire. Les huiles de poissons, qui représentent la première source des AGPI n-3 d'origine marine ont une odeur désagréable qui peut déranger le consommateur de ces huiles comme un supplément alimentaire.

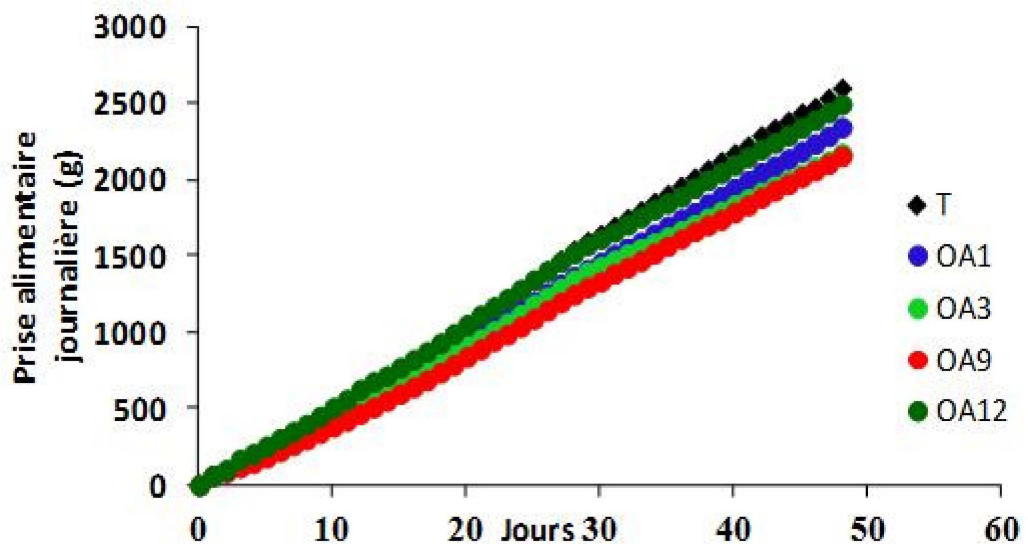


Figure 25 : Effet de différentes doses de *Odontella aurita* supplémentées à un régime standard sur la prise alimentaire journalière des rats durant les 7 semaines de régime. Les rats ont subi des régimes différents pendant 7 semaines, selon les lots ($n=6$), T : témoin, un régime normolipidique standard ; OA1 : le régime standard T supplémenté avec 1% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA3 : le régime standard T supplémenté avec 3% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA9 : le régime standard T supplémenté avec 9% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA12 : le régime standard T supplémenté avec 12% de lyophilisat de *O. aurita*.

2.2 Poids des organes

Après 7 semaines de régime, les organes (foie, tissu adipeux, reins et cœur) des animaux ont été prélevés et leur poids a été évalué (Tableau IIX).

Tableau IIX : Effet de différentes doses de *O. aurita* supplémentées à un régime standard sur le poids des organes après 7 semaines de régime

(g)	Témoin	OA1	OA3	OA9	OA12
Tissu adipeux	4,00 ± 0,75	4,57 ± 0,77	4,78 ± 1,99	3,97 ± 1,23	4,21 ± 1,27
Reins	2,52 ± 0,16	2,68 ± 0,22	2,51 ± 0,08	2,79 ± 0,35	2,67 ± 0,4
Cœur	1,28 ± 0,16	1,47 ± 0,24	1,27 ± 0,12	1,32 ± 0,1	1,32 ± 0,16
Foie	10,98 ± 1,35	10,09 ± 1,37	10,01 ± 0,59	10,03 ± 0,75	10,21 ± 1,28

*Les rats ont subi des régimes différents pendant 7 semaines, selon les lots (n=4), T : témoin, un régime normolipidique standard ; OA1 : le régime standard T supplémenté avec 1% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA3 : le régime standard T supplémenté avec 3% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA9 : le régime standard T supplémenté avec 9% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA12 : le régime standard T supplémenté avec 12% de lyophilisat de *O. aurita*.*

Les résultats sont exprimés en moyennes ± écartype pour n = 6 animaux.

Selon les résultats présentés dans le tableau IIX, aucune différence significative du poids des organes n'est observée entre les différents groupes. Les différentes doses de *O. aurita* testées dans cette étude, n'ont en effet aucun effet sur le poids des organes des animaux après 7 semaines de régime.

2.3 Paramètres biochimiques plasmatiques

Les résultats montrant les effets des différentes doses de *O. aurita* sur les taux de glucose, de triglycérides et du cholestérol total au niveau plasmatique après 7 semaines de consommation sont présentés dans le tableau IX.

Tableau IX : Effet de différentes doses de *O. aurita* supplémentées à un régime standard sur les taux de glucoses, de triglycérides et du cholestérol total plasmatiques après 7 semaines de régime.

g/L	T	OA1	OA3	OA9	OA12
Glycémie	1,65 ± 0,13	2,39 ± 0,09	2,03 ± 0,38	1,70 ± 0,15	2,30 ± 0,91
Triglycéridémie	0,86 ± 0,12	0,84 ± 0,14	0,83 ± 0,11	0,87 ± 0,11	0,95 ± 0,29
Cholestérolémie	0,64 ± 0,30	0,66 ± 0,16	0,50 ± 0,03	0,62 ± 0,11	0,64 ± 0,13

*Les rats ont subi des régimes différents pendant 7 semaines, selon les lots (n=4), T : témoin, un régime normolipidique standard ; OA1 : le régime standard T supplémenté avec 1% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA3 : le régime standard T supplémenté avec 3% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA9 : le régime standard T supplémenté avec 9% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA12 : le régime standard T supplémenté avec 12% de lyophilisat de *O. aurita*.*

Les résultats sont exprimés en moyennes ± écartype pour n = 4 animaux.

Les résultats indiqués dans le Tableau IX montrent que les différentes doses de *O. aurita* testées dans cette étude ne présentent aucun effet significatif sur la glycémie, sur la triglycéridémie et sur la cholestérolémie après 7 semaines de consommation. D'après ces résultats, nous pouvons donc conclure que la consommation de *O. aurita* pendant 7 semaines, même à dose moyenne (12%), n'augmente pas les taux de glucose, de triglycérides et du cholestérol total plasmatiques. Cependant, des études épidémiologiques, cliniques et expérimentales ont montré que l'EPA et le DHA dans l'huile de poisson peuvent influencer le métabolisme glucidique et lipidique en diminuant le taux de glucose et des triglycérides plasmatiques chez des sujets sains. D'autres études ont montré des effets similaires avec des esters de l'EPA ou du DHA purs. En effet, la forme de l'EPA apporté par la microalgue est différente de celle de l'EPA dans l'huile de poisson ou l'ester de l'EPA. Dans l'huile de poisson, nous trouvons les AGPI n-3 estérifiés exclusivement dans des triglycérides, qui représentent la forme de lipides la plus abondante en alimentation. Or, la microalgue *O. aurita* comporte en moyenne 8% de lipides par rapport à son poids sec. Ces lipides sont essentiellement sous forme de glycolipides (51%), de triglycérides (46%) et une faible quantité de phospholipides (3%). Cette forme variée de lipides dans la microalgue pourrait influencer leur digestion au niveau de l'estomac et par conséquent le taux des AGPI n-3 libérés et incorporés dans les phospholipides des différents tissus. Les résultats obtenus dans notre étude peuvent être expliqués par le taux faible de l'EPA apporté par la microalgue par rapport à celui apporté par l'huile de poisson.

2.4 Analyse de la composition en acides gras des lipides totaux plasmatiques

Afin d'évaluer le taux d'enrichissement des lipides totaux plasmatiques en AGPI n-3 (EPA, DPA et DHA), nous avons étudié les modifications de la composition des lipides plasmatiques en acides gras en fonction des différents régimes administrés.

Concernant l'effet des différents régimes sur la composition en acides gras des lipides plasmatiques, seul le taux des AGPI n-3, essentiellement l'EPA est modifié en fonction des différentes doses de *O. aurita* dans le régime (Tableau X). Les résultats montrent d'une part que le taux de l'EPA augmente d'une manière dose dépendante dans les lipides plasmatiques des animaux, et d'autre part, nous observons une augmentation significative du DPA et du DHA à partir de la dose 3%. En effet, lorsque les AGPI n-3 sont ajoutés au régime, une partie entre en compétition avec les autres acides gras alimentaires et s'incorpore dans les phospholipides membranaires, et l'autre partie subit une série de réactions d'élongation et de désaturation pour synthétiser d'autres AGPI n-3 plus longs. Ceci expliquerait les modifications de la composition en acides gras observées dans les lipides plasmatiques des animaux. L'EPA, l'acide gras majoritaire de la microalgue, est incorporé dans les lipides totaux plasmatiques. À partir de la dose 3% de *O. aurita*, une partie de l'EPA apportée par la microalgue est convertie en DPA et DHA. Ces 2 AGPI n-3 sont à leur tour incorporés dans les phospholipides membranaires, augmentant ainsi leur taux dans les lipides plasmatiques. En revanche, l'enrichissement des lipides plasmatiques en AGPI n-3 diminue le rapport AGPI n-6 / AGPI n-3 qui est en étroite relation avec la prévalence des maladies cardiovasculaires. Les recommandations internationales exigent un rapport AGPI n-6 / AGPI n-3 inférieur ou égale à 5. Au dessus, le risque de développement des maladies cardiovasculaires augmente significativement. Nos résultats (Tableau X) montrent une diminution significative de ce rapport dans les lipides plasmatiques chez les animaux nourris avec les régimes supplémentés avec *O. aurita* (à partir de la dose 3%) par rapport aux animaux témoins.

2.5 Analyse de la composition en acides gras des lipides totaux hépatiques

Le foie représente l'organe cible du métabolisme lipidique. Nous nous sommes donc intéressé à évaluer les modifications de la composition en acides gras des lipides hépatiques en fonction des différents régimes administrés.

Après 7 semaines de régime, nous observons des modifications dans la composition en acides gras des lipides hépatiques similaires que celles observées au niveau plasmatique (Tableau XI). Les résultats présentés dans le Tableau XI montrent une augmentation significative du taux de l'EPA dans les lipides hépatiques à partir de la dose 3% en comparaison avec le groupe témoin. Cette augmentation est dose-dépendante pour les autres doses de *O. aurita*. Nos résultats montrent également une conversion de l'EPA apporté par la microalgue en DPA et en DHA à partir de la dose 3%. Cette augmentation est représentée par une augmentation de ces 2 AGPI n-3 dans les lipides hépatiques en comparaison avec le groupe témoin. Par conséquent, le rapport AGPI n-6 / AGPI n-3 diminue significativement à partir de la dose 3% en comparaison avec les animaux nourris avec le régime témoin.

Tableau X : Effet de différentes doses de *O. aurita* supplémentées à un régime standard sur la composition en acides gras des lipides plasmatiques après 7 semaines de régime (en % molaire)

Acides gras	T	OA1	OA3	OA9	OA12
14-0	1,24 ± 0,24	1,29 ± 0,12	1,67 ± 0,43	2,15 ± 0,31	2,24 ± 0,23
16-0	17,38 ± 1,00	18,59 ± 0,84	19,07 ± 1,02	21,88 ± 2,70	19,72 ± 2,31
18-0	10,27 ± 2,19	10,70 ± 0,42	9,28 ± 0,66	10,56 ± 0,79	10,71 ± 1,98
AGS	28,88 ± 1,32	30,57 ± 1,11	30,01 ± 1,02	34,58 ± 2,75	32,67 ± 0,93
16_1	1,63 ± 0,46	1,61 ± 0,20	1,75 ± 0,42	2,39 ± 0,49	2,35 ± 0,17
18-1n-9	17,47 ± 3,33	19,02 ± 2,55	21,69 ± 3,39	19,73 ± 1,76	18,28 ± 4,18
18-1n-7	2,52 ± 0,26	2,33 ± 0,98	2,15 ± 0,59	2,00 ± 0,22	2,07 ± 0,39
20-1n-9	0,23 ± 0,08	0,39 ± 0,07	0,32 ± 0,07	0,20 ± 0,05	0,19 ± 0,02
AGMI	21,84 ± 3,94	23,34 ± 1,63	25,90 ± 2,90	24,32 ± 2,26	22,89 ± 4,58
18-2n-6	11,71 ± 1,21	12,42 ± 1,04	11,77 ± 0,77	12,91 ± 0,75	13,27 ± 1,46
20-4n-6	28,41 ± 6,41	29,69 ± 1,40	25,00 ± 3,43	23,25 ± 3,57	23,06 ± 4,77
AGPI n-6	40,11 ± 5,39	42,10 ± 1,30	36,77 ± 3,01	36,16 ± 2,88	36,32 ± 6,05
18_3	0,37 ± 0,14	0,36 ± 0,07	0,38 ± 0,07	0,40 ± 0,04	0,37 ± 0,08
20-5n-3	0,28 ± 0,06 ^c	0,36 ± 0,08 ^b	0,51 ± 0,02 ^b	1,55 ± 0,22 ^a	1,95 ± 0,57 ^a
22-5n-3	0,37 ± 0,07 ^c	0,39 ± 0,07 ^c	0,49 ± 0,03 ^b	0,67 ± 0,05 ^a	0,79 ± 0,11 ^a
22-6n-3	3,90 ± 0,27 ^b	3,63 ± 0,36 ^b	4,56 ± 0,20 ^a	3,45 ± 0,38 ^b	4,74 ± 0,63 ^a
AGPI n-3	4,56 ± 0,24 ^c	4,48 ± 0,39 ^c	5,57 ± 0,23 ^b	5,66 ± 0,37 ^b	7,48 ± 0,94 ^a
n-6/n-3	8,81 ± 1,08 ^a	9,44 ± 0,62 ^a	6,60 ± 0,40 ^b	6,40 ± 0,55 ^b	4,93 ± 1,08 ^c

Les rats ont subi des régimes différents pendant 7 semaines, selon les lots (n=4), T : témoin, un régime normolipidique standard ; OA1 : le régime standard T supplémenté avec 1% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA3 : le régime standard T supplémenté avec 3% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA9 : le régime standard T supplémenté avec 9% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA12 : le régime standard T supplémenté avec 12% de lyophilisat de *O. aurita*.

Les résultats sont exprimés en moyennes ± écartype pour n = 4 animaux.

AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras mono-insaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; n-6 : oméga-6 ; n-3 : oméga-3.

Pour chaque ligne, des lettres différentes sont affectées pour identifier les valeurs qui sont significativement différentes (Test SNK, p ≤ 0,05).

Tableau XI : Effet de différentes doses de *O. aurita* supplémentées à un régime standard sur la composition en acides gras des lipides hépatiques après 7 semaines de régime (en % molaire)

Acides gras	T	OA1	OA3	OA9	OA12
14-0	0,38 ± 0,16	0,26 ± 0,06	0,24 ± 0,02	0,27 ± 0,05	0,34 ± 0,10
16-0	20,85 ± 1,17	19,90 ± 0,41	20,15 ± 1,32	19,61 ± 0,5	19,75 ± 1,77
18-0	15,56 ± 2,33	17,23 ± 0,90	17,43 ± 1,19	17,71 ± 0,42	17,46 ± 2,94
AGS	36,78 ± 1,02	37,38 ± 0,90	37,82 ± 0,33	37,59 ± 0,82	38,11 ± 1,08
16_1	1,70 ± 0,18	1,57 ± 0,16	1,46 ± 0,29	1,82 ± 0,17	1,48 ± 0,6
18-1n-9	14,43 ± 0,39	14,08 ± 2,30	13,39 ± 0,72	13,29 ± 0,91	14,73 ± 2,98
18-1n-7	3,05 ± 0,6	2,92 ± 0,27	2,88 ± 0,36	2,41 ± 0,21	2,39 ± 0,42
20-1n-9	0,18 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,05	0,15 ± 0,04
AGMI	28,88 ± 4,50	18,11 ± 2,28	16,42 ± 0,64	14,33 ± 2,60	18,98 ± 4,40
18-2n-6	9,13 ± 0,53	10,17 ± 0,93	8,97 ± 0,35	10,72 ± 0,91	11,06 ± 0,60
20-4n-6	20,24 ± 2,92	22,84 ± 0,89	22,42 ± 1,71	21,19 ± 0,67	18,84 ± 3,27
AGPI n-6	29,37 ± 3,28	33,01 ± 0,80	28,59 ± 3,70	31,91 ± 0,93	31,34 ± 3,84
18_3	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01
20-5n-3	0,13 ± 0,02 ^d	0,16 ± 0,05 ^d	0,29 ± 0,10 ^c	0,82 ± 0,10 ^b	1,18 ± 0,15 ^a
22-5n-3	0,42 ± 0,04 ^b	0,51 ± 0,12 ^b	0,67 ± 0,06 ^a	0,92 ± 0,20 ^a	0,97 ± 0,18 ^a
22-6n-3	5,76 ± 0,95 ^b	5,52 ± 0,77 ^b	7,23 ± 0,36 ^a	6,69 ± 0,59 ^a	6,55 ± 0,83 ^a
AGPI n-3	6,30 ± 0,92 ^c	6,19 ± 0,75 ^c	7,42 ± 0,34 ^b	8,43 ± 0,14 ^a	9,12 ± 1,63 ^a
n-6/n-3	4,69 ± 0,33 ^a	5,38 ± 0,68 ^a	3,84 ± 0,34 ^b	3,79 ± 0,17 ^b	3,58 ± 0,90 ^b

Les rats ont subi des régimes différents pendant 7 semaines, selon les lots (n=4), T : témoin, un régime normolipidique standard ; OA1 : le régime standard T supplémenté avec 1% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA3 : le régime standard T supplémenté avec 3% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA9 : le régime standard T supplémenté avec 9% de lyophilisat de *O. aurita* ; OA12 : le régime standard T supplémenté avec 12% de lyophilisat de *O. aurita*.

Les résultats sont exprimés en moyennes ± écartype pour n = 4 animaux.


AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras mono-insaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; n-6 : oméga-6 ; n-3 : oméga-3.

Pour chaque ligne, des lettres différentes sont affectées pour identifier les valeurs qui sont significativement différentes (Test SNK, $p \leq 0,05$).

3. Conclusion

Dans cette étude préliminaire, différentes doses de lyophilisat d'*O. aurita* supplémentées à un régime standard ont été testées chez des rats Wistar, afin de déterminer la dose minimale permettant un enrichissement des lipides plasmatiques et tissulaires en EPA, l'acide gras majoritaire de la microalgue. Après 7 semaines de régime, les résultats de l'évolution du poids des rats et de la prise alimentaire journalière nous montrent aucune différence significative dans le poids des animaux entre les différents groupes, et que la dose de la microalgue n'influence pas sur la prise alimentaire journalière des rats. Concernant les résultats des paramètres biochimiques plasmatiques, *O. aurita* n'a aucun effet significatif sur les taux de glucose, de triglycérides et du cholestérol total plasmatiques quelque soit la dose testée chez les rats Wistar sains nourris avec un régime standard. En revanche, les résultats de l'analyse de la composition en acides gras des lipides plasmatiques et hépatiques nous révèlent que la consommation de *O. aurita* permet un enrichissement des phospholipides membranaires en EPA de manière dose-dépendante à partir de la dose 3%. Ces résultats nous ont permis de retenir la dose minimale efficace (3%) qui a montré un enrichissement des lipides plasmatiques et membranaires en EPA et en ses dérivés DPA et DHA.

Après avoir choisi la dose 3%, nous avons étudié son action sur les facteurs de risque cardio-vasculaires induits par un régime hyperlipidique.



The role of *Odontella aurita*, a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats

Effet d'*Odontella aurita* comme complément alimentaire sur la fonction plaquettaire et les facteurs de risque cardiovasculaires induits par un régime hyperlipidique chez le rat Wistar

Introduction :

L'athérosclérose et la thrombose sont deux processus responsables du développement et de la progression des maladies cardiovasculaires. Certains facteurs de risque, comme l'hyperlipidémie, l'hyperagrégabilité des plaquettes sanguines et le stress oxydant peuvent favoriser l'installation de ces pathologies cardiovasculaires. Plusieurs études nutritionnelles et épidémiologiques ont montré l'implication des lipides actifs, notamment les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de la série oméga 3, dans la prévention vis à vis de ces facteurs de risques(réf). Bien que la microalgue *Odontella aurita* représente une source importante d'AGPI-LC de la série oméga 3, en particulier, l'acide eicosapentaénoïque (EPA), les études nutritionnelles sur l'effet protecteur de cette microalgue contre les maladies cardiovasculaires restent limitées.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet de lyophilisat de *O. aurita*, fourni comme complément alimentaire sur la fonction plaquettaire et leur état redox chez des rats soumis à un régime alimentaire standard et à un régime hyperlipidique. L'évolution des paramètres biochimiques (plasmatiques et hépatiques), ainsi que l'enrichissement en AGPI-n-3 des phospholipides du plasma et du foie, comme organe cible du métabolisme lipidique sont également étudiées.

Vingt quatre rats mâles de souche Wistar ont été répartis en 4 groupes homogènes et soumis aux différents régimes : un régime standard (groupe témoin, T) ; un régime standard supplémenté avec 3 % de lyophilisat de *O. aurita* (groupe TOA) ; un régime hyperlipidique à 25 % de lipides (groupe HF) et un régime hyperlipidique supplémenté avec 3 % de lyophilisat de microalgue (groupe HFOA).

Après 8 semaines de régime, une différence significative ($p = 0,01$) est observée entre le poids corporel moyen des rats soumis aux régimes hyperlipidiques (HF et HFOA) et celui des rats nourris avec les régimes normolipidiques (T et TOA). La supplémentation du régime hyperlipidique avec 3 % de lyophilisat de *O. aurita* a permis de diminuer significativement la glycémie, les taux de cholestérol et de triglycérides sériques et hépatiques. L'analyse de la

composition en acides gras a révélé une augmentation de la teneur en oméga 3 dans les phospholipides plasmatiques et hépatiques des rats soumis aux régimes supplémentés avec la microalgue (TOA et HFOA) par rapport aux rats nourris avec les régimes (T et HF). Cet enrichissement en oméga 3 concerne essentiellement l'EPA qui représente l'acide gras majoritaire de *O. aurita*. En outre, en présence du régime hyperlipidique, *O. aurita* a montré son pouvoir antioxydant au niveau hépatique en favorisant l'activité de la glutathion peroxydase et en diminuant le taux de peroxydation lipidique. Concernant la fonction plaquettaire, aucune différence n'est observée entre les pourcentages maximaux d'agrégation induits par l'ADP (10 μ M) quel que soit le régime administré. En revanche, une tendance à la diminution de l'agrégation plaquettaire est observée chez le groupe HFOA par rapport au groupe HF en utilisant le collagène (5 μ g/mL) comme agoniste de l'agrégation.

Les résultats obtenus suggèrent un rôle préventif voire protecteur d'*O. aurita*, en tant que complément alimentaire, vis à vis des maladies cardiovasculaires. En présence d'un régime hyperlipidique, *O. aurita* diminuerait l'hyperagrégabilité des plaquettes et leur taux de peroxydation, qui représente une cause majeure de thrombose. De plus, des effets positifs sur la glycémie, les triglycérides et le cholestérol sériques et hépatiques ont également été mis en évidence.

RESEARCH

Open Access

The role of *Odontella aurita*, a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats

Adil Haimeur^{1,2}, Lionel Ulmann^{1*}, Virginie Mimouni¹, Frédérique Guéno¹, Fabienne Pineau-Vincent³, Nadia Meskini² and Gérard Tremblin¹

Abstract

Background: Dietary changes are a major factor in determining cardiovascular risk. *n*-3 polyunsaturated fatty acids modulate the risk factors for metabolic syndrome via multiple mechanisms, including the regulation of the lipid metabolism. We therefore investigated the effect of *Odontella aurita*, a microalga rich in EPA, which is already used as a food supplement, on the risk factors for high-fat diet induced metabolic syndrome in rats.

Methods: Male Wistar rats were divided into 4 groups and were fed with a standard diet (control); with the standard diet supplemented with 3% freeze-dried *O. aurita* (COA); with a high-fat diet (HF); or with the high-fat diet supplemented with 3% of freeze-dried *O. aurita* (HFOA) for 7 weeks. In this study we evaluated the impact of these different diets on the risk factors for metabolic syndrome, such as hyperlipidemia, platelet aggregation, thromboxane B₂ production, and oxidative stress.

Results: After 7 weeks of treatment, high fat feeding had increased final body weight, glycemia, triacylglycerol, and total cholesterol levels in plasma and liver compared to the control diet. Collagen-induced platelet aggregation and basal platelet thromboxane B₂ were also higher in the high-fat fed rats than in those in the control group. In the liver, oxidative stress was greater in the HF group than in the control group. *O. aurita* intake in HFOA-fed rats resulted in lower glycemia and lipid levels in the plasma and liver relative than in the HF group. Thus, in the HFOA group, *n*-3 polyunsaturated fatty acid levels in the tissues studied (plasma, liver, and platelets) were higher than in the HF group. Platelet hyper-aggregability tended to decrease in HFOA-fed rats as basal platelet thromboxane B₂ production decreased. Finally, *O. aurita* reduced oxidative stress in the liver, with lower malondialdehyde levels and increased glutathione peroxidase activity.

Conclusions: *O. aurita* is a marine diatom rich in EPA as well as in other bioactive molecules, such as pigments. The synergistic effect of these microalgal compounds, displayed a beneficial effect in reducing the risk factors for high-fat induced metabolic syndrome: hyperlipidemia, platelet aggregation, and oxidative stress.

Keywords: *Odontella aurita*, *n*-3 PUFA, Platelet aggregation, Metabolic syndrome, Oxidative stress

* Correspondence: lulman@univ-lemans.fr

¹ Université du Maine, PRES L'UNAM, EA 2160 MMS (Mer, Molécules, Santé),
Faculté des Sciences et Techniques, Le Mans - IUT Département Génie
Biologique, Laval, France

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Metabolic syndrome (MS) has usually been defined on the basis of a combination of risk factors for cardiovascular diseases (CVDs), such as impaired glucose metabolism, insulin resistance, atherogenic dyslipidemia, hypertension, and obesity [1]. Lifestyle modifications, including abundant calorie-rich food and physical inactivity are recent phenomena in human evolution and may be responsible for the onset of one or several risk factors for MS. Several studies have shown that animals fed high fat and/or high sucrose diets are more likely to develop risk factors for MS, such as dyslipidemia and hyperglycemia [2,3], insulin resistance [4], hepatic steatosis [5,6], platelet aggregation [7] and oxidative stress [8,9]. While the prevalence of MS is increasing worldwide [10], studies have shown that recent dietary modifications such as low fat diets, high-fiber diets, Mediterranean diets and diets rich in flavonoids and phenolic acids can reduce MS risk factors [11,12]. Another way to reduce risk in patients with MS may be to increase the relative abundance of omega-3 (*n*-3) polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in the diet [13].

The relationship between dietary *n*-3 PUFA and the risk of developing cardiovascular diseases is described in epidemiological, clinical, and animal studies [14-16]. Eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5*n*-3) and docosahexaenoic acid (DHA; 22:6*n*-3) are commonly referred to as bioactive *n*-3 fatty acids. They are known to reduce key risk factors for coronary diseases, for instance by reducing plasma triacylglycerol, arterial and venous thrombosis, diabetes mellitus, hypertension, and inflammation [15]. EPA and DHA also play a key role in normalizing platelet hyper-aggregability. When added to the diet, EPA and DHA can alter the phospholipid membrane composition of the cells, and therefore impact on the synthesis and action of eicosanoids, and regulate transcription factor activity and abundance. Another aspect of the action of *n*-3 fatty acids is to act as an important mediator of gene expression working via the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) that control the expression of the genes involved in the lipid and glucose metabolism and adipogenesis [17]. Ethyl-EPA markedly reduced the fatty droplets in the liver cells of mice fed a high-fat diet, also lowering plasma levels of total cholesterol and triacylglycerols [18]. Kajikawa et al. [5] showed that oral administration of highly purified EPA ethyl ester (EPA-E) improved hepatic fat accumulation in high fat/high sucrose diet-fed mice by suppressing the triglyceride (TG) synthesis enzymes regulated by sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) and decreased the accumulation of hepatic monounsaturated fatty acids (MUFAs) produced by stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1). Adan et al. [7] showed that EPA

and DHA feeding reduces serum cholesterol and triacylglycerol levels, and decreases platelet aggregation in hypercholesterolemic rats.

The richest dietary source of EPA and DHA is fish oils. However, fish do not synthesize these fatty acids *de novo*, as they lack the required key enzymatic activities [19]. Instead, fish accumulate EPA and DHA primarily by consuming plankton and algae from the marine food chain [20]. Unfortunately fish also accumulate pollutants, the oil extracted from them also has unpleasant odor, and the proportion of specific fatty acids in lipids from this source are difficult to control. These drawbacks mean that an alternative and renewable source must be found.

Marine microalgae are the primary producers of *n*-3 PUFA in the marine food chain. So far, only a few species of algae have been approved for use as food complements, the one most studied is *Chlorella sp.*, a fresh water unicellular green algae. It contains essential amino-acids, minerals, fibers, and lipid soluble vitamins [21,22]. Numerous studies have revealed the biochemical activities of *Chlorella*, especially when administered in the context of underlying disorders, such as streptozotocin-induced diabetes in rats [23]. Thus, in rabbits fed a high-cholesterol diet for 10 weeks, *Chlorella vulgaris*, demonstrated antilipidemic and anti-atherosclerotic actions [24]. Cherng et al. [2] also showed that *Chlorella pyrenoidosa* has the ability to prevent dyslipidemia in rats and hamsters models fed a high-fat diet containing 20% hydrogenated coconut oil (as the source of saturated fatty acids). In a human study, Lee et al. [25] showed that in male Korean smokers, *Chlorella vulgaris* supplementation conserved plasma antioxidant nutrient status and improved erythrocyte antioxidant enzyme activities. *Chlorella* intake can also lower cholesterol levels in patients with hypercholesterolemia [26]. These potential health benefits of *Chlorella* have been attributed to the effects of specific ingredients in this microalga such as minerals, dietary fiber, proteins, and *n*-3 PUFA (18:3*n*-3). *Odontella aurita* is a microalgal marine diatom that is known to contain high levels of EPA (26% of total fatty acid) and several bioactive compounds, such as pigments, fibers and phytosterols, which have beneficial effects on human health [27,28]. *O. aurita* is currently approved for use as a dietary supplement. The studies of Moreau et al. [27] focus on carotenoids extracted from this microalgae, and show that an antiproliferative effect was produced in cultures of bronchopulmonary and epithelial cells when extracts were added to the cell medium. However, no nutritional studies have been yet conducted to demonstrate the biological effect of *O. aurita* as a food supplement or to investigate the possible synergistic effect of various microalgal compounds.

Against this background, the aims of this study are to investigate the effects of freeze-dried *O. aurita* as a food supplement on risk factors for high-fat induced MS in rats fed with a high-fat diet, principally hyperlipidemia in the bloodstream and liver, platelet aggregation and oxidative stress, in order to prevent cardiovascular diseases.

Materials and methods

Animal experiments and diet

Male Wistar rats weighing (120 ± 10 g) were purchased from (Janvier, CERJ, Le Genest Saint Isle, France) and housed in pairs in cages with a 12h light/dark cycle and maintained at $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Rats were fed an R-112 standard diet (SAFE, Augy, France) containing (on a per weight basis; 5% fat, 23% protein, 58% carbohydrates, 6% cellulose, 7% mineral, and 1% vitamins). After a 1-week acclimation period, the rats were randomly assigned to 4 groups, with 6 rats in each. The control group (C), continued to receive the standard diet (R-112). The second group (COA) was fed the standard diet supplemented with 3% (w/w) freeze-dried *O. aurita* (Innovalg, Bouin, France). The freeze dried *O. aurita* content in *n*-3 PUFA and pigments was as following: *n*-3 PUFA (in % of total fatty acids), total = 32%, EPA = 26%; pigments, total = 9 mg/g of dry matter, chlorophyll *a* = 30%, fucoxanthin = 20% of total pigments (results provided by Innovalg, Bouin, France). The third (HF) group received a high fat diet containing (on a per weight basis: 25% fat, 23% proteins, 38% carbohydrates, 6% cellulose, 7% mineral, and 1% vitamins). The fourth group (HFOA) was fed with high fat diet supplemented with 3% (w/w) of freeze-dried *O. aurita*. The composition of the four diets is shown in Table 1, and the fatty acid composition of the different diets is presented in Table 2. The rats had free access to food and water throughout the study. The bodyweight gain of the rats was monitored at regular intervals, and their daily food intake was estimated. All the experiments involving animals had been approved by the institutional ethics committee (Direction des Services Vétérinaires de la Mayenne, France, N° B53500). Rats were fed the test diets for 7 weeks and were anaesthetized (with Diazepam/Ketamine 4v/3v), following an overnight fast on day 49, and exsanguinated via the abdominal aorta. The liver and adipose tissue were removed, rinsed with ice-cold saline solution (0.9% NaCl) and stored at (-70°C).

Platelet aggregation assay

Platelet preparation

Blood was recovered in polyethylene tube containing Acid-Citric-Dextrose anticoagulant (9:1 v/v) (citric acid 130 mM, trisodium citrate 170 mM, dextrose 4%). Washed platelets were prepared as described previously

Table 1 Diet composition

Composition (g/kg)	C	COA	HF	HFOA
Casein	230	230	230	230
Corn starch	200	200	130	130
Glucose	380	380	250	250
Cellulose	60	60	60	60
Lard	30	30	230	230
Corn oil	10	10	10	10
Rape oil	10	10	10	10
Mineral 205B SAFE	70	70	70	70
Vitamin 200 SAFE	10	10	10	10
freeze-dried <i>O. aurita</i>	-	30	-	30

Analysis was provided by SAFE (Scientific Animal Food & Engineering, Augy, France).

The mineral mixture provides the following amounts in mg/kg of diet:

CaHPO₄, 17.2; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₃, 120; FeSO₄, 7 H₂O, 200; trace elements, 400. Trace element mixture (mg/kg of diet): MnSO₄, H₂O, 98; CuSO₄, 5 H₂O, 20; ZnSO₄, H₂O, 80; CoSO₄, 7 H₂O, 0.1; KI, 0.3.

The vitamin mixture provides the following amounts per kg of diet: retinol, 39,600 IU; cholecalciferol, 5000 IU; thiamin, 40 mg; riboflavin, 30 mg; pantothenic acid, 140 mg; pyridoxine, 20 mg; inositol, 300 mg; cyanocobalamin, 0.1 mg; ascorbic acid, 1600 mg; choline, 2,720 mg; folic acid, 10 mg; p-aminobenzoic acid, 100 mg; biotin, 0.6 mg.

C, control; COA, control + *O. aurita*; HF, high fat; HFOA, high fat + *O. aurita*.

by Mekhfi et al. [29] with some modifications. Briefly, blood was centrifuged at $230 \times g$ for 15 min to obtain platelet rich plasma (PRP). The supernatant (PRP) was then centrifuged at $120 \times g$ for 8 min to remove any residual erythrocytes and leukocytes. The platelet rich plasma obtained was acidified to pH 6.5 with citric acid 0.15 M to inhibit spontaneous aggregation. PRP was then centrifuged at $900 \times g$ for 15 min to obtain platelet pellets. The cells were finally suspended in Tyrode buffer (NaCl 137 mM, KCl 2.6 mM, MgCl₂ 0.9 mM, glucose 5.5 mM, gelatin 0.25%, HEPES 5 mM, CaCl₂ 1.3 mM pH 7.4). Platelet poor plasma (PPP) was recovered for lipid analysis.

Platelet aggregation

Platelet aggregation was measured turbidimetrically in washed platelet suspensions [30] using an APACT 4004, 4-channel platelet aggregometer (LABiTEC, Ahrensburg, Germany). Platelet suspension concentrations were estimated by a Coulter cell counter (Beckman Coulter, Villepinte, France), and the concentrations were adjusted to 5×10^8 cells/mL using Tyrode buffer. Aggregation tests were performed at 37°C in cuvettes stirred at 1000 rpm. Washed platelets (225 μL) were stimulated with ADP 10 μM (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) or with Collagen (Kordia, Lille, France) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The light transmission was recorded for 5 min after platelet stimulation. The platelet aggregation was quantified as the maximum change in light transmission through a washed platelet solution expressed as a percentage of the light transmission through the blank (Tyrode buffer).

Table 2 Dietary fatty acid composition

Fatty acids (% molar)	C	COA	HF	HFOA
14:0	0.94 ± 0.12	1.00 ± 0.15	1.50 ± 0.14	1.67 ± 0.19
16:0	17.16 ± 1.70	17.72 ± 1.86	24.58 ± 1.03	25.49 ± 1.53
16:1n-7	1.39 ± 0.05	2.41 ± 0.14	0.23 ± 0.06	0.23 ± 0.04
18:0	9.19 ± 0.16	8.53 ± 0.23	11.53 ± 0.31	11.29 ± 0.30
18:1n-7+n-9	45.02 ± 2.54	42.31 ± 2.81	42.69 ± 1.96	42.06 ± 2.12
18:2n-6	20.14 ± 1.81	18.86 ± 1.54	12.33 ± 0.47	11.92 ± 0.51
18:4n-3	0.4 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.01
20:4n-6	-	-	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.02
20:5n-3	-	0.83 ± 0.16	-	0.76 ± 0.11
22:6n-3	-	tr	-	tr

Total lipids were extracted from diets according to Folch et al. method [31]. Fatty acid methyl ester (FAMES) were prepared according to the method of Slover and Lanza [33] and analyzed by gas chromatography as described in material and methods section. Values are expressed as mean ± SD (n=3). C, control; COA, control + *O. aurita*; HF, high fat; HFOA, high fat + *O. aurita*. tr: traces.

Phospholipid fatty acid composition analysis

Total lipids were extracted from the liver with chloroform/methanol (2:1 v/v) according to the method of Folch et al. [31]. Furthermore total lipids were extracted from the platelets and plasma using the Bligh and Dyer method [32]. Phospholipids (PLs) and neutral lipids (NLs) were separated from the total lipids by solid phase extraction using silica gel columns Sep-pak (Sep-Pak plus, silica cartridges, Waters, France). Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared according to the method of Slover and Lanza [33], and analyzed with a FOCUS gas-chromatography instrument (Thermo Electron Corporation, Les Ulis, France) equipped with a capillary column CP Sil-88 25 m × 0.25 mm id (Varian, Les Ulis, France). Analyses were carried out from 150°C to 220°C. The esters were detected with a flame-ionization detector. Individual fatty acids were identified from authentic fatty acid methyl ester standards (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), and expressed as a percentage of total fatty acids.

Biochemical analysis

Glycemia was measured in rat tails using a glucometer (FreeStyle PAPIILLON mini, Abbott, Rungis, France). However, plasma triacylglycerol and total cholesterol levels were determined by enzymatic methods, using commercial Kits (Biomérieux S.A, Marcy l'Etoile, France). Triacylglycerol and total cholesterol levels were also determined in the liver using total lipids extracted by enzymatic methods.

Measurement of lipid peroxidation in platelets and liver

Lipid peroxidation was evaluated by measuring the level of malondialdehyde (MDA) by the Ohkawa method [34]. 0.5 g of liver was homogenized with 4.5 mL KCl solution

(1.15%). To 0.5 mL washed platelet solution or 0.1 mL liver homogenate was added 0.1 mL 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.75 mL acetic acid 20% pH 3.5, 0.75 mL thiobarbituric acid (TBA) 0.8% and distilled water to make the volume up to 2.5 mL. The tubes were placed in a water bath at 95°C for 60 min, and then immediately cooled in ice. 0.5 mL of water and 2.5 mL of a solution of *n*-butanol and pyridine (15:1 v/v) were added to each tube, which was then shaken vigorously and then centrifuged at 1000 × g for 10 min. The organic phase corresponding to the upper layer was aspirated and the color intensity was measured at 532 nm. The standard range was prepared using the 1,3,3,3-tetramethoxypropane (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) solution.

Glutathione peroxidase assay

The platelet content was released by sonication. The lysate was centrifuged at 4000 × g for 10 min and the supernatant was used to determine the platelet glutathione peroxidase activity. The liver was homogenized in KCl solution (1.15%) using a Potter tissue homogenizer then centrifuged at 4000 × g for 10 min. Liver glutathione peroxidase activity was measured in the supernatant.

The glutathione peroxidase (GPx) activity was determined according to Paglia and Valentine method [35] as modified by Chaudière and Gérard [36]. Briefly, to a final volume of 1.5 mL containing Tris-HCl/EDTA (50 mM/0.1 mM) pH 7.6, NADPH, H⁺ (0.14 mM), reduced glutathione (GSH) (2 mM) and 0.7 U/mL of GSSG-reductase, was added 100 µL of platelet lysate or 100 µL of liver homogenate. The mixture was incubated at 37°C for 3 min. The reaction was started by adding 50 µL tertiary butyl hydroperoxide (*t*-BH) (0.2 mM). The change in absorbance was recorded at 340 nm for 5 min at 5 s intervals. An appropriate control without samples was run simultaneously. GPx activity was expressed in nmoles of hydroperoxide reduced per min and per mg protein.

Protein assay

Protein was determined by Bradford's colorimetric method [37] using Biorad reagent, with bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) as standard.

Thromboxane B₂ measurement

Rat washed platelets underwent three successive freeze/thaw cycles to release the cell content. The basal TXB₂ level was measured using an enzyme immunoassay (EIA) Kit (Enzo-Life sciences, Exeter, UK) according to the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis

All values were expressed as the mean \pm SD. After analysis of variance, the mean values were compared using Fisher's least significant difference test (Statgraphics Plus 5.1, Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

Results

Effect of diet treatments on body and organ weights

As shown in Table 3, the final bodyweight of the rats on the high-fat (HF) diet was significantly higher than that of the control (C) diet rats. Feeding with either the control or high-fat diet supplemented with *O. aurita* (COA and HFOA respectively) tended to decrease the final body weight after 7 weeks of diet treatment compared to both C and HF feeding, but this effect failed to reach statistical significance. With regard to organ weights (Table 3), only the adipose tissue was affected by the dietary treatments. The data showed that the HF diet significantly increased adipose tissue weight ($p < 0.016$) compared to the C diet. Adipose tissue weight/final body weight ratio (AT/Bw) was also calculated to evaluate the development of adiposity. The AT/Bw ratio was significantly greater in HF-fed rats than in the controls. The increased adiposity was prevented by *O. aurita* intake in the HFOA group, where the adipose tissue weight was reduced, and the AT/Bw ratio lower than that in HF-fed rats. Daily food intake was significantly greater in the C and COA groups than in the HF and HFOA groups. However, the daily energy intake did not differ for the different dietary treatments.

Effect of diet treatments on plasma and liver lipid levels

The *in-vivo* hypolipidemic and hypoglycemic effects of *O. aurita* intake was evaluated (Table 4). The HF group registered a significant increase in plasma glucose, triacylglycerols (TG) and total cholesterol compared to the C group ($p < 0.009$, $p = 0.001$ and $p = 0.035$ respectively). The presence of *O. aurita* produced a hypoglycemic and hypolipidemic effect in the HFOA-fed rats compared to the HF group. In the liver, the data revealed that liver lipids, especially TG and total cholesterol, were

significantly greater in the HF group than in the controls ($p < 0.001$). The liver TG and total cholesterol levels were significantly lower in the HFOA-fed rats than in the HF group (Table 4).

Effect of diet treatments on plasma total lipid fatty acid composition

The plasma total lipid fatty acid composition in each group of rats is reported in Table 5. After 7 weeks of treatment, the data revealed a significant change in the plasma total lipid fatty acid composition with the different dietary treatments. *O. aurita* intake in the COA and HFOA-fed rats significantly ($p = 0.024$) increased their total *n*-3 level compared to the C and HF groups, respectively. The increased *n*-3 level was mainly related to the EPA (20:5 *n*-3) rate, the main polyunsaturated fatty acid (PUFA) in microalgae. Furthermore, the data revealed that the DHA (22:6 *n*-3) level was significantly greater in the COA and HFOA groups than in the C and HF groups respectively ($p = 0.042$). Total *n*-3 increase with *O. aurita* intake induced a decrease of the *n*-6/*n*-3 PUFA ratio in the plasma in HFOA-fed rats compared to the HF group.

