N°d'ordre NNT : 2020LYSEI034

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

Ecole Doctorale N° 205

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité : Science de la vie, biologie et santé

Discipline: Physiologie

Soutenue publiquement le 12/05/2020, par :

Marie Michèle BOULET

Lipoprotéines riches en triglycérides chez le patient diabétique de type 2: effets sur l'activation plaquettaire et profil sphingolipidomique

Devant le jury composé de :

Dr COLLET Xavier Directeur de recherche Inserm, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, *Toulouse*	**Rapporteur**
Pr VERGES Bruno Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, CHU de Dijon, *Dijon*	**Rapporteur**
Dr BOYER Constance Chef de projet, Centre national interprofessionnel de l'économie laitière, *Paris*	**Examinatrice**
Pr MALPUECH BRUGERE Corinne Professeur des Universités, Université Clermont Auvergne, *Clermont-Ferrand*	**Examinatrice**
Dr MICHALSKI Marie-Caroline Directrice de recherche INRAE, Laboratoire CarMeN, *Lyon*	**Examinatrice**
Pr MOULIN Philippe Professeur des universités-Praticien Hospitalier, Hospices Civils de Lyon, *Bron*	**Examinateur**
Dr CALZADA Catherine Chargée de recherche CNRS, Laboratoire CarMeN, *Lyon*	**Directrice de thèse**
Dr CHEILLAN David Praticien Hospitalier, Hospices Civils de Lyon, *Bron*	**Co-directeur de thèse**

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Département FEDORA – INSA Lyon - Ecoles Doctorales –Quinquennal 2016-2020

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	**CHIMIE DE LYON** http://www.edchimie-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage secretariat@edchimie-lyon.fr INSA : R. GOURDON	**M. Stéphane DANIELE** Institut de recherches sur la catalyse et l'environnement de Lyon IRCELYON-UMR 5256 Équipe CDFA 2 Avenue Albert EINSTEIN 69 626 Villeurbanne CEDEX directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	**ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE** http://edeea.ec-lyon.fr Sec. : M.C. HAVGOUDOUKIAN ecole-doctorale.eea@ec-lyon.fr	**M. Gérard SCORLETTI** École Centrale de Lyon 36 Avenue Guy DE COLLONGUE 69 134 Écully Tél : 04.72.18.60.97 Fax 04.78.43.37.17 gerard.scorletti@ec-lyon.fr
E2M2	**ÉVOLUTION, ÉCOSYSTÈME, MICROBIOLOGIE, MODÉLISATION** http://e2m2.universite-lyon.fr Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 INSA : H. CHARLES secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr	**M. Philippe NORMAND** UMR 5557 Lab. d'Ecologie Microbienne Université Claude Bernard Lyon 1 Bâtiment Mendel 43, boulevard du 11 Novembre 1918 69 622 Villeurbanne CEDEX philippe.normand@univ-lyon1.fr
EDISS	**INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ** http://www.ediss-lyon.fr Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 INSA : M. LAGARDE secretariat.ediss@univ-lyon1.fr	**Mme Sylvie RICARD-BLUM** Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) - UMR 5246 CNRS - Université Lyon 1 Bâtiment Curien - 3ème étage Nord 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69622 Villeurbanne Cedex Tel : +33(0)4 72 44 82 32 sylvie.ricard-blum@univ-lyon1.fr
INFOMATHS	**INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES** http://edinfomaths.universite-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage Tél : 04.72.43.80.46 infomaths@univ-lyon1.fr	**M. Hamamache KHEDDOUCI** Bât. Nautibus 43, Boulevard du 11 novembre 1918 69 622 Villeurbanne Cedex France Tel : 04.72.44.83.69 hamamache.kheddouci@univ-lyon1.fr
Matériaux	**MATÉRIAUX DE LYON** http://ed34.universite-lyon.fr Sec. : Stéphanie CAUVIN Tél : 04.72.43.71.70 Bât. Direction ed.materiaux@insa-lyon.fr	**M. Jean-Yves BUFFIÈRE** INSA de Lyon MATEIS - Bât. Saint-Exupéry 7 Avenue Jean CAPELLE 69 621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04.72.43.85.28 jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr
MEGA	**MÉCANIQUE, ÉNERGÉTIQUE, GÉNIE CIVIL, ACOUSTIQUE** http://edmega.universite-lyon.fr Sec. : Stéphanie CAUVIN Tél : 04.72.43.71.70 Bât. Direction mega@insa-lyon.fr	**M. Jocelyn BONJOUR** INSA de Lyon Laboratoire CETHIL Bâtiment Sadi-Carnot 9, rue de la Physique 69 621 Villeurbanne CEDEX jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr
ScSo	**ScSo*** http://ed483.univ-lyon2.fr Sec. : Véronique GUICHARD INSA : J.Y. TOUSSAINT Tél : 04.78.69.72.76 veronique.cervantes@univ-lyon2.fr	**M. Christian MONTES** Université Lyon 2 86 Rue Pasteur 69 365 Lyon CEDEX 07 christian.montes@univ-lyon2.fr