Effect of diet treatments on platelet aggregation, TxB₂ production, and platelet phospholipid composition

The effect of dietary treatment on ADP and collagen-induced platelet aggregation is reported in Figure 1. The maximum aggregation percentage is presented in Table 6. The data did not reveal any difference in ADP-induced platelet aggregation in the different groups. However, *O. aurita* intake in HFOA-fed rats tended to normalize the platelet aggregation induced by collagen compared to the HF-fed rats ($p = 0.05$), but this effect failed to reach statistical significance.

The effects of *O. aurita* supplementation of a high fat diet on the basal platelet level of thromboxane B₂ is shown in Figure 2. The basal levels of eicosanoids in platelets are influenced by dietary fat. Rats fed with the HF diet displayed a significantly higher amount of TXB₂ in the platelet suspension than those fed with the control

Table 3 Animal characteristics after 7 weeks of treatment

Diet groups	C	COA	HF	HFOA	<i>p</i> value
Organs (g)					
Body weight (Bw)	359.1 \pm 18.7 ^{bc}	339.1 \pm 27.8 ^c	389.1 \pm 13.1 ^a	378.7 \pm 27.4 ^{ab}	0.008
Liver weight (Lw)	11.1 \pm 1.5	10 \pm 0.7	10.6 \pm 0.6	11 \pm 0.9	N.S
Adipose tissue (AT)	4.5 \pm 1.6 ^b	4.8 \pm 1.1 ^b	6.9 \pm 0.8 ^a	4.3 \pm 0.9 ^b	0.016
AT/Bw (%)	1.2 \pm 0.5 ^b	1.4 \pm 0.3 ^{ab}	1.8 \pm 0.3 ^a	1.1 \pm 0.2 ^b	0.045
Daily food intake (g/day)	46.2 \pm 12.8 ^a	42.8 \pm 9.2 ^a	35.9 \pm 8.7 ^b	32.3 \pm 8.8 ^b	< 0.001
Energy intake (Kcal/day)	170.47 \pm 47.23	161.3 \pm 34.7	168.23 \pm 40.8	154.07 \pm 41.97	N.S

Results are expressed as mean \pm SD (n=5). After a one-way ANOVA, Student–Newman–Keuls (SNK) multiple comparison test, results are arranged in increasing order from left to right: a > b > c ($p < 0.05$). C, control; COA, control + *O. aurita*; HF, high fat; HFOA, high fat + *O. aurita*. N.S: Not significant.

Table 4 Glycemia and plasma and liver lipids determinations after 7 weeks of treatment

Diet groups	C	COA	HF	HFOA	p value
Plasma (mmol/L)					
Glucose	4.30 ± 0.49 ^b	3.96 ± 0.27 ^b	5.17 ± 0.74 ^a	4.57 ± 0.51 ^{ab}	0.009
Triacylglycerols	0.84 ± 0.07 ^b	0.90 ± 0.06 ^b	1.06 ± 0.04 ^a	0.91 ± 0.09 ^b	0.001
Total cholesterol	1.49 ± 0.22 ^b	1.57 ± 0.22 ^b	1.87 ± 0.17 ^a	1.51 ± 0.13 ^b	0.035
Liver (mg/g)					
Triacylglycerols	12.04 ± 2.48 ^{bc}	10.14 ± 1.00 ^c	28.28 ± 4.97 ^a	16.62 ± 4.15 ^b	< 0.001
Total cholesterol	2.97 ± 0.49 ^b	2.64 ± 0.35 ^b	4.19 ± 0.66 ^a	2.88 ± 0.17 ^b	< 0.001

Results are expressed as mean ± SD (n=5). After a one-way ANOVA, Student–Newman–Keuls (SNK) multiple comparison test, results are arranged in increasing order from left to right: a > b > c (p < 0.05). C, control; COA, control + *O. aurita*; HF, high fat; HFOA, high fat + *O. aurita*.

diet (Figure 2). The basal TXB₂ level in rats fed with the HFOA diet was 16.6% lower than in the HF-fed rats, which was a significant difference.

The fatty acid composition of platelet phospholipids showed that *O. aurita* intake increased the total n-3 PUFA level when added to the HF diet (Table 7). Increased n-3 in HFOA fed rats involved docosapentaenoic acid (DPA), which represents an EPA conversion product. The total n-6/n-3 ratios were also lower in the HFOA group than in HF-fed rats.

In platelets, the redox status is a critical modulator of platelet function. Figure 3 presents the MDA level and GPx activity in platelets. The data show that HF feeding tended to increase the level of MDA and decrease GPx activity in rat platelets. *O. aurita* showed a tendency to

enhance platelet redox status by reducing the level of MDA and increasing GPx activity, but this effect failed to reach statistical significance.

Effect of diet treatments on liver phospholipids and neutral lipid fraction compositions

The fatty acid compositions of the liver phospholipids (PL) and neutral lipids (NL) are reported in Tables 8 and 9 respectively. After a 7-week period on the experimental diets, the data showed that after *O. aurita* intake by COA and HFOA-fed rats, EPA incorporation into the liver phospholipid fraction was significantly greater than in the C and HF-fed rats, respectively. Thus, DPA and DHA levels in liver PL, were significantly higher in the HFOA group than in the HF-fed rats, but there was no

Table 5 Plasma total lipid fatty acid composition of rats after 7 weeks of treatment

Diet groups	C	COA	HF	HFOA	p value
Fatty acids (% molar)					
14:0	0.32 ± 0.07 ^{ab}	0.34 ± 0.10 ^a	0.20 ± 0.03 ^b	0.23 ± 0.06 ^b	0.025
16:0	17.84 ± 1.86 ^a	16.94 ± 1.65 ^{ab}	15.11 ± 0.72 ^{bc}	14.83 ± 1.46 ^c	0.010
16:1	1.51 ± 0.27 ^a	1.69 ± 0.28 ^a	0.56 ± 0.05 ^b	0.58 ± 0.12 ^b	< 0.001
18:0	9.41 ± 0.74 ^b	8.76 ± 0.60 ^b	12.08 ± 0.85 ^a	11.29 ± 0.69 ^a	< 0.001
18:1n-7 + n-9	18.60 ± 3.84	16.84 ± 2.85	15.87 ± 1.53	16.09 ± 2.39	N.S
18:2n-6	10.40 ± 0.87	10.99 ± 1.40	12.09 ± 0.96	10.98 ± 1.00	N.S
18:3n-3	0.18 ± 0.05	0.25 ± 0.04	0.24 ± 0.05	0.22 ± 0.04	N.S
20:1n-9	0.27 ± 0.06 ^a	0.34 ± 0.09 ^a	0.15 ± 0.03 ^b	0.16 ± 0.04 ^b	< 0.001
20:4n-6	23.25 ± 3.22	23.44 ± 2.96	26.64 ± 1.76	23.40 ± 3.48	N.S
20:5n-3	0.27 ± 0.07 ^b	0.60 ± 0.16 ^a	0.19 ± 0.05 ^b	0.33 ± 0.09 ^b	< 0.001
22:5n-3	0.48 ± 0.022	0.46 ± 0.06	0.33 ± 0.04	0.43 ± 0.07	N.S
22:6n-3	4.42 ± 1.19 ^{ab}	5.31 ± 0.66 ^a	3.64 ± 0.70 ^b	4.92 ± 0.70 ^a	0.042
SFA	27.58 ± 1.49	26.10 ± 1.83	27.40 ± 0.86	26.35 ± 1.77	N.S
MUFA	20.38 ± 4.14	18.87 ± 2.89	16.57 ± 1.60	16.83 ± 2.51	N.S
Total n-3	5.22 ± 1.1 ^{ab}	5.99 ± 1.04 ^a	4.22 ± 0.68 ^b	5.71 ± 0.67 ^a	0.024
Total n-6	33.64 ± 2.54 ^b	34.44 ± 2.62 ^b	38.74 ± 0.95 ^a	34.39 ± 3.88 ^b	0.035
MUFA / SFA	0.73 ± 0.11	0.72 ± 0.10	0.60 ± 0.07	0.64 ± 0.07	N.S
n-6 / n-3	6.63 ± 1.18 ^b	5.88 ± 1.09 ^b	9.35 ± 1.37 ^a	6.12 ± 1.19 ^b	< 0.001

Results are expressed as mean ± SD (n=5). After a one-way ANOVA, Student–Newman–Keuls (SNK) multiple comparison test, results are arranged in increasing order from left to right: a > b > c (p < 0.05). C, control; COA, control + *O. aurita*; HF, high fat; HFOA, high fat + *O. aurita*. N.S: Not significant.

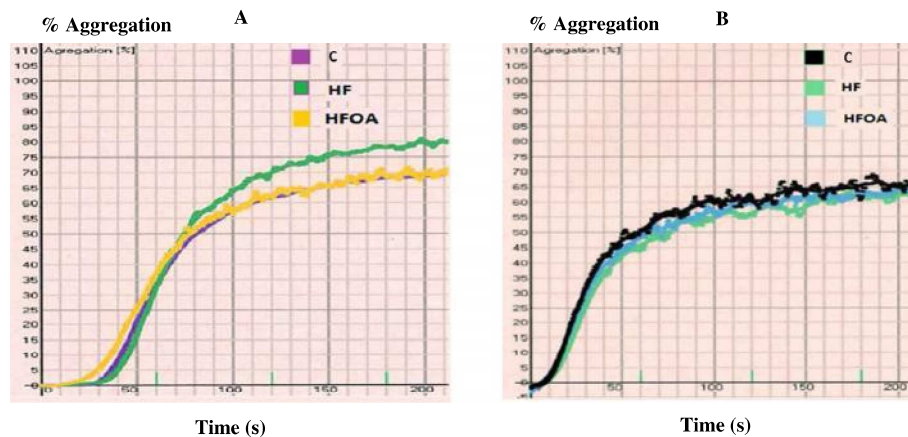


Figure 1 Platelet aggregation measurement after 7 weeks of treatment with different diets. Washed platelets were stimulated with collagen (5 µg/mL): **A** or with ADP (10 µM): **B**. C, control; HF, high fat; HFOA, high fat + *O. aurita*.

significant difference between these PUFA rates in the COA and C groups. Furthermore, the *n-6/n-3* PUFA ratio was significantly lower in the liver PL of HFOA-fed rats than in that of the HF group animals.

Compared to the liver PL fraction, more modifications were revealed in the composition of NL (Table 9). Beside total *n-3* enrichment in the liver NL fraction, especially with EPA, DPA, and DHA, the data showed that the total monounsaturated fatty acid (MUFA) level, especially of 16:1*n-7* and 18:1*n-7* + 18:1*n-9* MUFA levels, was significantly higher in the COA and HFOA groups than in the C and HF groups. The *n-6/n-3* PUFA ratio was also lower in the liver NL fraction in COA and HFOA-fed rats than in the C and HF groups.

Effect of diet treatments on the level of MDA and on GPx activity in liver

The hepatic MDA level and GPx activity are shown in Figure 4. A significantly higher liver MDA level was observed in the HF group than in the C group. *O. aurita* intake in HFOA-fed rats resulted in a significantly lower MDA level in the liver than in HF-fed rats. Thus, after 7 weeks of treatment, the HF diet had induced a significantly lower level of hepatic GPx activity than the C diet. However, HF diet supplementation with *O. aurita*

resulted in significantly greater antioxidant activity of GPx in the liver than that observed with the HF diet.

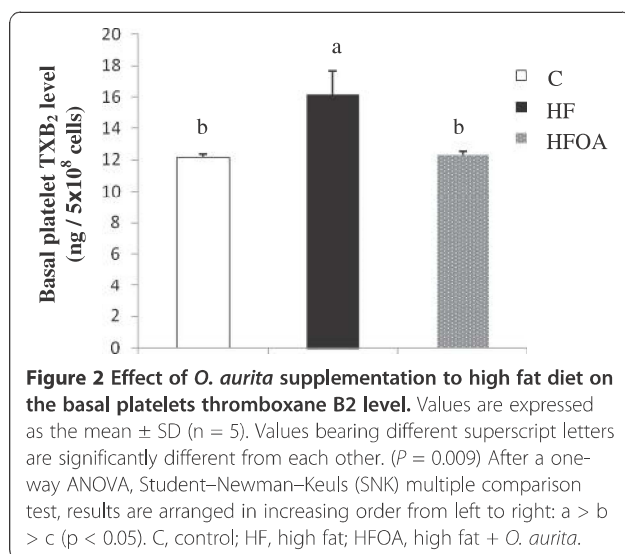
Discussion

The present investigation was undertaken to assess the influence of *O. aurita*, a marine diatom rich in EPA, on the risk factors for high-fat induced MS in rats. In this study, the HF diet group rats had significantly higher final body weight, adiposity, blood glucose, TG and total cholesterol levels than were found in the animals in the C group. Abdominal obesity and insulin resistance have been proposed as being the main causal factors of MS [38]. It was also found that *O. aurita* intake in HFOA group decreased adipose tissue weight, plasma glucose, and TG and total cholesterol levels, but had no effect on final body weight in the COA or HFOA groups as compared to the C and HF groups respectively. These results suggest that the administration of *O. aurita* reduces MS risk factors by lowering glycemia and blood lipid levels. Marine organisms such as fish and microalgae are known to be rich in *n-3* fatty acids, and specifically in EPA and DHA. Previous studies have already reported that purified EPA or DHA have differing effects on parameters involved in cardiovascular disease prevention [15]. Matzusawa et al. [38] showed that *n-3* PUFA plays an important role in preventing obesity by acting on the adipocytokines that regulates lipid and glucose homeostasis. Itoh et al. [39] reported that dietary EPA increased adiponectin secretion in genetically and high-fat diet induced obese mice. Indeed, the consumption of fish oil enriched in EPA can markedly reduce the levels of plasma triacylglycerols and associated very-low-density lipoprotein (VLDL) in the circulation in healthy subjects and selected patients with hypertriglyceridemia [40]. Nemoto et al. [18] showed that EPA markedly reduced the fatty droplets in the liver cells, and also lowered

Table 6 Effect of dietary regimens on rat platelet aggregation after 7 weeks of treatment

	% maximum aggregation			p value
	C	HF	HFOA	
Collagen 5 µg/mL	68.35 ± 3.56 ^b	80.29 ± 3.59 ^a	72.42 ± 1.09 ^{ab}	0.053
ADP 10 µM	80.18 ± 5.72	87.63 ± 5.09	86.97 ± 4.44	N.S

Values are means ± SD of 4 independent determinations (animals). After a one-way ANOVA, Student–Newman–Keuls (SNK) multiple comparison test results are arranged in increasing order from left to right: a > b > c (*p* < 0.05). C, control; HF, high fat; HFOA, high fat + *O. aurita*. N.S: Not significant.



plasma levels of total cholesterol and triacylglycerol in high fat-fed mice.

Platelet aggregation is considered to be closely involved in the development of arterial thrombosis after the formation of atherosclerotic plaques [41]. Furthermore, a variety of platelet functions abnormalities, including increased adhesiveness and activation *in vitro*

Table 7 Platelet phospholipids fatty acid composition of rats after 7 weeks of treatment

Diet groups	C	HF	HFOA	p value
Fatty acids (% molar)				
14:0	0.44 \pm 0.04	0.53 \pm 0.10	0.59 \pm 0.06	N.S
16:0	24.54 \pm 0.55	24.93 \pm 0.28	25.72 \pm 0.68	N.S
16:1	0.50 \pm 0.05 ^a	0.26 \pm 0.02 ^b	0.25 \pm 0.00 ^b	< 0.001
18:0	13.90 \pm 0.29	14.49 \pm 0.12	14.25 \pm 0.99	N.S
18:1n-7 + n-9	8.82 \pm 0.20 ^a	7.71 \pm 0.28 ^b	7.06 \pm 0.33 ^c	< 0.001
18:2n-6	4.33 \pm 0.04	4.66 \pm 0.39	4.39 \pm 0.10	N.S
18:3n-3	0.49 \pm 0.02	0.57 \pm 0.03	0.54 \pm 0.05	N.S
20:1n-9	0.46 \pm 0.01	0.57 \pm 0.06	0.54 \pm 0.06	N.S
20:4n-6	25.88 \pm 0.33 ^a	23.80 \pm 0.52 ^b	23.80 \pm 0.65 ^b	0.004
20:5n-3	0.20 \pm 0.03	0.17 \pm 0.03	0.22 \pm 0.00	N.S
22:5n-3	0.36 \pm 0.06 ^b	0.39 \pm 0.05 ^b	0.52 \pm 0.03 ^a	0.018
22:6n-3	0.47 \pm 0.08	0.48 \pm 0.05	0.63 \pm 0.14	N.S
SFA	38.89 \pm 0.45 ^b	39.95 \pm 0.22 ^a	40.57 \pm 0.38 ^a	0.004
MUFA	9.78 \pm 0.21 ^a	8.55 \pm 0.25 ^b	7.85 \pm 0.28 ^c	< 0.001
Total n-3	1.52 \pm 0.19 ^b	1.63 \pm 0.05 ^b	1.92 \pm 0.12 ^a	0.029
Total n-6	30.21 \pm 0.36 ^a	28.47 \pm 0.54 ^b	28.19 \pm 0.71 ^b	0.009
MUFA / SFA	0.25 \pm 0.00 ^a	0.21 \pm 0.00 ^b	0.19 \pm 0.00 ^c	< 0.001
n-6 / n-3	20.02 \pm 2.75 ^a	17.48 \pm 0.86 ^b	14.71 \pm 0.71 ^{bc}	0.025

Results are expressed as mean \pm SD (n=6). After a one-way ANOVA, Student–Newman–Keuls (SNK) multiple comparison test, results are arranged in increasing order from left to right: a > b > c (p < 0.05). C, control; HF, high fat; HFOA, high fat + *O. aurita*. N.S: Not significant.

and *in vivo* and increased sensitivity to physiological agonists, have been identified in obese subjects [42]. The polyunsaturated fatty acids EPA and DHA play a crucial role in reducing platelet aggregation [43]. In the present investigation we compared platelet activities in three groups: control, C, high-fat, HF, and high fat + *O. aurita*, HFOA. It was found that rats fed the HFOA diet displayed lower collagen-induced platelet aggregation, but not in ADP-induced platelet aggregation, than rats fed with the HF diet. The decrease in platelet aggregation in the HFOA group was confirmed by the lower TXB₂ level in this group compared to the HF group. The fatty acid composition of platelet phospholipids revealed higher levels of n-3 PUFA in the HFOA than in the HF group. These findings could be explained by the incorporation and conversion of EPA produced by the microalgae in the platelet phospholipids. When n-3 PUFA are consumed they are selectively incorporated into the phospholipids of the platelet membrane, and thus decrease the release and formation of TXB₂, which is a potent inducer of platelet aggregation. Burri et al. [44] have shown that the consumption of a diet high in linoleic acid (LA) decreases ADP- and collagen-induced platelet aggregation compared to a diet containing oleic acid. Studies by Kwon et al. [45] have found that the consumption of both oleic acid and linoleic acid reduce collagen-induced platelet aggregation compared to that found in subjects consuming a diet high in saturated fatty acids. Moreover, Véricel et al. [46] showed that a small intake of n-3 PUFA reduced the oxidative stress in the platelets of elderly people, and could be beneficial to subjects with atherothrombotic tendencies by lowering the cell peroxide tone.

The levels of n-3 fatty acids incorporated into tissue lipids can be considered to be a cardiovascular disease risk marker, as has often been reported previously [47,48]. The results reported in Tables 5, 7, 8 and 9 showed higher levels of n-3 PUFA in the plasma and liver fatty acid compositions in rats fed with COA and HFOA diets than those in rats on the fed with C or HF diets. These results show that the EPA provided by the *O. aurita* diet is incorporated into the plasma and liver lipids. Moreover, there is a relationship between food intake and lipid enrichment with EPA. The rats fed the COA diet had a higher food intake than those receiving the HFOA diet, and higher EPA levels were observed in the plasma and liver in the COA group than in the HFOA group.

The liver is a very important site for maintaining body lipid homeostasis. Our data show that rats fed with the HF diet had higher hepatic TG and total cholesterol levels than HFOA-fed rats, which suggests that *O. aurita* could regulate hepatic genes involved in lipid metabolism through the effect of EPA. Stearoyl-CoA desaturase

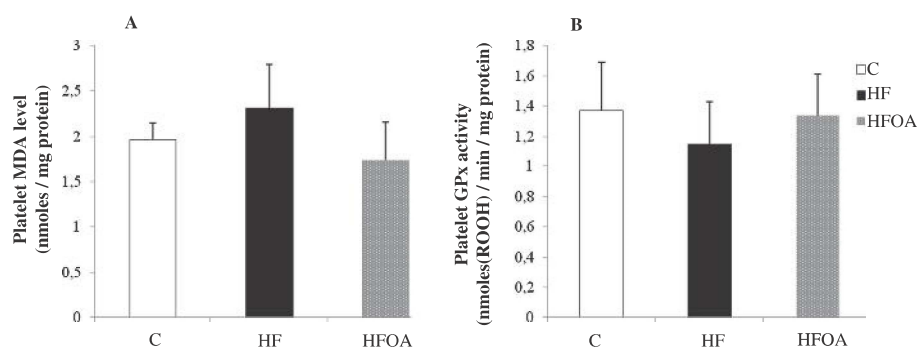


Figure 3 Effect of *O. aurita* supplementation to high fat diet on platelets oxidative stress after 7 weeks of treatment. (A): effect of *O. aurita* on platelets MDA level ($p = 0.180$); (B): effect of *O. aurita* on platelets GPx activity ($p = 0.617$). Values are expressed as the mean \pm SD ($n = 5$). After a one-way ANOVA, Student–Newman–Keuls (SNK) multiple comparison test, results are arranged in increasing order from left to right: $a > b > c$ ($p < 0.05$). C, control; HF, high fat; HFOA, high fat + *O. aurita*.

(SCD) is an endoplasmic reticulum enzyme that catalyzes the biosynthesis of monounsaturated fatty acids (MUFAs) from saturated fatty acids (SFAs) that are either synthesized *de novo* or derived from the diet. The regulation of this process plays a critical role in disorders such as obesity, diabetes, and atherosclerosis. SCD1, the main SCD isoform expressed in liver, is a key player in the regulation of lipid partitioning in liver. The importance of SCD1 in neutral lipid synthesis in liver has been

confirmed by studies in SCD1 $-/-$ mice, in which an SCD1 deficiency leads to a fall in the hepatic triacylglycerol and cholesterol ester contents [49,50] and down regulates *de novo* fatty acid synthesis [51]. The results shown in Table 9 show a lower level of total MUFA in liver neutral lipids in the HF group than in the controls. However, the lower MUFA level was enhanced by *O. aurita* intake in HFOA fed rats. These results may suggest the potential regulation of SCD1 by *O. aurita*.

Table 8 Phospholipid fatty acid composition in liver rat after 7 weeks of diet

Diet groups	C	COA	HF	HFOA	<i>p</i> value
Fatty acids (% molar)					
14:0	0.31 \pm 0.18	0.18 \pm 0.04	0.14 \pm 0.03	0.16 \pm 0.07	N.S
16:0	17.86 \pm 1.69 ^a	17.15 \pm 0.90 ^a	14.97 \pm 0.54 ^b	14.99 \pm 1.14 ^b	< 0.001
16:1	0.20 \pm 0.07	0.16 \pm 0.06	0.15 \pm 0.05	0.14 \pm 0.03	N.S
18:0	21.82 \pm 2.05 ^b	21.99 \pm 1.11 ^b	26.98 \pm 0.39 ^a	26.57 \pm 0.69 ^a	< 0.001
18:1n-7 + n-9	9.12 \pm 1.05 ^a	8.76 \pm 0.51 ^a	7.30 \pm 0.77 ^b	7.15 \pm 0.68 ^b	0.001
18:2n-6	8.80 \pm 0.93	9.48 \pm 0.96	9.65 \pm 0.61	9.43 \pm 0.54	N.S
18:3n-3	0.10 \pm 0.03	0.10 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.09 \pm 0.03	N.S
20:1n-9	0.14 \pm 0.05	0.13 \pm 0.03	0.12 \pm 0.04	0.10 \pm 0.03	N.S
20:4n-6	27.80 \pm 1.83 ^{ab}	26.31 \pm 1.64 ^b	29.37 \pm 0.60 ^a	28.57 \pm 1.62 ^a	0.044
20:5n-3	0.14 \pm 0.04 ^{bc}	0.28 \pm 0.07 ^a	0.12 \pm 0.03 ^c	0.20 \pm 0.03 ^b	< 0.001
22:5n-3	0.57 \pm 0.08 ^b	0.66 \pm 0.09 ^{ab}	0.61 \pm 0.06 ^b	0.71 \pm 0.09 ^a	0.038
22:6n-3	7.79 \pm 0.50 ^a	7.80 \pm 0.30 ^a	6.94 \pm 0.60 ^b	7.46 \pm 0.39 ^{ab}	0.025
SFA	39.99 \pm 0.83 ^b	39.47 \pm 0.59 ^b	42.14 \pm 0.67 ^a	41.77 \pm 0.67 ^a	< 0.001
MUFA	9.65 \pm 1.00 ^a	9.04 \pm 0.55 ^a	6.83 \pm 0.90 ^b	7.62 \pm 0.75 ^b	< 0.001
Total n-3	8.47 \pm 0.49 ^a	8.81 \pm 0.47 ^a	7.68 \pm 0.65 ^b	8.35 \pm 0.29 ^a	0.009
Total n-6	36.60 \pm 1.03 ^b	37.57 \pm 0.95 ^{ab}	38.99 \pm 0.5 ^a	38.00 \pm 1.34 ^{ab}	0.025
$\Delta 9$ desaturase index	0.29 \pm 0.04 ^a	0.29 \pm 0.02 ^a	0.20 \pm 0.03 ^b	0.21 \pm 0.02 ^b	0.002
MUFA / SFA	0.25 \pm 0.04 ^a	0.23 \pm 0.02 ^a	0.17 \pm 0.02 ^b	0.17 \pm 0.01 ^b	< 0.001
n-6 / n-3	4.32 \pm 0.18 ^b	4.15 \pm 0.30 ^b	5.13 \pm 0.52 ^a	4.55 \pm 0.24 ^b	0.002

Results are expressed as mean \pm SD ($n=5$). After a one-way ANOVA, Student–Newman–Keuls (SNK) multiple comparison test, results are arranged in increasing order from left to right: $a > b > c$ ($p < 0.05$). C, control; COA, control + *O. aurita*; HF, high fat; HFOA, high fat + *O. aurita*. N.S: Not significant. $\Delta 9$ desaturase index = $[18:1n-7 + n-9 / (18:0 + 18:1n-7 + n-9)]$.

Table 9 Liver neutral lipids fatty acid composition of rats after 7 weeks of treatment

Diet groups	C	COA	HF	HFOA	p value
Fatty acids (% molar)					
14:0	0.95 ± 0.06 ^a	0.88 ± 0.32 ^a	0.51 ± 0.17 ^b	0.64 ± 0.29 ^{ab}	0.030
16:0	25.53 ± 2.22	24.39 ± 2.73	22.84 ± 0.55	23.07 ± 1.80	N.S
16:1	3.75 ± 1.00 ^a	3.41 ± 0.74 ^a	0.34 ± 0.03 ^b	0.40 ± 0.07 ^b	< 0.001
18:0	6.06 ± 1.76	5.75 ± 2.58	5.42 ± 1.32	4.39 ± 0.86	N.S
18:1n-7 + n-9	35.06 ± 4.60 ^b	35.84 ± 3.57 ^b	32.97 ± 1.90 ^b	41.00 ± 2.48 ^a	0.005
18:2n-6	11.41 ± 1.96 ^b	11.20 ± 2.91 ^b	15.14 ± 1.57 ^a	14.61 ± 1.36 ^a	0.008
18:3n-3	0.46 ± 0.20	0.54 ± 0.16	0.62 ± 0.06	0.65 ± 0.10	N.S
20:1n-9	0.14 ± 0.01 ^c	0.40 ± 0.06 ^a	0.15 ± 0.00 ^c	0.28 ± 0.00 ^b	< 0.001
20:4n-6	3.89 ± 0.45	3.39 ± 0.81	3.27 ± 0.78	3.64 ± 1.44	N.S
20:5n-3	0.13 ± 0.04 ^b	0.33 ± 0.16 ^a	0.15 ± 0.04 ^b	0.19 ± 0.05 ^b	0.011
22:5n-3	0.16 ± 0.03 ^b	0.35 ± 0.10 ^a	0.12 ± 0.01 ^b	0.41 ± 0.15 ^a	< 0.001
22:6n-3	1.09 ± 0.07 ^b	1.58 ± 0.17 ^a	1.02 ± 0.19 ^b	1.14 ± 0.06 ^b	0.004
SFA	32.75 ± 1.26 ^a	31.02 ± 2.41 ^a	28.77 ± 1.65 ^b	28.72 ± 0.9 ^b	0.002
MUFA	38.88 ± 4.19 ^{ab}	42.15 ± 5.39 ^a	33.60 ± 2.06 ^b	42.97 ± 4.00 ^a	0.007
Total n-3	1.88 ± 0.16 ^b	2.68 ± 0.43 ^a	1.94 ± 0.27 ^b	2.78 ± 0.68 ^a	0.043
Total n-6	14.96 ± 2.01	14.14 ± 2.48	20.40 ± 4.18	19.52 ± 3.55	N.S
Δ9 desaturase index	0.85 ± 0.05	0.86 ± 0.05	0.86 ± 0.03	0.89 ± 0.03	N.S
MUFA / SFA	1.19 ± 0.15 ^b	1.55 ± 0.24 ^a	1.17 ± 0.06 ^b	1.49 ± 0.09 ^a	0.004
n-6 / n-3	7.37 ± 0.94 ^{ab}	5.56 ± 0.60 ^c	8.44 ± 0.84 ^a	7.25 ± 0.66 ^b	0.001

Results are expressed as mean ± SD (n=5). After a one-way ANOVA, Student–Newman–Keuls (SNK) multiple comparison test, results are arranged in increasing order from left to right: a > b > c (p < 0.05). C, control; COA, control + *O. aurita*; HF, high fat; HFOA, high fat + *O. aurita*. N.S: Not significant. Δ9 desaturase index = [18:1n-7 + n-9/(18:0 + 18:1n-7 + n-9)].

Velliquette et al. [52] showed that diets enriched in linoleic acid, α-linolenic acid and, by metabolic inference, EPA, can regulate SCD activity at the level of transcription.

Numerous studies have shown that oxidative stress is increased in obesity, which is an essential component of MS, and that reactive oxygen species (ROS) levels can be reduced as a result of weight loss [53]. Obesity

induced by a high fat diet leads to enhanced oxidative stress in rats [54]. Roberts et al. [55] also showed that ROS were overproduced in a rat model of MS induced by a diet high in fat and refined sugar. The results shown in Figure 3 showed that *O. aurita* intake in HFOA group resulted in significantly lower hepatic oxidative stress after 7 weeks of treatment than in HF fed rats. Rats fed with HFOA had lower level of hepatic MDA than HF

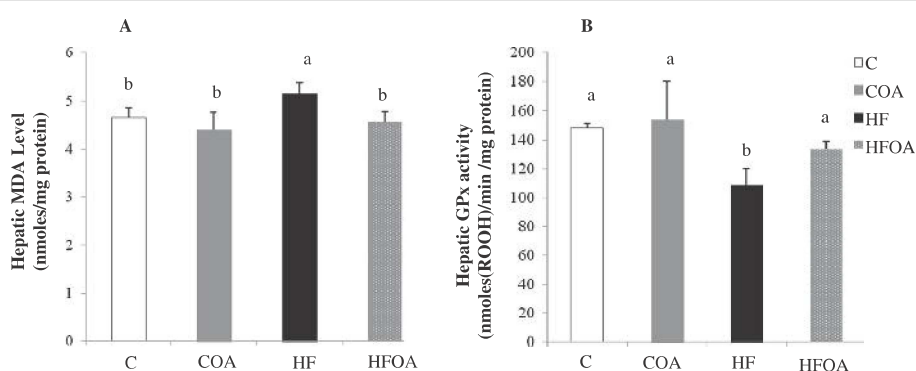


Figure 4 Effect of *O. aurita* supplementation of standard or high fat diets on hepatic oxidative stress after 7 weeks of treatment. (A): effect of *O. aurita* on hepatic MDA level (p = 0.006); (B): effect of *O. aurita* on hepatic GPx activity (p = 0.002). Values are expressed as the mean ± SD (n = 5). Values bearing different superscript letters are significantly different from each other. After a one-way ANOVA, Student–Newman–Keuls (SNK) multiple comparison test, the results are arranged in increasing order from left to right: a > b > c (p < 0.05). C, control; COA, control + *O. aurita*; HF, high fat; HFOA, high fat + *O. aurita*.

fed rats. Thus, the antioxidant activity of hepatic GPx was higher in the HFOA group than in the HF group. Indeed, a significant correlation ($r = 0.986$ and $p = 0.002$) has been established between a fall in MDA level and an increase in GPx activity in response to the HFOA diet. These results prove that *O. aurita* supplementation of the HF diet reduces the hepatic oxidative stress after 7 weeks of treatments. Beside *n*-3 PUFA, *O. aurita* also contains a large portion of pigments. Chlorophyll *a* and fucoxanthin are the major pigments in *O. aurita* (30.0 and 20.4 % of total pigments, respectively). Many studies have reported that micronutrients, such as polyphenols, pigments, vitamins and minerals, can prevent or at least attenuate the damage caused by oxidative stress. The Feillet-Coudray et al. [56] study demonstrates that a polyphenol extract seems to have some protective effects against hepatic steatosis and against the oxidative stress induced by high fat, high sucrose diet in rats. Fucoxanthin, like other carotenoids displays remarkable bioactivities (antioxidant, anti-obesity etc.) that are relevant to human health (for a review see Peng et al. [57]).

The present investigation showed that *O. aurita* could be used as food supplement to prevent risk factors for high-fat induced MS. The beneficial effects of *O. aurita* showed in the present investigation could be due to a synergistic effect between the various different active microalgal components, such as *n*-3 PUFA and pigments. Kay [58] proposed that the possible active ingredients of *Chlorella* that reduce blood lipid levels could be water-soluble fiber, vegetable protein, phospholipids, Vitamin C, Vitamin E and beta-carotene. Furthermore numerous authors have provided evidence that a combination of phytosterols and *n*-3 fatty acids may reduce cardiovascular risk in a complementary and synergistic way [59,60].

In conclusion, our data show that *O. aurita* supplementation reduces the risk factors for high-fat induced MS in rats after 7 weeks of treatment. *O. aurita* intake in HFOA-fed rats resulted in lower levels of glycemia, triacylglycerols, and total cholesterol in plasma and liver than the same levels found in HF-fed rats. Furthermore, rats given the HFOA diet tended to have lower collagen-induced platelet aggregation, decreased platelet TXB₂ level and enhanced *n*-3 PUFA incorporation in plasma, platelet, and liver lipids. Finally, *O. aurita* as food supplement in HFOA-fed rats displayed an antioxidant effect in the liver, with lower levels of MDA and increased GPx activity.

Abbreviations

MS: Metabolic syndrome; CVD: Cardiovascular diseases; PUFA: Polyunsaturated fatty acid; *n*-3: Omega-3; *n*-6: Omega-6; EPA: Eicosapentaenoic acid; DHA: Docosahexaenoic acid; PPARs: Peroxisome proliferator-activated receptors; EPA-E: Eicosapentaenoic acid ethyl ester; SREBP-1: Sterol regulatory element binding protein-1; SCD1: Stearoyl-CoA desaturase 1; PRP: Platelet rich plasma; PPP: Platelet poor plasma;

PL: Phospholipids; NL: Neutral lipids; FAMES: Fatty acid methyl ester; MDA: Malondialdehyde; GPx: Glutathione peroxidase; TXB₂: Thromboxane B₂; AT: Adipose tissue; Bw: Bodyweight; TG: Triacylglycerol; VLDL: Very-low-density lipoprotein; LA: Linoleic acid; MUFA: Monounsaturated fatty acids; SFA: Saturated fatty acids; ROS: Reactive oxygen species.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AH participated in planning the study, the experimental work, analysis of samples, statistical analysis, data analysis and manuscript preparation. LU participated in planning the study, the experimental work, statistical analysis and manuscript preparation. VM participated in planning the study, the experimental work and manuscript preparation. FG participated in the experimental work. FPV participated in aggregation experiments, result discussion and analysis and in manuscript preparation. NM participated in the planning and organization of the study, in the experimental work and manuscript preparation. GT participated in the planning and organization of the study and manuscript preparation. All the authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The research is supported by the PHC-Volubilis program n° MA/21/61 with joint financial support from the French Foreign Affairs Ministry and the Moroccan Ministry of Research and Higher Education, and by the FP 7 European Project GIAVAP (Genetic Improvement of Algae for Value Added Products).

The authors thank M. Ghosh for reviewing the English text and the staff of the haemostasis laboratory, Hospital of Le Mans, France for their graceful reception.

Author details

¹Université du Maine, PRES L'UNAM, EA 2160 MMS (Mer, Molécules, Santé), Faculté des Sciences et Techniques, Le Mans - IUT Département Génie Biologique, Laval, France. ²Université Hassan II, Laboratoire de Biochimie, Environnement et Agroalimentaire, Faculté des Sciences et Techniques, Mohammedia, Maroc. ³Centre Hospitalier du Mans, Laboratoire d'Hémostase, Le Mans, France.

Received: 14 June 2012 Accepted: 26 October 2012

Published: 31 October 2012

References

1. Fulop T, Tessier D, Carpentier A: **The metabolic syndrome.** *Pathol Biol* 2006, **54**:375–386.
2. Cheng JY, Shih MF: **Preventing dyslipidemia by *Chlorella pyrenoidosa* in rats and hamsters after chronic high fat diet treatment.** *Life Sci* 2005, **76**:3001–3013.
3. Li W, Shi YH, Yang RL, Cui J, Xiao Y, Wang B, Le Wei G: **Effect of somatostatin analog on high-fat diet-induced metabolic syndrome: involvement of reactive oxygen species.** *Peptides* 2010, **31**:625–629.
4. Samane S, Christon R, Dombrowski L, Turcotte S, Charrouf Z, Lavigne C, Levy E, Bachelar H, Amarouch H, Marette A, Haddad PS: **Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity.** *Metab Clin Exp* 2009, **58**:909–919.
5. Kajikawa S, Harada T, Kawashima A, Imada K, Mizuguchi K: **Highly purified eicosapentaenoic acid prevents the progression of hepatic steatosis by repressing monounsaturated fatty acid synthesis in high-fat/high-sucrose diet-fed mice.** *Prostaglandin Leukotriess Essent Fatty Acids* 2009, **80**:229–238.
6. Pérez-Echarri N, Pérez-Matute P, Marcos-Gómez B, Martí A, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ: **Down-regulation in muscle and liver lipogenic genes: EPA ethyl ester treatment in lean and overweight (high-fat-fed) rats.** *J Nutr Biochem* 2009, **20**:705–714.
7. Adan Y, Shibata K, Sato M, Ikeda I, Imaizumi K: **Effects of Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic acid on lipid metabolism, eicosanoid production, platelet aggregation and atherosclerosis in hypercholesterolemic rats.** *Biosci Biotechnol Biochem* 1999, **63**:11–119.

8. Hee Hong J, Seon Lee I: **Effects of *Artemisia capillaris* ethyl acetate fraction on oxidative stress and antioxidant enzyme in high-fat diet induced obese mice.** *Chem Biol Interact* 2009, **179**:88–93.
9. Makni M, Fetoui H, Garoui EM, Gargoui NK, Jaber H, Makni J, Boudawara T, Zeghal N: **Hypolipidemic and hypatoprotective seeds mixture diet rich in ω -3 and ω -6 fatty acids.** *Food Chem Toxicol* 2010, **48**:2239–2246.
10. Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ: **The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations.** *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004, **33**:351–375.
11. Minich DM, Bland JS: **Dietary management of the metabolic syndrome beyond macronutriments.** *Nutr Rev* 2008, **66**:429–444.
12. Lyer A, Panchal S, Poudyal H, Brown L: **Potential health benefits of Indian spices in the symptoms of the metabolic syndrome: a review.** *Indian J Biochem Biophys* 2009, **46**:467–481.
13. Paniagua JA, Pérez-Martínez P, Gjelstad IMF, Tierney AC, Delgado-Lista J, Defoort C, Blaak EE, Risérus ULF, Drevon CA, Kiec-Wilk B, Lovegrove JA, Roche HM, López-Miranda J, LIPGENE Study Investigators: **A low-fat high-carbohydrate diet supplemented with long-chain n-3 PUFA reduces the risk of the metabolic syndrome.** *Atherosclerosis* 2011, **218**:443–450.
14. Balk EM, Lichtenstein AH, Chung M, Kupelnick B, Chew P, Lau J: **Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular diseases risk: a systematic review.** *Atherosclerosis* 2006, **189**:19–30.
15. Mozaffarian D, Wu JHY: **Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease.** *J Am Coll Cardiol* 2011, **58**:2047–2067.
16. Lerman RH, Kaskel L, McIntosh M, Najm W, Fernandez ML, Baruffi E, Harris E: **Correction of the omega-3 index in women with metabolic syndrome by adding omega-3 supplements to a mediterranean style diet.** *J Clin Lipidol* 2011, **5**:s146.
17. Adkins Y, Kelley DS: **Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids.** *J Nutr Biochem* 2010, **21**:781–792.
18. Nemoto N, Suzuki S, Kikuchi H, Okabe H, Sassa S, Sakamoto S: **Ethyl-eicosapentaenoic acid reduces liver lipids and lowers plasma levels of lipids in mice fed a high-fat diet.** *In Vivo* 2009, **23**:685–690.
19. Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, Brown L: **Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action.** *Prog Lipid Res* 2011, **50**:372–387.
20. Judé S, Roger S, Martel E, Besson P, Richard S, Bougnoux P, Champeroux P, Le Guennec JY: **Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: a comparison of their protective effects on coronary heart diseases and breast cancers.** *Prog Biophys Mol Biol* 2006, **90**:299–325.
21. Belarbi H, Molina E, Chisti YA: **Process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil.** *Proc Biochem* 2000, **35**:951–969.
22. Borowitzka MA: **Micro-algae as sources of fine chemicals.** *Microbiol Sci* 1986, **3**:372–375.
23. Shibata S, Natori Y, Nishihara T, Tomisaka K, Matsumoto K, Sansawa H, Nguyen VC: **Antioxydant and anticaract effects of *Chlorella* on rats with streptozotocin-induced diabetes.** *J Nutr Sci Vitaminol* 2003, **49**:334–339.
24. Sano T, Tanaka Y: **Effects of dried powdered *Chlorella vulgaris* on experimental atherosclerosis and alimentary hypercholesterolemia in cholesterol-fed rabbit.** *Artery* 1987, **14**:76–84.
25. Lee SH, Kang HJ, Lee HJ, Kang MH, Park YK: **Six-week supplementation with *Chlorella* has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers.** *Nutrition* 2010, **26**:175–183.
26. Okudo M, Hasegawa T, Sonoda M, Okabe T, Tanaka M: **The effects of *Chlorella* on the level of cholesterol in serum and liver.** *Jpn J Nutr* 1975, **33**:3–8.
27. Moreau D, Tomasoni C, Cathrine J, Kaas R, Le Guedes R, Cadoret JP, Muller-Feuga A, Kontiza I, Vagias C, Roussis V, Roussakis C: **Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines.** *Envir Toxicol Pharmacol* 2006, **22**:97–103.
28. Lattimer JM, Haub MD: **Effects of dietary fibers and its components on metabolic health.** *Nutrients* 2010, **2**:1266–1289.
29. Mekhfi H, El Haouari M, Legssyer A, Bnouham M, Aziz M, Atmani F, Remmal A, Ziyat A: **Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants.** *J Ethnopharmacol* 2004, **94**:317–322.
30. Born GVR: **Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal.** *Nature* 1962, **194**:927–929.
31. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: **A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.** *J Biol Chem* 1957, **226**:497–509.
32. Bligh EG, Dyer WJ: **A rapid method of lipid extraction and purification.** *Can J Biochem Physiol* 1959, **37**:911–917.
33. Slover HT, Lanza E: **Quantitative analysis of food fatty acids by capillary gas chromatography.** *J Am Oil Chem Soc* 1979, **56**:933–943.
34. Ohkawa H, Ohishi N, Yagik K: **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** *Anal Biochem* 1979, **95**:351–358.
35. Paglia DE, Valentine WN: **Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase.** *J Lab Clin Med* 1967, **70**:158–169.
36. Chaudière J, Gerard D: **Dosage de l'activité glutathion-peroxydase.** In *Biologie des Lipides chez l'Homme*. Edited by Douste-Blazy L, Mendy F. Paris: Médicales Internationales; 1988:275–289.
37. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding method.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248–254.
38. Matsuzawa Y, Fumahashi T, Nakamura T: **Molecular mechanism of metabolic syndrome X, contribution of adipocytokines: adipocyte-derived bioactive substance.** *Ann NY Acad Sci* 1999, **892**:146–154.
39. Itoh M, Suganami T, Satoh N, Tanimoto-Koyama K, Yuan X, Tanaka M, Kawano H, Yano T, Aoe S, Takeya M, Shimatsu A, Kuzuya H, Kamei Y, Ogawa Y: **Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, **27**:1918–1925.
40. Phillipson BE, Rothrock DW, Connor WE, Harris WS, Illingworth DR: **Reduction of plasma lipids, lipoproteins, and apoproteins by dietary fish oils in patients with hypertriglyceridemia.** *N Engl J Med* 1985, **312**:1210–1216.
41. Fuster V, Chesebro JH: **Antithrombotic therapy: role of platelet-inhibitor drugs. II. Pharmacologic effects of platelet-inhibitor drugs (second of three parts).** *Mayo Clin Proc* 1981, **56**:s185.
42. Anfossi G, Russo I, Trovati M: **Platelet dysfunction in central obesity.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009, **19**:440–449.
43. Lagarde M, Calzada C, Guichardant M, Véricel E: **Dose effect and metabolism of docosahexaenoic acid: Pathophysiological relevance in blood platelets.** *Prostaglandin Leukotr Essent Fatty Acids*. in press.
44. Burri BJ, Dougherty RM, Kelley DS, Iacono JM: **Platelet aggregation in humans is affected by replacement of dietary linoleic acid with oleic acid.** *Am J Clin Nutr* 1991, **54**:359–362.
45. Know J, Snook JT, Wardlaw GM, Hwang DH: **Effects of diets high in saturated fatty acids, canola oil, or safflower oil on platelet function, thromboxane B₂ formation, and fatty acid composition of platelet phospholipids.** *Am J Clin Nutr* 1991, **54**:351–358.
46. Véricel E, Calzada C, Chapuy P, Lagarde M: **The influence of n-3 fatty acids on platelets in elderly people.** *Atherosclerosis* 1999, **147**:187–192.
47. Arkhipenko YV, Sazontova TG: **Mechanisms of the cardioprotective effect of a diet enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids.** *Pathophysiol* 1995, **2**:131–140.
48. Zampolli A, Bysted A, Leth T, Mortensen A, De Caterina R, Falk E: **Contrasting effect of fish oil supplementation on the development of atherosclerosis in murine models.** *Atherosclerosis* 2006, **184**:78–85.
49. Miyazaki M, Kim YC, Ntambi JM: **A lipogenic diet in mice with a disruption of stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis.** *J Lipid Res* 2001, **42**:1018–1024.
50. Miyazaki M, Kim YC, Gray-Keller MP, Attie AD, Ntambi JM: **The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1.** *J Biol Chem* 2000, **275**:30132–30138.
51. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD: **Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:11482–11486.
52. Velliquette RA, Gillies PJ, Kris-Etherton MP, Green JW, Zhao G, Vanden Heuvel JP: **Regulation of human stearoyl-CoA desaturase by omega-3 and omega-6 fatty acids: Implications for the dietary management of elevated serum triglycerides.** *J Clin Lipidol* 2009, **3**:281–288.
53. Vincent HK, Taylor AG: **Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans.** *Int J Obes* 2006, **30**:400–418.
54. Dobrian AD, Davies MJ, Schriver SD, Lauterio TJ, Prewitt RL: **Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension.** *Hypertension* 2011, **37**:554–560.

55. Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND: **Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome.** *Metabolism* 2006, **55**:928–934.
56. Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Cristol JP, Coudray C: **Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems.** *Free Radic Biol Medic* 2009, **46**:624–632.
57. Peng J, Yuan JP, Wu CF, Wang JH: **Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health.** *Mar Drugs* 2011, **9**:1806–1828.
58. Kay PA: **Microalgae as food and supplement.** *Crit Rev Food Sci Nutr* 1991, **30**:555–573.
59. Micallef MA, Garg ML: **Beyond blood lipids: phytosterols, statins and omega-3 polyunsaturated fatty acid therapy for hyperlipidemia.** *J Nutr Biochem* 2009, **20**:927–939.
60. Rao AV, Rao LG: **Carotenoids and human health.** *Pharmacol Res* 2007, **55**:207–216.

doi:10.1186/1476-511X-11-147

Cite this article as: Haimeur et al.: The role of *Odontella aurita*, a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats. *Lipids in Health and Disease* 2012 **11**:147.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



A comparative study on the effect of two omega-3 rich food supplements (fish oil and *Odontella aurita*) on some risk factors for metabolic syndrome in high-fat fed rats

Etude comparative des effets de deux suppléments alimentaires (*Odontella aurita* et l'huile de poisson) sur l'agrégation plaquettaire et certains paramètres biochimiques liés au syndrome métabolique chez des rats dyslipidémiques

Introduction :

Il est actuellement bien admis que les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de la série oméga-3, principalement l'EPA et le DHA, contribuent à la prévention de certains facteurs de risque liés aux pathologies cardiovasculaires. Les recommandations internationales exigent un apport régulier d'oméga-3 dans notre alimentation quotidienne pour maintenir un rapport oméga-6/oméga-3 satisfaisant (proche de 5). En effet, ce rapport est quatre fois trop élevé chez les populations des pays développés. Une des solutions avancées pour rétablir l'équilibre de ce rapport consiste en la supplémentation nutritionnelle à l'aide d'une source riche en oméga-3. Les huiles de poisson représentent la principale source d'AGPI-LC de la série oméga-3. Cependant, la diminution des ressources halieutiques et la génération de déchets polluants au cours du procédé de fabrication de ces huiles entre autres problèmes, contribuent à rechercher des sources alternatives d'oméga-3. De par sa richesse en EPA et en d'autres molécules bio-actives, la microalgue *Odontella aurita* a été autorisée en nutrition humaine en 2003, comme complément alimentaire riche en oméga-3, par l'AFSSA (Agence Française pour la Sécurité Sanitaire des Aliments). Cependant, très peu d'études nutritionnelles prouvant les effets bénéfiques de cette microalgue ont été réalisées. L'objectif de ce travail est donc de comparer les effets d'un lyophilisat de *O. aurita* et de l'huile de poisson sur l'agrégation plaquettaire, certains paramètres biochimiques sériques et tissulaires et le stress oxydatif chez des rats rendus dyslipidémiques.

Pour cela, 24 rats mâles de souche Wistar ont été répartis en 4 groupes homogènes et soumis à différents régimes : un régime standard (groupe témoin, T) ; un régime hyperlipidique à 40 % de lipides (groupe HF) et un régime hyperlipidique supplémenté avec 12 % de lyophilisat de microalgue (groupe HFOA) et un régime hyperlipidique supplémenté avec 0,5 % d'huile de poisson (HFFO). Les deux derniers régimes ont été conçus de façon à apporter le même taux d'EPA.

Après 8 semaines de régime, une diminution significative du poids corporel est observée chez les rats nourris avec le régime HFOA par rapport aux rats du groupe HFFO. Par ailleurs, les résultats obtenus pour les différents paramètres liés au syndrome métabolique montrent que la microalgue et l'huile de poisson diminuent de façon similaire les teneurs en lipides sériques et hépatiques et réduisent ainsi le développement de la stéatose hépatique par rapport au régime HF. D'autre part, la supplémentation en lyophilisat d'*O. aurita* et en huile de poisson diminuent l'agrégation plaquettaire et le stress oxydatif par rapport aux résultats obtenus chez le groupe HF. En revanche, l'analyse de la composition en acides gras des phospholipides des tissus (foie et cœur) et des plaquettes montre une incorporation d'AGPI-LC moins importante chez le groupe HFOA comparativement à celle observée chez le groupe HFFO.

En conclusion, malgré une incorporation moins importante des AGPI-LC dans les phospholipides des tissus et des plaquettes, la microalgue a montré des effets biologiques similaires, voir dans certains cas plus significatifs, que l'huile de poisson. Ceci peut s'expliquer par un effet synergique entre l'EPA et d'autres biomolécules actives comme les pigments présents dans la microalgue.

A comparative study on the effect of two omega-3 PUFA rich dietary supplements (fish oil and the microalga *Odontella aurita*) on some cardiovascular disease risk factors in high-fat fed rats

Adil Haimeur ^{a,b}, Virginie Mimouni ^a, Lionel Ulmann ^{a,*}, Anne-Sophie Martineau ^c, Hafida Messaouri ^b, Fabienne Pineau-Vincent ^d, Gérard Tremblin ^a, Nadia Meskini ^b

^a IUT Département Génie Biologique, Rue des Drs Calmette et Guérin, 53020 Laval cedex 9, Faculté des Sciences et Techniques, Avenue O. Messiaen, 72085 Le Mans. EA 2160-MMS, Mer Molécules Santé, IUML-FR 3473 CNRS, Université du Maine, France.

^b Université Hassan II, Equipe Nutrition, Environnement, Santé. Laboratoire de Virologie, Microbiologie, Qualité/Écotoxicologie et Biodiversité, Faculté des Sciences et Techniques, Mohammedia, Morocco.

^c ONIRIS, Unité Nutrition et Endocrinologie, Nantes, France

^d Centre Hospitalier du Mans, Laboratoire d'Hémostase, Avenue Rubillard, 72037 Le Mans cedex 9, France.

*Corresponding author: Dr. Lionel Ulmann. Email address, Lionel.Ulmann@univ-lemans.fr; phone, + 33 2 44 02 24 73; fax, + 33 2 43 59 49 58

Abstract

Dietary supplementation with marine omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) can have beneficial effects on a number of risk factors for cardiovascular disease (CVD). We compared the effects of two n-3 PUFA rich food supplements (freeze-dried *O. aurita* and fish oil) on risk factors for CVD.

Male Wistar rats were randomly divided into four groups of six animals each and fed the following diets: the control group (C) received a standard diet containing 7% lipids; the second group (HF, high fat) was fed a high-fat diet containing 40% lipids; the third group (HFFO, high fat + fish oil) was fed the high-fat diet supplemented with 0.5% fish oil; and the fourth group (HFOA, high fat + *O. aurita*) received the high-fat diet supplemented with 12% of freeze-dried *O. aurita*.

After 8 weeks rats fed the high-fat diet supplemented with *O. aurita* displayed a significantly lower bodyweight than those in the other groups. Moreover, both the microalga and the fish oil significantly reduced insulinaemia and serum lipid levels. However, *O. aurita* was more effective than the fish oil in reducing hepatic lipid levels and in preventing high-fat diet-induced steatosis. *O. aurita* also reduced platelet aggregation and oxidative status induced by high fat intake.

Freeze-dried *O. aurita* showed similar or even greater biological effects than the fish oil. This could be explained by a potential effect of the n-3 PUFAs or to the others compounds of the microalgae.

Keywords : *Odontella aurita* . n-3 PUFA . Lipid metabolism . Cardiovascular disease . Platelet aggregation . Rat

Abbreviations: AT, adipose tissue; BW, body weight; C, control diet; CVD, cardiovascular disease; DHA, docosahexaenoic acid; DPA, docosapentaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; FO, fish oil; GPx, glutathione peroxidase; HF, high fat diet; HFFO, high fat + fish oil diet; HFOA, high fat + *Odontella aurita* diet; MDA, malondialdehyde; OA, *Odontella aurita*; PRP, platelet rich plasma; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acid; TxB₂, thromboxane B₂; GPx, glutathione peroxidase.

1. Introduction

On the basis of their proven health benefits, global demand for marine omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) has increased significantly over the last two decades. The marine n-3 PUFAs eicosapentaenoic acid (20:5n-3, EPA) and docosahexanoic acid (22:6n-3, DHA) occur mainly in FO and are commercially available as food supplements. The European Food Safety Agency (EFSA) recommends a daily intake of 250 mg/d of EPA and DHA for adults, because such an intake is linked to lower incidences of cardiovascular disease (CVD) [1]. There is abundant evidence that EPA and DHA from either fish or FO supplements have potentially beneficial effects on some markers of metabolic syndrome risk, a major public health problem that is increasing in prevalence worldwide [2-4]. Indeed, when added to the diet, FO or purified EPA and DHA from various sources can significantly reduce triglyceridemia, hypertension and inflammation [5]. Furthermore, EPA and DHA play preventative roles in diabetes mellitus by enhancing insulin sensitivity [6] and in arterial and venous thrombosis by reducing platelet aggregation [7]. However, the quality of the ingested FO is variable and depends on fish species, the season and the location of fishing sites [8].

Marine microalgae offer interesting alternative sources of n-3 PUFAs and other high-value compounds, such as sterols and pigments, which are of economic relevance in food science, pharmacology and human health [9]. Even today, the consumption of complete microalgae or lipid extracts in the form of commercial food supplements is restricted to certain genera, such as *Spirulina*, *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Dunaliella*, *Ulkenia* and *Odontella*, however many other microalgae have been tested as potential food supplements, but are not yet authorised for commercial use [10]. The beneficial effect of these microalgae on human health, in particular in preventing CVD, has been identified in several studies [11-13]. The future exploitation of the biological diversity of microalgae for human consumption

can be expected to be hampered by food safety regulations for a long time. Therefore, the authorisation (following EC regulation 258/97) of the marine diatom *Odontella aurita* (OA) as a novel food supplement rich in omega-3 by the French company Innovalg is a major step forward in the diversification of microalgal biotechnology. OA is a diatom known to contain high levels of EPA (26% of total fatty acids) and several other bioactive compounds, such as pigments, fibres and phytosterols, with beneficial effects on human health [14]. Due to the synergistic effect of these bioactive compounds, OA has already shown beneficial effects as a dietary supplement in reducing the risk factors for metabolic syndrome in high-fat (HF) diet fed rats [15].

The aim of this study was to compare two n-3 PUFA-rich food supplements (FO and freeze-dried OA) in preventing some of the risk factors for CVD in rats fed a (HF) diet. In the mediterranean diet, the relationship between the quality (saturated fatty acid (SFA) and PUFA) and the quantity of dietary lipids and the onset of CVD was clearly demonstrated [16]. In this study, rats were administered a HF diet containing 40% of lipids, consisting essentially of saturated fats, which are considered to be risk factors for several metabolic disorders including hyperlipidaemia, insulin-resistance, diabetes, thrombosis and oxidative stress. We investigated the effects of freeze-dried OA or FO, used as a food supplement, *versus* the risk factors associated with HF diet induced metabolic disorders in the blood and liver, platelet aggregation and oxidative stress, with a view to preventing CVD.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental protocol

Male Wistar rats weighing 120 ± 10 g were purchased from (Centre d'Élevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France). They were housed in pairs in cages in a room under standard conditions of temperature (22-24°C), humidity (40-60%) and 12 h light/dark cycle. All the animals were fed a standard diet (SAFE, Augy, France) for 1 week of acclimation. The animals were then randomly divided into four groups of 6 rats, and were fed with the following diets for 8 weeks: the control group (C), continued to receive the standard diet; the HF group was fed a HF diet containing (on a per weight basis: 40% fat, 23% proteins, 23% carbohydrates, 6% cellulose, 7% mineral and 1% vitamins); the HFOA group received the HF diet supplemented with 12% (w/w) of freeze-dried OA (Innovalg, Bouin, France); the HFFO group was fed with the HF diet supplemented with 0.5% (w/w) of FO (Polaris, Pleuven, France). The compositions of the experimental diets are shown in Table 1. All animals were fed *ad libitum* with free access to water. All study protocols complied with the institutional guidelines (Direction des Services Vétérinaires de la Mayenne, France, N° B53500).

The fatty acid compositions of the various diets are shown in Table 2.

2.2. Sample collection and analysis

The bodyweight (BW) gains of the rats were monitored at regular intervals, and their daily food intakes were estimated. At the end of the experiment, blood was collected from the abdominal aorta under Diazepam/Ketamine (4v/3v) anaesthesia and the liver and adipose tissue (AT) were removed, rinsed with ice-cold NaCl (0.9%) and weighed. Fractions of the

Table 1 Composition of the experimental diets (g/Kg diet)

Nutrient	C	HF	HFFO	HFOA
Caseine	230	230	230	230
Corn starch	200	80	80	80
Glucose	360	150	150	150
Cellulose	60	60	60	60
Lard	50	50	50	50
Hydrogenated coconut oil	-	330	330	330
Freeze-dried <i>O. aurita</i>	-	-	-	120
Fish oil	-	-	5	-
Corn oil	10	10	10	10
Rape oil	10	10	10	10
Mineral 205B SAFE	70	70	70	70
Vitamine 200 SAFE	10	10	10	10

Analysis was provided by SAFE (Scientific Animal Food & Engineering, Augy, France).

The mineral mixture provides the following amounts in mg/kg of diet: CaHPO₄, 17.2; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₃, 120; FeSO₄, 7 H₂O, 200; trace elements, 400.

Trace element mixture (mg/kg of diet): MnSO₄, H₂O, 98; CuSO₂, 5 H₂O, 20; ZnSO₄, 7 H₂O, 80; CoSO₄, 7 H₂O, 0.1; KI, 0.3. The vitamin mixture provides the following amounts per kg of diet: retinol, 39.600 IU; cholecalciferol, 5000 IU; thiamin, 40 mg; riboflavin, 30 mg; pantothenic acid, 140 mg; pyridoxine, 20 mg; inositol, 300 mg; cyanocobolamin, 0.1 mg; ascorbic acid, 1600 mg; choline, 2.720 mg; folic acid, 10 mg; p-aminobenzoic acid, 100 mg; biotin, 0.6 mg.

Table 2 Fatty acid compositions of the experimental diets (% molar)

Fatty acid	C	HF	HFFO	HFOA
(% molar)				
14:0	0.9 ± 0.1	5.5 ± 0.2	5.7 ± 0.2	4.9 ± 0.1
16:0	17.1 ± 1.7	28.7 ± 1.9	25.5 ± 1.5	27.6 ± 1.0
16:1	1.39 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
18:0	9.1 ± 0.2	12.5 ± 0.2	12.3 ± 0.3	12.9 ± 0.3
18:1n7/9	45.0 ± 2.5	32.3 ± 2.8	32.0 ± 2.1	32.7 ± 2.0
18:2n-6	20.1 ± 1.8	18.8 ± 1.5	18.9 ± 0.5	18.3 ± 0.5
18:4n-3	0.4 ± 0.02	0.4 ± 0.03	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.04
20:4n-6	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.01
20:5n-3	0.02 ± 0.0	0.02 ± 0.01	1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.1
22:5n-3	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.02
22:6n-3	-	0.1 ± 0.03	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.02

All values were expressed as the mean ± SD (n=3).

- , not detected.

liver and AT were fixed in Bouin's solution for the histology, the rest was frozen in liquid nitrogen and kept for lipid and oxidative stress analysis. Frozen samples were stored at - 80°C before analysis.

2.2.1. Blood parameter analysis

Plasma levels of glucose, total cholesterol and triglycerides (TG) were measured using commercial enzyme kits (Biomérieux S.A, Marcy l'Etoile, France). The plasma insulin level was measured using a commercially-available, enzyme-linked immunoassay (ELISA) kit (Eurobio, Courtaboeuf, France).

2.2.2. Tissue lipid analysis

To assess the hepatic lipid content, a fraction of the liver tissue was homogenized and total lipids were extracted according to Folch et al. [17]. Plasma and platelet lipids were extracted following the method described by Bligh and Dyer [18]. Phospholipids were separated from an aliquot of the total lipids after extraction using silica gel columns Sep-Pak (Sep-Pakplus, silica cartridges, Waters, France). Phospholipid extracts were transmethylated according to the method of Slover and Lanza [19], and analysed using a FOCUS gas-chromatography instrument (Thermo Electron Corporation, Les Ulis, France) equipped with a flame-ionization detector. Pure standards (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were used to identify the fatty acids by comparing the peak retention times of the samples to those of the standards.

Hepatic cholesterol and TG levels were determined in aliquot of the liver total lipid extract using commercial kits (Biomérieux S.A, Marcy l'Etoile, France).

2.2.3. Histology analysis

For histology studies, immediately after removal, liver and adipose tissue samples were fixed in Bouin's solution (picric acid, formalin, acetic acid, 3:1:0.2 v/v/v) and embedded in paraffin. Sections (5 µm) were prepared and stained with hematoxylin and eosin. The histology views were obtained using a Motic BA400 microscope (Motic Co, Wetzlar, Germany).

2.2.4. Platelet activity and thromboxane B₂ level

Platelet aggregation was measured using the turbidimetric method [20] for a washed platelet suspension using a Apact aggregometer (LABiTEC, Ahrensburg, Germany). Blood was collected from the abdominal aorta into tubes containing citrate-dextrose anticoagulant (9:1 v/v) (citric acid 130 mM, trisodium citrate 170 mM, dextrose 4%) and platelets were isolated as described previously [15]. Platelet suspension concentrations were adjusted to 5×10^5 cells/ μ L using Tyrode buffer. Platelets suspensions were preincubated at 37°C for 10 min in the cuvettes stirred at 1000 rpm. Platelet stimulation was initiated by adding of agonists (ADP 5 μ M (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) or collagen 5 μ g/mL (Kordia, Lille, France)). The extent of platelet aggregation was expressed in terms of percent of change in light transmission 5 min after the addition of the agonist.

To determine the platelet thromboxane B₂ (TxB₂) level, isolated platelets were subjected to three successive freeze/thaw cycles to release the cell contents. The baseline TxB₂ level was determined using an enzyme immunoassay (EIA) kit (Enzo-Life Sciences, Exeter, U.K.) according to the manufacturer's instructions.

2.2.5. Oxidative stress measurement

To evaluate the redox status in liver and platelets, the malondialdehyde (MDA) level and the glutathione peroxidase (GPx) activity were determined.

2.2.5.1. Platelet and liver malondialdehyde level evaluation

The MDA level was measured spectrophotometrically (532 nm) as 2-thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) in the liver homogenate or washed-platelet solution using the

widely cited method of Ohkawa et al [21]. TBARS values were expressed as MDA equivalents. 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP) was used as the standard.

2.2.5.2. Platelet glutathione peroxidase activity determination

The GPx activity was determined according to the method of Paglia and Valentine [22] as modified by Chaudière and Gérard [23]. Briefly, tert-butylhydroperoxide (0.2 mM) and reduced glutathione (2 mM) were used as substrates at 37°C in the presence of 0.14 mM NADPH and 0.7 units/mL glutathione reductase. The rate of NADPH oxidation at 340 nm was used as an index of hydroperoxide reduction.

2.2.6. Protein assay

Proteins were determined in the liver homogenate and platelet lysate by Bradford's [24] colorimetric method using BioRad reagent. The calibration range was prepared using the bovine serum albumin (BSA) solution (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

2.2.7. Statistical analysis

All values were expressed as the mean \pm SD. After analysis of variance, the mean values were compared using Fisher's least significant difference test (Statgraphics Plus 5.1, Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

3. Results

3.1. Body and organ weights, food intake

As shown in Table 3, the bodyweight in the HF group was not affected *versus* the control group. Moreover, the bodyweight in the HFOA group was significantly lower than that in the other groups ($p<0.05$). With regard to the organ weights, only the AT was affected by the dietary treatments. The data showed that AT weight in the HF group was higher than that in the control group, thus the adipose tissue weight/body weight ratio (AT/BW) was significantly greater ($p<0.05$) in the HF group than in the control group. OA and FO intake significantly reduced adiposity *versus* the HF group, but the reduction in the weight of AT observed in the HFOA group was less than that observed in the HFFO group. During the experiment, the food intake of the rats fed with the standard diet was greater than that of those fed with the HF diets, despite their equal overall energy intakes.

3.2. Plasma biochemical parameters

The plasma biochemical parameters of the four groups are reported in Fig. 1. No significant difference in the glycaemia or blood lipids was observed between the HF and control groups.

Table 3 Effects of supplementation with freeze-dried *Odontella aurita* compared to that with fish oil on the bodyweight and organ weights, daily food intake and energy intake in rats fed a high-fat diet for 8 weeks

Diet groups Organs	C	HF	HFFO	HFOA
Body weight (g)	465.4 ^a ± 22.7	468.0 ^a ± 31.2	460.8 ^a ± 14.6	386.4 ^b ± 18.5
Liver weight (g)	12.4 ± 0.7	11.8 ± 1.7	11.4 ± 1.4	9.6 ± 1.6
Adipose tissue (g)	13.6 ^b ± 2.8	17.1 ^a ± 3.0	11.0 ^b ± 1.0	8.5 ^c ± 2.3
AT/BW (%)	2.7 ^b ± 0.7	3.3 ^a ± 1.2	2.6 ^b ± 0.8	2.8 ^b ± 0.5
LW/BW (%)	2.5 ± 0.8	2.4 ± 0.6	2.4 ± 0.7	2.5 ± 0.6
Daily food intake (g/day)	26.7 ^a ± 2.7	19.7 ^b ± 1.1	18.1 ^b ± 1.6	18.5 ^b ± 1.6
Energy intake (Kcal/day)	108.0 ± 11.0	112.0 ± 6.2	103.0 ± 9.3	105.0 ± 9.2

All values were expressed as the mean ± SD (n=6). After analysis of variance, the mean values were compared using Fisher's least significant difference test.

^{a,b,c} Mean values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$) with a > b > c.

-, not detected.

Figure 1

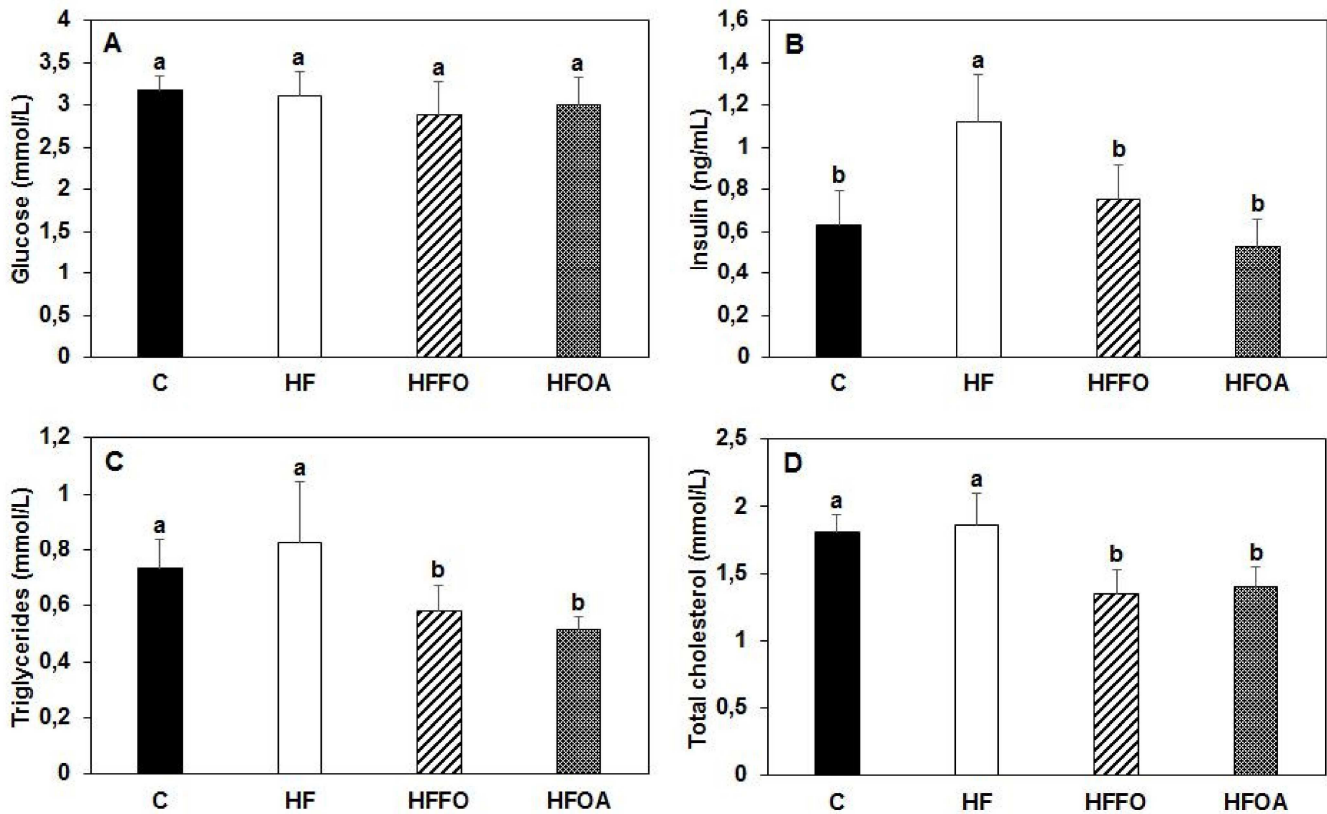


Fig. 1 - Effects of supplementation with freeze-dried *Odontella aurita* compared to fish oil on (A) plasma glucose level; (B) plasma insulin level; (C) plasma triglyceride levels and (D) plasma cholesterol level in rats fed a high fat diet for 8 weeks. Values are means with their standard deviations (n = 6), represented by vertical bars.

^{a,b} Mean values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$) with a > b.

However, a significant increase in the plasma insulin level ($p<0.05$) was observed in rats fed the HF diet *versus* the control animals. OA and FO intakes also produced significantly ($p<0.05$) lower plasma insulin, cholesterol and TG levels.

3.3. Liver lipid levels

Measurements of the hepatic TG and cholesterol (Fig. 2) levels revealed that lipid levels were higher in the HF group than in the control group. The effect of OA on lipid synthesis was associated with a significant reduction in both cholesterol and TG levels ($p<0.05$). In contrast, FO seems to have reduced cholesterol levels without having any effect on TG levels.

3.4. Histology

As shown in Fig. 3 (A), liver sections revealed normal liver structure in the C group. The HF group displayed marked steatosis with microvesicular fat accumulation. In the HFOA and HFFO groups, histological sections of the liver showed an improvement in the high fat-induced steatosis with a liver structure similar to that in the control group. The steatosis quantification results are shown in Fig. 4 (A). Data show that there were more fat droplets in the HF group than in the control group. OA intake produced a steatosis improvement, with a decrease in the percentage of liver droplets (Fig. 3A, Fig. 4A); with regard to the visceral adiposity, data (Fig. 3B) indicate that visceral adipocytes were bigger in HF group. After an OA supplementation, the HFOA group adipocytes were smaller than those in the HF group. The morphological observations also identified smaller adipocytes in the HFFO group than in the HF group. The adipocyte size results are presented in Fig. 4 (B). Adipocytes were

significantly higher in the HF group, with a median value of 28 μm versus a median of 18 μm in the control group.

Figure 2

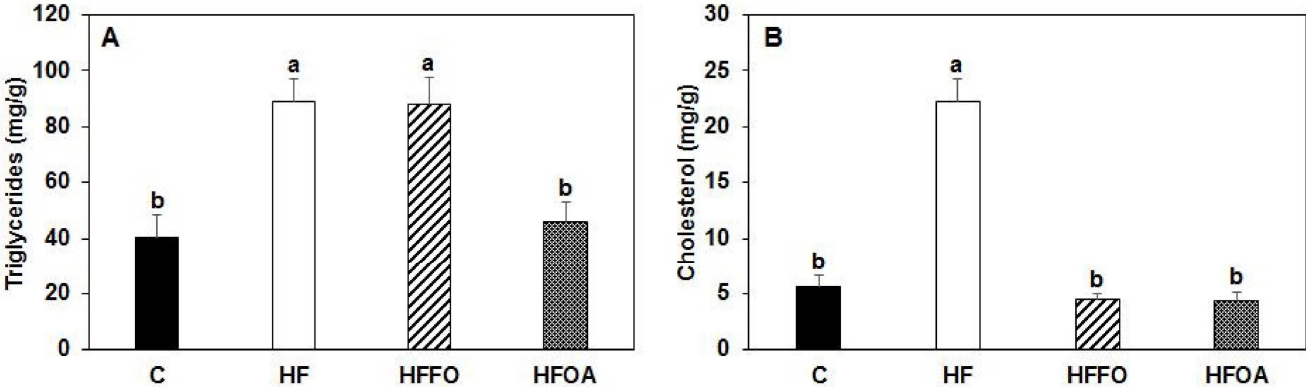


Fig. 2 - Effects of supplementation with freeze-dried *Odontella aurita* compared to fish oil on (A) liver triglyceride and (B) liver cholesterol levels in rats fed a high-fat diet for 8 weeks.

Values are means with their standard deviations (n = 6), represented by vertical bars.

^{a,b} Mean values with different superscript letters are significantly different (p < 0.05) with a > b.

Figure 3

A

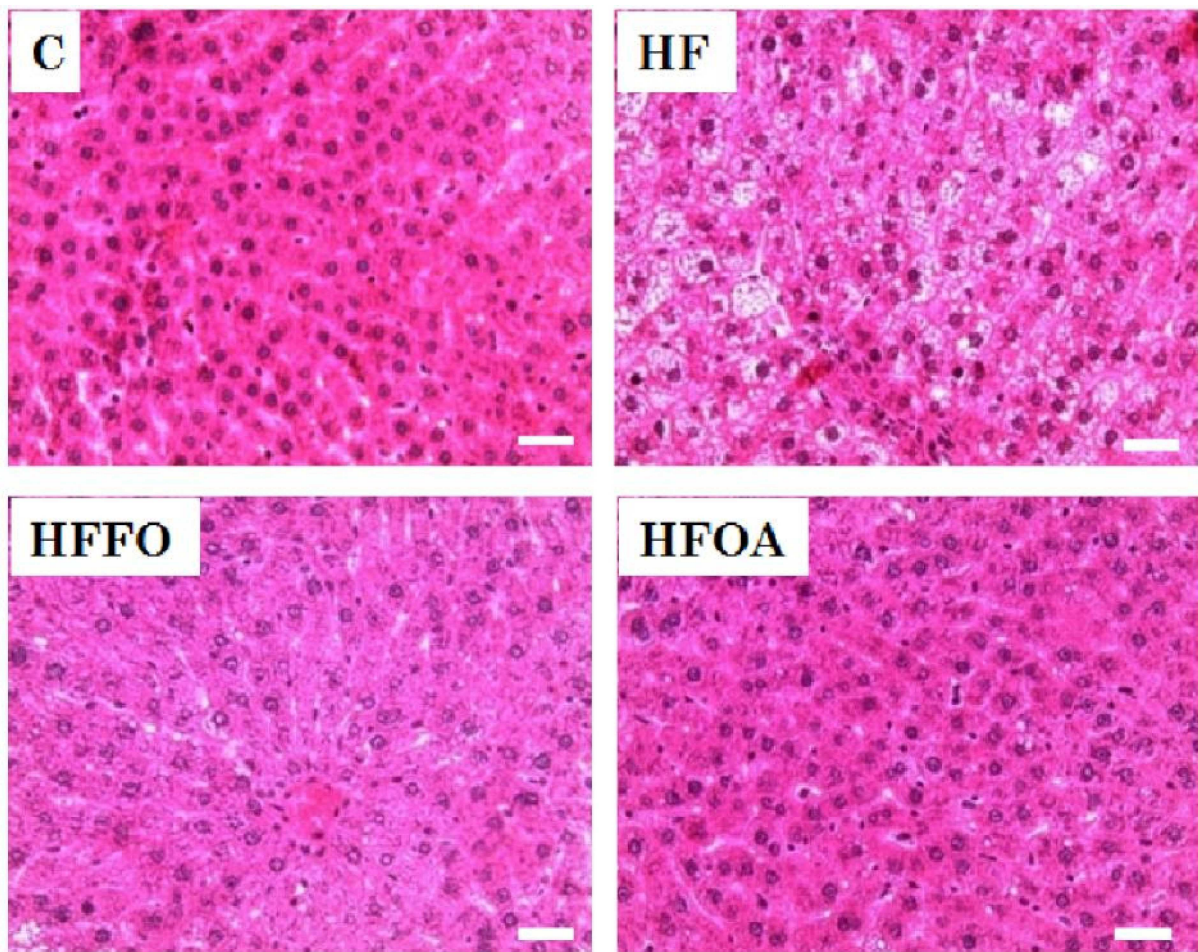


Fig. 3 - Effects of supplementation with freeze-dried *Odontella aurita* compared to fish oil on (A) hepato-steatosis and (B) adipocyte size of rats fed a high-fat diet for 8 weeks. Liver and adipose tissues were stained with haematoxylin and eosin. Scale bar = 50 µm.

Figure 3

B

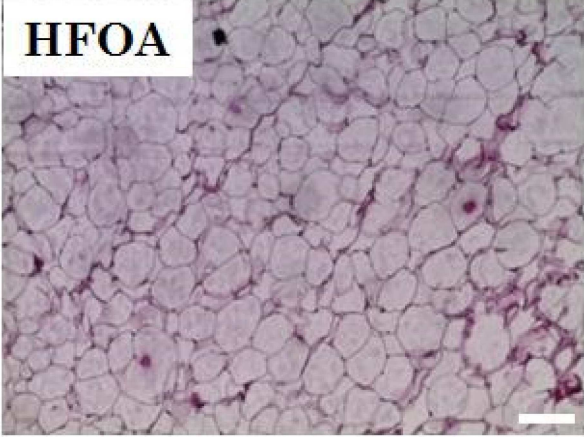
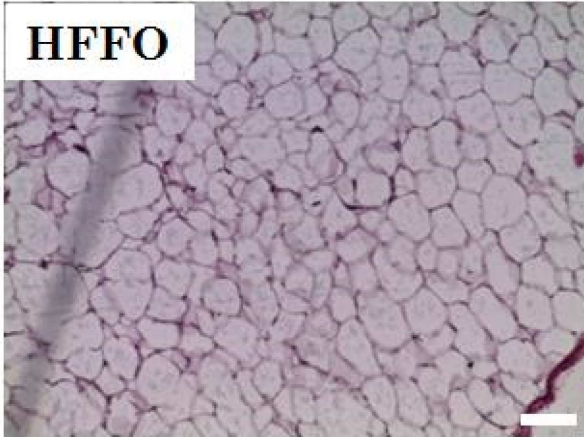
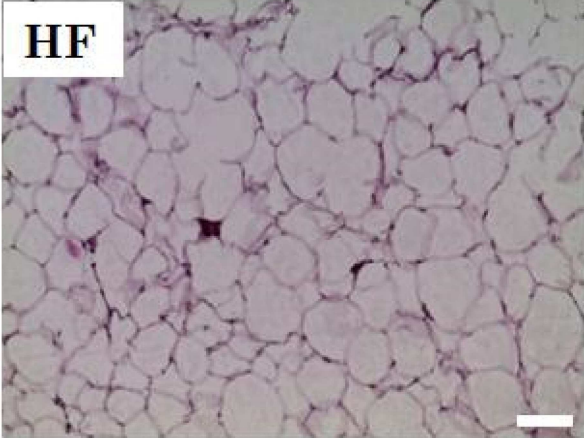
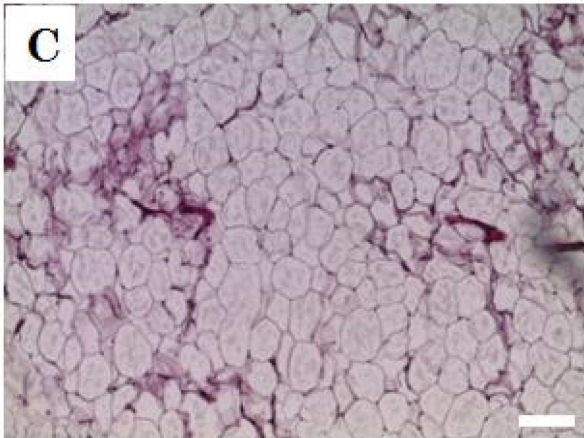


Figure 4

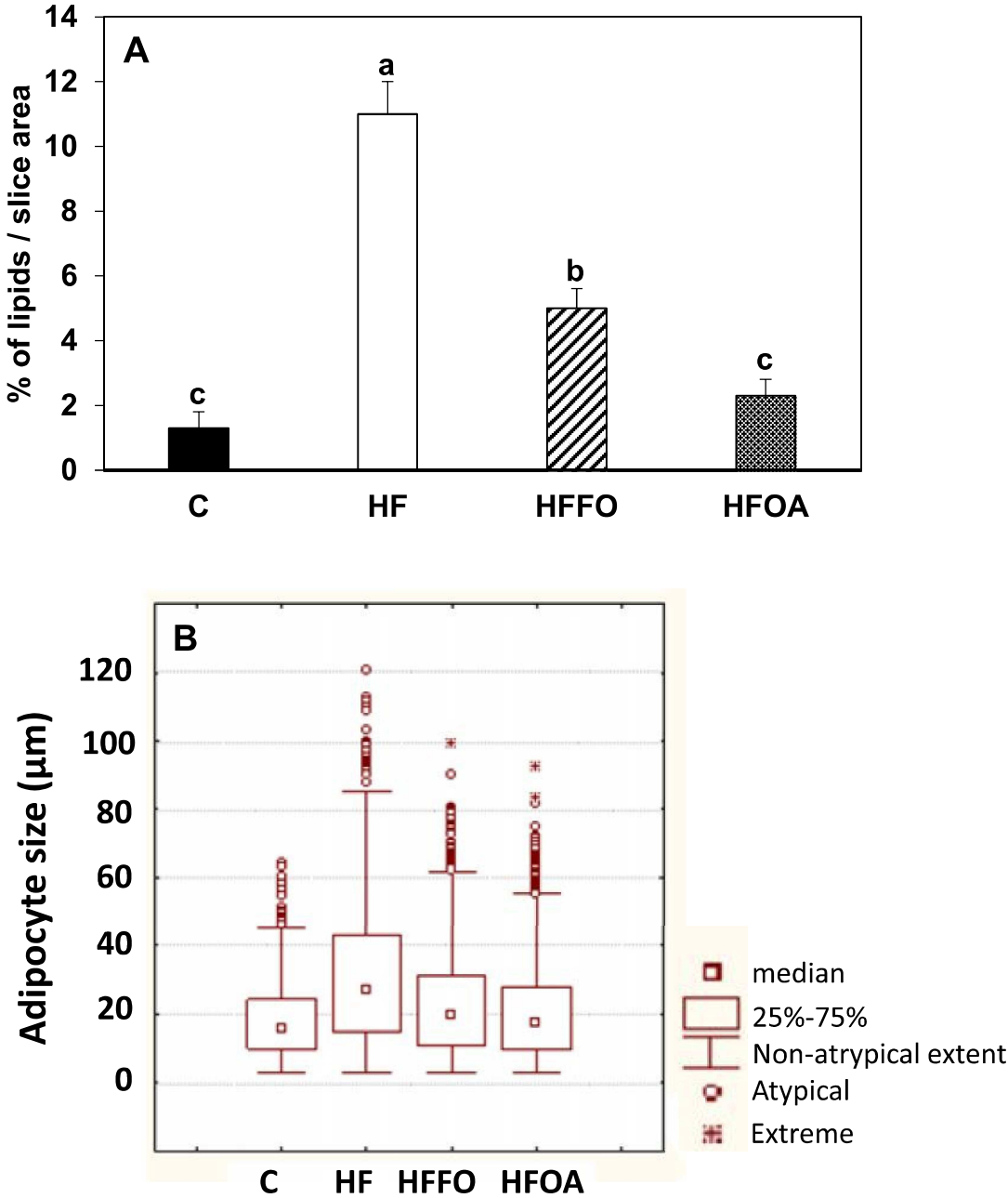


Fig. 4 - (A) Quantitative steatosis after 8 weeks supplementation with freeze-dried *Odontella aurita*. Quantitative steatosis was evaluated using the Mesurim Pro 3.4 software. After the steatosis evaluation (white dots), the measure of area was evaluated and results were expressed as percentage of lipids (white dots) per slice area. Values are means with their

standard deviations (n = 20 cells in 5 different slices for each group), represented by vertical bars.

^{a,b,c} Mean values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$) with $a > b > c$.

(B) Adipocyte size after 8 weeks supplementation with freeze-dried *Odontella aurita*.

Adipocyte size was evaluated using the Mesurim Pro 3.4 software. The shapes of cells were reconstituted and the diameter of the cells was evaluated. Results are presented in box plot with median, 25%, 75% and non-atypical extent.

3.5. Fatty acid composition of the plasma total lipid and the hepatic phospholipids

Rats fed the HF diet showed a higher SFA content in the plasma total lipids and liver phospholipids (Tables 4 and 5, respectively) compared to control rats. In this case, it concerns 14:0 and 18:0. On the other hand, rats fed the HFOA and HFFO diets displayed greater n-3 PUFA incorporation into plasma total lipids and liver phospholipids than those in the HF group. However, EPA incorporation was greater in the rats fed the HFFO diet than in those that had received the HFOA diet, even though both groups ingested the same amount of EPA in their daily food intake. The incorporation of n-3 PUFA into plasma total lipids and liver phospholipids induced a n-6 PUFA decrease, which provide less protection against CVDs than n-3 PUFAs. Consequently, the rats fed the HFFO and the HFOA diets had lower n-6/n-3 ratios than those in the HF group. Furthermore, the fatty acid composition of hepatic phospholipids showed that the MUFA/SFA ratio in the HFFO group was lower than in the HF group. However, there was no difference in the MUFA/SFA ratio between the HFOA and HF groups.

Table 4 Effect of supplementation with freeze-dried *Odontella aurita* compared to that with fish oil on the fatty acid composition of plasma total lipids in rats fed a high fat diet for 8 weeks

Diet groups	C	HF	HFFO	HFOA
Fatty acid (% molar)				
14:0	0.6 ^b ± 0.2	2.6 ^a ± 0.8	2.5 ^a ± 0.6	2.4 ^a ± 0.8
16:0	16.3 ± 4.1	17.2 ± 5.0	17.0 ± 1.2	17.5 ± 3.7
18:0	6.5 ^b ± 1.2	11.1 ^a ± 2.3	11.6 ^a ± 2.1	10.8 ^a ± 1.3
SFA	23.4 ^b ± 4.4	31.0 ^a ± 4.9	31.1 ^a ± 2.9	30.8 ^a ± 3.6
16:1	1.7 ± 0.8	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.3
18:1n-9	17.9 ^a ± 7.4	14.3 ^b ± 7.6	12.7 ^b ± 3.3	15.6 ^{a,b} ± 8.1
18:1n-7	0.1 ± 0.0	-	-	-
22:1	0.6 ^a ± 0.2	0.8 ^a ± 0.2	0.2 ^b ± 0.1	0.4 ^b ± 0.1
20:1n-9	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
24:1n-9	1.3 ± 0.6	1.0 ± 0.4	0.7 ± 0.0	0.9 ± 0.3
MUFA	20.5 ^a ± 4.5	18.1 ^b ± 3.7	14.8 ^b ± 3.4	18.7 ^b ± 4.3
18:2n-6	7.6 ^b ± 1.2	8.9 ^b ± 2.5	12.3 ^a ± 1.4	9.4 ^{a,b} ± 3.0
20:4n-6	18.2 ^a ± 2.7	19.6 ^a ± 3.7	14.1 ^b ± 1.0	14.5 ^b ± 2.1
n-6	26.2 ^b ± 3.1	28.7 ^a ± 3.0	26.7 ^b ± 2.3	25.6 ^b ± 3.9
18:3n-3	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1
20:5n-3	0.2 ^c ± 0.0	0.2 ^c ± 0.1	2.2 ^a ± 0.4	1.1 ^b ± 0.4
22:5n-3	0.4 ^b ± 0.1	0.5 ^b ± 0.1	1.8 ^a ± 0.4	0.8 ^{a,b} ± 0.3
22:6n-3	2.2 ^c ± 0.8	2.8 ^c ± 0.9	6.8 ^a ± 0.5	3.2 ^b ± 1.5
n-3	2.8 ^c ± 0.9	3.4 ^c ± 1.0	11.1 ^a ± 1.7	5.2 ^b ± 2.1
n-6/n-3	10.1 ^a ± 2.2	8.8 ^{a,b} ± 1.3	2.4 ^c ± 0.2	4.7 ^b ± 0.8
MUFA/SFA	0.9 ^a ± 0.2	0.6 ^b ± 0.2	0.5 ^b ± 0.1	0.6 ^b ± 0.2

All values were expressed as the mean ± SD (n=6). After analysis of variance, the mean values were compared using Fisher's least significant difference test

^{a,b,c} Mean values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$) with a > b > c.

-, not detected.

3.6. Oxidative status of the liver

The results concerning the oxidative stress in the liver are shown in Fig. 5. Rats fed the HF diet displayed greater oxidative stress than the control rats. This oxidative stress was marked by an increase in the liver MDA level and a decreased GPx activity. When rats were fed the HFOA diet, an improvement in their liver oxidative status was observed, with a decrease in MDA level and an increased GPx activity.

Figure 5

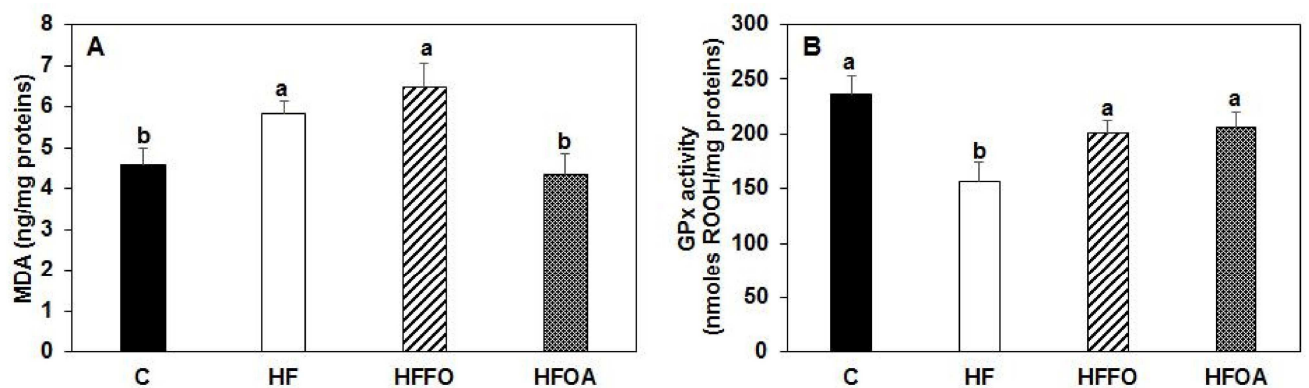


Fig. 5 - Effects of supplementation with freeze-dried *Odontella aurita* compared to fish oil on (A) the liver malondialdehyde (MDA) level and (B) the liver glutathione peroxidase (GPx) activity in rats fed a high-fat diet for 8 weeks. Values are means with their standard deviations (n = 6), represented by vertical bars.

^{a,b} Mean values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$) with a > b.

3.7. Platelet activity

Results obtained on ADP and collagen-induced platelet aggregation are reported in Fig. 6 (A). The data showed that significant platelet hyper-aggregation occurred in rats fed the HF diet compared to the controls. When rats were fed the HFOA, platelet aggregation decreased by 32% with both agonists *versus* the HF group. However, OA seems to be more effective than fish oil in preventing collagen-induced platelet aggregation. The effects of OA and FO on platelet TxB₂ level, are reported in Fig. 6 (B). Rats fed the HF diet displayed more platelet TxB₂ than control rats. OA supplementation reduced the platelet TxB₂ level by 31% *versus* HF-fed rats. The HFFO rats displayed a similar decrease in platelet TxB₂ level as those in the HFOA group. The effect of OA and FO on platelet oxidative status is reported in Fig. 7. The platelet oxidative stress level in the HF rats is higher than in control ones. OA supplementation improved HF diet-induced oxidative stress in platelets by reducing the MDA level and enhancing GPx activity. Similar results were observed in rats fed the HFFO diet. The arachidonic acid (20:4n-6) and n-3 PUFA-LC contents of platelet phospholipids are reported in Fig. 8. The data revealed a significant reduction in the 20:4n-6 content in rats fed the HFOA and the HFFO diets compared to the HF group. A significant increase of n-3 PUFAs (EPA, DPA and DHA) was observed in the HFOA and HFFO groups, compared to the HF one. However, incorporation of these n-3 PUFAs was higher in the HFFO group than in the HFOA group.

Figure 6

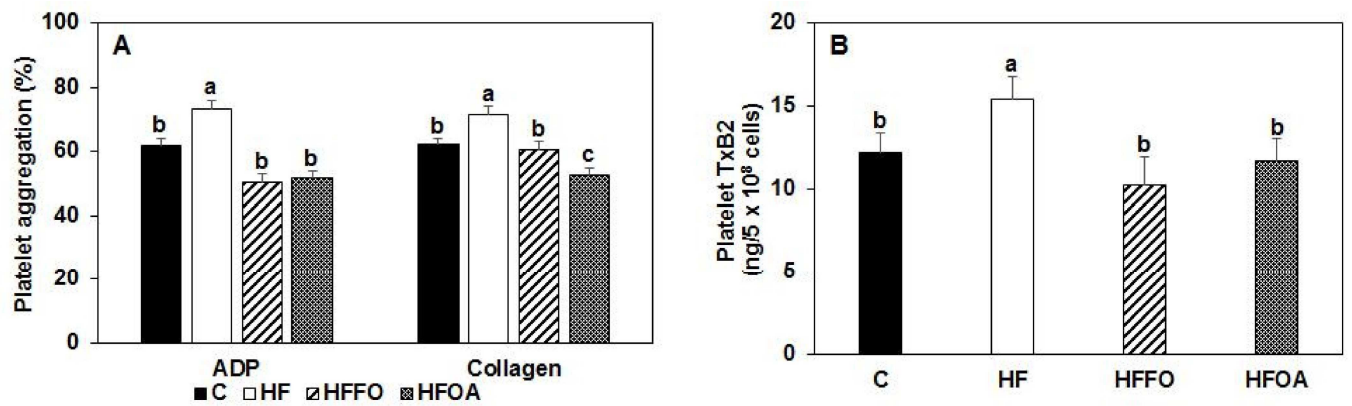


Fig. 6 - Effects of supplementation with freeze-dried *Odontella aurita* compared to fish oil on (A) platelet aggregation and (B) platelet thromboxane B2 level in rats fed a high-fat diet for 8 weeks. Values are means with their standard deviations (n = 6), represented by vertical bars. ^{a,b,c} Mean values with different superscript letters are significantly different (p < 0.05) with a > b > c.

Rat platelets were isolated as described in Material and methods section and stimulated with adenosine-diphosphate (ADP) 5 μ M or with collagen 5 μ g/mL.

Figure 7

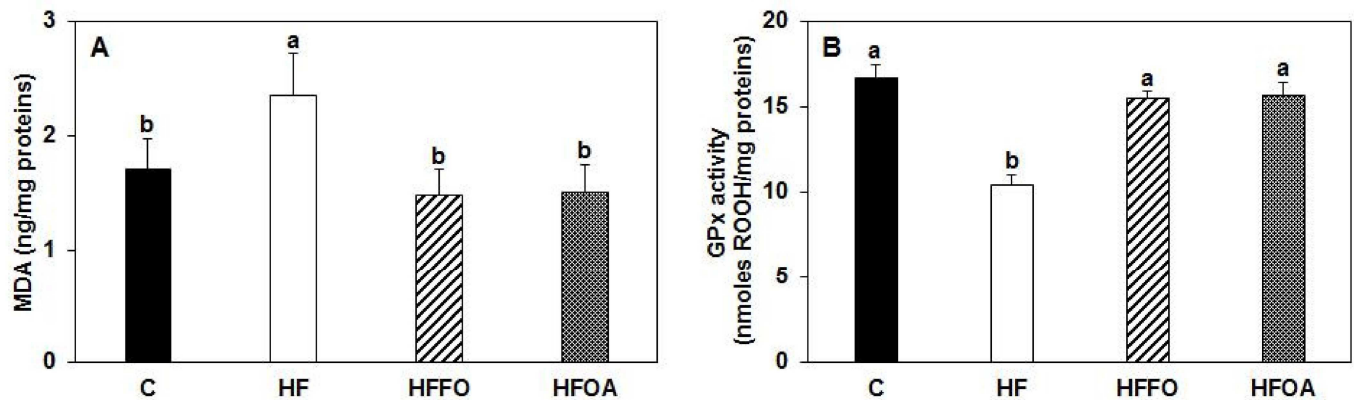


Fig. 7 - Effects of supplementation with freeze-dried *Odontella aurita* compared to fish oil on (A) platelet malondialdehyde (MDA) and (B) glutathione peroxidase (GPx) activity in rats fed a high-fat diet for 8 weeks. Values are means with their standard deviations (n = 6), represented by vertical bars.

^{a,b} Mean values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$) with a > b.

4. Discussion

Our study was undertaken to compare the effect of two EPA-rich food supplements (FO and OA, Table 2) on some risk factors for high-fat induced metabolic disorders in rats. The main objective was to investigate the impact of this microalga as a food supplement on risk factors involved in CVD. As a control, we decided to use an EPA-rich FO. This allowed us to study the impact of one of the various compounds contained in the microalga; indeed, OA contains not only EPA but also pigments and phytosterols.

It is well known that high SFA diets are associated with the onset of metabolic syndrome in rats and mice [25,26] as well as in humans [27-29]. Metabolic syndrome is generally characterized by a combination of various metabolic disorders including dyslipidaemia, central obesity, insulin resistance, diabetes mellitus, hypertension and non-alcoholic fatty acid disease [30]. Abdominal obesity is one of the key aetiological features of CVD risk factors. One of the mechanisms related to abdominal obesity and CVD is the increase in the free fatty acids released from visceral fat cells. These free fatty acids enter the blood stream; then they are directed into the liver, where they interfere with glucose and lipid metabolism leading to insulin resistance and hyperlipidaemia [31]. In our study, rats fed the HF diet (40% fat, essentially saturated fats), developed several CVD risk factors such as central obesity, insulin resistance and non-alcoholic fatty acid diseases, but not dyslipidaemia.

Previous studies have already reported that supplementing the diet with FO n-3 PUFAs has beneficial effects on parameters involved in CVD risk factors [32]. Buckley and Howe [33] showed that a dietary intake of these fatty acids may reduce body weight in obese animals, and body fat accumulation, specifically visceral fat of animals fed a HF diet. Our data showed that rats fed the HF diet had higher adiposity and AT/BW ratio than those in the C group. On the other hand, we observed that n-3 PUFA supplementation from FO and OA reduced HF induced adiposity by decreasing both BW and AT weight. Weight loss is known to result in a decrease in circulating inflammatory markers [34], such as adipokines, and n-3 PUFAs from marine sources have been shown to have anti-inflammatory properties [35-37]. This would appear to indicate that the reduction of BW and adiposity observed in the HFOA group could be attributed to n-3 PUFAs contained in OA.

It has been established that HF diet consumption increases blood lipids. However, we did not observe any difference in blood lipids between the HF and C groups. Walrand et al. [38] showed that short-chain SFA (less than 12 carbon atoms) appear to be neutral with regard to

blood levels of LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and TG. After absorption, SFA can be used or beta-oxidation to supply energy, and therefore have no real direct impact on lipid metabolism. The HF diet e used in our study contained 40% of lipids, including 33% of hydrogenated coconut oil, rich in short-chain SFA. This could explain the blood lipid profile obtained in the HF group. However, our HF diet did effectively trigger HF induced CVD risk factors, insofar as we observed insulin resistance and non-alcoholic fatty acid disease in the rats on the HF diet.

Our data also showed that OA supplementation enhanced insulin sensitivity and decreased blood TG and cholesterol levels. In the liver, OA supplementation reduced TG and cholesterol levels, and prevented hepatic steatosis by reducing lipid accumulation in rats fed the HFOA diet. N-3 PUFAs from marine sources are already known to be involved in managing CVD risk factors by reducing lipid levels in the blood and liver, and by enhancing insulin sensitivity. Accumulating evidence shows that FO supplementation reduces lipidaemia and prevents hepatic steatosis by lowering lipid metabolism in the liver [39]. At least 4 nuclear receptors are affected by EPA and DHA, and which may be involved in regulating lipid metabolism [40-42]. This would appear to indicate that n-3 PUFAs from OA could regulate lipid metabolism in the same way that EPA and DHA from FO.

The intake of n-3 PUFAs has been shown to influence the fatty acid composition of membrane phospholipids, thus modulating several metabolic processes that take place in the liver. The fatty acid composition of plasma phospholipids showed that although similar levels of EPA were provided by the FO and OA diets, the incorporation of EPA in plasma phospholipids was higher in the HFFO diet rats than in HFOA ones. Similar results were obtained for the fatty acid composition of the hepatic phospholipids. This could be explained by the bioavailability of the n-3 PUFAs in both sources. FO consists essentially of

triglycerides, whereas lipids from OA are composed of 46% neutral lipids, 51% glycolipids and 3% phospholipids [43].

Our results showed a significant increase of redox status in the HF diet rats compared to the control ones. Increased redox status is characterized by increased MDA levels and lower GPx activity in the liver. Similar findings were reported in several studies reporting that high levels of dietary fat induced oxidative stress by leading to the overproduction of reactive oxygen species (ROS), and lower antioxidative enzyme activity [44, 45]. A significantly decreased of high-fat induced oxidative stress by reducing lipid peroxidation (MDA) and increasing GPx activity was observed in the HFOA group. However, FO enhanced GPx activity, but had no effect on lipid peroxidation in the HFFO group. This demonstrates that OA supplementation reduces hepatic oxidative stress to a greater extent than FO. As well as n-3 PUFAs, OA also contains a large proportion of bioactive molecules, such as chlorophyll *a* and fucoxanthin, their main pigments (30.0 and 20.4% of total pigments, respectively). Many studies have reported that micronutrients, such pigments and other molecules as polyphenols, vitamins and minerals, can prevent or at least attenuate the damage caused by oxidative stress. Feillet-Coudray et al. [46] demonstrates that a polyphenol extracted from red wine seems to have some protective effects against hepatic steatosis and against the oxidative stress induced by HF, high-sucrose diets in rats. Fucoxanthin, like other carotenoids, displays remarkable bioactivities (antioxidant and anti-obesity) that are relevant to human health [47].

Platelets play a central role in the onset of thrombosis, which is one of the complications of CVD. Our results showed a reduced platelet aggregation in the HFOA group compared to the HF one. To understand how OA produces its anti-platelet aggregation effect, we studied the effect of the microalga on the fatty acid composition of the platelet phospholipids, in the production of TxB₂, the stable form of the thromboxane A₂ (TxA₂), and on the platelet redox status. The data showed that rats fed the HFOA diet have a lower TxB₂ level than rats fed the

HF diet. Furthermore, the fatty acid composition of the platelet phospholipids was significantly modified depending on the various different diet treatments. N-3 PUFA levels, particularly EPA, was higher in the HFOA group than in the HF group. The platelet phospholipid 20:4n-6 content from the HFOA rats was lower than those in the HF group. OA also enhanced HF induced oxidative stress in platelets by reducing platelet MDA levels and increasing GPx activity. Recent studies have demonstrated that the dietary intake of n-3 PUFAs can reduce the risk of coronary heart disease as a result of their anti-atherogenic, anti-inflammatory and anti-thrombotic effects [48]. Platelet aggregation is an early event in the onset of thrombosis and is initiated by TxA₂, a potent aggregation agent and vasoconstrictor [49]. Evidence from dietary intervention studies has shown that the consumption of n-3 PUFAs reduces the production of TxA₂ [50, 51], extends bleeding time [52, 53] and decreases platelet aggregation *in vitro* [4]. EPA and DHA both reduce platelet aggregation in hypertensive subjects [55], diabetic subjects [54, 56], and in healthy controls both *in vitro* and *ex vivo* [57, 58]. At least two mechanisms are probably involved in the regulation of platelet function by the n-3 PUFAs: (i) modulation of the pool of precursor fatty acids and their competitors, (ii) changes in cell membrane fluidity, resulting in changes in the activity and/or efficiency of platelet agonist receptors [59, 60]. This would appear to indicate that the antiplatelet effect of OA could be related to the n-3 PUFAs and other bioactive molecules contained in the microalga.

5. Conclusion

OA can be used as an alternative n-3 PUFA rich food supplement as we have demonstrated that this microalga produces similar effects to FO in preventing HF induced CVD risk factors in rats. Although the incorporation of n-3 PUFAs was greater in rats fed the FO than in those

that received lyophilised OA, the biological effects of n-3 PUFAs from these two sources were similar. Our objective was to compare the efficiencies of the microalga and of a commercial marine source (FO) and our results were in favour of the microalga.

6. Disclosure

The authors declare that they do not have any conflict of interest.

7. Acknowledgments

This study was supported by the PHC-Volubilis program n° MA/21/61 with joint financial support from the French Foreign Affairs Ministry, the Moroccan Ministry of Research and Higher Education and the FP 7 European Project GIAVAP (Genetic Improvement of Algae for Value Added Products).

A.H. contributed to planning the study, the experimental work, analysis of samples, statistical analysis, data analysis and compiling the manuscript. V.M, L.U., NM and GT contributed to planning the study, the experimental work and compiling the manuscript. A.S.M. contributed to the experimental work. F.P.V. contributed to platelet aggregation studies. H.M. contributed to the histology analysis. The authors also thank M. Ghosh for reviewing the English text.

8. References

- [1] EFSA. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to labeling reference intake values for n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. EFSA J 2009;1176:1–11.

- [2] Lund EK. Health benefits of seafood; is it just the fatty acids? *Food Chem* 2013;140:413–20.
- [3] Weintraub H. Update on marine omega-3 fatty acids: Management of dyslipidemia and current omega-3 treatment options. *Atherosclerosis* 2013;230:381–9.
- [4] Mozaffarian D, Wu JHY. Omega-3 fatty acids and cardiovascular diseases. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:2047–67.
- [5] Scicchitano P, Cameli M, Maiello M, Modesti PA, Muiesan ML, Novo S, et al. Nutraceuticals and dyslipidemia: Beyond the common therapeutics. *J Funct Foods* 2014;6:11–32.
- [6] Dworatzek PD, Acrudi K, Gougeon R, Husein N, Sievenpiper JL, Williams SL. Nutrition therapy. *Can J Diabetes* 2013;37: S45–S55.
- [7] Gao LG, Cao J, Mao QX, Lu XC, Zhou XL, Fan L. Influence of omega-3 polyunsaturated fatty acids-supplementation on platelet aggregation in humans: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* 2013;226:328–34.
- [8] Sijtsma L, De Swaaf ME. Biotechnological production and applications of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;64:146–53.
- [9] Martins DA, Custódio L, Barreria L, Pereira H, Ben-Hamadou R, Varela J, et al. Alternative sources of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae. *Mar Drugs* 2013;11:2259–81.
- [10] De Jesus Raposo MF, De Moraes RM, De Moraes AM. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sci* 2013;15:479–86.
- [11] Shibata S, Natori Y, Nishihara T, Tomisaka K, Matsumoto K, Sansawa H, et al. Antioxydant and anticataract effects of *Chlorella* on rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Nutr Sci Vitaminol* 2003;49:334–9.

- [12] Moreau D, Tomasoni C, Jacquot C, Kaas R, Le Guedes R, Cadoret JP, et al. Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines. *Envir Toxicol Pharmacol* 2006;22:97–103.
- [13] Fujimoto M, Tsuneyama K, Fujimoto T, Selmi C, Gershwin ME, Shimada Y. Spirulina improves non-alcoholic steatohepatitis, visceral fat macrophage aggregation, and serum lipid in mouse model of metabolic syndrome. *Digest Liver Dis* 2012;44:767–74.
- [14] Lattimer JM, Haub MD. Effects of dietary fibers and its components on metabolic health. *Nutrients* 2010;2:1266–89.
- [15] Haimeur A, Ulmann L, Mimouni V, Guéno F, Pineau-Vincent F, Meskini N, et al. The role of *Odontella aurita*, a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats. *Lipids Health Dis* 2012;11:147.
- [16] Lorgeril M, Salen P. The Mediterranean-style diet for the prevention of cardiovascular diseases. *Public Health Nutr* 2006;9:118–23.
- [17] Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497–509.
- [18] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911–17.
- [19] Slover HT, Lanza E. Quantitative analysis of food fatty acids by capillary gas chromatography. *J Am Oil Chem Soc* 1979;56:933–43.
- [20] Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194:927–9.


- [21] Ohkawa H, Ohishi N, Yagik K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351–8.
- [22] Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158–69.
- [23] Chaudière J, Gerard D. Dosage de l'activité glutathion-peroxydase. In Douste-Blazy L, Mendy F, editors. *Biologie des Lipides chez l'Homme*, Paris, 1988 p 275–89.
- [24] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding method. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [25] Lottenberg AM, da Silva Afonso M, Ferrari Lavrador MS, Machado RM, Nakandakare ER. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 2012;23:1027–40.
- [26] Oliart Ros RM, Torres-Márquez ME, Badillo A, O Angulo Guerrero. Dietary fatty acids effects on sucrose-induced cardiovascular syndrome in rats. *J Nutr Biochem* 2001;12:207–12.
- [27] Matsumori R, Miazaki T, Shimada K, Kume A, Kitamura Y, Oshida K, et al. High level of very long-chain saturated fatty acid in erythrocytes correlates with atherogenic lipoprotein profiles in subjects with metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pr* 2013;99:12–8.
- [28] Jans A, van Hees AMJ, Gjelstad IMF, Sparks LM, Tierney AC, Risérus U, et al. Impact of dietary fat quantity and quality on skeletal muscle fatty acid metabolism in subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism* 2012;61:1554–65.
- [29] Richard C, Royer MM, Couture P, Cianflone K, Rezvani R, Desroches S, et al. Effect of the Mediterranean diet on plasma adipokine concentrations in men with metabolic syndrome. *Metabolism* 2013;62:1803–10.

- [30] Fulop T, Tessier D, Carpentier A. The metabolic syndrome. *Pathol Biol* 2006;54:375–86.
- [31] Abate N. Obesity and cardiovascular disease pathogenetic role of the metabolic syndrome and therapeutic implications. *J Diabetes Complications* 2000;14:154–74.
- [32] Djoussé L, Akinkuolie AO, Wu JHY, Ding EL, Gaziano JM. Fish consumption, omega-3 fatty acids and risk of heart failure: A meta-analysis. *Clin Nutr* 2012;31:846–53.
- [33] Buckley JD, Howe RP. Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Obes Rev* 2009;10:648–59.
- [34] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity induced inflammation. *Science* 1993;259:87–91.
- [35] Yates CM, Calder PC, Rainger GE. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacol Therapeutic* 2014;141:272–82.
- [36] Titos E, Clària J. Omega-3-derived mediators counteract obesity-induced adipose tissue inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2013;107:77–84.
- [37] Munro IA, Garg ML. Dietary supplementation with long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and weight loss in obese adults. *Obes Res Clin Pr* 2013;7:173–81.
- [38] Walrand S, Fish F, Bourre JM. Tous les acides gras saturés ont-ils le même effet métabolique ? *Nutr Clin Metabol* 2010;24:63–75.
- [39] Adkins Y, Kelley DS. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem* 2010;21:781–92.
- [40] Meher A, Joshi A, Joshi S. Differential regulation of hepatic transcription factors in the wistar rat offspring born or dams fed folic acid, vitamin B₁₂ deficient diets and

- supplemented with omega-3 fatty acids. Plos One 2014;doi:10.1371/journal.pone.0090209.
- [41] Schmidt S, Willers J, Stahl F, Mutz KO, Scheper T, Hahn A. Regulation of lipid metabolism-related gene expression in whole blood cells of normo- and dyslipidemic men after fish oil supplementation. *Lipids Health Dis* 2013;11:172.
- [42] Gillies PJ, Bhatia SK, Belcher LA, Hannon DB, Thompson JT, van den Heuvel JP. Regulation of inflammatory and lipid metabolism genes by eicosapentaenoic acid-rich oil. *J Lipid Res* 2012;53:1679–89.
- [43] Guihéneuf F, Fouqueray M, Mimouni V, Ulmann L, Jacquette B, et al. Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine microalgae *Pavlova lutheri* (Pavlovophyceae) and *Odontella aurita* (Bacillariophyceae). *J Appl Phycol* 2010;22:629–38.
- [44] Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism Clin Exp* 2008;57:1071–7.
- [45] Robert CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet induced metabolic syndrome. *Metabolism* 2006;55:928–34.
- [46] Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, Cristol JP, et al. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radic Biol Medic* 2009;46:624–32.
- [47] Peng J, Yuan JP, Wu CF, Wang JH. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. *Mar Drugs* 2011;9:1806–28.

- [48] Goodnight SH, Harris WS, Connor WE. The effects of dietary omega-3 fatty acids on platelet composition and function in man: a prospective, controlled study. *Blood* 1981;58:880–5.
- [49] Milionis HJ, Elisaf MS, Mikhailidis DP. Platelet function and lipid-lowering interventions. *Platelets* 1999;10:357–67.
- [50] Archer SI, Green D, Chamberlain M, Dyer AR, Liu K. Association of dietary fish and n-3 fatty acids intake with hemostatic factors in the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1119–23.
- [51] Von Schacky C, Fischer S, Weber PC. Long-term effects of dietary marine omega-3 fatty acids upon plasma and cellular lipids, platelet function, and eicosanoid formation in humans. *J Clin Invest* 1985;76:1626–31.
- [52] Knapp HR, Reilly IA, Alessandrini P, Fitzgerald GA. In vivo indexes of platelet and vascular function during fish-oil administration in patients with atherosclerosis. *The New Engl J Med* 1986;314:937–42.
- [53] Véricel E, Calzada C, Chapuy P, Lagarde M. The influence of n-3 fatty acids on platelets in elderly people. *Atherosclerosis* 1999;147:187–92.
- [54] Axelrod L, Camuso J, Williams E, Kleinman K, Briones E, Schoenfeld D. Effects of a small quantity of omega-3 fatty acids on cardiovascular risk factors in NIDDM. A randomized, prospective, double-blind, controlled study. *Diabetes Care* 1994;17:37–44.
- [55] Mori TA, Beilin LJ, Burke V, Morris J, Ritchie J. Interactions between dietary fat, fish, and fish oils and their effects on platelet function in men at risk of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:279–86.
- [56] Tamura Y, Hirai A, Terano T, Yoshida S, Takenaga M, Kitagawa H. Anti-thrombotic and anti-atherogenic action of eicosapentaenoic acid. *Jpn Circ J* 1987;51:471–7.

- [57] Wensing AG, Mensink RP, Hornstra G. Effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids from plant and marine origin on platelet aggregation in healthy elderly subjects. *Br J Nutr* 1999;82:183–91.
- [58] Prisco D, Filippini M, Francalanci I, Paniccia R, Gensini GF, Neri Serneri GG. Effect of n-3 fatty acid ethyl ester supplementation on fatty acid composition of the single platelet phospholipids and on platelet functions. *Metabolism* 1995;44:562–9.
- [59] Das UN. Essential fatty acid metabolism in patients with essential hypertension diabetes mellitus and coronary heart diseases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1995;52:387–91.
- [60] Hornstra G, Rand ML. Influence of dietary lipids on platelet-vessel wall interaction: possible role of eicosanoids and platelet membrane fluidity. *Haemostasis* 1986;16:41–2.



**A comparative study on the effect
of argan oil vs fish oil on some risk
factors for metabolic syndrome in
high-fat fed rats**

Etude comparative des effets de l'huile d'argan et de l'huile de poisson sur certains facteurs de risque du syndrome métabolique chez des rats nourris avec un régime hyperlipidique

Introduction

Le syndrome métabolique correspond à un ensemble d'anomalies métaboliques, telles que la résistance à l'insuline, la dyslipidémie, l'adiposité et l'hypertension artérielle. Chacun de ces composants constitue un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires, tels que l'athérosclérose et la thrombose. Par ailleurs, il est actuellement bien admis que l'huile de poisson, riche en acides gras polyinsaturés de la série oméga-3 (EPA et DHA) réduit certains facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, notamment le taux de lipides athérogènes et l'activité des plaquettes sanguines. L'huile d'argan, extraite du fruit de l'arganier (*Argania spinosa*, arbre ancestral et endémique du Maroc) est composée de 80 % d'acides gras insaturés (essentiellement de la série oméga-6) et d'une fraction insaponifiable (1 %) particulièrement riche en tocophérols, doués de propriétés anti-oxydantes. Etant donné sa composition chimique, la nature de ses acides gras et de sa fraction insaponifiable particulière, il est attendu que l'huile d'argan soit dotée d'effets biologiques et nutritionnels puissants améliorant certains facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. L'objectif de ce travail est donc de comparer les effets de l'huile de poisson et d'argan sur l'agrégation plaquettaire, et sur certains facteurs de risque liés au syndrome métabolique chez des rats nourris avec un régime hyperlipidique.

Pour cela, 24 rats mâles de souche Wistar ont été répartis en 4 groupes homogènes et soumis à différents régimes : un régime standard (groupe témoin, T) ; un régime hyperlipidique à 40 % de lipides (groupe HF) et un régime hyperlipidique supplémenté avec 5 % d'huile de poisson (groupe HFFO) et un régime hyperlipidique supplémenté avec 5 % d'huile d'argan (HFAO).

Après 8 semaines de régime, une diminution significative du poids corporel est observée chez les rats nourris avec le régime HFFO par rapport aux rats du groupe HFAO. Au niveau plasmatique, l'huile d'argan a montré un effet hypolipémiant similaire à celui de l'huile de poisson. Cependant, au contraire de l'huile de poisson, l'huile d'argan n'a aucun

effet significatif sur le taux des lipides hépatiques après 8 semaines de régime. D'autre part, la supplémentation en huile d'argan et en huile de poisson diminue de façon similaire l'hyperactivité plaquettaire induite par le régime hyperlipidique. Concernant les résultats du stress oxydatif, l'huile d'argan montre un effet anti-oxydant au niveau tissulaire et au niveau cellulaire plus important que celui observé chez le groupe HFFO.

A comparative study on the effect of argan oil vs fish oil on some risk factors for metabolic syndrome in high-fat fed rats

Adil Haimeur ^{1,2}, Virginie Mimouni ¹, Lionel Ulmann ¹, Hafida Meassaouri², Nezha Abouakil², Gérard Tremblin ¹, Nadia Meskini ²

¹ IUT Département Génie Biologique F-53020 Laval, Faculté des Sciences et Techniques F-72085 Le Mans. EA 2160-MMS, MicroMar, Mer Molécules Santé, IUML-FR 3473 CNRS, Université du Maine, France.

² Université Hassan II, Equipe Nutrition, Environnement, Santé. Laboratoire de Virologie, Microbiologie, Qualité/Écotoxicologie et Biodiversité, Faculté des Sciences et Techniques, Mohammedia, Morocco.

Adil Haimeur: haimeur@gmail.com

Virginie Mimouni: virginie.mimouni@univ-lemans.fr

Lionel Ulmann: lionel.ulmann@univ-lemans.fr

Gérard Tremblin: gerard.tremblin@univ-lemans.fr

Nadia Meskini: nadia_meskini@hotmail.com

Introduction

Metabolic syndrome (MS) is defined as a clustering of interrelated metabolic risk factors that include dyslipidemia, hypertension, insulin resistance, inflammation, and abdominal obesity [1]. More recently, the prothrombotic and proinflammatory states have been recognized as components of the MS [2]. Each of these metabolic disorders constitutes a risk factor for cardiovascular disease (CVD) [3-6]. The combination of 2 or more of these risk factors significantly increases the incidence of the cardiovascular disease like atherosclerosis and thrombosis [3-5]. A prothrombotic condition may arise when the balance between the 3 main parts of hemostasis, namely, coagulation system, fibrinolysis, and platelet function, becomes disrupted. Patients with MS exhibit a pattern of coagulation factors that promote thrombosis or retard thrombolysis [6] as well as higher platelet activity [7-9]. Platelets activation is thought to play a crucial role in the initiation and development of atherosclerotic lesions [10,11]. The mechanism by which the MS increases platelet activity is related to the production of the oxidized low-density lipoprotein (LDL) as well as to the increased reactive oxygen species (ROS) in MS patients [12,13]. The association of MS risk factors's with acute CVD justifies the therapeutic management of these risk factors to reduce the prevalence of CVD in patients at risk.

Although the etiology of MS has not yet been fully elucidated, complex interactions between genetic, metabolic, and environmental factors including diet are thought to be involved. The link between the diet and the etiology of these pathologies has been extensively studied [14,15]. The biological basis for the diet-heart hypothesis has been based mainly on the effects of saturated (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids on the lipid profile [16,17], but dietary fat quality may also modulate cardiovascular outcomes through its effects on thrombosis, endothelial function, inflammation, abdominal obesity,

insulin sensitivity, the development of type 2 diabetes and arrhythmias [18-20]. The type of PUFA may also differentially affect cardiovascular outcome. A high intake of fatty fish or long-chain omega-3 fatty acids [eicosapentaenoic acid, EPA (20:5n-3) and docosahexaenoic acid DHA (22:6n-3)], present in fish oils, has fairly consistently been associated with a lower incidence of MS risk factors in prospective cohort studies and in animal studies [21]. The shorter chain omega-3 fatty acid, α -linolenic acid (18:3n-3), may also be protective [22].

Omega-6 fatty acids and in particular their precursor, linoleic acid (18:2n-6), have often been shown to exert proinflammatory and prothrombotic effects [23]. On the other hand, long chain n-6 PUFA, namely, γ -linolenic acid (18:3n-6) and arachidonic acid (20:4n-6), were reported to be protective against CVD risk factors [24,25]. The Mediterranean diet, (Med Diet) a well-known healthy food pattern, has been associated with reduced prevalence [26] and incident [27] of the MS. Olive oil is the main vegetable oil in fat components of the Med Diet. Long-term feeding of olive oil, rich in oleic acid, largely accounts for the very low prevalence of CVD in people of the Mediterranean region [28]. Among vegetable oils, argan oil is traditionally used in Morocco against to hypercholesterolemia and associated CVD. It is extracted from the almonds of the *Argania spinosa* tree, an endemic Moroccan tree growing in semi-desertic areas. This oil contains a high proportion of MUFA (mainly oleic acid, 18:1n-9, 45%) and n-6 PUFA (35% 18:2n-6) and a very low n-3 PUFA level (0.1%-0.3% 18:3n-3). It is also rich in antioxidants (e.g., tocopherol and plant sterols) and in several phenolic compounds (e.g., ferulic, syringic, and vanillic acids) [29,30]. As could be expected from its interesting composition, argan oil has demonstrated its pharmacological effects in several studies. Argan oil intake has notably been shown to decrease several MS risk factors, like atherogenic lipids [31], blood pressure [32] and insulin resistance [33] in human and animal model. Haimeur *et al.* [34] has recently demonstrated the antiplatelet and the

antioxidant effect of argan oil in dyslipidemic patients. In animals, Mekhfi *et al.* [35] have reported that argan oil has antithrombotic activity in rats, which could be related to its antiplatelet aggregation rather than its anticoagulant activity.

The present study was undertaken to compare the preventive effects of fish oil and argan oil intake on high-fat diet induced MS risk factors in rats. We used the high-fat diet, an established model of diet-induced MS risk factors. Indeed, it has been established that high-fat diet intake increases blood lipid levels, insulin resistance, platelet activity, and oxidative stress [36-38]. We used a high-fat diet contained 40% of lipids composed mainly (33%) by saturated fat. We investigated the effects of fish oil (rich in n-3 PUFA) and argan oil (rich in n-6 PUFA and n-9 PUFA) on lipid levels, insulin resistance, platelet activity and oxidative status in high-fat fed rats.

Experimental methods

Animals and experimental protocol

Twenty-four male Wistar rats weighing 120 ± 10 g were purchased from (Centre d'Élevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France). They were housed in pairs in a room under standard conditions of temperature (22-24 °C), humidity (40-60%) and 12 h light/dark cycle. All the animals were fed a standard diet (SAFE, Augy, France) for 1 week of acclimation. The animals were then randomly divided into four groups of 6 rats, and were fed with the following diets for 8 weeks: the control group (C), continued to receive the standard diet; the HF group was fed a high-fat diet containing (on a per weight basis: 40% fat, 23% proteins, 23% carbohydrates, 6% cellulose, 7% mineral and 1% vitamins); the HFFO group received the high-fat diet supplemented with 5% (w/w) of fish oil (Polaris, Pleuven, France); the HFAO group was fed with the high-fat diet supplemented with 5% (w/w) of argan oil (argan

oil company, Casablanca, Morocco). The compositions of the experimental diets are shown in Table 1. All animals were fed *ad libitum* with free access to water. All study protocols complied with the institutional guidelines (Direction des services Vétérinaires de la Mayenne, France, N° B53500). The fatty acid compositions of the various diets are shown in Table 2.

Table 1. Composition of the experimental diets (g/Kg diet)

Nutrient	C	HF	HFAO	HFFO
Caseine	230	230	230	230
Corn starch	200	80	80	80
Glucose	360	150	150	150
Cellulose	60	60	60	60
Lard	50	50	-	-
Coprah	-	330	330	330
Argan oil	-	-	50	-
Fish oil	-	-	-	50
Corn oil	10	10	10	10
Rape oil	10	10	10	10
Mineral 205B SAFE	70	70	70	70
Vitamine 200 SAFE	10	10	10	10

C, control diet; HF, high-fat diet; HFAO, high-fat diet supplemented with 5% (w/w) of argan oil; HFFO, high-fat diet supplemented with 5% (w/w) of fish oil.

Analysis was provided by SAFE (Scientific Animal Food & Engineering, Augy, France).

The mineral mixture provides the following amounts in mg/kg of diet: CaHPO₄, 17.2; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₃, 120; FeSO₄, 7 H₂O, 200; trace elements, 400.

Trace element mixture (mg/kg of diet): MnSO₄, H₂O, 98; CuSO₂, 5 H₂O, 20; ZnSO₄, 7 H₂O, 80; CoSO₄, 7 H₂O, 0.1; KI, 0.3. The vitamin mixture provides the following amounts per kg of diet: retinol, 39.600 IU; cholecalciferol, 5000 IU; thiamin, 40 mg; riboflavin, 30 mg; pantothenic acid, 140 mg; pyridoxine, 20 mg; inositol, 300 mg; cyanocobolamin, 0.1 mg; ascorbic acid, 1600 mg; choline, 2.720 mg; folic acid, 10 mg; p-aminobenzoic acid, 100 mg; biotin, 0.6 mg.

Table 2. Fatty acid compositions of the experimental diets (% molar)

(Means values with their standard deviations for n= 3)

Fatty acid	C		HF		HFAO		HFFO	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
14 :0	0.9	0.1	5.5	0.2	4.2	0.3	4.9	0.1
16 :0	17.1	1.7	28.7	1.9	24.5	1.3	22.6	1.7
16 :1	1.39	0.1	0.9	0.1	0.7	0.1	0.7	0.1
18 :0	9.1	0.2	12.5	0.2	11.4	0.5	9.9	0.8
18 :1n7/9	45.0	2.5	32.3	2.8	42.3	2.6	20.7	1.5
18 :2n-6	20.1	1.8	18.8	1.5	27.9	2.5	15.3	1.3
18 :4n-3	0.4	0.02	0.4	0.03	-	-	0.3	0.1
20 :4n-6	0.1	0.02	0.1	0.02	0.2	0.03	0.1	0.0
20 :5n-3	0.02	0.0	0.02	0.0	-	-	25.2	2.1
22 :5n-3	0.1	0.03	0.1	0.02	0.1	0.02	0.9	0.1
22 :6n-3	-	-	0.1	0.03	-	-	5.6	0.9

C, control diet; HF, high-fat diet; HFAO, high-fat diet supplemented with 5% (w/w) of argan oil; HFFO, high-fat diet supplemented with 5% (w/w) of fish oil.

-, not detected.

The body weight (BW) gains of the rats were monitored at regular intervals, and their daily food intakes were estimated. At the end of the experiment, blood was collected from the abdominal aorta under Diazepam/Ketamine (4v/3v) anaesthesia and the liver and adipose tissue (AT) were removed, rinsed with ice-cold NaCl (0.9%) and weighed. Fractions of the liver and adipose tissues were fixed in Bouin's solution for the histology; the rest was frozen in liquid nitrogen and kept for lipid and oxidative stress analysis. Frozen samples were stored at -80 °C before analysis.

Measurement of plasma biochemical parameters

Plasma levels of glucose, total cholesterol and triglycerides were measured using commercial enzyme kits (Biomérieux S.A, Marcy l'Etoile, France). The plasma insulin level was

measured using a commercially-available, enzyme-linked immunoassay (ELISA) kit (Eurobio, Courtaboeuf, France).

Fatty acid phospholipid analysis

To assess the hepatic lipid content, a fraction of the liver tissue was homogenized and total lipids were extracted according to Folch *et al.* [39]. Plasma and platelet lipids were extracted following the method described by Bligh and Dyer [40]. Phospholipids were separated from an aliquot of the total lipids after extraction using silica gel columns Sep-Pak (Sep-Pakplus, silica cartridges, Waters, France). Phospholipids were eluted with 60 mL of methanol, conditioned by means of a nitrogen stream and stored at -20 °C until analysed. Phospholipid extracts were transmethylated according to the method of Slover and Lanza [41], and analysed using a FOCUS gas-chromatography instrument (Thermo Electron Corporation, Les Ulis, France) fitted with a capillary column CP Sil-88 25 m × 0.25 mm id (Varian, Les Ulis, France). Analyses were carried out from 150 °C to 220 °C. The esters were detected with a flame-ionization detector. Pure standards (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were used to identify the fatty acids by comparing the peak retention times of the samples to those of the standards.

Hepatic lipid measurements

Hepatic cholesterol and triglyceride levels were determined in aliquot of the liver total lipid extract using commercial kits (Biomérieux S.A, Marcy l'Etoile, France).

Histology

Immediately after removal, liver and adipose tissue samples were fixed in Bouin's solution (picric acid, formalin, acetic acid, 3:1:0.2 v/v/v) and embedded in paraffin. Sections (5 µm)

were prepared with a microtome and stained with hematoxylin and eosin. The histology views (x 400 original magnification) were obtained using a Motic BA400 microscope (Motic Co, Wetzlar, Germany).

Platelet aggregation

In-vitro platelet aggregation was measured using the turbidimetric method [42] for a washed platelet suspension using a four-channel Apact aggregometer (LABiTEC, Ahrensburg, Germany). Blood was collected from the abdominal aorta into tubes containing citrate-dextrose anticoagulant (9:1 v/v) (citric acid 130 mM, trisodium citrate 170 mM, dextrose 4%). Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifuging total blood at $230 \times g$ for 15 min at 25°C . The supernatant (PRP) was then centrifuged at $120 \times g$ for 8 min to remove any residual erythrocytes and leukocytes. The platelet-rich plasma obtained was acidified to pH 6.5 with citric acid 0.15 M to inhibit spontaneous aggregation. The PRP was then centrifuged at $900 \times g$ for 15 min to obtain platelet pellets. Finally the cells were suspended in Tyrode buffer (NaCl 137 mM, KCl 2.6 mM, MgCl_2 0.9 mM, glucose 5.5 mM, gelatin 0.25%, HEPES 5 mM, CaCl_2 1.3 mM pH 7.4). Platelet suspension concentrations were estimated using a Coulter cell counter (Beckman Coulter, Villepinte, France), and the concentrations were adjusted to 5×10^5 cells/ μL using Tyrode buffer. A volume of 225 μL of washed platelets was preincubated at 37°C for 10 min in the cuvettes stirred at 1000 rpm. Platelet stimulation was initiated by adding ADP 5 μM (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) or collagen 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Kordia, Lille, France). The light transmission was recorded for 5 min after platelet stimulation. The platelet aggregation was quantified as the maximum change in light transmission through a washed platelet solution expressed as a percentage of the light transmission through the blank (Tyrode buffer).

Platelet thromboxane B₂ measurement

To determine the platelet thromboxane B₂ (TxB₂) level, isolated platelets were subjected to three successive freeze/thaw cycles to release the cell contents. The baseline TxB₂ level was determined using an enzyme immunoassay (EIA) kit (Enzo-Life Sciences, Exeter, U.K.) according to the manufacturer's instructions.

Oxidative status evaluation in liver and platelet

To evaluate the redox status in liver and platelets, the malondialdehyde (MDA) level and the glutathione peroxidase (GPx) activity were determined.

The MDA level was measured separately in the liver homogenate or washed-platelet solution using the method of Ohkawa [43]. To 0.1 mL of liver homogenate or 0.5 mL of washed-platelet solution was added: 0.1 mL 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS); 0.75 mL acetic acid 20% at pH 3.5; 0.75 mL thiobarbituric acid (TBA) 0.8% and distilled water *q.s.p* 2.5 mL. The tubes were heated at 95 °C for 1 h, and then immediately cooled in ice. After adding 0.5 mL of water and 2.5 mL *n*-butanol/pyridine solution (15:1 v/v), tubes were vigorously shaken and centrifuged at 1000 × g for 10 min. The organic phase corresponding to the upper layer was aspirated and the absorbance measured at 532 nm. The standard range was prepared using 1,3,3,3 tetramethoxypropane solution (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

The GPx activity was determined according to the method of Paglia and Valentine [44] as modified by Chaudière and Gérard [45]. Briefly, to a final volume of 1.5 mL containing Tris-HCl/EDTA (50 mM/0.1 mM) at pH 7.6, NADPH, H⁺ (0.14 mM), reduced glutathione (GSH) (2 mM) and 0.7 U/mL of GSSG-reductase, was added 0.1 mL of liver homogenate or platelet

lysate. The mixture was incubated at 37 °C for 3 min. The reaction was started by adding 50 µL of substrate (tertiary butyl hydroperoxide 0.2 mM). The change in absorbance was recorded at 340 nm for 5 min at 5 s intervals. An appropriate control without samples was run simultaneously. GPx was expressed in nmoles of hydroperoxide reduced per min and per mg protein.

Protein assay

Protein was determined in the liver homogenate and platelet lysate by Bradford's [46] colorimetric method using BioRad reagent. The calibration range was prepared using the bovine serum albumin (BSA) solution (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Statistical analysis

All values were expressed as the mean \pm SD. After analysis of variance, the mean values were compared using Fisher's least significant difference test (Statgraphics Plus 5.1, Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

Results

Body and organ weights, food intake

As shown in Table 3, final body weights were not significantly different among the control group and HF-fed rats. However, supplementation with fish oil ~~intake~~ significantly decreases final body weight. Among measured organ weights, only adipose tissues were affected by the dietary treatments. HF diet significantly increased the adipose tissue weight in the HF group than that in the control group ($p < 0.05$), thus the adipose tissue weight/bodyweight ratio (AT/BW) was significantly greater ($p < 0.05$) in the HF group than in the control group,

confirming the development of obesity in this dietary model. The increased adiposity was prevented by FO but not by AO intake in HF-fed rats. During the experiment, the food intake of the rats fed with the standard diet was greater than that of those fed with the high-fat diets, despite their equal overall energy intakes.

Table 3. Effects of supplementation with argan oil compared to that with fish oil on the bodyweight and organ weights, daily food intake and energy intake in rats fed a high-fat diet for 8 weeks

(Mean values with their standard deviations for n = 6)

Diet groups	C		HF		HFAO		HFFO	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Bodyweight (g)	465.4 ^a	22.7	468.0 ^a	31.2	461.8 ^a	20.5	449.3 ^b	22.5
Liver weight (g)	12.4	0.7	11.8	1.7	12.5	0.7	12.4	1.1
Adipose tissue (g)	13.6 ^b	2.8	17.1 ^a	3.0	15.8 ^a	2.7	9.5 ^c	2.6
AT/BW (%)	2.7 ^b	0.7	3.3 ^a	1.2	3.1 ^a	0.9	2.0 ^b	0.7
LW/BW (%)	2.5	0.8	2.4	0.6	2.8	0.9	2.7	0.5
Daily food intake (g/day)	26.7 ^a	2.7	19.7 ^b	1.1	19.3 ^b	1.0	18.9 ^b	1.9
Energy intake (Kcal/day)	108.0	11.0	112.0	6.2	106.5	8.1	103.8	10.6

C, control diet; HF, high-fat diet; HFAO, high-fat diet supplemented with 5% (w/w) of argan oil; HFFO, high-fat diet supplemented with 5% (w/w) of fish oil; AT, adipose tissue weight; BW, body weight; LW, liver weight.

^{a, b, c} Mean values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

Plasma biochemical parameters

Figure 1 illustrates the results of the plasma biochemical parameters of rats feeding the different dietary treatments for 8 weeks. The data showed no significant difference in plasma glucose and lipid levels between the control group and the HF one. However, a significant increase in the plasma insulin level ($p < 0.05$) was observed in rats fed the HF diet *versus* the control animals. Argan oil treatment significantly decreases ($p < 0.05$) cholesterol and triglycerides levels in plasma when compared with HF diet intake, but no effect on plasma

insulin level was observed in AO group. However, Fish oil treatment significantly decreases ($p<0.05$) both lipid and insulin levels in plasma when compared with HF diet.

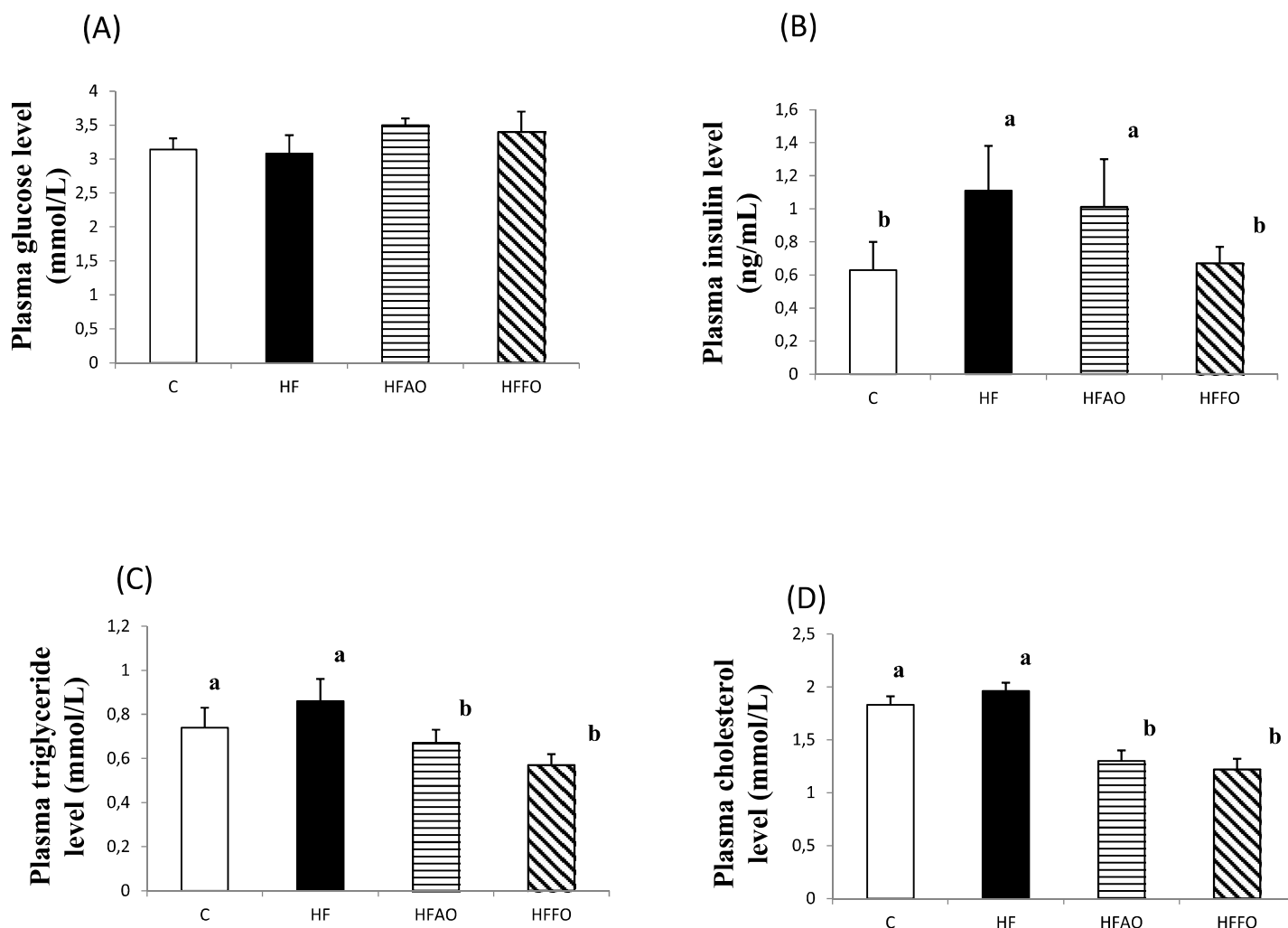


Fig. 1. Effects of supplementation with argan oil compared to that with fish oil on (A) glycaemia; (B) plasma insulin level; (C) blood triglyceride levels and (D) blood cholesterol level in rats fed a high fat diet for 8 weeks. Values are means with their standard deviations (n = 6), represented by vertical bars. ^{a, b} Mean values with different superscript letters are significantly different (p < 0.05).

□, control ; ■, high fat ; ▨, high fat supplemented with argan oil ; ▩, high fat supplemented with fish oil

Liver lipid levels

Measurements of the hepatic triglyceride and cholesterol (Fig. 2) levels revealed that HF intake significantly increases the hepatic lipid levels when compared with control group. The increased hepatic lipid level was prevented by fish oil intake but argan oil intake appears to have no significant effect on hepatic lipid metabolism.

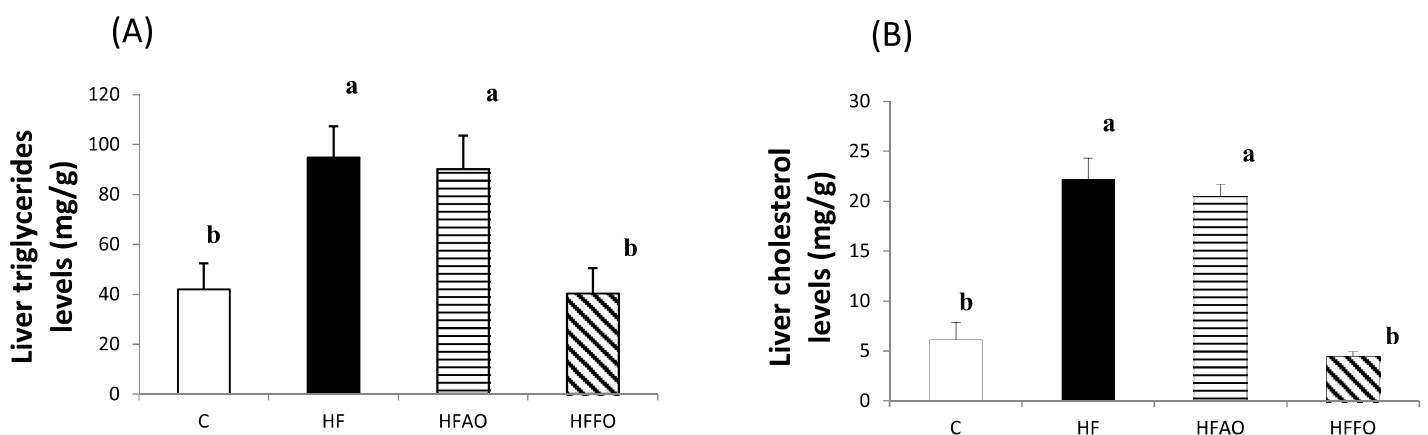


Fig. 2. Effects of supplementation with argan oil compared to that with fish oil supplementation on (A) liver triglyceride and (B) liver cholesterol levels in rats fed a high-fat diet for 8 weeks. Values are means with their standard deviations ($n = 6$), represented by vertical bars. ^{a, b} Mean values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

□, control diet; ■, high-fat diet; ▨, high-fat diet supplemented with argan oil; ▩, high-fat diet supplemented with fish oil.

Histology

As shown in Fig. 3 (A), haematoxylin and eosin staining of liver sections revealed normal liver structure in the C group. The HF group displayed marked steatosis with microvesicular fat accumulation. In the HFAO groups, histological sections of the liver showed an improvement in the high fat-induced steatosis with a liver structure similar to that in the control group. With regard to the adiposity, the histology observations (Fig. 3B) indicated that visceral adipocytes were greater in HF group when compared to control group. After an 8 weeks period of fish oil supplementation, visceral adipocytes in the HFFO group were significantly smaller than those in the HF group.

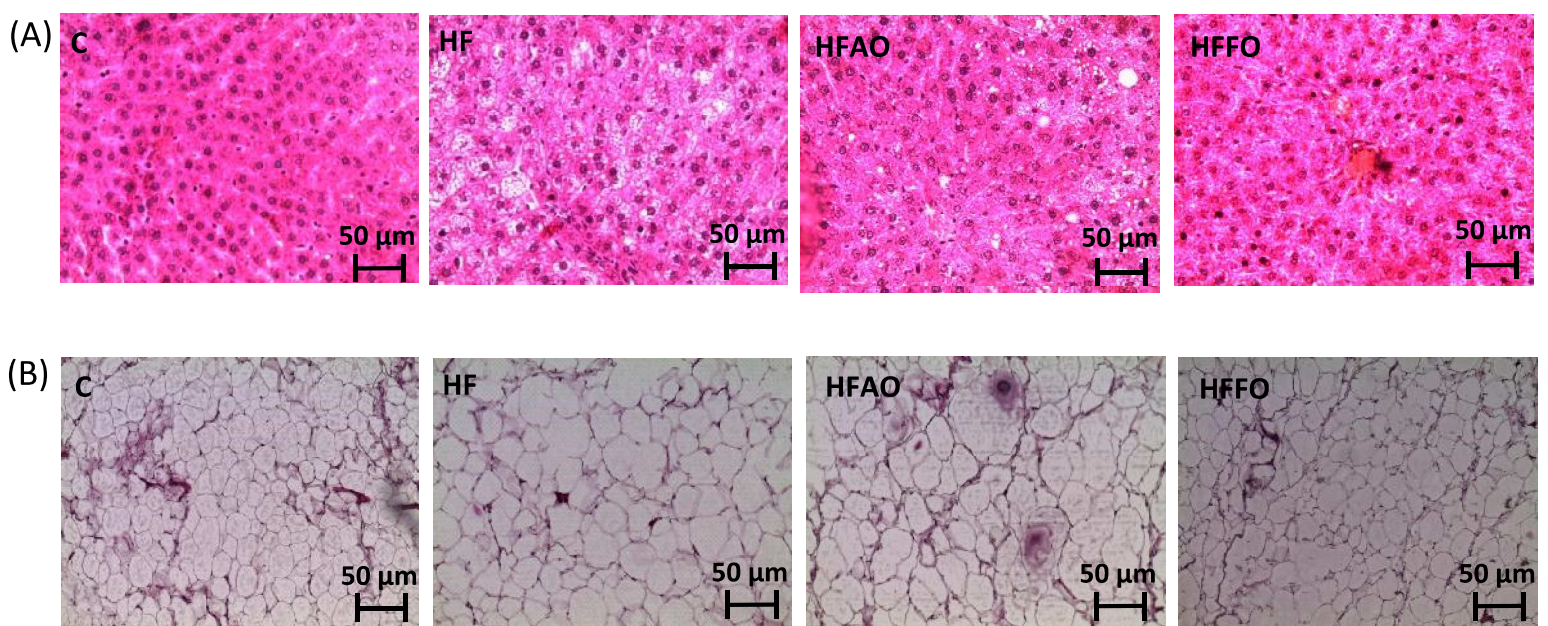


Fig. 3. Effect of supplementation with argan oil compared to that with fish oil on (A) hepato-steatosis and (B) adipocyte size of rats fed a high-fat diet for 8 weeks. Liver and adipose tissues were stained with haematoxylin and eosin. Original magnification x 400.

Fatty acid composition of the plasma total lipid and the hepatic phospholipids

Significant modifications in the total lipid composition of the plasma fatty acids and phospholipid composition of the hepatic fatty acids were observed depending on the diet. Rats fed the high-fat diet showed a higher SFA content in the plasma total lipids and liver phospholipids (Tables 4 and 5, respectively) compared to control rats. We analyzed the composition of the fatty acids in plasma total lipids, which reflect the fat consumed in the diet. The data of the composition of the fatty acids in plasma total lipids (Table 4) showed a significant increase of the oleic acid (18:1n-9) and the linoleic acid (18:2n-6) levels in HFAO group when compared to the others experimental groups. Oleic and linoleic acids are the mainly fatty acids in argan oil. Consequently, an increased of total MUFA and n-6 PUFA was observed in rats fed HFAO diet when compared to the others experimental diets. On the other hand, the fatty acid composition of the total plasma lipids in HFFO group showed an increased n-3 PUFA as compared with the others groups. The increased n-3 PUFA level concerns the EPA (20:5n-3), the mainly fatty acid in the fish oil used in this study. We have also analysed the composition of the fatty acids in the liver phospholipids to evaluate the incorporation of the fatty acids provided from the experimental diets in the membranes of the hepatocytes. The data (Table 5) showed a significant increase of the oleic acid (18:1n-9) and the linoleic acid (18:2n-6) levels in HFAO group when compared to the others experimental groups. In HFFO group, we observed a higher level of the n-3 PUFA in the liver phospholipids, specifically, the EPA and DHA level.

Table 4. Effect of supplementation with argan oil compared to that with fish oil on the fatty acid composition of plasma total lipids in rats fed a high fat diet for 8 weeks
(Means values with their standard deviations for n = 6)

Fatty acid	C		HF		HFAO		HFFO	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
14 :0	0.6 ^b	0.2	2.6 ^a	0.8	2.5 ^a	0.3	2.7 ^a	0.5
16 :0	16.3	4.1	17.2	5.0	14.4	0.6	15.5	1.7
18 :0	6.5 ^b	1.2	11.1 ^a	2.3	11.7 ^a	1.8	11.9 ^a	2.1
SFA	23.4 ^b	4.4	31.0 ^a	4.9	29.2 ^a	2.1	30.5 ^a	2.3
16 :1	1.7	0.8	0.8	0.1	0.5	0.1	0.9	0.2
18 :1n-9	17.9 ^a	7.4	14.3 ^b	7.6	17.1 ^a	5.3	6.3 ^c	0.9
18 :1n-7	0.1	0.0	-	-	0.2	0.05	-	-
22 :1	0.6 ^b	0.2	0.8 ^b	0.2	1.3 ^a	0.2	0.3 ^b	0.1
20 :1n-9	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.03	0.3	0.1
24 :1n-9	1.3	0.6	1.0	0.4	1.1	0.3	0.7	0.3
MUFA	20.5 ^a	4.5	18.1 ^b	3.7	21.0 ^a	3.1	9.1 ^c	1.2
18 :2n-6	7.6 ^b	1.2	8.9 ^b	2.5	12.2 ^a	1.2	7.8 ^b	0.8
20 :4n-6	18.2 ^a	2.7	19.6 ^a	3.7	18.1 ^b	2.0	12.4 ^b	2.1
n-6	26.2 ^b	3.1	28.7 ^b	3.0	30.9 ^a	2.1	21.2 ^c	2.5
18 :3n-3	0.4	0.1	0.3	0.1	0.2	0.05	0.3	0.1
20 :5n-3	0.2 ^b	0.0	0.2 ^b	0.1	0.1 ^b	0.02	8.8 ^a	1.7
22 :5n-3	0.4 ^b	0.1	0.5 ^b	0.1	0.4 ^b	0.1	2.1 ^a	0.3
22 :6n-3	2.2 ^b	0.8	2.8 ^b	0.9	1.85 ^b	0.1	5.2 ^a	0.7
n-3	2.8 ^b	0.9	3.4 ^b	1.0	2.7 ^b	0.2	15.9 ^a	1.1
n-6/n-3	10.1 ^a	2.2	8.8 ^a	1.3	10.0 ^a	0.2	1.5 ^c	0.2
MUFA/SFA	0.9 ^a	0.2	0.6 ^a	0.2	0.7 ^a	0.1	0.3 ^b	0.1

C, control diet; HF, high-fat diet; HFAO, high-fat diet supplemented with 5% (w/w) of argan oil; HFFO, high-fat diet supplemented with 5% (w/w) of fish oil; SFA, saturated fatty acids; MUFA, mono-unsaturated fatty acids

- , not detected.

^{a, b, c} Mean values with different superscript letters are significantly different (p < 0.05).

Table 5. Effect of supplementation with argan oil compared to that with fish oil on the fatty acid composition of liver phospholipids in rats fed a high-fat diet for 8 weeks (Mean values with their standard deviations for n = 6)

Fatty acid	C		HF		HFAO		HFFO	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
14 :0	0.4 ^b	0.02	3.1 ^a	1.0	3.6 ^a	0.3	2.2 ^a	0.3
16 :0	20.9	1.2	20.9	1.5	19.7	0.8	19.6	1.6
18 :0	14.6	0.1	17.1	2.7	15.4	0.5	17.0	2.4
SFA	35.9 ^b	1.2	41.3 ^a	0.8	39.1 ^a	1.0	37.5 ^{a,b}	1.5
16 :1	2.1 ^a	0.5	1.1 ^b	0.3	0.7 ^b	0.1	1.1 ^b	0.5
18 :1n-9	22.4 ^a	3.1	19.9 ^b	2.7	21.5 ^b	1.2	8.9 ^c	2.5
18 :1n-7	0.07	0.02	0.05	0.01	-	-	-	-
22-1	0.6 ^b	0.1	0.9 ^b	0.09	1.68 ^a	0.2	0.2 ^c	0.06
20 :1n-9	0.2	0.04	0.2	0.04	0.3	0.02	0.3	0.01
24 :1n-9	0.06	0.04	0.06	0.02	0.1	0.01	0.07	0.02
MUFA	25.4 ^a	3.2	22.3 ^a	3.1	25.1 ^a	1.8	11.0 ^b	0.7
18 :2n-6	9.4 ^b	0.6	10.0 ^b	0.3	15.6 ^a	0.8	7.6 ^c	0.3
20 :4n-6	18.3 ^a	1.7	15.3 ^b	2.8	15.1 ^b	0.6	10.1 ^c	0.5
n-6	28.1 ^b	2.1	25.5 ^b	2.9	31.2 ^a	1.0	17.3 ^c	0.9
18 :3n-3	0.3	0.04	0.3	0.07	0.3	0.02	0.4	0.06
20 :5n-3	0.1 ^b	0.03	0.1 ^b	0.01	0.1 ^b	0.01	6.1 ^a	0.8
22 :5n-3	0.3 ^b	0.06	0.4 ^b	0.07	0.5 ^b	0.1	6.7 ^a	0.8
22 :6n-3	4.7 ^b	0.6	4.8 ^b	0.6	3.0 ^b	0.1	14.1 ^a	1.2
n-3	5.2 ^b	0.7	5.5 ^b	0.6	4.1 ^b	0.5	28.5 ^a	1.0
n-6/n-3	5.4 ^b	0.6	4.6 ^b	0.3	7.5 ^a	0.3	0.6 ^c	0.1
MUFA/SFA	0.7 ^a	0.08	0.5 ^a	0.1	0.6 ^a	0.07	0.3 ^b	0.05

C, control diet; HF, high-fat diet; HFAO, high-fat diet supplemented with 5% (w/w) of argan oil; HFFO, high-fat diet supplemented with 5% (w/w) of fish oil; SFA, saturated fatty acids; MUFA, mono-unsaturated fatty acids.

^{a, b, c} Mean values with different superscript letters are significantly different (p < 0.05).

Oxidative status of the liver

The results concerning the oxidative stress in the liver are shown in Fig. 4. After 8 weeks, rats fed the HF diet displayed greater oxidative stress than the control rats. This oxidative stress was marked by a significant increase in the liver MDA level and a significant decrease in GPx activity. Argan oil intake significantly prevents the HF-induced oxidative status in liver by decreasing the MDA level and enhancing the GPx activity. However, fish oil intake showed a significant increase of the GPx activity, but no effect on the MDA level was observed.

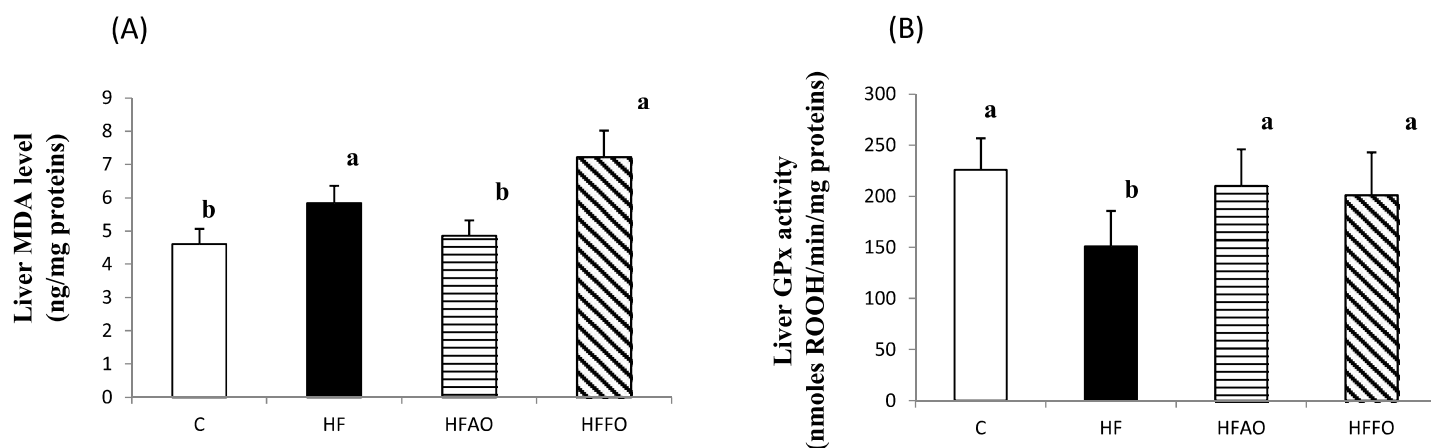


Fig. 4. Effects of supplementation with argan oil compared to that with fish oil on (A) the liver malondialdehyde (MDA) level and (B) the liver glutathione peroxidase (GPx) activity in rats fed a high-fat diet for 8 weeks. Values are means with their standard deviations (n =6), represented by vertical bars. ^{a, b} Mean values with different superscript letters are significantly different (p < 0.05).

□, control diet; ■, high-fat diet; ▨, high-fat diet supplemented with argan oil; ▩, high-fat diet supplemented with fish oil.

Platelet activity

Results obtained on ADP and collagen-induced platelet aggregation, are reported in Fig 5 (A). The data showed that significant platelet hyper-aggregation occurred in rats fed the HF diet compared to the controls. Argan oil intake significantly decreased platelet aggregation induced by ADP by about 33% and collagen-induced platelet aggregation was decreased by about 23% when compared to the HF group. Fish oil intake showed a similar effect on platelet aggregation as that observed in argan oil intake. The effects of the different experimental diets on platelet thromboxane B₂ (TxB₂) level are reported in Fig 5 (B). The data showed that rats fed the HF diet displayed significantly more platelet TxB₂ than control rats. Fish oil intake significantly prevents the increased platelet TxB₂ level but not argan oil intake. The effect of *O. aurita* and fish oil on platelet oxidative status was investigated and the results are shown in Fig 6. The data reveal greater oxidative stress in the platelets of rats fed the HF diet than in control rats. Argan oil intake significantly improved HF diet-induced oxidative stress in platelets by reducing significantly, the MDA level and enhancing GPx activity. However, fish oil supplementation increased significantly platelet GPx activity but also increased platelet lipid peroxidation by increasing platelet MDA level.

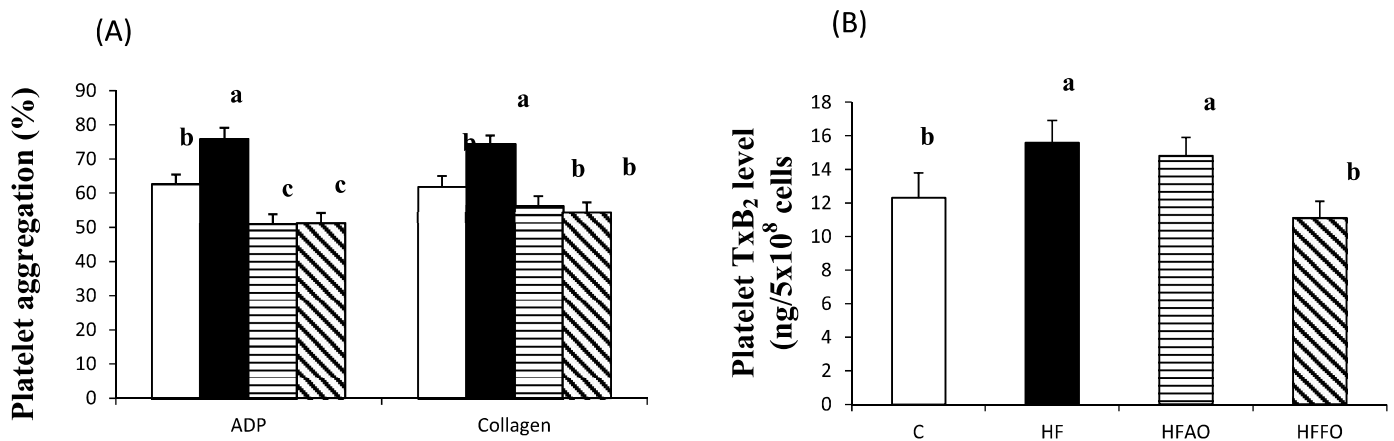


Fig. 5. Effects of supplementation with argan oil compared to that with fish oil on (A) platelet aggregation and (B) platelet thromboxane B₂ level in rats fed a high-fat diet for 8 weeks. Values are means with their standard deviations (n = 6), represented by vertical bars. ^{a, b, c} Mean values with different superscript letters are significantly different (p < 0.05).

Rat platelets were isolated as described in material and methods section and stimulated with adenosine-diphosphate (ADP) 5 μM or with collagen 5 μg/mL.

□, control; ■, high-fat; ▨, high-fat supplemented with argan oil; ▩, high-fat supplemented with fish oil.

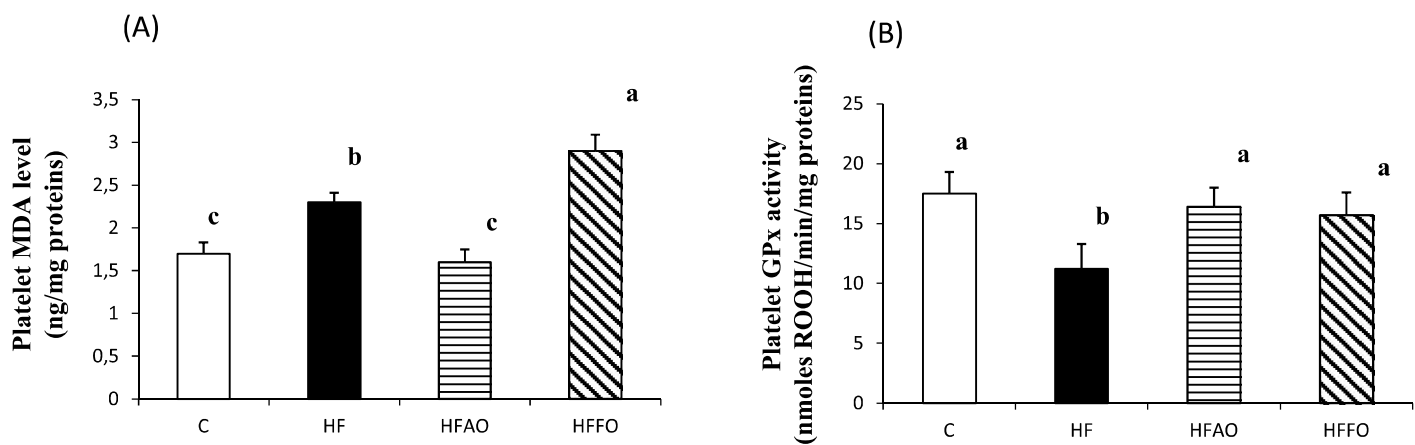


Fig. 6. Effects of supplementation with argan oil compared to that with fish oil supplementation on (A) platelet malondialdehyde (MDA) level and (B) platelet glutathione peroxidase (GPx) activity in rats fed a high fat diet for 8 weeks. Values are means with their standard deviations ($n = 6$), represented by vertical bars.

^{a, b, c} Mean values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

□, control diet; ■, high-fat diet; ▨, high-fat diet supplemented with argan oil; ▩, high-fat diet supplemented with fish oil

Discussion

Our study shows that the intake of either dietary fish oil or argan oil can improve certain features of the MS in the HF-fed rat, a well-known model of diet-induced MS risk factors. Our results with FO diet expand and complete previous studies concerning its beneficial action in the MS, notably by showing a reduction in adiposity, as discussed further below. Previous studies have also demonstrated the beneficial effects of argan oil on blood lipid parameters in animals and humans [31,37,39-41]. However, to our knowledge, this is the first demonstration that argan oil can prevent platelet hyper-activity and oxidative stress in both platelet and liver of HF-fed rats. It is well known that diets rich in saturated fats are associated with the onset of MS in rats and mice [46,47] as well as in humans [48-51]. MS is generally characterized by a combination of various metabolic disorders including dyslipidaemia, central obesity, insulin resistance, diabetes mellitus, hypertension and non-alcoholic fatty acid disease, [52]. Abdominal obesity is one of the key aetiological features of metabolic syndrome. One of the mechanisms related to abdominal obesity and metabolic syndrome is the increase in the free fatty acids released from visceral fat cells. These free fatty acids enter the blood stream; then they are directed into the liver, where they interfere with glucose and lipid metabolism leading to insulin resistance and hyperlipidaemia [53]. In our study, rats fed the HF diet (40% fat, essentially saturated fats) for 8 weeks developed several metabolic syndrome risk factors such as central obesity, insulin resistance and non-alcoholic fatty acid diseases, but not dyslipidaemia. We consider that these results indicate that our rat model fed the HF diet developed metabolic syndrome. We found that replacing 5% of the fat content of the HF diet by fish oil prevented many features of metabolic syndrome risk factors in HF-fed rats. Firstly, fish oil treatment prevented the gain in body and adipose tissue weights induced in this dietary model. This is consistent with the data reported by Raclot *et al.* [54], but differs

from other studies that either failed to observe this [55] or simply did not study adiposity evaluation [56,57]. In HFFO animals, final body weight and adipose tissue weight were reduced as compared with that of HFones. Previous studies have already reported that supplementing the diet with marine n-3 PUFA extracted from fish oil has beneficial effects on parameters involved in MS [58]. Buckley and Howe [59] showed that a dietary intake of marine n-3 PUFA from fish oil can lower body weight in obese animals, and may reduce fat accumulation by the body, particularly that of visceral fat in animals fed a high-fat diet. Weight loss is known to result in a decrease in circulating inflammatory markers [60], such as adipokines, and n-3 PUFAs from marine sources have been shown to have anti-inflammatory properties [61-63].

It has been established that high-fat diet consumption has the serious consequence of increasing blood lipids. However, we did not observe any difference in blood lipids between the HF and C groups. Walrand *et al.* [64] showed that short-chain saturated fatty acids (with less than 12 carbon atoms) appear to be neutral with regard to blood levels of LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides. After being ingested, these saturated fatty acids can be used immediately for beta-oxidation to supply energy, and therefore have no real direct impact on lipid metabolism [65,66]. The high-fat diet we used in this study contained 40% of lipids, including 33 % of hydrogenated coconut oil, which is known to be rich in short-chain saturated fatty acids. This could explain the blood lipid profile obtained in the HF group. However, our high-fat diet did effectively trigger high-fat induced metabolic syndrome risk factors, insofar as we observed insulin resistance and non-alcoholic fatty acid disease in the rats on the high-fat diet. Our data showed that replacing 5% of the fat content of the HF diet by fish oil significantly decreased insulin and lipid levels in plasma. In the liver, fish oil markedly reduced triglyceride and cholesterol levels, and prevented hepatic steatosis by

reducing lipid accumulation in rats fed the HFOA diet. N-3 PUFAs from marine sources are already known to be involved in managing MS risk factors by reducing lipid levels in the blood and liver, and by enhancing insulin sensitivity. Accumulating evidence shows that fish oil supplementation reduces lipidaemia and prevents hepatic steatosis by lowering lipid metabolism in the liver [67]. At least 4 nuclear receptors are affected by EPA and DHA, and which may be involved in regulating lipid metabolism [68-70]. These include the liver X receptor (LXR), hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF-4 α), the farnesol X receptor (FXR), and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). The composition of the fatty acids in the liver phospholipids showed that fish oil intake is associated with enrichment in n-3 PUFA, essentially in EPA, the mainly fatty acid in the fish oil used in our study. The DHA level was also higher in liver phospholipids of HFFO fed-rats as compared with the others groups. The increased DHA level could be due to conversion of the EPA provided from fish oil into DHA, or provided directly from the fish oil intake. However, DHA is most susceptible to peroxidation because of its high degree of unsaturation [71-75]. When the n-3 PUFA are ingested, the unsaturation of membrane fatty acids is increased as a result of the n-3 PUFA incorporation. There may be an increased need for antioxidants (i.e. α -tocopherol) to prevent oxidative stress [76-78]. Indeed, this corroborate with our findings concerning the liver and the platelet lipid peroxidation. We found firstly that HF-diet increases oxidative status in liver and platelet. Thus, fish oil intake showed no effect on MDA level in both tissues, but enhanced GPx activity.

Platelets play a central role in the onset of thrombosis, which is one of the complications of MS. As a result, inhibitors of platelet aggregation are becoming very important in the prevention and treatment of many atherothrombotic disorders [79]. Our results showed that HF-diet intake increased platelet activity as compared with standard diet intake. Thus, the platelet TxB₂ level, the stable form of the thromboxane A₂ (TxA₂), and the platelet oxidative

status were higher in HF group when compared with the control one. Fish oil intake showed a preventive effect against the HF diet-induced platelet hyperactivity and TxA₂ synthesis, and it also enhanced platelet antioxidant enzyme activity. Recent studies have demonstrated that the dietary intake of marine n-3 PUFAs can reduce the risk of coronary heart disease as a result of their anti-atherogenic, anti-inflammatory and anti-thrombotic effects [80]. Platelet aggregation is an early event in the onset of thrombosis and is initiated by TxA₂, a potent aggregation agent and vasoconstrictor [81]. Evidence from dietary intervention studies has shown that the consumption of marine n-3 PUFAs reduces the production of TxA₂ [82-84], increases bleeding time [85,86] and decreases platelet aggregation *in vitro* [87]. EPA and DHA both reduce platelet aggregation in hypertensive subjects [88], diabetic subjects [89,90], and in healthy controls both *in vitro* and *ex vivo* [91-93]. In the animal model, n-3 PUFAs from marine sources suppressed TxA₂ formation in a dose-dependent manner [94].

Results with argan oil-fed animals were different from those of fish oil-fed ones. Firstly, unlike fish oil treatment, argan oil supplementation did not affect adiposity and plasma insulin level as compared with the HF group. Similarly, argan oil effects on lipid metabolism were quite different from those of fish oil, with only improvements in plasma lipid level without any effect on liver lipid level or steatosis unlike fish oil intake. Nevertheless, argan oil animals demonstrated a marked improvement in oxidative status in liver and platelets. Unlike fish oil, argan oil feeding decreased lipid peroxidation in both liver and platelets. On the other hand, argan oil decreased platelet aggregation similarly as shown with fish oil, but the anti-aggregation mechanism of both oils seems to be different because fish oil decreased TxA₂ synthesis but not argan oil.

Several factors may explain the different responses of HF-fed animals to the 2 oils used in this study. Whereas the beneficial effects of fish oil can be mostly related to its n-3 PUFA content, it is less clear whether the effects of argan oil can be linked to its fatty acid content. As clearly

shown in Table 2, the argan oil diet did not have a fatty acid composition that differed greatly from HF diet, with the notable exception of oleic and linoleic acids. Indeed, the effect of these abundant acids on CVD risk factors such as dyslipidemia, platelet aggregation, insulin resistance or hypertension is rather controversial [95,96]. In addition, linoleic acid is mainly thought to be deleterious in the context of CVD [97-99], whereas a combination of oleic and linoleic acids (main unsaturated fatty acids of argan oil) has been shown to reduce endothelial function in healthy animals [100]. On the other hand, the preventive effects of argan oil could be attributed to the antioxidant properties of its tocopherols and polyphenols [101,102] because a reduction of oxidative stress is known to improve platelet activity [103]. Indeed, the polyphenols extracted from argan oil have been shown *in vitro* to inhibit low-density lipoprotein oxidation and to stimulate the reverse transport of cholesterol [104]. In addition, there is convincing evidence for a beneficial effect of dietary argan oil on altered blood lipids [105]. It is, in fact, these positive considerations that prompted us to study the biological activity of argan oil in the context of obesity-induced MS. Indeed, given the involvement of dyslipidemia, platelet activity and oxidative stress in the pathogenesis of the MS and diabetes [105-107], these amelioration by argan oil may thus also play a role in the preventive effects observed herein.

Conclusion

Our study clearly demonstrates that diets containing fish oil or argan oil can each prevent a distinct number of the deleterious effects of feeding an HF diet. More specifically, consuming fish oil prevents the development of adiposity, restores insulin sensitivity, decreases plasma and liver lipid, and also prevents prothrombotic effect. Intake of argan oil as food supplement, in contrast, has more modest effects in HF diet rats; notably, it does not affect adiposity or liver lipid level but improves plasma lipid, oxidative status and platelet activity. Fish oil and, to a lower degree, argan oil thus represent promising nutritional tools against to MS and

associated co-morbidities. So, It would be interesting to understand mechanisms involved in their distinct beneficial actions

References

1. Sarti C, Gallagher J (2006) The metabolic syndrome prevalence, CHD risk, and treatment. *J diabetes complicat* **20**, 121-132
2. Marsland AL, McCaffery JM, Muldoon MF *et al.* Systemic inflammation and the metabolic syndrome among middle-aged community volunteers. *Metabolism: clinical and experimental* **59**, 1801-1808.
3. Selig PM (2006) Metabolic syndrome in the acute care setting. *AACN Clin Issues* **17**, 79-85.
4. Borst SE, Conover CF (2005) High-fat diet induces increased tissue expression of TNF-alpha. *Life Sci* **77**, 2156-2165.
5. Dobrian AD, Davies MJ, Schriver SD *et al.* (2001) Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertension* **37**, 554-560.
- 6- Trost S, Pratley R, Sobel B (2006) Impaired fibrinolysis and risk for cardiovascular disease in the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* **6**, 47-54.
7. Serebruany VL, Malinin A, Ong S *et al.* (2008) Patients with metabolic syndrome exhibit higher platelet activity than those with conventional risk factors for vascular disease. *J Thromb Thrombolysis* **25**, 207-213.
8. Anfossi G, Russo I, Massucco P, *et al.* (2004) Impaired synthesis and action of antiaggregating cyclic nucleotides in platelets from obese subjects: possible role in platelet hyperactivation in obesity. *Eur J Clin Invest* **34**, 482-9.
9. Arteaga RB, Chirinos JA, Soriano AO, *et al.* (2006) Endothelial microparticles and platelet and leukocyte activation in patients with the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* **98**, 70-74.
10. Lindemann S, Kramer B, Daub K *et al.* (2007) Molecular pathways used by platelets to initiate and accelerate atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* **18**, 566-573.
11. Totani L, Evangelista V (2010) Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 2357-2361.

12. Liapikos TA, Antonopoulou S, Karabina SP *et al.* (1994) Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated. *Biochim Biophys Acta* **1212**, 353-360.
13. Patrizia F, Stefania B, Angela F *et al.* (2004) Oxidant Stress and Platelet Activation in Hypercholesterolemia. *Antioxid Redox Signaling* **6**, 747-756.
14. Shahidi F, Miraliakbari H. (2004) Omega-3 (n-3) fatty acids in health and disease: cardiovascular disease and cancer. *J Med Food* **7**, 387-401.
15. Zhao G, Etherton TD, Martin KR *et al.* (2004) Dietary alpha-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. *J Nutr* **134**, 2991-2997.
16. Trautwein EA, Rieckhoff D, Kunath-Rau A *et al.* (1999) Replacing saturated fat with PUFA-rich (sunflower oil) or MUFA-rich (rapeseed, olive and high-oleic sunflower oil) fats resulted in comparable hypocholesterolemic effects in cholesterol-fed hamsters. *Ann Nutr Metab* **43**, 159-172.
17. Mensink RP, Katan MB (1992) Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb* **12**, 911-919.
18. Charnock JS, Sundram K, Abeywardena MY *et al.* (1991) Dietary fats and oils in cardiac arrhythmia in rats. *Am J Clin Nutr* **53**, 1047S-1049S.
19. Summers LK, Fielding BA, Bradshaw HA *et al.* (2002) Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity. *Diabetologia* **45**, 369-377.
20. Laaksonen DE, Lakka TA, Lakka HM *et al.* (2002) Serum fatty acid composition predicts development of impaired fasting glycaemia and diabetes in middle-aged men. *Diabetic Med* **19**, 456-64.
21. He K, Song Y, Daviglius ML *et al.* (2004) Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Circulation* **109**, 2705-2711.
22. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE *et al.* (1999) Dietary intake of alpha-linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women. *Am J Clin Nutr* **69**, 890-897.
23. Calder PC (2006) Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **75**, 197-202.

24. Storlien LH, Kriketos AD, Calvert GD *et al.* (1997) Fatty acids, triglycerides and syndromes of insulin resistance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **57**, 379-385.
25. Krishna Mohan I, Das UN (2001) Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by polyunsaturated fatty acids. *Nutrition* **17**, 126-51.
26. Panagiotakos DB, Pitsavos CH, Chrysohoou C *et al.* (2004) Impact of lifestyle habits on the prevalence of the metabolic syndrome among Greek adults from the ATTICA study. *Am Heart J* **147**, 106-112.
27. Tortosa A, Bes-Rastrollo M, Sanchez-Villegas A *et al.* (2007) Mediterranean diet is Inversely associated with the incidence of metabolic syndrome: the SUN prospective cohort. *Diabetes Care* **30**, 2957-2959.
28. Herrera MD, Perez-Guerrero C, Marhuenda E *et al.* (2001) Effects of dietary oleic-rich oils (virgin olive and high – oleic-acid sunflower) on vascular reactivity in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr* **86**, 349-357.
29. Khallouki F, Younos C, Soulimani R *et al.* (2003) Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherol squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *Eur J Cancer Prev* **12**, 67-75.
30. Rojas LB, Quideau S, Pardon P *et al.* (2005) Colorimetric evaluation of phenolic content and GC-MS characterization of phenolic composition of alimentary and cosmetic argan oil and press cake. *J Agric Food Chem* **53**, 9122-9127.
31. Drissi A, Girona J, Cherki M *et al.* (2004) Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). *Clin Nutr* **23**, 1159-1166.
32. Derouiche A, Cherki M, Drissi A *et al.* (2005) Nutritional intervention study with argan oil in man: effects on lipids and apolipoproteins. *Ann Nutr Metab* **49**, 196-201.
33. Samane S, Noel J, Charrouf Z *et al.* (2006) Insulin- sensitizing and anti-proliferative effects of *Argania spinosa* seed extracts. *ECAM* **3**, 317-327.
34. Haimeur A, Messaouir H, Ulmann L *et al.* (2013) Argan oil prevents prothrombotic complications by lowering lipid levels and platelet aggregation, enhancing oxidative status in dyslipidemic patients from the area of Rabat (Morocco). *Lipids Health Dis* **12**:107.

35. Mekhfi H, Belmekki F, Ziyat A *et al.* (2012) Antithrombotic activity of argan oil: An in vivo experimental study. *Nutrition* **28**, 937-941.
36. Tremblay F, Lavigne C, Jacques H *et al.* (2003) Dietary cod protein restores insulin-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and GLUT4 translocation to the T-tubules in skeletal muscle of high-fat-fed obese rats. *Diabetes* **52**, 29-37.
37. Haimeur A, Ulmann L, Mimouni V *et al.* (2012) The role of *Odontella aurita*, a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats. *Lipids Health Dis* **11**:47.
38. Saad A Noeman, Hala E Hamooda and Amal A Baalash (2011) Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. *Diabetol metab syndr* **3**:17
39. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.
40. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917.
41. Slover HT, Lanza E (1979) Quantitative analysis of food fatty acids by capillary gas chromatography. *J Am Oil Chem Soc* **56**, 933-943.
42. Born GVR (1962) Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* **194**, 927-929.
43. Ohkawa H, Ohishi N, Yagik K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **95**, 351-358.
44. Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* **70**, 158-169.
45. Chaudière J, Gerard D (1988) Dosage de l'activité glutathion-peroxydase. *In Biologie des Lipides chez l'Homme*. pp. 275-289 [L Douste-Blazy, F Mendy, editors]. Paris: Médicales Internationales.
46. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding method. *Anal Biochem* **72**, 248-254.


47. Berrougui H, Alvarez de Sotomayor M, Perez-Guerrero C *et al.* (2004) Argan (*Argania spinosa*) oil lowers blood pressure and improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr* **92**, 921-929.
48. Berrada Y, Settaf A, Baddouri K *et al.* (2000) Experimental evidence of an antihypertensive and hypocholesterolemic effect of oil of argan, *Argania sideroxylon*. *Therapie* **55**, 375-378.
49. Lottenberg AM, Afonso MDS, Lavrador MSF *et al.* (2012) The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* **23**, 1027-1040.
50. Oliart Ros RM, Torres-Márquez ME, Badillo A *et al.* (2001) Dietary fatty acids effects on sucrose-induced cardiovascular syndrome in rats. *J Nutr Biochem* **12**, 207-212.
51. Matsumori R, Miazaki T, Shimada K *et al.* (2013) High level of very long-chain saturated fatty acid in erythrocytes correlates with atherogenic lipoprotein profiles in subjects with metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pr* **99**, 12-18.
52. Jans A, Van Hees AMJ, Gjelstad IMF *et al.* (2012) Impact of dietary fat quantity and quality on skeletal muscle fatty acid metabolism in subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism* **61**, 1554-1565.
53. Richard C, Royer MM, Couture P *et al.* (2013) Effect of the Mediterranean diet on plasma adipokine concentrations in men with metabolic syndrome. *Metabolism* **62**, 1803-1810.
54. Erkkilä A, De Mallo VDF, Risérus U *et al.* (2008) Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach. *Prog Lip Res* **47**, 172-187.
55. Fulop T, Tessier D, Carpentier A (2006) The metabolic syndrome. *Pathol Biol* **54**, 375-386.
56. Abate N (2000) Obesity and cardiovascular disease pathogenetic role of the metabolic syndrome and therapeutic implications. *J Diabetes Complications* **14**, 154-174.
57. Raclot T, Groscolas R, Langin D *et al.* (1997) Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. *J Lipid Res* **38**, 1963-1972.
58. Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ *et al.* (1991) Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* **40**, 280-289.

59. Kikugawa K, Yasuhara Y, Ando K *et al.* (2003) Protective effect of supplementation of fish oil with high n-3 polyunsaturated fatty acids against oxidative stress-induced DNA damage of rat liver in vivo. *J Agric Food Chem* **51**, 6073-6079.
60. Djoussé L, Akinkuolie AO, WU JHY *et al.* (2012) Fish consumption, omega-3 fatty acids and risk of heart failure: A meta-analysis. *Clin Nutr* **31**, 846-853.
61. Buckley JD, Howe RP (2009) Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Obs Rev* **10**, 648-659.
62. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity induced inflammation. *Science* **259**, 87-91.
63. Yates CM, Calder PC, Rainger GE (2014) Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacol Therapeutic* **141**, 272-282.
64. Titos E, Clària J. (2013) Omega-3-derived mediators counteract obesity-induced adipose tissue inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **107**, 77-84.
65. Munro IA, Garg ML (2013) Dietary supplementation with long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and weight loss in obese adults. *Obes Res Clin Pr* **7**, 173-181.
66. Walrand S, Fish F, Bourre JM (2010) Tous les acides gras saturés ont-ils le même effet métabolique ?. *Nutr Clin Metabol* **24**, 63-75.
67. Dubois V, Breton S, Linder M *et al.* (2007) Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur J Lipid Sci Technol* **109**, 710-732.
68. Grundy SM, Denke MA (1990) Dietary influence on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res* **31**, 1149-1172.
69. Adkins Y, Kelley DS (2010) Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem* **21**, 781-792.
70. Meher A, Joshi A, Joshi S (2014) Differential regulation of hepatic transcription factors in the wistar rat offspring born or dams fed folic acid, vitamin B₁₂ deficient diets and supplemented with omega-3 fatty acids. *Plos One* **9(2)**: e90209. doi:10.1371/journal.pone.0090209.

71. Schmidt S, Willers J, Stahl F *et al.* (2013) Regulation of lipid metabolism-related gene expression in whole blood cells of normo- and dyslipidemic men after fish oil supplementation. *Lipids Health Dis* **11**:172.
72. Gillies PJ, Bhatia SK, Belcher LA *et al.* (2012) Regulation of inflammatory and lipid metabolism genes by eicosapentaenoic acid-rich oil. *J Lipid Res* **53**, 1679-1689.
73. Sugihara N, Tsuruta Y, Date Y *et al.* (1994) High peroxidative susceptibility of fish oil polyunsaturated fatty acid in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **126**, 124-128.
74. Palozza P, Sgarlata E, Luberto C *et al.* (1996) N-3 fatty acids induce oxidative modifications in human erythrocytes depending on dose and duration of dietary supplementation. *Am J Clin Nutr* **64**, 297-304.
75. Allard JP, Kurian R, Aghdassi E *et al.* (1997) Lipid peroxidation during n-3 fatty acid and vitamin E supplementation in humans. *Lipids* **32**, 535-541.
76. Mouri K, Ikesu H, Esaka T *et al.* (1984) The influence of marine oil intake upon levels of lipids, alpha-tocopherol and lipid peroxidation in serum and liver of rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **30**, 307-318.
77. Meydani M, Natiello F, Goldin B *et al.* (1991) Effect of long-term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women. *J Nutr* **121**, 484-491.
78. Saito M, Nakatsugawa K. Increased susceptibility of liver to lipid peroxidation after ingestion of a high fish oil diet. *Int J Vitam Nutr Res* **64**, 144-151.
79. Jackson SP (2007) The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* **109**, 5087-5095.
80. Goodnight SH, Harris WS, Connor WE (1981) The effects of dietary omega-3 fatty acids on platelet composition and function in man: a prospective, controlled study. *Blood* **58**, 880-885.
81. Milionis HJ, Elisaf MS, Mikhailidis DP (1999) Platelet function and lipid-lowering interventions. *Platelets* **10**, 357-367.
82. Akiba S, Murata T, Kitatani K *et al.* (2000) Involvement of lipoxygenase pathway in docosapentaenoic acid-induced inhibition of platelet aggregation. *Biol Pharmacol Bulletin* **23**, 1293-1297.

83. Archer SI, Green D, Chamberlain M *et al.* (1998) Association of dietary fish and n-3 fatty acids intake with hemostatic factors in the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 1119-1123.
84. Von Schacky C, Fischer S, Weber PC (1985) Long-term effects of dietary marine omega-3 fatty acids upon plasma and cellular lipids, platelet function, and eicosanoid formation in humans. *J Clin Inv* **76**, 1626-1631.
85. Knapp HR, Reilly IA, Alessandrini P *et al.* (1986) In vivo indexes of platelet and vascular function during fish-oil administration in patients with atherosclerosis. *The New England J Med* **314**, 937-942.
86. Véricel E, Calzada C, Chapuy P *et al.* (1999) The influence of n-3 fatty acids on platelets in elderly people. *Atherosclerosis* **147**, 187-192.
87. Axelrod L, Camuso J, Williams E *et al.* (1994) Effects of a small quantity of omega-3 fatty acids on cardiovascular risk factors in NIDDM. A randomized, prospective, double-blind, controlled study. *Diabetes Care* **17**, 37-44.
88. Mori TA, Beilin LJ, Burke V *et al.* (1997) Interactions between dietary fat, fish, and fish oils and their effects on platelet function in men at risk of cardiovascular disease. *Arterioscler, Thromb Vasc Biol* **17**, 279-286.
89. Axelrod L, Camuso J, Williams E *et al.* (1994) Effects of a small quantity of omega-3 fatty acids on cardiovascular risk factors in NIDDM. A randomized, prospective, double-blind, controlled study. *Diabetes Care* **17**, 37-44.
90. Tamura Y, Hirai A, Terano T *et al.* (1987) Anti-thrombotic and anti-atherogenic action of eicosapentaenoic acid. *Japanese Circ Journal* **51**, 471-477.
91. Wensing AG, Mensink RP, Hornstra G (1999) Effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids from plant and marine origin on platelet aggregation in healthy elderly subjects. *Br J Nutr* **82**, 183-191.
92. Prisco D, Filippini M, Francalanci I *et al.* (1995) Effect of n-3 fatty acid ethyl ester supplementation on fatty acid composition of the single platelet phospholipids and on platelet functions. *Metabolism* **44**, 562-569.
93. Gaudette DC, Holub BJ (1990) Albumin-bound docosahexaenoic acid and collagen-induced human platelet reactivity. *Lipids* **25**, 166-169.

94. Das UN (1995) Essential fatty acid metabolism in patients with essential hypertension diabetes mellitus and coronary heart diseases. *Prostaglandins Leukot and Essent Fatty Acids* **52**, 387-391.
95. Davda J, Labhasetwar V(2001) An update on angiogenesis therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **11**, 1-21.
96. Hennig B, Meerarani P, Ramadass P *et al.* (2000) Fatty acid-mediated activation of vascular endothelial cells. *Metabolism* **49**, 1006-1013.
97. Dichtl W, Ares MP, Jonson AN *et al.* (2002) Linoleic acid stimulated vascular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells depends on nuclear factor-kappaB activation. *Metabolism* **51**, 327-333.
98. Christon R, Marette A, Badeau M *et al.* Fatty acid-induced changes in vascular reactivity in healthy adult rats. *Metabolism* **54**, 1600-1609.
99. Cherki M, Derouiche A, Drissi A *et al.* (2005) Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: intervention study in healthy men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **15**, 352-360.
100. Berrougui H, Cloutier M, Isabelle M *et al.* (2006) Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa L.*) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* **184**, 389-396.
101. Cherki M, Berrougui H, Drissi A *et al.* (2006) Argan oil: which benefits on cardiovascular diseases? *Pharmacol Res* **54**, 1-5.
102. Paolisso G, D'Amore A, Giugliano D *et al.* (1993) Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr* **57**, 650-656.
103. Smith Jr SC (2007) Multiple risk factors for cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Am J Med* **120**, 3-11.
104. Rader DJ (2007) Effect of insulin resistance, dyslipidemia, and intraabdominal adiposity on the development of cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Am J Med* **120**, 12-18.



Argan oil prevents prothrombotic complications by lowering lipid levels and platelet aggregation, enhancing oxidative status in dyslipidemic patients from the area of Rabat (Morocco)

Etude clinique sur l'effet hypolipémiant et antiagrégant de l'huile d'argan chez des patients dyslipidémiques Marocains

Introduction :

Les patients dyslipidémiques présentent un risque accru de développer une athérosclérose dont les complications cliniques posent de graves problèmes de santé. Par ailleurs, il est actuellement bien admis que les acides gras monoinsaturés et polyinsaturés réduisent certains facteurs de développement de l'athérosclérose, notamment le taux de lipides athérogènes et l'activité des plaquettes sanguines. L'huile d'argan extraite du fruit de l'arganier est bien connue pour ses propriétés pharmacologiques. L'objectif de cette étude est donc d'étudier l'influence de l'huile d'argan sur le profil lipidique et sur l'agrégation des plaquettes sanguines et leur état rédox chez des patients dyslipidémiques.

Trente neuf patients dyslipidémiques de sexe et d'âges différents ont été recrutés au cours de cette étude. Les critères retenus chez ces patients étaient la présence d'une hypercholestérolémie et/ou d'une hypertriglycémie. Les 39 patients recrutés ont suivi tout d'abord une phase de stabilisation, pendant laquelle les patients ne consomment ni de l'huile d'olive ni de l'huile d'argan pendant 2 semaines. Après les deux semaines de stabilisation, les patients ont été séparés en deux groupes, le premier groupe, (témoin, 18 patients) consomme 20 g/jour de beurre lors du petit déjeuner pendant 3 semaines ; dans le deuxième groupe, (huile d'argan, 21 patients) le beurre a été remplacé par 25 mL d'huile d'argan extra vierge sur la même période. Le bilan lipidique, ainsi que la fonction plaquettaire sanguine et leur état rédox ont été évalués avant et après la phase d'intervention chez les deux groupes. Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent une amélioration significative des lipides athérogènes chez les patients du groupe huile d'argan après les 3 semaines de traitement. Cette amélioration est marquée par une baisse des taux de cholestérol total et de LDL-cholestérol sériques de 23,8 % et 25,6 %, respectivement, avec une augmentation des HDL-cholestérol de 26 %, comparativement aux valeurs obtenues avant la phase de traitement. Par ailleurs, une diminution de l'agrégation plaquettaire d'environ 25 %, est observée ainsi qu'un rétablissement du stress oxydatif au niveau des plaquettes chez les patients du groupe huile d'argan par rapport au groupe témoin.

Ces activités hypolipémiante, antiagrégante et antioxydante de l'huile d'argan peuvent être attribuées aux acides gras polyinsaturés et aux différents composés, comme les polyphénols, présents dans cette huile. Au regard de ces résultats, l'huile d'argan peut être recommandée dans la prise en charge diététique des patients dyslipidémiques afin de prévenir le développement de complications prothrombotiques chez ces patients à risque.

RESEARCH

Open Access

Argan oil prevents prothrombotic complications by lowering lipid levels and platelet aggregation, enhancing oxidative status in dyslipidemic patients from the area of Rabat (Morocco)

Adil Haimeur^{1,2}, Hafida Messaouri², Lionel Ulmann¹, Virginie Mimouni¹, Azelarab Masrar³, Abdelmjid Chraïbi⁴, Gérard Tremblin¹ and Nadia Meskini^{2*}

Abstract

Background: It is now established that patients with hyperlipidemia have a high risk of atherosclerosis and thrombotic complications, which are two important events responsible for the onset and progression of cardiovascular disease. In the context of managing dyslipidemia by means of dietary advice based on the consumption of argan oil, we wanted to investigate the effect of virgin argan oil on plasma lipids, and for the first time, on the platelet hyperactivation and oxidative status associated with dyslipidemia. This study concerns patients recruited in the area of Rabat in Morocco.

Methods: 39 dyslipidemic (79% women) patients were recruited for our study in the area of Rabat in Morocco. They were randomly assigned to the two following groups: the argan group, in which the subjects consumed 25 mL/day of argan oil at breakfast for 3 weeks, and the control group in which argan oil was replaced by butter.

Results: After a 3-week consumption period, blood total cholesterol was significantly lower in the argan oil group, as was LDL cholesterol (23.8% and 25.6% lower, respectively). However, the HDL cholesterol level had increased by 26% at the end of the intervention period compared to baseline. Interestingly, in the argan oil group thrombin-induced platelet aggregation was lower, and oxidative status was enhanced as a result of lower platelet MDA and higher GPx activity, respectively.

Conclusions: In conclusion, our results, even if it is not representative of the Moroccan population, show that argan oil can prevent the prothrombotic complications associated with dyslipidemia, which are a major risk factor for cardiovascular disease.

Keywords: Platelet aggregation, Argan oil, Dyslipidemia, Oxidative stress

Background

Cardiovascular disease (CVD) is the main cause of increasing mortality worldwide. In 2008, heart disease accounted for 23% of deaths in Morocco [1]. Dyslipidemia, the main risk factor for CVD, is a heterogeneous metabolic disorder involving multiple etiologies; it is commonly characterized by increased triglycerides, low-

density lipoprotein (LDL) cholesterol and apolipoprotein B (apo-B) levels, and reduced plasma high-density lipoprotein (HDL) cholesterol [2]. These components of dyslipidemia confer an increased risk for atherosclerosis and thrombosis, which are two important events responsible for the onset and progression of CVD [3]. It is now established that patients with hyperlipidemia have a high risk of atherosclerosis and thrombotic complications [4-6]. Several mechanisms have been suggested by which alterations in plasma lipid levels may promote atherosclerosis [7-9]. One major determinant of the prothrombotic state associated with hypercholesterolemia appears to be related

* Correspondence: nadia_meskini@hotmail.com

²Université Hassan II, Equipe Nutrition, Environnement, Santé. Laboratoire de Virologie, Microbiologie, Qualité/Écotoxicologie et Biodiversité, Faculté des Sciences et Techniques, Mohammedia, Morocco

Full list of author information is available at the end of the article

to enhanced platelet activation. Indeed, platelets are known to play a fundamental role in atherogenesis and in the pathology of atherothrombotic disorders [10]. *In-vivo* platelet activation has been reported in type-IIa hypercholesterolemic patients [11], suggesting that high levels of oxidized LDL, via changes in the composition of platelet membrane phospholipids and cholesterol, may increase the platelet reactivity associated with enhanced thromboxane A₂ (TxA₂) biosynthesis. The involvement of blood platelet activation in the onset of atherosclerosis is well established. It has long been recognized that platelets are involved in the late thrombotic complications of atherosclerosis plaque due to erosion of the endothelium or rupture of the fibrous cap that covers the lipid core within the plaque [12]. The association of platelet activation with acute CVD justifies anti-platelet therapy as a standard treatment for those at high risk of atherothrombosis.

Several epidemiological, clinical, and experimental studies have established that diet can have beneficial effects on the cardiovascular system, and can therefore be considered to provide an effective therapeutic tool for preventing several CVD risk factors, such as dyslipidemia, platelet hyper-reactivity, and diabetes [13,14]. As far as ingested lipids are concerned, the influence of their quality and quantity has often been demonstrated in human and animal models [15]. Haimeur et al. [16] showed that a high fat diet consumption increased the incidence of CVD in rats, by increasing blood lipids level, platelet aggregation and hepatic oxidative stress, however these risk factors of CVD were lower in rats fed with a high fat diet supplemented with a freeze-dried of *Odontella aurita*, a marine diatom rich in omega-3 (eicosapentaenoic acid) and antioxidants molecules.

Argan oil is a natural vegetable oil that has been widely used in both the daily diet and folk medicine in Morocco. It is extracted from the kernels of *Argania spinosa*, an endemic tree growing in the south-western region of Morocco. The main traditional use of this edible oil is for nutritional purposes by consuming it directly on toast, generally during breakfast [17]. This oil is rich in unsaturated fatty acids (80%) principally oleic and linoleic acids (44.8% and 33.7%, respectively) [18]. Interestingly, the unsaponifiable fraction of argan oil (1% of the oil constituents) contains mainly antioxidant compounds, such as tocopherols, especially γ -tocopherol, which are present in higher portions than in olive oil (637 mg/kg versus 258 mg/kg of total tocopherols, respectively) (Table 1) [18]. As could be expected from its interesting composition, argan oil has demonstrated its pharmacological effects in several studies. Initially demonstrated in rats [19-22], the hypocholesterolemic potency of argan oil in humans has also been demonstrated by a cohort study of 60 healthy men [23]. Numerous nutritional studies have also shown that argan oil lowers LDL

Table 1 Chemical composition of argan oil [18]

Fatty acids	(%)
C 16:0	13.4
C 18:0	5.1
C 18:1	44.8
C 18:2	35.7
C 18:3	0.1
Sterols mg/100 g oil	
Schottenol	142
Spinasterol	115
Stigmasta-8,22-dien-3-ol	9
Others	29
Tocopherols mg/Kg oil	
α -tocopherol	35
δ -tocopherol	122
γ -tocopherol	480
Phenols μg/Kg oil	
Vanillic acid	67
Syringic acid	37
Ferulic acid	3147
Tyrosol	12

cholesterol and has antioxidant properties; these properties have been demonstrated in a cohort study involving 96 people [24]. Here, the subjects who consumed argan oil on a regular basis presented with significantly lower levels of plasma LDL cholesterol and lipoprotein A Lp (a), and lower levels of plasma lipoperoxides (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) [24]. Argan oil also increases HDL cholesterol and lowers triglyceride levels in men [25], and therefore regular argan oil consumption could potentially prevent diabetes [26]. Furthermore, when rats were fed for 4 weeks with 10 mL/kg/day of argan oil, the thrombin-induced aggregation of isolated platelets was significantly inhibited (36%), however, the tail bleeding time remained unchanged [27]. Recently, Mekhfi et al. [28] have reported that argan oil has antithrombotic activity in rats, which could be related to its antiplatelet rather than its anticoagulant activity.

Argan oil has already been reported to be a hypo-lipidemic factor in both human and animal models without producing any adverse effects [20,24]. However, the anti-aggregant effect of argan oil has so far only been described *in-vitro* in rats [27]. Thus the originality of the study reported here, is investigating the protective effect of argan oil against platelet disorders, such as hyperactivity and oxidative stress in dyslipidemic patients. According to the low sampling of patient recruited in the area of the city of Rabat, our exploratory study is not significant of the moroccan population.

Methods

Patients

This study was conducted on dyslipidemic patients attending the Endocrinology Department of the Ibn Sina University Hospital, Rabat, Morocco. The inclusion criteria was patients with hypercholesterolemia or/and hypertriglyceridemia. The exclusion criteria included myocardial infarction, the presence of hepatic or renal disease, the use of anti-aggregant drugs (aspirin, thienopyridines) or of lipid-lowering drugs (statins), unusual diet (low or high fat or carbohydrate diets), or taking hormone therapy during the previous 6 months. The protocol and objectives of this study were explained to the participants in detail. Before the recruitment, patients give their consent orally. The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of the Endocrinology, Diabetology, and Nutrition Department, Ibn Sina University Hospital, Rabat, Morocco. Among the 78 patients who consulted, a total of 39 dyslipidemic patients were selected on the basis of the inclusion criteria. All the patients included underwent a thorough physical examination in the Service at 3 consultations during the study.

Study design

This study was conducted according to the protocol described by Derouiche et al. [25]. The study design consisted of two diet periods. The first diet period (stabilization period) lasted 2 weeks during which all the patients consumed 20 g/day of butter on toasted bread for breakfast, and both argan oil and olive oil were eliminated from their diet. This stabilization period was intended to ensure that all the patients had a similar fat intake and stable dyslipidemia parameters before starting the study. In the second diet period (nutritional intervention), which lasted 3 weeks, the patients were randomly assigned to one of two groups: the first group (18 patients) received the 20 g/day butter diet (control group: C); the second group (21 patients) received 25 mL/day of virgin argan oil instead of the butter with the toasted bread for breakfast (argan oil group: AO). The daily eating habits of all the patients were investigated by means of a comprehensive food questionnaire covering all foods commonly consumed in Morocco. During the nutritional intervention period, all patients followed a lifestyle and diet recommended by the guidelines for the management of dyslipidemia [29]. The argan oil supplied to the patients was all purchased from the same source, and was extracted by an industrial process [30].

Blood collection

During the study, the patients provided 3 blood samples. The first was collected intravenously in vacuum tubes after they had fasted for 12 h, and was used to confirm their dyslipidemia by serum lipid analysis. At the end of the stabilization period, the second sample was collected

intravenously into two tubes: the first was a vacuum tube containing EDTA, and this blood was used for serum lipid analysis, and the other was a tube containing citric phosphate dextrose (CPD) anticoagulant (citric acid: 15.6 mM; sodium citrate: 89.4 mM, monosodium phosphate: 16.1 mM and dextrose: 128.7 mM) in a ratio of 1/7 v/v CPD/blood, and this was used for platelet analysis (platelet aggregation test, basal TxB₂ determination and platelet oxidative status). The third blood sample was similar to the second and was collected at the end of the nutritional intervention.

Anthropometric and serum lipid parameters

Demographic and anthropometric parameters (age, sex, weight, body mass index (BMI), blood pressure) were recorded for the patients at baseline. Serum total cholesterol (TC) and HDL-cholesterol levels were determined using commercial enzymatic kits (Randox cholesterol enzymatic kit and Randox HDL cholesterol precipitant for cholesterol and HDL-cholesterol, respectively, Crumlin, Co. Antrim, UK) according to Richmond's colorimetric procedure [31]. Serum triglyceride levels were determined using a commercial kit (Randox, Triglyceride Enzymatic Kit, Crumlin, Co. Antrim, UK) according to Trinder's colorimetric method [32]. The LDL-cholesterol level was calculated by Friedewald's formula [33]. LDL cholesterol (g/L) = total cholesterol (g/L) – HDL cholesterol (g/L) – triglycerides/5 (g/L).

Platelet aggregation

Platelets were isolated as previously described by Lagarde et al. [34]. Briefly, blood was centrifuged at 200 x g for 15 min at 20°C to obtain platelet-rich plasma (PRP). PRP was then acidified to pH 6.4 with 0.15 M citric acid, and immediately centrifuged at 900 x g for 10 min at 20°C. Platelet pellets were resuspended in Tyrode/HEPES buffer solution (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 11.9 mM NaHCO₃, 0.41 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 5.0 mM HEPES, pH 7.35). Platelet concentration was adjusted to 300 000 /μL before aggregation assay. The isolated platelets were then used to determine platelet aggregation by turbidimetry [35] using a PACKS 4 aggregometer (HEL-ENA, TX, USA). Aggregation tests were performed at 37°C in cuvettes stirred at 1000 rpm. Isolated platelets were stimulated by exposure to thrombin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) 0.2 U/mL. The light transmission was recorded for 3 min after platelet stimulation. The platelet aggregation was quantified from the maximum change in light transmission through a washed platelet suspension, expressed as a percentage of the light transmission through the blank (Tyrode buffer).

Platelet MDA measurement

Platelet lipid peroxidation was evaluated by measuring the malondialdehyde (MDA) level according to the method

described by Ohkawa [36]. To 500 μ L of platelet solution were added 100 μ L of 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 750 μ L of acetic acid 20% at pH 3.5, 750 μ L of thio-barbituric acid (TBA) 0.8%, and distilled water to make up the volume to 2.5 mL. The tubes were maintained in a water bath at 95°C for 60 min. The tubes were then immediately cooled in ice. 500 μ L of distilled water and 2.5 mL of a solution of *n*-butanol and pyridine (15:1 v/v) were then added to each tube. The tubes were shaken vigorously before being centrifuged at 1000 x g for 10 min. The organic phase, corresponding to the upper layer, was aspirated and its color intensity measured at 532 nm. A standard range was prepared using a 1,3,3,3- tetra-methoxypropane (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) solution.

Platelet glutathione peroxidase activity

The glutathione peroxidase (GPx) activity was determined in isolated platelets according to the Paglia and Valentine method [37], as modified by Chaudière and Gérard [38]. Briefly, 100 μ L of platelet lysate was added to a final volume of 1.5 mL of a solution containing Tris-HCl/EDTA (50 mM/0.1 mM) pH 7.6, NADPH, H⁺ (0.14 mM), reduced glutathione (GSH) (2 mM) and 0.7 U/mL of GSSG-reductase. The mixture was incubated at 37°C for 3 min. The reaction was started by adding 50 μ L tertiary butyl hydroperoxide (*t*-BH) (0.2 mM). The change in absorbance was recorded at 340 nm for 5 min at 5 s intervals. An appropriate control without the platelet sample was run simultaneously. GPx activity was expressed in nmoles of hydroperoxide reduced per min and per mg protein.

Thromboxane B₂ measurement

To determine the platelet thromboxane B₂ (TxB₂) level, isolated platelets were subjected to three successive freeze/thaw cycles to release the cell contents. The baseline TxB₂ level was measured by enzyme immunoassay (EIA) Kit (Enzo-Life Sciences, Exeter, U.K) according to the Manufacturer's instructions.

Assay of proteins

Platelet total proteins were determined by the Bradford colorimetric method [39] using Biorad reagent and bovine serum albumin as standard (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Statistical analysis

All values were expressed as the mean \pm SD. After analysis of variance, the mean values were compared using Fisher's least significant difference test (Statgraphics Plus 5.1, Manugistics Inc., Rockville, MD, USA). $P < 0.05$ was accepted for significant differences.

Results

Baseline anthropometric parameters

The baseline characteristics of the patients, including their sex and age as well as the risk factors associated with atherosclerosis diseases, are presented in Table 2. At the beginning of the intervention period, the data showed that both groups displayed abnormal blood lipid markers characterized by hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. According to the International Diabetes Federation (IDF) definition [40], all of the patients exhibited at least two components of metabolic syndrome (MS). In addition to hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia, the most frequent component of the MS in our patients was central obesity.

Serum lipid parameters

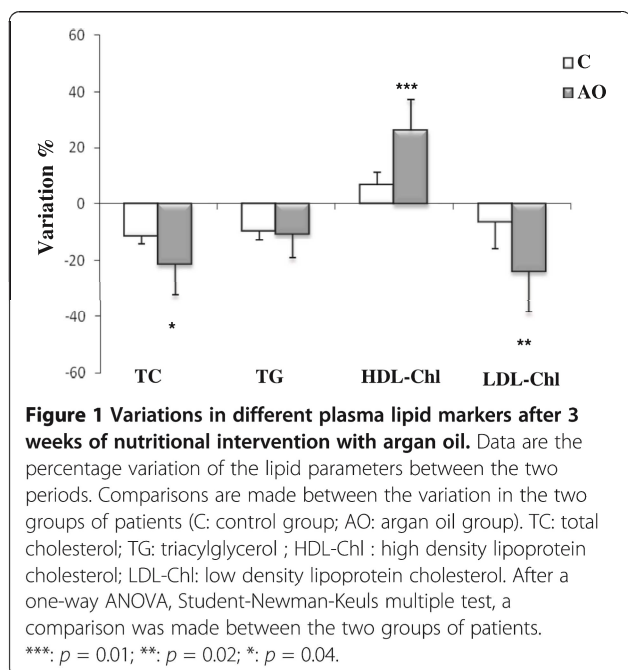
After the three weeks of the nutritional intervention period, a significant improvement in atherogenic lipid parameters was found in the AO group patients as compared to the values found before the nutritional intervention period (Figure 1). The data showed significantly ($p = 0.04$) lower total cholesterol and LDL-cholesterol levels ($p = 0.02$) and significantly ($p = 0.01$) higher HDL-cholesterol levels in the group consuming argan oil than in the control group of patients (23.8% versus 13.5%, 25.6% versus 10.4%, and 26% versus 6.6%, respectively). However, there was no difference in triglyceride levels between the two groups after the three weeks of the intervention period.

Platelet aggregation and TxB₂ production

Platelet hyperactivity is associated with an increase risk of adverse cardiovascular outcomes. We evaluated the platelet function of patients by studying the platelet response to aggregation agonist stimulation. The thrombin-induced aggregation example is shown in the Figure 2. The results obtained after the three weeks of the nutritional intervention period showed that the percentage thrombin-induced platelet aggregation was significantly ($p = 0.03$) lower in

Table 2 Baseline anthropometrical and biological characteristics of the study groups

Characteristic	Control group	Argan oil group
Sex (W/M)	14/4	17/4
Age (years)	51 \pm 9	55 \pm 8
Weight (Kg)	74.9 \pm 13.0	72.3 \pm 9.4
SBP (mmHg)	11.9 \pm 1.3	12.4 \pm 0.9
DBP (mmHg)	6.7 \pm 0.9	6.9 \pm 0.7
BMI (Kg/m ²)	29.6 \pm 5.0	29.7 \pm 4.9
TC (g/L)	2.53 \pm 0.3	2.41 \pm 0.4
TG (g/L)	1.62 \pm 0.1	1.73 \pm 0.2
HDL-chl (g/L)	0.45 \pm 0.07	0.50 \pm 0.05
LDL-chl (g/L)	1.13 \pm 0.2	1.35 \pm 0.3



the AO group than in the control group (44.5% versus 62.6%) at the end of the intervention period (Figure 3).

On another hand, the baseline concentration of TxB_2 , the stable catabolite of TxA_2 , tended to be lower in the AO group than in the control group after the three weeks of the intervention period, but this difference was not statistically significant ($p = 0.1$) (Figure 4).

Platelet oxidative status

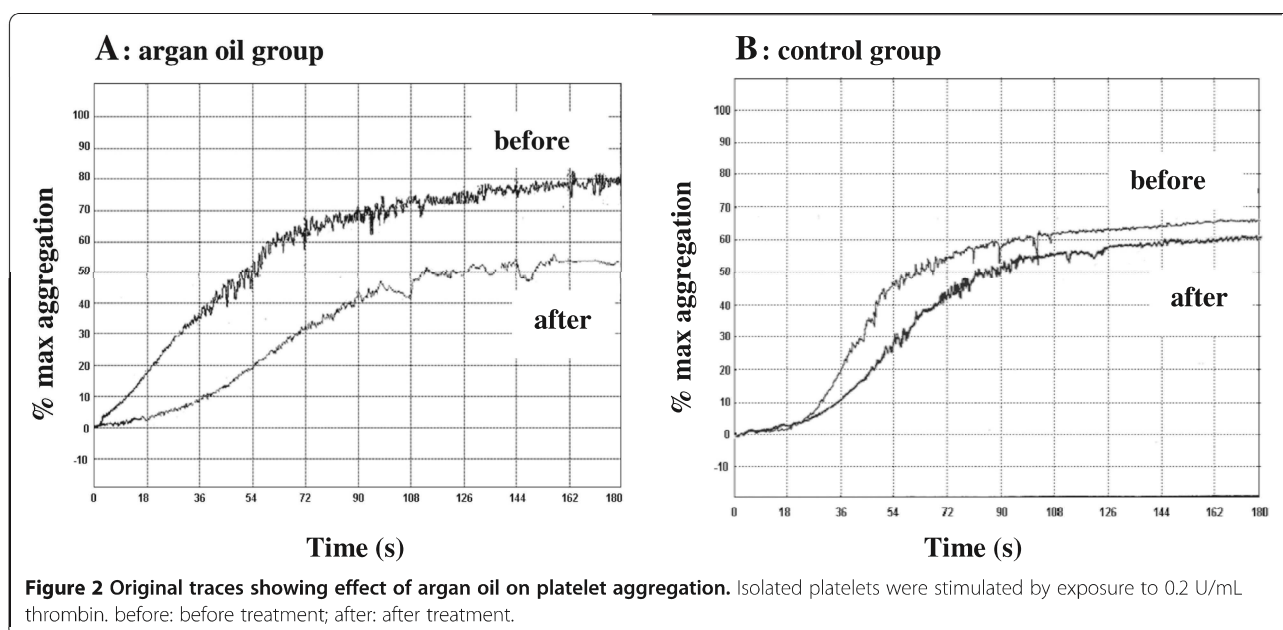
The results for the platelet oxidative status are shown in Figures 5 and 6. After the three weeks of the intervention

period, the data showed that platelet lipid peroxidation levels were lower in patients consuming argan oil, with an MDA level about 34% lower ($p = 0.02$) than in the control group at the end of the intervention period (Figure 5). This result was correlated with the activity of platelet GPx, the main enzyme catalyzing the reduction of lipid hydroperoxides to the corresponding alcohols (Figure 6). Interestingly, at the end of the intervention period, the platelet GPx activity in the AO group increased by 22% ($p = 0.02$) when compared to the control group.

Discussion

Hypercholesterolemia and platelet hyperactivity are associated with an increased risk of adverse cardiovascular outcomes (coronary artery disease, hypertension). Argan oil is rich in unsaturated fatty acids, and also contains a non-glyceride fraction characterized by the presence of sterols and antioxidant components, which gives it interesting biological and pharmacological properties. The present investigation was undertaken to assess the potential platelet anti-aggregant and antioxidant effects of argan oil on dyslipidemic patients. This clinical study involved evaluating the effects of argan oil after a three-week period during which consuming argan oil on toasted bread for breakfast was compared with consuming butter on toasted bread.

Interestingly, our results showed that argan oil appeared to be effective in preventing hypercholesterolemia in dyslipidemic patients. They show that after three weeks of argan oil consumption, circulating total cholesterol and LDL-cholesterol lowered by about 24% and 25%, respectively, compared to the values obtained before the nutrition intervention period. In addition, patients who consumed



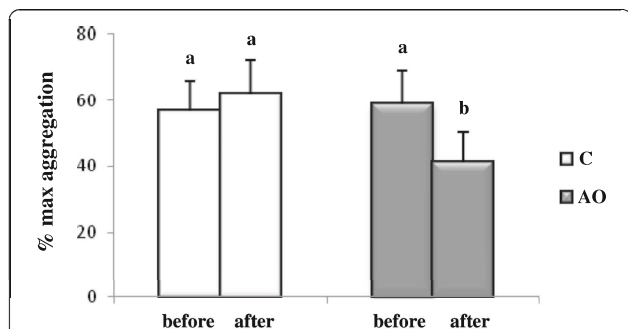


Figure 3 Platelet aggregation after 3 weeks of nutritional intervention with argan oil. Washed platelets were stimulated with thrombin (0.2 U/ml). Comparisons are made between the % platelet aggregation before and after the intervention period in the two groups. C: control group; AO: argan oil group. After a one-way ANOVA, Student-Newman-Keuls multiple comparison test, results are arranged in increasing order from left to right $a > b$ ($p < 0.05$).

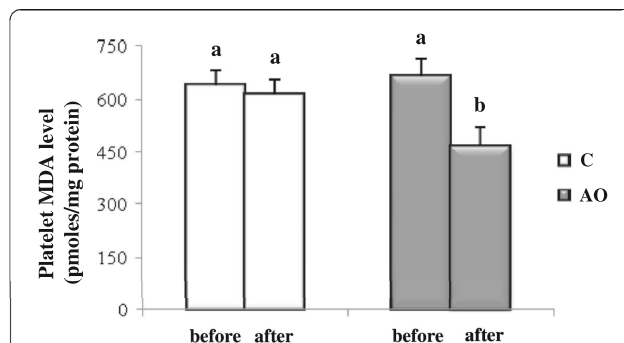


Figure 5 Platelet malondialdehyde (MDA) level after 3 weeks of nutritional intervention with argan oil. Comparisons are made between the platelet MDA level before and after the intervention period in the two groups. C: control group; AO: argan oil group. After a one-way ANOVA, Student-Newman-Keuls multiple comparison test, results are arranged in increasing order from left to right $a > b$ ($p < 0.05$).

argan oil had a higher plasma HDL-cholesterol levels than control patients. However, argan oil had no effect on circulating triglyceride levels after three weeks of intervention, whereas Derouiche et al. [25] reported that plasma triglyceride levels decreased significantly by 17.5% in healthy people consuming about 28 mL/day of argan oil over a 3-week period. Indeed, a lipid-lowering effect of argan oil has been reported in several other studies involving either animals or healthy male subjects [41-43], but our results demonstrate for the first time the hypocholesterolemic effect of argan oil on dyslipidemic patients. There is now abundant evidence that diets high in unsaturated fatty acids have a hypocholesterolemic effect when substituted for diets high in saturated fatty acids [44,45]. This has been showed by the beneficial effects of the “Mediterranean diet”, which is attributed, besides the effects of fibers, complex carbohydrates, vegetable proteins

etc, to its high content of olive oil, which is an important source of monounsaturated fatty acids (MUFAs) (73% of oleic acid), whereas sunflower oil has a high content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (61.6% of linoleic acid) [46]. However, argan oil is also characterized by containing balanced proportions of MUFAs and PUFAs (44.8% oleic acid and 33.7% linoleic acid) [18]. Linoleic acid (C18: 2n - 6) is an essential fatty acid, and is a precursor in the biosynthesis of arachidonic acid (C20: 4n - 6). Arachidonic-derived fatty acids, particularly γ -linolenic acid, are known to reduce the total cholesterol, VLDL, and LDL-cholesterol levels in human and rat serum [47,48]. In addition to unsaturated fatty acids, other minor components of argan oil, such as plant sterols, may also be implicated in the hypocholesterolemic effect of this oil. Phytosterols differ from cholesterol by having ethyl or

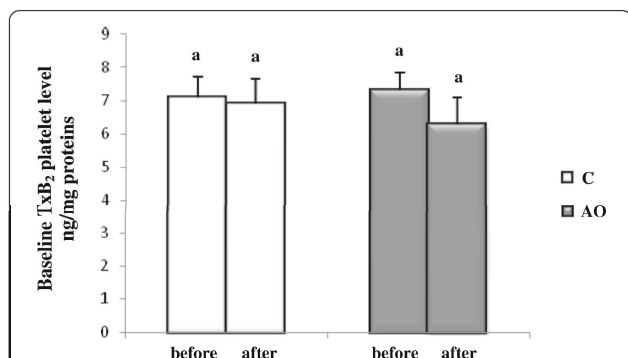


Figure 4 Platelet thromboxane B₂ (TxB₂) level after 3 weeks of nutritional intervention with argan oil. Comparisons are made between the platelet TxB₂ level before and after the intervention period in the two groups. C: control group; AO: argan oil group. After a one-way ANOVA, Student-Newman-Keuls multiple comparison test, results are arranged in increasing order from left to right $a > b$ ($p < 0.05$).

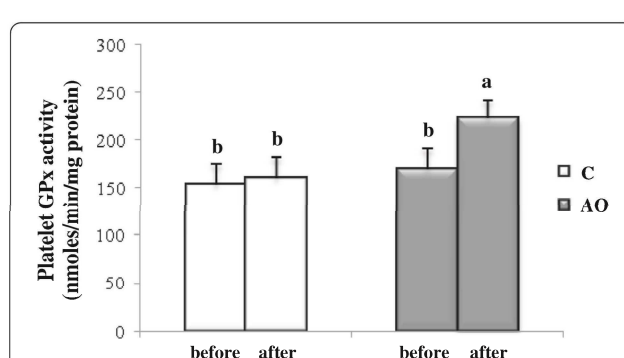


Figure 6 Platelet glutathione peroxidase (GPx) activity after 3 weeks of nutritional intervention with argan oil. Comparisons are made between the platelet GPx activity before and after the intervention period in the two groups. C: control group; AO: argan oil group. After a one-way ANOVA, Student-Newman-Keuls multiple comparison test, results are arranged in increasing order from left to right $a > b$ ($p < 0.05$).

methyl groups at carbon-24 and/or a double bond at carbon-22. These features increase their hydrophobicity and reduce their absorption [49]. Phytosterols compete with endogenous cholesterol for space within bile salt micelles in the intestinal lumen, thereby reducing cholesterol absorption [50,51]. A recent, randomized, placebo-controlled, crossover trial reported that incorporating softgel capsules containing esterified plant sterols/stanols 1.8 g/day into the National Cholesterol Education Program (NCEP) Therapeutic Lifestyle Changes diet, produced favorable changes in atherogenic lipoprotein and cholesterol levels in subjects with hypercholesterolemia [52]. These results corroborate those found in several studies conducted with argan oil [25,41-43]. Furthermore, the cholesterol-lowering effect of argan oil observed in our study could be related to a synergistic effect of unsaturated fatty acids and sterols, the main constituents of this oil.

Accumulating evidence indicates that oxidative stress plays a significant role in the onset of atherosclerosis [53], and that platelet activation is an important contributing factor in the process of atherosclerosis and its thrombotic complications. In this study, we investigated the effect of argan oil on platelet aggregation, TxB_2 release, and platelet oxidative status in dyslipidemic patients. Our results showed that argan oil produced an anti-aggregant effect after it had been consumed for three weeks instead of butter at breakfast. This anti-aggregant effect was demonstrated by a 29% decrease in thrombin-induced aggregation and a tendency towards lower baseline TxB_2 levels in the AO group than in controls. *In-vitro*, an inhibition of thrombin- or epinephrine-induced aggregation by up to 50% was obtained in isolated rats platelets with a dose of 0.5% of argan oil [27]. At least two mechanisms are probably involved by which the fatty acids regulate platelet function: modulation of the pool of precursor fatty acids and their competitors, with subsequent effects on eicosanoid metabolism, and changes in cell membrane fluidity, resulting in changes in the activity and/or efficiency of platelet agonist receptors [54,55]. The chemical composition of argan oil is dominated by unsaturated fatty acids (80%), principally oleic and linoleic acids. These unsaturated fatty acids are known to be precursors of pro-thrombotic and pro-inflammatory eicosanoids; so the anti-aggregant effect observed could be related to the unsaponifiable fraction of argan oil (1% of the oil constituents), which is richer in tocopherols than olive oil. It also contains other important compounds, such as phenols, principally ferulic and syringic acids, which have already been reported to be anti-aggregants [56]. However, several studies have related the anti-aggregant effect of linoleic acid to the synthesis of prostaglandins E1 (PGE_1) and prostacyclins I₂ (PGI_2), which share the same receptor in platelet membranes and inhibit platelet aggregation by increasing cyclic AMP (cAMP) through the activation of

receptor-linked adenylate cyclase [57,58]. Furthermore, most oxidant-induced alterations are influenced by the nature of the cellular redox status. It is known that the increased lipid peroxidation observed in some redox-sensitive pathological states (such as dyslipidemia and diabetes) [59] is closely associated with impairment of the antioxidant defenses against peroxides, i.e. decreased activity of GPx [60], the main enzyme that catalyzes the reduction of lipid hydroperoxides to the corresponding alcohols. The results obtained on the platelet oxidative status showed an antioxidant effect of argan oil after three weeks of intervention. This antioxidant effect was manifested by lower platelet MDA levels and higher platelet GPx activity in patients who had consumed argan oil for three weeks compared to control patients who had not. In spite of the high antioxidant content of argan oil, little is known about its mechanism of action. *In-vitro* investigations of the antioxidant effect of argan oil have reported that incubating LDL with tocopherols, sterols, and phenolic extracts of argan oil significantly prolonged the lag-phase of LDL peroxidation [61]. Also, phenolic extracts have been shown to lower the rate of lipid peroxidation, and reduce the disappearance of vitamin E in a concentration-dependent manner [61]. Other *ex-vivo* studies have investigated whether the consumption of argan oil could improve antioxidant status in healthy male subjects [23]. Indeed, polyphenols, tocopherols, and sterols could all act as powerful antioxidants via several mechanisms: scavenging of peroxy radicals that break the peroxidation chain reaction; chelating free Cu^{2+} to form redox-inactive complexes, thus reducing metal-catalyzed oxidation; and inhibiting the binding of Cu^{2+} to apolipoproteins and subsequently preventing the modification of the amino acid apo-B protein residue [62].

In conclusion, our study shows that argan oil intake for a period of three weeks reduces the risk factors for prothrombotic complications by decreasing plasma cholesterol levels and preventing the platelet hyperactivity and oxidative stress associated with dyslipidemia. Despite the limitations of our study due to the difficulty of collecting sufficient blood to perform all the platelet analysis, these new data are of considerable relevance to the management of dyslipidemia, which is a major risk factor for CVD. Finally, argan oil could be part of the dietary advice provided in the context of the nutritional management of atherosclerotic CVD.

Abbreviations

CVD: Cardiovascular disease; LDL: Low-density lipoprotein; HDL: High-density lipoprotein; apo-B: Apolipoprotein B; TxA_2 : Thromboxane A₂; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; CPD: Citric phosphate dextrose; BMI: Body mass index; PRP: Platelet-rich plasma; MDA: Malondialdehyde; GPx: Glutathione peroxidase; IDF: International Diabetes Federation; MS: Metabolic syndrome; SFA: Saturated fatty acids; MUFAs: Monounsaturated fatty acids; PUFAs: Polyunsaturated fatty acids;

NCEP: National Cholesterol Education Program; PGE₁: Prostaglandins E1; PGI₂: Prostacyclins I₂.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AH drafted the manuscript and was involved in study design and performed statistical and data analysis. HM carried out sample collection and storage and participated in sample preparation and analysis. LU participated in results discussion and manuscript preparation. VM participated in results discussion and manuscript preparation. AM contributed to the platelet results discussion. AC participated in the coordination of patients recruitment. GT participated in the manuscript preparation. NM participated in the planning and organization of the study, in the experimental work and manuscript preparation. All the authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The research is supported by an "accord programme PHC-Volubilis n° MA/21/61 with joint financial support from the French Foreign Affairs Ministry and the Moroccan Ministry of Research and Higher Education. The authors gratefully thank Zakaria Ouissafane for providing the argan oil used in this study. We would also like to thank the doctors and the nursing staff at the Endocrinology, Diabetology and Nutrition Department of the Ibn Sina University Hospital, Rabat, Morocco for their assistance in carrying out physical examinations and collecting blood. Our grateful thanks also to the technical staff of the Hemostasis Laboratory at the Ibn Sina University Hospital, Rabat, Morocco for their warm reception. The authors would also like to thank M. Ghosh for reviewing the English text.

Author details

¹IUT Département Génie Biologique, Université du Maine, PRES L'UNAM, EA 2160 MMS (Mer, Molécules, Santé), Faculté des Sciences et Techniques, Le Mans, Laval, France. ²Université Hassan II, Equipe Nutrition, Environnement, Santé. Laboratoire de Virologie, Microbiologie, Qualité/Écotoxicologie et Biodiversité, Faculté des Sciences et Techniques, Mohammedia, Morocco. ³Centre Hospitalier Universitaire Ibn Sina, Service d'Endocrinologie Diabétologie et Nutrition, Rabat, Morocco. ⁴Centre Hospitalier Universitaire Ibn Sina, Laboratoire d'Hémostase, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat, Morocco.

Received: 15 May 2013 Accepted: 4 July 2013

Published: 20 July 2013

References

- Anonymous: *Santé en chiffres 2011*. Maroc: Ministère de la santé; 2012:5–180.
- Grundy SM: **Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor**. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, **92**:399–404.
- Jacobson TA, Miller M, Schaefer EJ: **Hypertriglyceridemia and cardiovascular risk reduction**. *Clin Ther* 2007, **29**:763–777.
- Lacoste L, Lam JYT, Hang J, Letchacovski G, Solymoss CB, Waters D: **Hyperlipidemia and coronary disease**. *Circulation* 1995, **92**:3172–3177.
- McNeal C, Wilson DP: **Metabolic syndrome and dyslipidemia in youth**. *J Clin Lipidol* 2008, **2**:147–155.
- Serebruany VL, Malinin A, Ong S, Atar D: **Patients with metabolic syndrome exhibit higher platelet activity than those with conventional risk factors for vascular disease**. *J Thromb Thrombolysis* 2008, **25**:207–213.
- Alexandru N, Popov D, Georgescu A: **Platelet dysfunction in vascular pathologies and how can it be treated**. *Thromb Res* 2012, **129**:116–126.
- Badimón L, Vilahur G, Padró T: **Lipoproteins, platelets, and atherothrombosis**. *Rev Esp Cardiol* 2009, **62**:1161–1178.
- Huo Y, Ley KF: **Role of the platelets in the development of atherosclerosis**. *Trends Cardiovasc Med* 2004, **14**:18–22.
- Libby P: **Inflammation in atherosclerosis**. *Nature* 2002, **420**:868–874.
- David G, Giammarresi C, Barbagallo C, Catalano I, Cala A, Notarbartolo A: **Thromboxane biosynthesis, neutrophil and coagulative activation in type IIa hypercholesterolemia**. *Thromb Haemost* 1995, **74**:1015–1019.
- Shi G, Morrell CN: **Platelets as initiators and mediators of inflammation at the vessel wall**. *Thromb Res* 2011, **127**:387–390.
- Bhupathiraju SN, Tucker KL: **Coronary heart disease prevention: Nutrients, foods and dietary patterns**. *Clin Chim Acta* 2012, **412**:1493–1514.
- Mitjavila MT, Fandos M, Salas-Salvados J, et al: **The Mediterranean diet improves the systemic lipid and DNA oxidative damage in metabolic syndrome individuals. A randomized controlled trial**. *Clin Nutr* 2013, **32**:172–178.
- Erkkilä A, De Mello VDF, Risérus U, Laaksonen DE: **Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach**. *Prog Lipid Res* 2008, **47**:172–187.
- Haimeur A, Ulmann L, Mimouni V, Guéno F, Pineau-Vincent F, Meskini N, Tremblin G: **The role of *Odontella aurita*, a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats**. *Lipids Health Dis* 2012, **11**:147.
- Charrouf Z, Guillaume D: **Ethnoecological, ethnomedical and phytochemical study of *Argania spinosa* (L) skeels**. *J Ethnopharmacol* 1999, **67**:7–14.
- Khalouki F, Younos C, Soulimani R, et al: **Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids tocopherols squalene sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects**. *Eur J Canc Prev* 2003, **12**:67–75.
- Bellahcen S, Mekhfi H, Ziyat A, et al: **Prevention of chemically induced diabetes milletus in experimental animals by virgin argan oil**. *Phytother Res* 2012, **26**:180–185.
- Berrougui H, Ettaib A, Herrena Gonzalez MD, Alvez De Sotomayor M, Bennani Kabchi N, Hmamouchi M: **Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in *Meriones shawi* rats**. *J Ethnopharmacol* 2003, **89**:15–18.
- Marhuenda E, Herrera MD: **Argan (*Argania spinosa*) oil lowers blood pressure and improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats**. *Br J Nutr* 2004, **92**:921–929.
- Samane S, Christon R, Dombrowski L, et al: **Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity**. *Metab Clin Exp* 2009, **58**:909–919.
- Cherki M, Derouiche A, Drissi A, et al: **Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: Intervention study in healthy men**. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005, **15**:352–360.
- Drissi A, Girona J, Cherki M, et al: **Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*)**. *Clin Nutr* 2004, **23**:1159–1166.
- Derouiche A, Cherki M, Drissi A, et al: **Nutritional intervention study with argan oil in man: effects on lipids and apolipoproteins**. *Ann Nutr Metab* 2005, **49**:196–201.
- Samane S, Noël J, Charrouf Z, Amarouch H, Haddad PS: **Insulin-sensitizing and anti-proliferative effects of *Argania spinosa* seed extracts**. *Evid Based Complement Alternat Med* 2006, **3**:317–327.
- Mekhfi H, Gadi D, Bnouham M, Ziyat A, Legssyer A, Aziz M: **Effect of argan oil on platelet aggregation and bleeding time: a beneficial nutritional property**. *J Compl Integr Med* 2008, **5**:1–18.
- Mekhfi H, Belmekki F, Ziyat A, Legssyer A, Bnouham M, Aziz M: **Antithrombotic activity of argan oil: An *in vivo* experimental study**. *Nutrition* 2012, **28**:937–941.
- Reiner Z, De Backer G, Graham I, et al: **ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidemias the task force for the management of dyslipidemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS)**. *Atherosclerosis* 2011, **217**:3–46.
- Boukhobza M, Pichon-Prun N: **L'arganier ressource économique et médicinale pour le Maroc**. *Phytothérapie* 1988, **27**:21–26.
- Richmond W: **Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum**. *Clin Chem* 1973, **19**:1350–1356.
- Trinder P: **Enzymatic method of triglycerides**. *Ann Clin Biochem* 1969, **6**:24–27.
- Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS: **Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge**. *Clin Chem* 1972, **18**:499–502.
- Lagarde M, Bryon PA, Guichardant M, Dechavanne MA: **Simple and efficient method for platelet isolation from their plasma**. *Thromb Res* 1980, **17**:581–588.
- Born GVR: **Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal**. *Nature* 1962, **194**:927–929.

36. Ohkawa H, Ohishi N, Yagik K: **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** *Anal Biochem* 1979, **95**:351–358.
37. Paglia DE, Valentine WN: **Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase.** *J Lab Clin Med* 1967, **70**:158–169.
38. Chaudière J, Gerard D: **Dosage de l'activité glutathion-peroxydase.** In *Biologie des Lipides chez l'Homme*. Edited by Douste-Blazy L, Mendy F. Paris: Médicales Internationales; 1988:275–289.
39. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248–254.
40. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J: **The metabolic syndrome—a new worldwide definition.** *Lancet* 2005, **366**:1059–1062.
41. Berrougui H, Cherki M, Koumbadinga GA, et al: **Antiatherogenic activity of extracts of *Argania spinosa* L. pericarp: beneficial effects on lipid peroxidation and cholesterol homeostasis.** *Can J Physiol Pharmacol* 2007, **85**:918–927.
42. Cherki M, Berrougui H, Drissi A, Adlouni A, Khalil A: **Argan oil: which benefits on cardiovascular diseases?** *Pharmacol Res* 2006, **54**:1–5.
43. Elmanfalouti H, Guillaume D, Denhez C, Charrouf Z: **Therapeutic potential of argan oil: a review.** *J Pharm Pharmacol* 2010, **62**:1669–1675.
44. Kris-Etherton P, Pearson TA, et al: **High monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations.** *Am J Clin Nutr* 1999, **70**:1009–1015.
45. Williams CM, Francis-Knapper JA, Webb D, et al: **Cholesterol reduction using manufactured foods high in monounsaturated fatty acids: a randomized crossover study.** *Br J Nutr* 1999, **81**:439–446.
46. Perez-Jimenez F: **International conference on the healthy effect of virgin olive oil.** *Eur J Clin Invest* 2005, **35**:421–424.
47. Nijjar PS, Burke FM, Bloesch A, Rader DJ: **Role of dietary supplements in lowering low-density lipoprotein cholesterol: A review.** *J Clin Lipidol* 2010, **4**:248–258.
48. Takada R, Saitoh M, Mori T: **Dietary gamma-linolenic acid-enriched oil reduces body fat content and induces liver enzyme activities relating to fatty acid beta-oxidation in rats.** *J Nutr* 1994, **124**:469–474.
49. Patch CS, Tapsell LC, Williams PG, Gordon M: **Plant sterols as dietary adjuvants in the reduction of cardiovascular risk: theory and evidence.** *J Vasc Health Risk Manag* 2006, **2**:157–162.
50. Calpe-Berdiel L, Escolà-gil JC, Blanco-Vaca F: **New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism.** *Atherosclerosis* 2009, **203**:18–31.
51. Jones PJ, Raeini-Sarjaz M, Ntanos FY, Vanstone CA, Feng JY, Parsons WE: **Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters.** *J Lipid Res* 2000, **41**:697–705.
52. Maki KC, Lawless AL, Reeves MS, et al: **Lipid effects of a dietary supplement softgel capsule containing plant sterols/stanols in primary hypercholesterolemia.** *Nutrition* 2013, **29**:96–100.
53. Rice-Evans C, Burdon C: **Free radical-lipid interactions and their pathological consequences.** *Prog Lipid Res* 1993, **32**:71–110.
54. Das UN: **Essential fatty acid metabolism in patients with essential hypertension diabetes mellitus and coronary heart diseases.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1995, **52**:387–391.
55. Hornstra G, Rand ML: **Influence of dietary lipids on platelet-vessel wall interaction: possible role of eicosanoids and platelet membrane fluidity.** *Haemostasis* 1986, **16**:41–42.
56. Ostertag LM, O'Kennedy N, Horgan GW, Kroon PA, Duthie GG, De Roos B: **In vitro anti-platelet effects of simple plant-derived phenolic compounds are only found at high non-physiological concentrations.** *Mol Nutr Food Res* 2011, **55**:1624–1636.
57. Burri BJ, Dougherty RM, Kelley DS, Iacono M: **Platelet aggregation in humans is affected by replacement of dietary linoleic acid with oleic acid.** *Am J Clin Nutr* 1991, **54**:359–362.
58. Dutta-Roy AK, Sinha AK: **Purification and properties of prostaglandin E₁ / prostacyclin receptor of human blood platelets.** *J Biol Chem* 1987, **262**:12685–12691.
59. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, McCarthy S, Betteridge DJ, Wolff SP: **Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM.** *Diabetes* 1995, **44**:1054–1058.
60. Muruganandam A, Drouillard C, Thibert RJ, Cheung RM, Draisay TF, Mutus B: **Glutathione metabolic enzyme activities in diabetic platelets as a function of glycemic control.** *Thromb Res* 1992, **67**:385–397.
61. Berrougui H, Cloutier M, Isabelle M, Khalil A: **Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages.** *Atherosclerosis* 2006, **184**:389–396.
62. Jialal I, Fuller CJ, Huet BA: **The effect of a-tocopherol supplementation on LDL oxidation a dose response study.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, **15**:190–198.

doi:10.1186/1476-511X-12-107

Cite this article as: Haimeur et al.: Argan oil prevents prothrombotic complications by lowering lipid levels and platelet aggregation, enhancing oxidative status in dyslipidemic patients from the area of Rabat (Morocco). *Lipids in Health and Disease* 2013 **12**:107.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Conclusion générale

Conclusion

Il y a de plus en plus de corrélations entre l'alimentation et le développement des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2, certains cancers et l'obésité, maladies dont l'incidence croissante accroît significativement la pression sur les dépenses en santé. Le syndrome métabolique est une constellation d'anomalies métaboliques causales (insulino-résistance obésité viscérale) et consécutives (dyslipidémie, hypertension) du désordre métabolique. Il est donc important de proposer des solutions nouvelles pour prévenir ces maladies, les traiter et limiter leurs dommages. Dans ce contexte, la nutrition peut jouer un rôle important dans la prévention, et dans certains cas, le traitement de ces anomalies métaboliques. Les acides gras polyinsaturés sont connus pour leur effet protecteur vis-à-vis des maladies cardiovasculaires. Cependant, le mécanisme d'action par lequel ils exercent leurs effets biologiques semble être différent.

Ainsi, l'objectif de ce travail était dans un premier temps de comparer les effets de trois compléments alimentaires riches en AGPI commercialisés : l'huile de poisson, l'huile d'argan et un lyophilisat de microalgue marine sur l'agrégation plaquettaire et certains facteurs de risque liés au syndrome métabolique chez des rats soumis à un régime hyperlipidique. En complément, une étude clinique a été également menée dans le but d'investiguer l'effet de l'huile d'argan sur la fonction plaquettaire et le stress oxydatif chez des patients dyslipidémiques.

Dans la première partie de ce travail, nous avons réalisé une étude préliminaire afin de rechercher les effets d'un régime standard supplémenté avec différentes doses de lyophilisat d'une microalgue *Odontella aurita*, riche en AGPI-LC de la série oméga-3, sur certains paramètres biochimiques plasmatiques et tissulaires associés au syndrome métabolique chez des rats Wistar. Cette étude nous a permis de retenir la dose minimale efficace à incorporer dans un régime hyperlipidique pour laquelle un effet positif sur les différents paramètres étudiés a été obtenu.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié l'effet du lyophilisat d'*O.aurita* apporté à cette dose (3 % poids/poids) sur les facteurs de risque cardiovasculaire induits par un régime hyperlipidique chez le rat. Nos résultats ont montré, que le régime hyperlipidique induit une augmentation du poids corporel, mais aussi de la glycémie et des teneurs en triglycérides et en cholestérol plasmatiques et hépatiques. Nous avons également

observé une augmentation de l'induction de l'agrégation plaquettaire par le collagène ainsi que du stress oxydatif au niveau du foie. En revanche, l'apport d'*O. aurita* induit une diminution de la glycémie et des teneurs en lipides dans le plasma ainsi qu'une réduction de l'agrégation plaquettaire. Un enrichissement en acides gras polyinsaturés, notamment en oméga-3, est observé dans le foie au niveau duquel le stress oxydatif est réduit. Ces différents effets protecteurs de la microalgue pourraient être attribués à un effet synergique de ses composés bioactifs (AGPI n-3, pigments, antioxydants, etc.).

La troisième partie de cette étude consiste à comparer les effets de cette microalgue avec l'huile de poisson qui représente la première source d'AGPI n-3 commercialisée. Pour cela, une étude nutritionnelle a été réalisée chez des rats soumis à un régime hyperlipidique supplémenté ou non avec soit du lyophilisat d'*O. aurita*, soit avec de l'huile de poisson. Après 8 semaines de régime, une diminution significative du poids corporel est observée chez les rats nourris avec le régime supplémenté avec le lyophilisat de la microalgue par rapport aux rats nourris avec le régime supplémenté en huile de poisson. Par ailleurs, les résultats obtenus pour les différents paramètres liés au syndrome métabolique montrent que la microalgue et l'huile de poisson diminuent de façon similaire les teneurs en lipides sériques et hépatiques et réduisent ainsi le développement de la stéatose hépatique par rapport au régime hyperlipidique. D'autre part, la supplémentation en lyophilisat d'*O. aurita* et en huile de poisson diminuent l'agrégation plaquettaire et le stress oxydatif par rapport aux résultats obtenus chez le groupe témoin rendu hyperlipidémique. En revanche, l'analyse de la composition en acides gras des phospholipides des tissus (foie et cœur) et des plaquettes montre une incorporation d'AGPI n-3 moins importante chez le groupe hyperlipidémique complétement avec des microalgues comparativement à celle observée chez le groupe hyperlipidémique complétement avec de l'huile de poisson.

Nous avons par la suite comparé les effets de l'huile de poisson et de l'huile d'argan sur la fonction plaquettaire et sur certains facteurs de risque du syndrome métabolique induits par un régime hyperlipidique chez des rats Wistar. Pour cela, une étude nutritionnelle a été réalisée chez des rats Wistar soumis à un régime hyperlipidique supplémenté ou non avec soit de l'huile d'argan soit avec de l'huile de poisson. Après 8 semaines de régime, nos résultats montrent que les 2 sources diminuent, de façon similaire, l'agrégation plaquettaire et les facteurs de risque du syndrome métabolique étudiés. Cependant, le mécanisme d'action des deux huiles semble être différent.

Afin de valoriser nos résultats de l'huile d'argan, nous avons réalisé une étude clinique pour rechercher l'effet antiagrégant et hypolipémiant de cette huile chez des patients dyslipidémiques. Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent une amélioration significative des lipides athérogènes chez les patients qui ont consommé l'huile d'argan pendant 3 semaines. Cette amélioration est marquée par une baisse des taux de cholestérol totale et de LDL-cholestérol sériques de 23,8 % et 25,6 %, respectivement, avec une augmentation des HDL-cholestérol de 26 %, en comparaison avec les valeurs obtenus avant la phase de traitement. Par ailleurs, les résultats de la fonction des plaquettes et leur état rédox montrent une diminution de l'agrégation plaquettaire d'environ 25 %, ainsi qu'un rétablissement du stress oxydatif des plaquettes chez les patients du groupe huile d'argan en comparaison avec le groupe témoin.

Ces résultats laissent entrevoir la possibilité d'élaborer de nouvelles approches thérapeutiques nutritionnelles afin de diminuer ou idéalement neutraliser les effets métaboliques, oxydatifs et thrombotiques néfastes induits par une consommation accrue de graisses saturées. La consommation sous forme de complément alimentaire des différentes sources d'AGPI testées dans cette étude, semble être une stratégie intéressante et efficace de lutte contre le syndrome métabolique et le risque cardio-vasculaire. Cependant, le mécanisme d'action de chaque source semble être différent.

Ces travaux ouvrent un certain nombre de perspectives et nécessitent de prolonger certaines études afin de pouvoir approfondir la compréhension des mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques des biomolécules issus des microalgues, de l'huile de poisson ou de l'huile d'argan. Des études supplémentaires, notamment à long terme, sont nécessaires pour confirmer le potentiel extrêmement intéressant des microalgues et de l'huile d'argan et déterminer le ou les mécanisme(s) qui sont responsables de l'effet préventif identifié dans la présente étude.

Une étude nutritionnelle devra être menée pour investiguer les effets séparés des molécules bioactives après extraction de la microalgue *O. aurita* et de l'huile d'argan sur la fonction plaquettaire et les facteurs associés au syndrome métabolique que nous avons évalué dans la présente étude. La caractérisation des altérations du métabolisme des lipides dans le foie et le tissu adipeux associées au syndrome métabolique ainsi que les mécanismes d'action d'hormones et de voies de signalisation cellulaires qui sont les médiateurs de ces perturbations permettront d'élucider les mécanismes par lesquels ces biomolécules exercent leurs effets

favorables sur la santé cardiovasculaire. En complément, des études *in-vitro* devront être envisagées. Concrètement, les plaquettes des rats isolés peuvent être incubées avec des extraits d'*O. aurita* ou de l'huile d'argan et la fonction plaquettaire pourra être déterminée par turbidimétrie par la suite. La voie de signalisation impliquée dans l'effet anti-agrégant pourra éventuellement être investiguée *in-vitro* par la mesure du taux de phosphorylation des kinases, en particulier la P38 kinase, qui semble intervenir dans la voie de signalisation de l'agrégation plaquettaire après la fixation d'un agoniste de l'agrégation sur son récepteur adéquat. La mobilité du Ca^{2+} plaquettaire intracellulaire pourrait également être une voie de recherche intéressante afin d'élucider le mécanisme d'action de l'effet anti-agrégant.

Le rôle des AGPI, comme médiateur cellulaire, a été démontré dans plusieurs études. Ils peuvent agir directement sur des récepteurs nucléaires modifiant ainsi leur expression ou leur fonction. En effet, l'étude du rôle des récepteurs nucléaires, les PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) dans la régulation de la sensibilité à l'insuline et du métabolisme du glucose et des lipides pourrait représenter une voie de recherche intéressante. Il est possible que les effets bénéfiques observés sur l'insulino-résistance, l'adiposité et la lipogénèse puissent s'expliquer par la modulation de ces récepteurs qui sont régulateurs de la synthèse, de la mise en réserve et de l'oxydation des lipides. En outre, l'implication des PPARs dans la régulation des gènes de l'oxydation pourrait être suivie.

Afin de compléter cette étude, un essai clinique devrait être mené dans le but de valoriser l'utilisation de la microalgue *O. aurita* complétant celui déjà réalisé au Maroc avec l'huile d'Argan comme supplément alimentaire riche en AGPI n-3 et en d'autres molécules bioactives. En effet, cette microalgue a été autorisée à être commercialisée comme supplément alimentaire depuis 2004. Cependant, aucun essai clinique n'a été mené pour prouver son effet bénéfique chez l'homme. Nos premiers résultats sur un modèle murin constituent donc une base de données intéressantes pour la mise en place d'un essai clinique en milieu hospitalier avec les collègues marocains.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

Accinni R., Rosina M., Bamonti F. (2006). Effects of combined dietary supplementation on oxidative and inflammatory status in dyslipidemic subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 16: 121-127.

Afssa. (2010). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras.

Alberti KGMM., Zimmet PZ. (1998) For the WHO Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part I. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 15: 539-53.

Alessandri J.M., Guesnet P., Vancassel S., Astorg P., Denis I., Langelier B., Aid S., PomesBallihaut C., Champeil-Potokar G., Lavalie M. (2004) Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev.* 44: 509-38.

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

Aliciguzel Y., Ozen I., Aslan M., Karayalcin U. (2003) Activities of xanthine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats. *J. Lab. Clin. Med.* 142:172-177.

Ambrosio G., Golino P., Pascucci I., Rosolowsky M., Campbell WB., DeClerck F., Tritto I., Chiariello M. (1994) Modulation of platelet function by reactive oxygen metabolites. *Am J Physiol.* 267: 308-318.

Ammon HPT., Klumpp S., Fuß A., Verspohl EJ., Jaeschke H., Wendel A., Müller P. (1989) A possible role of plasma glutathione in glucose-mediated insulin secretion: in vitro and in vivo studies in rats. *Diabetologia.* 32: 797-800.

Andersen RA. (2004) Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae. *American Journal of Botany*. 9: 1508-1522.

Andersson A., Nälsén C., Tengblad S., Vessby B. (2002) Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary fat composition in humans. *Am J Clin Nutr*.76:1222-1229.

Apt KE., Behrens PW. (1999) Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology*. 35: 215-226.

Aqel N., Ball RY., Waldmann H., Mitchinson MJ. (1984) Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 53: 265-271.

Arkan MC., Hevener AL., Greten FR., Maeda S., Li ZW., Long JM., Wynshaw-Boris A., Poli G., Olefsky J., Karin M. (2005). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 11: 191-198.

Arterburn LM., Hall EB., Oken H. (2006) Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*. 83: 1467S-1476.

Arthur JR. (2000) The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci*. (13-14): 1825-1835.

-B-

Babcock T., Helton WS., Espat NJ. (2000) Eicosapentaenoic acid (EPA): an anti-inflammatory ω -3 fat with potential clinical applications. *Nutrition*. 16: 1116-1118.

Baker PW., Gibbons GF. (2000). Effect of dietary fish oil on the sensitivity of hepatic lipid metabolism to regulation by insulin. *J Lipid Res*. 41: 719-726.

Baker PW., Gibbons GF. (2000). Effect of dietary fish oil on the sensitivity of hepatic lipid metabolism to regulation by insulin. *J Lipid Res*. 41: 719-726.

Barceló-Coblijn G., Murphy EJ. (2009) Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res*. 48: 355-374.

Barja G. (2002) Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity. *Free Radic Biol Med.* 33: 1167-1172.

Barnard RJ., Roberts CK. (1998) Diet-induced insulin resistance precedes other aspects of the metabolic syndrome. *J Appl Physiol.* 84: 1311-1315.

Barnathan G. (2007) Sources connues et potentielles de DHA pour les besoins de l'homme. *OCL.* 14: 35-43.

Bartness TJ., Polk DR., McGriff WR., Youngstrom TG., DiGirolamo M. (1992) Reversal of high-fat diet-induced obesity in female rats. *Am J Physiol.* 263: 790-797.

Barzanti V., Battino M., Baracca A., Cavazzoni M., Cocchi M., Noble R., Maranesi M., Turchetto E., Lenaz G. (1994) The effect of dietary lipid changes on the fatty acid composition and function of liver, heart and brain mitochondria in the rat at different ages. *Br J Nutr.* 71: 193-202.

Batandier C., Guigas B., Detaille D., El-Mir MY., Fontaine E., Rigoulet M., Leverve XM. (2006) The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr.* 38: 33-42.

Bays HE., Tighe AP., Sadovsky R., Davidson MH. (2008) Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 6: 391-409.

Bazan NG. (2006). The onset of brain injury and neurodegeneration triggers the synthesis of docosanoid neuroprotective signaling. *Cell Mol Neurobiol.* 26: 901-913.

Bearer EL., Prakash JM., Li Z. (2002) Actin dynamics in platelets. *Int Rev Cytol.* 217:137-182.

Becker W. (2004) Microalgae in human and animal nutrition. In: Handbook of microalgal culture. Richmond A. (Ed), Oxford: Blackwell Publishing, pp. 312-351.

Behnke O., Forer A. (1998). From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol.* 61:3-23.

Belcadi R. (1994) Etude des variations du système antioxydant cellulaire en fonction de l'âge et de l'apport alimentaire d'acides gras polyinsaturés, chez le rat. Influence particulière de l'ingestion de l'huile d'argan. Thèse 3ème cycle. Univ. Ibnou Zohr. Agadir.

Benzaria A., Meskini N., Dubois M., Croset M., Némoz G., Lagarde M., Prigent AF. (2006) Effect of dietary argan oil on fatty acid composition, proliferation, and phospholipase D activity of rat thymocytes. *Nutrition*. 22: 628-637.

Beretz A., Cazenave JP., Anton A. (1982) Inhibition of aggregation and secretion of human platelets by quercetin and other flavonoids: Structure-activity relationship. *Agents Actions*. 12: 382-387.

Berrada Y., Settaf A., Baddouri K., Cherrah A., Hassar M. (2000) Mise en évidence expérimentale des effets antihypertenseurs et hypocholestérolémiantes de l'huile d'argan, *Argania sideroxylon*. *Thérapie*. 55: 375–378.

Berrougui H., Ettaib A., Herrera-Gonzalez MD., Alvarez de Sotomayor M., Bennani-Kabchi N., Hmamouchi M. (2003) Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in Meriones shawi rats. *J Ethnopharmacol*. 89: 15-18.

Berrougui M., Alvarez de Sotomayor M., Perz-Guerrero C., Attaib A., Hmamouchi M., Marhuenda E., Herrera MD. (2004) Argan (*Argania spinosa*) oil lowers blood pressure and improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr*. 92: 921-929.

Berrougui M., Cloutier M., Isabelle M., Khalil A. (2006) Phenolic extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*. 184: 389-396.

Berti L., Mosthaf L., Kroder G., Kellerer M., Tippmer S., Mushack J., Seffer E., Seedorf K., Haring H. (1994). Glucose-induced translocation of protein kinase C isoforms in rat-1 fibroblasts is paralleled by inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 269: 3381-3386.

Bézar J., Blond JP., Bernard A., Clouet P. (1994) The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues. *Reprod Nutr Dev*. 34: 539-568.

Bezerra RM., Ueno M., Silva MS., Tavares DQ., Carvalho CR., Saad MJ. (2000) A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *J Nutr.* 130: 1531-1535.

Bizeau ME., Short C., Thresher JS., Commerford SR., Willis WT., Pagliassotti MJ. (2001a). Increased pyruvate flux capacities account for diet-induced increases in gluconeogenesis in vitro. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281: 427-433.

Bizeau ME., Thresher JS., Pagliassotti MJ. (2001b). A high-sucrose diet increases gluconeogenic capacity in isolated periportal and perivenous rat hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280: 695-702.

Bligh EG., Dyer WJ. (1959) A rapid method of lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 37: 911-917.

Bloch-Damti A., Bashan N. (2005). Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 7: 1553-1567.

Blockmans D., Deckmyn H., Vermeylen J. (1995) Platelet Activation. *Blood Reviews.* 9: 143-156.

Boden G. (2004) Gluconeogenesis and glycogenolysis in health and diabetes. *J Investig Med.* 52: 375-378.

Boldyrev A. (2005) Protection of proteins from oxidative stress A new illusion or a novel strategy? *Ann N Y Acad Sci.* 1057:193–205.

Bonnefont-Rousselot D. (2002) Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 5: 561-568.

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

Bourre JM. (2007a) Acides gras omega-3, structures et fonctions du cerveau. *Revue Neurologique.* 163: 243-244.

- Bourre JM.** (2007b) Dietary omega-3 fatty acids for women. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 61: 105-112.
- Boveris A., Chance B.** (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 134:707-716.
- Braud JP.** (1997) Simultaneous culture in pilot tanks of the macroalga *Chondrus crispus* (Gigartinales) and the microalga *Odontella aurita* (Eupodiscaceae) producing EPA. In: Marine microorganisms for industry. Le Gal Y., Muller-Feuga A. (Eds), Actes de colloques - Ifremer, pp. 39-47.
- Broos K., De Meyer S.F., Feys H.B., Vanhoorelbeke K., Deckmyn H.** (2012). Blood platelet biochemistry. *Thrombosis Research*. 129: 245-249.
- Brown MR., Jeffrey SW., Volkman JK., Dunstan GA.** (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture Fish Nutrition and Feeding Proceedings of the Sixth International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish, 151: 315-331.
- Brownlee M.** (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 414: 813-820.
- Brun S., Carmona MC., Mampel T., Viñas O., Giralt M., Iglesias R., Villarroya F.** (1999) Activators of peroxisome proliferator-activated receptor- α induce the expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle: a potential mechanism for the lipid intake-dependent activation of uncoupling protein-3 gene expression at birth. *Diabetes*. 48:1217-22.
- Buettner GR.** (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*. 300:535-543.
- Bunnag P., Hori MT., Ormsby B., Berger ME., Golub MS., Tuck ML.** (1997) Impaired in vivo adrenergic responses in diet-induced hypertensive rats. *Hypertens Res*. 20:17-21.
- Burch JW., Burch PT.** (1990). Glutathione disulfide production during arachidonic acid oxygenation in human platelets. *Prostaglandins* 39:123-134.

Burdge G. (2004) Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7:137-144.

Burdge GC., Calder PC. (2005) Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev.* 45:581-597.

BURR GO., BURR MM. (1929) A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *Biol Chem.* 82:345-367.

BURR GO., BURR MM. (1930) The nature and role of the fatty acids essential in nutrition. *Biol Chem.* 86:587-621.

Busserolles J., Zimowska W., Rocke E., Rayssiguier Y., Mazur A. (2002) Rats fed a high sucrose diet have altered heart antioxidant enzyme activity and gene expression. *Life Sci.* 71: 1303-1312.

-C-

Cadet J., Douki T., Frelon S., Sauvaigo S., Pouget J. P., Ravanat JL. (2002) Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS/MS measurement. *Free Radic Biol Med.* 33:441-449.

Cai H., Harrison DG. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87:840-844.

Calder PC. (2002) Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc.* 61:345-358.

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

Calzada C., Véricel E., Colas R., Guillot N., El Khoury G., Drai J., Sassolas A., Peretti N., Ponsin G., Lagarde M., Moulin P. (2013) Inhibitory effects of in vivo oxidized high-density lipoproteins on platelet aggregation: evidence from patients with abetalipoproteinemia. *FASEB J.* 27:2855-2861.

Cardozo KHM., Guaratini T., Barros MP., Falcão VR., Tonon AP., Lopes NP., Campos S., Torres MA., Souza AO., Colepicolo P., Pinto E. (2007) Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 146:60-78.

Ceriello A. (2000) Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism*. 49:27-29.

Certik M., Shimizu S. (1999) Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87:1-14.

Chan DC., Watts GF., Barrett PH., Beilin LJ., Redgrave TG., Mori TA. (2002). Regulatory effects of HMG CoA reductase inhibitor and fish oils on apolipoprotein B-100 kinetics in insulin-resistant obese male subjects with dyslipidemia. *Diabetes*. 51:2377-2386.

Chan DC., Watts GF., Mori TA., Barrett PH., Redgrave TG., Beilin LJ. (2003). Randomized controlled trial of the effect of n-3 fatty acid supplementation on the metabolism of apolipoprotein B-100 and chylomicron remnants in men with visceral obesity. *Am J Clin Nutr*. 77:300-307.

Charouff Z, Guillaume D. (1999) Ethnoeconomical, Ethnomedical, and phytochemical Study of *Argania Spinoza (L.) Skeels*. *J Ethnopharmacol*. 67:7-14.

Chaudière J., Gerard D. (1988) Dosage de l'activité glutathion-peroxydase. In *Biologie des Lipides chez l'Homme*. Edited by Douste-Blazy L, Mendy F. Paris: Médicales Internationales; 275-289 pp.

Chicco A., D'Alessandro M., Karabatas L., Pastorale C., Basabe JC., Lombardo YB. (2003) Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *J Nutr*. 133:127-133.

Chisti Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25:294-306.

Chou CJ., Cha MC., Jung DW., Boozer CN., Hashim SA., Pi-Sunyer FX. (2001) High-fat diet feeding elevates skeletal muscle uncoupling protein 3 levels but not its activity in rats. *Obes Res*. 9:313-319.

Christiansen EN., Lund JS., Rortvei T., Rustan AC. (1991) Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on fatty acid desaturation in rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 1082:57-62.

Clarke SD. (2001) Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr.* 131:1129-1132.

Clouet P, Niot I, Bézard J. (1989) Pathway of alpha-linolenic acid through the mitochondrial outer membrane in the rat liver and influence on the rate of oxidation. Comparison with linoleic and oleic acids. *Biochem J.* 263:867-73.

Commerford SR., Ferniza JB., Bizeau ME., Thresher JS., Willis WT., Pagliassotti MJ. (2002). Diets enriched in sucrose or fat increase gluconeogenesis and G-6-Pase but not basal glucose production in rats. *Am J Physiol Endocrinol Meta.*28:545-555.

Coughlin SR. (2000) Thrombin Signalling and Protease-Activated Receptors. *Nature.* 407:258-64.

Coulon L. (2004) Effet d'un hydroperoxyde lipidique et des LDL oxydées sur les enzymes impliquées dans la libération de l'acide arachidonique des phospholipides plaquettaires. Thèse de doctorat. Université de Lyon.

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

Cunnane SC. (2004) Metabolism of polyunsaturated fatty acids and ketogenesis: an emerging connection. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 70:237-241.

-D-

De Fronzo RA., Ferrannini E. (1991) Insulin resistance a multifaceted syndrom responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardio-vascular disease. *Diabetes Care.* 14:173-194.

De Luca C., Olefsky JM. (2008). Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett.* 582:97-105.

DeFina LF., Marcoux LG., Devers SM., Cleaver JP., Willis BL. (2011) Effects of omega-3 supplementation in combination with diet and exercise on weight loss and body composition. *Am J Clin Nutr.* 93:455-462.

Delarue F., Kedjouar B., Mesange F., Bayard F., Faye JC., Poirot M. (1999) Modifications of benzyloxy ethanamine antiestrogen molecules: influence affinity for antiestrogen binding site (AEBS) and cell cytotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 57:657-661.

Delarue J., Chang-Hong L., Richard C., Corporeau C., Brigitte S. (2006). Interaction of fish oil and a glucocorticoid on metabolic responses to an oral glucose load in healthy human subjects. *Br J Nutr.* 95:267-272.

Delsal J. (1944) Nouveau procédé d'extraction des lipides du sérum par le méthylal. Application aux micro-dosages du cholestérol total, des phosphoamino-lipides et des protéines. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique.* 26:99-105.

Derouiche A., Cherki M., Drissi A., Bamou Y., El Messal M., Idrissi-Oudghiri A., Lecerf JM., Adlouni A. (2005) Nutritional intervention study with argan oil in man: effects on lipids and apolipoproteins. *Annals of Nutrition and Metabolism.* 49:196-201.

Dickinson HO., Mason JM., Nicolson DJ., Campbell F., Beyer FR., Cook JV., Williams B., Ford GA. (2006) Life style interventions to reduce raised blood pressure: a systematic review of randomized controlled trials. *J Hypertens.* 24:215-233.

Dikalov SI., Kirilyuk IA., Voinov M., Grigor'ev IA. (2011). EPR detection of cellular and mitochondrial superoxide using cyclic hydroxylamines. *Free Radic Res.* 45:417-430.

Din JN., Newby DE., Flapan AD. (2004) Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *British Medical Journal.* 328:30-35.

Din JN., Harding SA., Valerio CJ., Sarma J., Lyall K., Riemersma RA., Newby DE., Flapan AD. (2008) Dietary intervention with oil rich fish reduces platelet-monocyte aggregation in man. *Atherosclerosis.* 197:290-296.

Dincer Y., Akcay T., Alademir Z., Ilkova H. (2002) Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 51:1360-1362.

Drissi A., Girona J., Cherki M., God G., Derouiche A., El Messal M., Saile L., Kettani A., Sol R., Masana L., Adlouni A. (2004) Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). *Clinical Nutrition*. 23: 1159-1166.

Dyerberg J., Bang HO. (1979) Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Nutrition*. 11:475-476.

Dyerberg J., Jørgensen KA. (1982) Marine oils and thrombogenesis. *Prog Lipid Res*. 21:255-69.

-E-

Eckel RH., Grundy SM., Zimmet PZ. (2005) The metabolic syndrome. *Lancet*. 365:1415-1428.

El-Mir MY., Nogueira V., Fontaine E., Avéret N., Rigoulet M., Leverve X. (2000) Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*. 275:223-228.

Engblom D., Saha S., Engstro"ML., Westman M., Audoly LP., Jakobsson PJ., Blomqvist A. (2003) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat Neurosci*. 6:1137-1138.

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

Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. (2005) The molecular basis for oxidative stress induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal*. 7:1040-1052.

-F-

Faeh D., Minehira K., Schwarz JM., Periasamy R., Park S., Tappy L. (2005) Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulinsensitivity in healthy men. *Diabetes*. 54:1907-1913.

Faure P., Rossini E., Lafond JL., Richard MJ., Favier A., Halimi S. (1997) Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets. *J Nutr*. 127:103-107.

Favier A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Act. Chim*. 108-115.

Feki M., Souissi M., Mebazaa A. (2001) Vitamin E: structure, metabolism, and functions. *Ann Med Interne (Paris)*. 152:384-391.

Felber JP., Ferrannini E., Golay A., Meyer HU., Theibaud D., Curchod B., Maeder E., Jequier E., DeFronzo RA. (1987) Role of lipid oxidation in pathogenesis of insulin resistance of obesity and type II diabetes. *Diabetes*. 36:1341-1350.

Ferré P., Foufelle F. (2010) Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab*. 12:83-92.

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

Flaumenhaft R. (2003) Molecular Basis of Platelet Granule Secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23:1152-1160.

Flower RJ. (2003) The development of COX2 inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2:179-191.

Folch J., Lees M., Sloane Stanley GH. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 226:497–509.

Fridovich I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*. 64:97-112.

Friedwald WT., Levy RI., Fredrickson DS. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 18:499-502.

Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimomura I. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 114:1752-1761.

-G-

Gawaz M., Brand K., Dickfeld T., Pogatsa-Murray G., Page S, Bogner C., Koch W., Schömig A., Neumann F. (2000) Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis.* 148:75-85.

George JN. (2000) Platelets. *Lancet.* 355:1531-1539.

Gibbins JM. (2004) Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci.* 117:3415-3425.

Gladyshev VN., Factor VM., Housseau F., Hatfield DL. (1998) Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 251:488-493

Griel AE., Ruder EH., Kris-Etherton PM. (2006) The changing roles of dietary carbohydrates: from simple to complex. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:1958-1965.

Griendling KK., Sorescu D., Ushio-Fukai M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 86:494-501.

Grundey SM. (2008) Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 4:629-636.

Grundy SM., Hansen B., Smith SC., Cleeman JI., Kahn RA. (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.

Grundy SM., Brewer HB Jr., Cleeman JI., Smith SC Jr., Lenfant C. (2004) American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 109:433-438.

Guesnet P., Ailhaud G., Delplanque B., Alessandri JM. (2013) Place des lipides dans l'alimentation du nourrisson. *OCL*. 20:79-87.

Guihéneuf F., (2008) Régulation par des facteurs environnementaux de la synthèse des acides gras à longue chaîne de différentes espèces de microalgues marines. Effets combinés de l'éclaircissement et de la nature de la source carbonée sur l'optimisation de la synthèse de l'EPA et du DHA. Intérêts nutritionnels. Thèse de doctorat. Université du Maine.

Gunstone FD. (2007) Omega-3 fatty acids - Introduction. In: Long-chain omega-3 specialty oils. Breivik (Ed), Bridgwater: The Oily Press, pp. 1-22.

Gutteridge JM., Halliwell B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*. 899:136-147.

-H-

Haimeur A., Messaouri H., Ulmann L., Mimouni V., Masrar A., Chraïbi A., Tremblin G., Meskini N. (2013) Argan oil prevents prothrombotic complications by lowering lipid levels and platelet aggregation, enhancing oxidative status in dyslipidemic patients from the area of Rabat (Morocco). *Lipids in Health and Disease*. 12:107.

Halliwell B., Chirico S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 5:715-724.

Halliwell B., Gutteridge JM. (1995) The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*. 18:125-126.

Halliwell B., Cross CE. (1994) Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 102:5-12.

Handin RI., Karabin R., Boxer GJ. (1977). Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J Clin Invest.* 59:959-965.

Harel M., Koven W., Lein I., Bar Y., Behrens P., Stubblefield J., Zohar Y., Place A.R. (2002) Advanced DHA, EPA and ARA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. *Aquaculture.* 213:347-362.

Hatsukami D., Grillo M., Boyle R., Allen S., Jensen J., Bliss R. (2000) Treatment of spit tobacco users with transdermal nicotine system and mint snuff. *Journal of Consulting and Clinical Psychology.* 68:241-249.

Heizer ML., McKinney JS., Ellis EF. (1991) 14,15-Epoxyeicosatrienoic acid inhibits platelet aggregation in mouse cerebral arterioles. *Stroke.* 22:1389-1393.

Henderson RJ., Tocher DT. (1992) Thin-layer chromatography. In: Lipids analysis A practical approach. Hamilton R.J., Hamilton S. (Eds), Oxford: Oxford University Press, pp. 65-111.

Henn V., Slupsky JR., Gräfe M., Anagnostopoulos I., Förster R., Müller-Berghaus G., Kroczeck RA. (1998) CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 391:591-594.

Hesselink MK., Mensink M., Schrauwen P. (2003) Human uncoupling protein-3 and obesity: an update. *Obes Res.* 11:1429-1443.

Hilali M., Charrouf Z., Soulhi AEA., Hachimi L., Guillaume D. (2005) Influence of origin and extraction method on argan oil physico-chemical characteristics and composition. *J Agric Food Sci.* 53:2081-2087.

Hill JO., Melanson EL., Wyatt HT. (2000) Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. *J Nutr.* 130:284-288.

Hillier TA., Fagot-Campagna A., Eschwège E., Vol S., Cailleau M., Balkau B. (2006) Weight change and changes in the metabolic syndrome as the French population moves towards overweight: the D.E.S.I.R. cohort. *Int J Epidemiol.* 35:190-196.

Himms-Hagen J., Harper ME. (2001) Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp Biol Med.* 226:78-84.

Hollenberg MD. (2002) Compton SJ. Proteinase-Activated Receptors. *Pharmacol Rev.* 54:203-217.

Hollopeter G, Jantzen H-M, Vincent D. (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature.* 409:202-207.

Holman RT., Johnson SB., Hatch TF. (1982) A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am J Clin Nutr.* 35:617-623.

Horton TJ., Gayles EC., Prach PA., Koppenhafer TA., Pagliassotti M J. (1997) Female rats do not develop sucrose-induced insulin resistance. *Am J Physiol.* 272:1571-1576.

Hotamisligil GS., Shargill NS., Spiegelman BM. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 259:87-91.

Hourani SMO. (1991) Cusack N J. Pharmacological Receptors on Blood Platelets. *Pharmacol Rev.* 43:243-298.

Houstis N., Rosen ED., Lander ES. (2006) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature.* 440:944-948.

Hu FB., Stampfer MJ., Manson JE., Rimm E., Colditz GA., Rosner BA., Hennekens CH., Willett WC. (1997) Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med.* 337:1491-1499.

Huang PL. (2009) A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech.* 2:231-237.

Hunt JV., Dean RT., Wolff SP. (1988) Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J.* 256:205-212.

-I-

Imig JD., Falck JR., Inscho EW. (1999) Contribution of cytochrome P450 epoxygenase and hydroxylase pathways to a erent arteriolar autoregulatory responsiveness. *Br J Pharmacol.*127:1399-1405.

Innis SM. (2004) Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Adv Exp Med Biol.* 554:27-43.

Inoguchi T., Li P., Umeda F., Yu HY., Kakimoto M., Imamura M., Aoki T., Etoh T., Hashimoto T., Naruse M., Sano H., Utsumi H., Nawata H. (2000) High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes.* 49:1939-1945.

Iossa S., Lionetti L., Mollica MP., Crescenzo R., Barletta A., Liverini G. (2000) Effect of long-term high-fat feeding on energy balance and liver oxidative activity in rats. *Br J Nutr.* 84:377-385.

Iossa S., Lionetti L., Mollica MP., Crescenzo R., Botta M., Barletta A., Liverini G. (2003) Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. *Br J Nutr.* 90:953-960.

Irani K., Pham Y., Coleman LD., Roos C., Cooke GE., Miodovnik A., Karim N., Wilhide CC., Bray PF., Goldschmidt-Clermont PJ. (1998) Priming of platelet alphaIIb beta3 by oxidants is associated with tyrosine phosphorylation of beta3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:1698-1706.

-J-

Jakus V., Rietbrock N. (2004) Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res.* 2:131-142.

Jiang Y., Chen F., Liang SZ. (1999) Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *Process Biochemistry*. 34:633-637.

-K-

Kahn BB., Alquier T., Carling D., Hardie DG. (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 1:15-25.

Kahn CR., Saad MJ. (1992) Alterations in insulin receptor and substrate phosphorylation in hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol.* 3:69-77.

Kaplan ZS., Jackson SP. (2011) The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011:51-61.

Khallouki F., Younos C., Soulimani R., Oster T., Charrouf Z., Spieglehalder B., Batsch H., Owen RW. (2003) Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, squalene, sterols, tocopherols and phenolic antioxidants should confer valuable cancer chemopreventive effects. *Eur. J. Cancer Prev.* 12:67-75.

Kieffer N., Bettaieb A., Legrand C., Coulombel L., Vainchenker W., Edelman L., Breton-Gorius J. (1989) Developmentally regulated expression of a 78 kDa erythroblast membrane glycoprotein immunologically related to the platelet thrombospondin receptor. *Biochem J.* 262:835-842.

Kim JY., Nolte LA. (1999) Insulin resistance of muscle glucose transport in male and female rats fed a high-sucrose diet. *Am J Physiol.* 276:665-672.

Knuckey RM., Brown MR., Barrett SM., Hallegraef GM. (2002) Isolation of new nanoplankton diatom strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture.* 211:253-274.

Konstantinides S., Schafer K., Koschnick S., Loskutoff DJ. (2001) Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J Clin Invest.* 108:1533-1540.

Korshunov SS., Skulachev VP., Starkov AA. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416:15-18.

Kraegen EW., Cooney GJ., Ye JM., Thompson AL., Furler SM. (2001) The role of lipids in the pathogenesis of muscle insulin resistance and beta cell failure in type II diabetes and obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 109:189-201.

Krinsky NI. (1992) Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med.* 200:248-54.

Krinsky NI., Yeum KJ. (2003) Carotenoid-radical interactions. *Biochem Biophys Res Commun.* 305:754-760.

Kris-Etherton PM., Yu S., Etherton TD., Morgan R., Moriarty K., Shaffer D. (1997) Fatty acids and progression of coronary artery disease. *Am J Clin Nutr.* 65:1088-1090.

Krook A., Digby J., O'Rahilly S., Zierath JR., Wallberg-Henriksson H. (1998) Uncoupling Protein 3 Is Reduced in Skeletal Muscle of NIDDM Patients. *Diabetes.* 47:1528-1531.

Krotz F., Sohn HY., Gloe T., Zahler S., Riexinger T., Schiele T. M., Becker BF., Theisen K., Klauss V., Pohl U. (2002) NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood.* 100:917-924.

Kuhn H., Belkner J., Zaiss S. (1994) involvement of 15-lipoxygenase in early stages of atherogenesis. *J Exp Med.* 179:1903-1911.

-L-

Laakso M. (1996) Lipids and lipoproteins as risk factors for coronary heart disease in non insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Med.* 28:341-345.

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 PA., Guichardant M., Dechavanne MA. (1980) Simple and efficient method for platelet isolation from their plasma. *Thromb Res.* 17:581-588.

Lau DC., Dhillon B., Yan H. (2005) Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288:2031-2041.

Laybutt DR., Schmitz-Peiffer C., Saha AK., Ruderman NB., Biden TJ., Kraegen EW. (1999) Muscle lipid accumulation and protein kinase C activation in the insulin-resistant chronically glucose-infused rat. *Am J Physiol.* 277:1070-1076.

Laye S. (2010) Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 82:295-303.

Lee AY., Chung SS. (1999) Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.* 13:23-30.

Lee RE. (1989) *Psychology*, 2nd Edition, Cambridge University Press, 645 p.

Lemarchal P. (1989) La régulation hormonale et nutritionnelle des désaturases. *Cah Nutr Diet.* 2:99-106.

Leverve XM., Guigas B., Detaille D., Batandier C., Koceir EA., Chauvin C., Fontaine E., Wiernsperger NF. (2003) Mitochondrial metabolism and type-2 diabetes: a specific target of metformin. *Diabetes Metab.* 29:688-694.

Levine RL. (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med.* 32:790-796.

Lewis GF., Carpentier A., Adeli K., Giacca A. (2002) Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine Reviews.* 23:201-229.

Li D., Bode ODH., Sinclair AJ. (2002) Omega-3 (n-3) fatty acids. In Gunstone, F.D., ed. *Lipids for functional foods and nutraceuticals*, pp. 225-262, The Oily Press, UK.

Liang S., Xueming L., Chen F., Chen Z. (2004) Current microalgal health food R&D activities in China. *Hydrobiologia*. 512:45-48.

Linden MD., Tran H., Woods R., Tonkin A. (2012) High Platelet Reactivity and Antiplatelet Therapy Resistance. *Semin Thromb Hemost* 38:200-212.

López JA., Dong JF. (2004) Cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS-13 on endothelial cells. *Semin Hematol*. 41:15-23.

Lorente-Cebrián S., Costa AG., Navas-Carretero S., Zabala M., Martínez JA., Moreno-Aliaga MJ. (2013) Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *J Physiol Biochem*. 69:633-651.

-M-

Maddux BA., See W., Lawrence JC., Goldfine AL., Goldfine ID., Evans JL. (2001) Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes*. 50:404-410.

Maechler P., Wollheim CB. (1999) Glutamate acts as a mitochondrially derived messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature*. 402:685-689.

Maison P., Byrne CD., Hales CN., Day NE., Wareham NJ. (2001) Do different dimensions of the metabolic syndrome change together over time? Evidence supporting obesity as the central feature. *Diabetes Care*. 24:1758-1763.

Mao GD., Poznansky MJ. (1992) Electron spin resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes. *FEBS Lett*. 305:233-236.

Marcus A J., Safier LB. (1993) Thromboregulation: Multicellular Modulation of Platelet Reactivity in Hemostasis and Thrombosis. *FASEB J*. 7: 516-522.

Massberg S., Brand K., Grüner S., Page S., Müller E., Müller I., Bergmeier W., Richter T., Lorenz M., Konrad I., Nieswandt B., Gawaz M. (2002) A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*. 196:887-896.

- Mataix J., Quiles JL., Huertas JR., Battino M., Mañas M.** (1998) Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 24:511-521.
- Mayes PA.** (1993) Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr.* 58:754-765.
- McAdam B F., Catella-Lawson F., Mardin IA., Kapoor S., Lawson JA., Itzgerald GA.** (1999) Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of Cox-2. *Proc Natl Acad Sci.* 96:272-277.
- Mekhfi H., El Haouari M., Legssyer A., Bnouham M., Aziz M., Atmani F., Remmal A., Ziyat A.** (2004) Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 94:317-322.
- Mendelsohn ME., Karas RH.** (1999) The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 340:1801-1811.
- Meshkani R., Adeli K.** (2009) Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem.* 42:1331-1346.
- Mohamedou MM., Zouirech K., El Messal M., El Kebbaj MS., Chraibi A., Adlouni A.** (2011) Argan Oil Exerts an Antiatherogenic Effect by Improving Lipids and Susceptibility of LDL to Oxidation in Type 2 Diabetes Patients. *Int J Endocrinol.* 2011:747835.
- Molina Grima E., Belarbi H., Acien Fernandez F.G., Robles Medina A., Chisti Y.** (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnological Advances.* 20:491-515.
- Moreau D., Tomasoni C., Cathrine J., Kaas R., Le Guedes R., Cadoret JP., Muller-Feuga A., Kontiza I., Vagias C., Roussis V., Roussakis C.** (2006) Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines. *Envir Toxicol Pharmacol.* 22:97-103.
- Mueller CF., Laude K., McNally JS., Harrison DG.** (2005) ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:274-278.

Muller-Feuga A. (1997) Microalgues marines : les enjeux de la recherche. Ifremer (Ed). 35 p.

-N-

Nakamura MT., Nara TY. (2004) Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr.* 24:345-376.

Nappo F., Loreto M., Giugliano G., Grella E., Esposito K., Lettieri B., Giugliano D. (2002) Elevated plasma free fatty acid concentrations do not modify cardiac repolarization in patients treated by electrolyte-glucose-insulin infusion. *J Endocrinol Invest.* 25:19-22.

NCEP (2001) Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. Executive summary of the third report on 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.

Nichols PD. (2007) fish oil sources. In Breivik (Ed.), Long chain Omega-3 Specialty Oils. The Oily Press, Bridgewater, England, pp. 23-40.

Niemoller TD, Bazan NG. (2010) Docosahexaenoic acid neurolipidomics. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 91:85-89.

Nishikawa T., Edelstein D., Du XL., Yamagishi S., Matsumura T., Kaneda Y., Yorek MA., Beebe D., Oates PJ., Hammes HP., Giardino I., Brownlee M. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 404:787-790.

Nurjhan N., Consoli A., Gerich J. (1992) Increased lipolysis and its consequences on gluconeogenesis in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 89:169-175.

-O-

Ochoa JJ., Quiles JL., Ibanez S., Martinez E., Lopez-Frias M., Huertaz JR., Mataix J. (2003) Aging-related oxidative stress depends on dietary lipid source in rat postmitotic tissue. *J Bioenerg Biomembr.* 35:267-275.

Ogihara T., Asano T., Katagiri H., Sakoda H., Anai M., Shojima N., Ono H., Fujishiro M., Kushiya A., Fukushima Y., Kikuchi M., Noguchi N., Aburatani H., Gotoh Y., Komuro I., Fujita T. (2004) Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappa B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetologia*. 47:794-805.

Ohkawa H., Ohishi N., Yagik K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 95:351-358.

Ostrakhovitch EA., Afanas'ev IB. (2001) Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators. *Biochem Pharmacol*. 62:743-746.

Oury C., Toth-Zsomboki E., Vermeylen J., Hoylaerts MF. (2006) The Platelet ATP and ADP Receptors. *Curr Pharm Des*. 12:859-875.

-P-

Paglia DE., Valentine WN. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 70:158-169.

Pagliassotti MJ., Shahrokhi KA., Moscarello M. (1994) Involvement of liver and skeletal muscle in sucrose-induced insulin resistance: dose-response studies. *Am J Physiol*. 266:1637-1644.

Palaniappan L., Carnethon MR., Wang Y., Hanley AJG., Fortmann SP., Haffner SM., Wagenknecht L. (2004) Predictors of the incident metabolic syndrome in adults: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care*. 27:788-793.

Paolisso G., Gambardella A., Tagliamonte MR., Saccomanno F., Salvatore T., Gualdiero P., D'Onofrio MV., Howard BV. (1996) Does free fatty acid infusion impair insulin action also through an increase in oxidative stress? *J Clin Endocrinol Metab*. 81:4244-4248.

Park S., Kim YW., Kim JY., Jang EC., Doh KO., Lee SK. (2001) Effect of high fat diet on insulin resistance: dietary fat versus visceral fat mass. *J Korean Med Sci*. 16:386-390.

Park YW., Zhu S., Palaniappan L., Heshka S., Carnethon MR., Heymsfield SB. (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.

Patrono C., Collier B., Dalen JE., FitzGerald GA., Fuster V., Gent M., Hirsh J., Roth G. (2001) Platelet-active drugs. The relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest.* 119:39S-63S.

Paulson DJ., Ward KM., Shug AL. (1984) Malonyl CoA inhibition of carnitine palmitoyltransferase in rat heart mitochondria. *FEBS Lett.* 176:381-384.

Pérez-Carreras M., Del Hoyo P., Martín MA., Rubio JC., Martín A., Castellano G., Colina F., Arenas J., Solis-Herruzo JA. (2003) Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 38:999-1007.

Perreault M., Marette A. (2001) Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med.* 7:1138-1143.

Peyron-Caso E., Fluteau-Nadler S., Kabir M., Guerre-Millo M., Quignard-Boulange A., Slama G., Rizkalla SW. (2002) Regulation of glucose transport and transporter 4 (GLUT-4) in muscle and adipocytes of sucrose-fed rats: effects of n-3 poly- and monounsaturated fatty acids. *Horm Metab Res.* 34:360-366.

Pignatelli P., Pulcinelli FM., Lenti L., Gazzaniga PP., Violi F. (1998) Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood.* 91:484- 490.

Plourde M., Cunnane SC. (2007) Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl Physiol Nutr Metab.* 32:619-34.

Ponis E., Parisi G., Le Coz JR., Robert R., Zitelli GC., Tredici MR. (2006a) Effect of the culture system and culture technique on biochemical characteristics of *Pavlova lutheri* and its nutritional value for *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture Nutrition.* 12:322-329.

Ponis E., Probert I., Véron B., Le Coz JR., Mathieu M., Robert R. (2006b) Nutritional value of six *Pavlovophyceae* for *Crassostrea gigas* and *Pecten maximus* Larvae. *Aquaculture*. 254:544-553.

Pratico D., Pasin M., Barry OP., Ghiselli A., Sabatino G., Iuliano L., FitzGerald GA., Violi F. (1999) Iron-dependent human platelet activation and hydroxyl radical formation: involvement of protein kinase C. *Circulation*. 99:3118-3124.

Prentki M., Corkey BE. (1996) Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes*. 45:273-283.

-Q-

Quiles JL., Huertas JR., Mañas M., Ochoa JJ., Battino M., Mataix J. (2001) Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in the rat. *J Bioenerg Biomembr*. 33:127-134.

-R-

Rådmark O., Samuelsson B. (2009) 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. *JLR*. 50: 40-45.

Ratziu V., Giral P., Charlotte F., Bruckert E., Thibault V., Theodorou I., Khalil L., Turpin G., Opolon P., Poynard T. (2000) Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology*. 118:1117-1123.

Reaven GM. (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 37:1595-1607.

Reaven GM. (2005). The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. *Annu Rev Nutr*. 25:391-406.

Reil TD., Barnard RJ. (1999) Diet-induced changes in endothelial-dependent relaxation of the rat aorta. *J Surg Res*. 85:96-100.

Renaud SM., Thinh LV., Parry DL. (1999) The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*. 170:147-159.

Reviere B. (2002) Biologie et phylogénie des algues – Tome 1. Editions Belin, Paris. 352 p.

Richard N. (2006) Effet de taux et de la nature des lipides alimentaires sur les mécanismes intervenant dans la constitution des dépôts lipidiques (transport, captage, synthèse) chez la truite arc-en-ciel et le bar. L'université de Bordeaux I. Thèse de doctorat.

Roberts CK., Nosratota D., Vaziri ND., Barnard RJ. (2002) Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability. *Circulation*. 106:2530-2532.

Robertson RP., Harmon J., Tran PO., Tanaka Y., Takahashi H. (2003) Glucose toxicity in β -cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*. 52:581-587.

Rodger W. (1991) Non-insulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *CMAJ*. 145:1571-1581.

Rodvein R., Lindon JN., Levine PH. (1976) Physiology and ultrastructure of the blood platelet following exposure to hydrogen peroxide. *Br J Haematol*. 33:19-26.

Rösen P., Nawroth PP., King G., Möller W., Tritschler HJ., 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.

Ross R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 340:115-126.

Rossi AS., Lombardo YB., Lacorte JM., Chicco AG., Rouault C., Slama G., Rizkalla SW. (2005) Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 289:486-494.

Rousseau D., Héliès-Toussaint C., Moreau D., Raederstorff D., Grynberg A. (2003)

Dietary n-3 PUFAs affect the blood pressure rise and cardiac impairments in a hyperinsulinemia rat model in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285:1294-1302.

-S-

Sakai K., Matsumoto K., Nishikawa T., Suefuji M., Nakamaru K., Hirashima

Y., Kawashima J., Shirotani T., Ichinose K., Brownlee M., Araki E. (2003) Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 300:216-222.

Sakai K., Okuyama H., Kon K., Maeda N., Sekiya M., Shiga T., Reitz RC. (1990) Effects of high alpha-linolenate and linoleate diets on erythrocyte deformability and hematological indices in rats. *Lipids.* 25:793-797.

Saltzman AG., Morse B., Whitman MM., Ivanshchenko Y., Jaye M., Felder S. (1991)

Cloning of the Human Serotonin 5-HT₂ and 5-HT_{1c} Receptor Subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 181:1469-1478.

Salvemini D., de Nucci G., Sneddon JM., Vane JR. (1989) Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation. *Br J Pharmacol.* 97:1145-1150.

Sampath H., Ntambi JM. (2005) Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Ann Rev Nutr.* 25:317-340.

Santoro SA., Zutter MM. (1995) The Alpha-2 beta-1 Integrin: A Collagen Receptor on Platelets and Other Cells. *Thromb Haemost.* 74:813-821.

Santoso S., Kunicki TJ., Kroll H., Haberbosch W., Gardemann A. (1999) Association of the Platelet Glycoprotein Ia C807 T Gene Polymorphism with Nonfatal Myocardial Infarction in Younger Patients. *Blood.* 93:2449-2453.

Satoh H., Amagase K., Ebara S., Akiba Y., Takeuchi K. (2012) Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 Both Play an Important Role in the Protection of the Duodenal Mucosa in Cats. *J Pharmacol Exp Ther.* 344:189-195.

- Savi P., Herbert JM.** (2005) Clopidogrel and ticlopidine: P2Y₁₂ adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 31:174-183.
- Schmitz G., Ecker J.** (2008) The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res.* 47:147-155.
- Scholz RW., Reddy PW., Wynn MK., Graham KS., Liken AD., Gumprich E., Reddy CC.** (1997) Free Radic. *Biol Med.* 23:815-828.
- Schrauwen P., Saris WHM., Hesselink MKC.** (2001) An alternative function for human uncoupling protein-3: protection of mitochondria against accumulation of non-esterified fatty acids inside the mitochondrial matrix. *FASEB J.* 15:2497-2502.
- Schrauwen P., Hesselink M.** (2002) UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J Exp Biol.* 205:2275-2285.
- Seibold A., Williams B., Huang ZF., Friedman J., Moore RH., Knoll BJ., Clark RB.** (2000) Localization of the sites mediating desensitization of the beta(2)-adrenergic receptor by the GRK pathway. *Mol Pharmacol.* 58:1162-1173.
- Seno T., Inoue N., Gao D., Okuda M., Sumi Y., Matsui K., Yamada S., Hirata KI., Kawashima S., Tawa R.** (2001) Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production. *Thromb Res.* 103:399-409.
- Sharma JN., Mohammed LA.** (2006) The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders: is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic targets? *Inflammopharmacology.* 14:10-16.
- Shattil SJ., Kashiwagi H., Pampori N.** (1998) Integrin Signaling: The Platelet Paradigm. *Blood.* 91:2645-2657.
- Shoelson SE., Lee J., Goldfine AB.** (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 116:1793-1801.
- Shulman GI.** (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 106:171-176.

- Simoneau JA., Kelley DE., Warden C.** (1999) Obesity and increased contractile activity influence the protein content of UCP2 in human skeletal muscle. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 23:68-71.
- Simopoulos AP.** (2001) The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence. *J Nutr.* 131:3065-3073.
- Singh D., Greenwald JE., Bianchine J., Metz EN., Sagone AL.** (1981) Evidence for the generation of hydroxyl radical during arachidonic acid metabolism by human platelets. *Am J Hematol.* 11:233-240.
- Slover HT., Lanza E.** (1979) Quantitative analysis of food fatty acids by capillarygas chromatography. *J Am Oil Chem Soc.* 56:933-943.
- Soderhjelm L., Wiese HF., Holman RT.** (1970) The role of polyunsaturated acids in human nutrition and metabolism. Progress in the chemistry of fats and other lipids. IX (4) Pergamon Press, London. 555-585 pp.
- Solinas G., Vilcu JG., Neels GK., Bandyopadhyay JL., Luo W., Naugler S., Grivennikov A., Wynshaw-Boris M., Scadeng JM.** (2007) JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab.* 6:386-397.
- Sorg O.** (2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C R Biol.* 327:649-662.
- Soslau G., Classi R., Morgan DA.** (2001) Unique Pathway of Thrombin-Induced Platelet Aggregation Mediated by Glycoprotein Ib. *J Biol Chem.* 276:21173-21183.
- Sparks LM., Xie H., Koza RA., Mynatt R., Hulver MW., Bray GA., Smith SR.** (2005) A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes.* 54:1926-1933.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A.** (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 101:87-96.

Sprecher H. (2000) Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta*. 1486:219-231.

Sreekumar R., Unnikrishnan J., Fu A., Nygren J., Short KR., Schimke J., Barazzoni R., Nair KS. (2002) Impact of high-fat diet and antioxidant supplement on mitochondrial functions and gene transcripts in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282:1055-1061.

Srividhya S., Anuradha CV. (2002) Metformin improves liver antioxidant potential in rats fed a high-fructose diet. *Asia Pac J Clin Nutr*. 11:319-322.

Steen VM., Holmsen H., Aarbakke G. (1993) The Plateletstimulating Effect of Adrenaline through Alfa 2-Adrenergic Receptors Requires Simultaneous Activation by a True Stimulatory Platelet Agonist. Evidence That Adrenaline Per Se Does Not Induce Human Platelet Activation in Vitro. *Thromb Haemost*. 70:506-513.

Stern M., Williams K., Gonzalez-Villalpando C. (2004) Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes Care*. 27:2676-2681.

Stocker R., Bowry VW., Frei B. (1991) L'ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci*. 88:1646-1650.

Sugioka K., Shimosegawa Y., Nakano M. (1987) Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett*. 210:37-39.

Sukenik A., Carmeli Y., Berner T. (1989) Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the *Eustigmatophyceae Nannochloropsis sp.* *Journal of Phycology*. 25: 686-692.

-T-

Taghibiglou C., Carpentier A., Van Iderstine SC., Chen B., Rudy D., Aiton A., Lewis GF., Adeli K. (2000) Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB

degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J Biol Chem.* 275:8416-8425.

Takahara K., Murray R., Fitzgerald GA., Fitzgerald D J. (1990) The Response to Thromboxane A₂ Analogues in Human Platelets. Discrimination of Two Binding Sites Linked to Distinct Effector Systems. *J Biol Chem.* 265:6836-6844.

Takeda H., Yano T., Shichiri M. (1992) Abnormalities in Platelets and Vascular Endothelial Cells Induced by Glycated Lipoproteins. *Internal Medicine.* 31:746-751.

Tamemoto H., Kadowaki T., Tobe K., Yagi T., Sakura H., Hayakawa T., Terauchi Y., Ueki K., Kaburagi Y., Satoh S. (1994) Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature.* 372:182-186.

Tantry US., Budaj A., Gurbel, PA. (2012). Antiplatelet therapy beyond 2012: role of personalized medicine. *Pol Arch Med Wewn.* 122:298-305.

Taskinen MR. (2003) Diabetic dislipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 46:733-749.

Taskinen MR., Kahri J., Koivisto V., Shepherd J., Packard CJ. (1992) Metabolism of HDL apolipoprotein A-I and A-II in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 35:347-356.

Thorburn AW., Storlien LH., Jenkins AB., Khouri S., Kraegen EW. (1989) Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am J Clin Nutr.* 49:1155-1163.

Thresher JS., Podolin DA., Wei Y., Mazzeo RS., Pagliassotti MJ. (2000) Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279:1334-1340.

Tiedge M., Lortz S., Drinkgern J., Lenzen S. (1997) Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes.* 46:1733-1742.

Tomaselli L. (2004) The microalgal cell. In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Richmond A. (Ed), Oxford: Blackwell Publishing, pp. 3-19.

Tonon T., Harvey D., Larson TR., Graham IA. (2003) Identification of a very long chain polyunsaturated fatty acid [Δ 4]-desaturase from the microalga *Pavlova lutheri*. *FEBS Letters*. 553:440-444.

Touati G., Brivet M., Ogier H. (2005) Inborn errors of galactose and fructose metabolism. *EMC-Pédiatrie*. 2:151-161.

-V-

Vergés B. (2005) New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabete. *Diabetes Metab*. 31:429-439.

Vergès B. (2007) Pathophysiology of dyslipidemia in patients with metabolic syndrome or type 2 diabetes mellitus. *Nutr Clin Metab*. 21:9-16.

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

Vessby B. (2003) Dietary fat, fatty acid composition in plasma and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol*. 14:15-19.

Vidal-Puig AJ., Grujic D., Zhang CY., Hagen T., Boss O., Ido Y., Szczepanik A., Wade J., Mootha V., Cortright R., Muoio DM., Lowell BB. (2000) Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem*. 275:16258-16266.

Volkman JK., Jeffrey SW., Nichols PD., Rogers GI., Garland CD. (1989) Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 128:219-240.

Von Hundelshausen P., Schmitt MMN. (2014) Platelets and their chemokines in atherosclerosis-clinical applications. *Front Physiol*. 5:294.

Voss A., Reinhart M., Sankarappa S., Sprecher H. (1991) The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid in rat liver is independent of 4-desaturase. *JBiolChem.* 266:1995-2000.

-W-

Ward OP., Singh A. (2005) Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochemistry.* 40: 3627-3652.

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

Wattanapitayakul SK., Mihm MJ., Young AP., Bauer JA. (2001) Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends Pharmacol Sci.* 22:361-368.

Wautier MP., Chappey O., Corda S., Stern DM., Schmidt AM., Wautier JL. (2001) Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280:685-694.

Weber AA., Zimmermann KC., Meyer-Kirchrath J., Schroür K. (1999) Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet.* 353(9156):900.

West DB., York B. (1998) Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am J Clin Nutr.* 67:505-512.

Westerbacka J., Yki-Järvinen H., Turpeinen A., Rissanen A., Vehkavaara S., Syrjälä M., Lassila R. (2002) Inhibition of platelet-collagen interaction. An in vivo action of insulin abolished by insulinresistance in obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:167-172.

Wheatcroft SB., Williams IL. (2003) Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med.* 20:255-268.

White JG. (1968) Effects of colchicine and Vinca alkaloids on human platelets. Influence on platelet microtubules and contractile function. *The American journal of pathology*. 53:281-291.

White JG., Krumwiede M. (2007) Some contributions of electron microscopy to knowledge of human platelets. *Thromb Haemost.* 98:69-72.

Williams CM., Burdge G. (2006) Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. *Proc Nutr Soc* 65:42-50.

Withers DJ., Gutierrez JS., Towery H., Burks DJ., Ren JM., Previs S., Zhang Y., Bernal D., Pons S., Shulman GI., Bonner-Weir S., White MF. (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. 26;391(6670):900-4.

Wolff SP., Dean RT. (1987) Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J*. 245: 243-250.

Wu L., Parhofer KG. (2014) Diabetic dyslipidemia. *Metabolism*. 63:1469-1479.

Wu D., Liu L., Meydani M., Meydani SN. (2005) Vitamin E increases production of vasodilator prostanoids in human aortic endothelial cells through opposing effects on cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. *J Nutr*. 135:1847-1853.

Wurzinger LJ. (1990) Histophysiology of the circulating platelet. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 120:1-96.

-Y-

Yan M., Dai T., Deak JC., Kyriakis JM., Zon LI., Woodgett JR., Templeton DJ. (1994) Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature*. 372(6508):798-800.

Yki-Järvinen H. (2001) Combination therapies with insulin in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 24:758– 776.

Yokozawa T., Ju Kim H., Ju Cho E. (2008) Gravinol ameliorates high-fructose-induced metabolic syndrome through regulation of lipid metabolism and proinflammatory state in rats. *J Agric Food Chem.* 56:5026–5032.

Yoshioka S., Uemura K. (2000) Dietary fat-induced increase in blood pressure and insulin resistance in rats. *J Hypertens.* 18:1857-1864.

Yu C., Chen Y., Cline GW., Zhang D., Zong H., Wang Y., Bergeron R., Kim JK., Cushman SW., Cooney GJ., Atcheson B., White MF., Kraegen EW., Shulman GI. (2002) Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem.* 277:50230-50236.

-Z-

Zafari AM., Ushio-Fukai M., Akers M., Yin Q., Shah A., Harrison DG., Taylor WR., Griendling KK. (1998) Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension.* 32:488-495.

Zhang Z., Apse K., Pang J., Stanton RC. (2000) High Glucose Inhibits Glucose-6-phosphate Dehydrogenase via cAMP in Aortic Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry.* 275:40042-40047.