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

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

RESUME

Le diabète de type 2 (DT2) est associé à plusieurs altérations du métabolisme lipidique ainsi qu'à l'incidence de complications cardiovasculaires. L'hypertriglycéridémie (HTG), caractérisée par une augmentation de la concentration des lipoprotéines riches en triglycérides (LRT), à jeun et en postprandial, ainsi que l'hyperactivité plaquettaire sont des facteurs de risque d'athérothrombose chez les patients DT2. La composition lipidomique des lipoprotéines peut également être modifiée dans un contexte de DT2, ce qui peut, par conséquent, affecter leur fonctionnalité. Notre objectif était de déterminer l'effet des LRT de patientes DT2 à jeun et suite à un repas contenant une matière grasse de source différente (végétale vs laitière) sur l'agrégation de plaquettes saines, ainsi que de déterminer la composition lipidomique, plus particulièrement en sphingolipides (SL), des LRT.

D'abord, nous avons montré que les LRT de patients DT2 à jeun activent la voie de signalisation de l'acide arachidonique dans les plaquettes et augmentent leur concentration de thromboxane B_2 (TxB_2) et leur agrégation. Nous avons ensuite mis en place un protocole clinique en parallèle randomisé visant à étudier les effets des LRT de 30 patientes DT2 à jeun et 4h après l'ingestion d'un petit déjeuner contenant 20g de lipides de source laitière (beurre) ou végétale (pâte à tartiner cacao-noisette) sur les plaquettes et la composition en SL de ces lipoprotéines. Nous avons démontré que l'ingestion de 20g de lipides cause une augmentation des triglycérides et de l'ApoB-48 plasmatiques à 4h et modifie la composition en acides gras (AG) des LRT. De plus, les LRT isolés à jeun et en postprandial augmentent de manière similaire l'agrégation et la concentration de TxB_2 plaquettaire. Concernant la composition en SL, la consommation d'une matière grasse riche en AG saturés a augmenté les concentrations en céramides (Cer) totales des LRT, plus précisément au niveau des espèces Cer 16:0, 22:0, 24:1 et 24:0, comparativement aux concentrations à jeun. La composition en SL des LRT de DT2 à jeun est également différente de celle de volontaires saines (augmentation des sphingomyélines, gangliosides GM3, de la sphingosine-1-phosphate et de la lyso sphingomyéline).

Ces travaux mettent en évidence l'implication possible des LRT post-prandiales dans le développement de l'athérothrombose chez les patients DT2, ainsi que l'intérêt de l'étude du lipidome des lipoprotéines dans une optique de prévention des complications cardiovasculaires associées au DT2. Les mécanismes sous-tendant les effets de la composition en SL des LRT sur leur interaction avec les plaquettes restent à élucider.

Mots-clés : diabète de type 2, athérothrombose, risque cardiovasculaire, lipoprotéines riches en triglycérides, plaquettes, sphingolipides, lipidomique

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

SUMMARY

Type 2 diabetes (T2D) is associated with impaired lipid metabolism as well as higher incidence of cardiovascular complications. Hypertriglyceridemia (HTG), defined by an increase of triglyceride-rich lipoproteins (TGRL) in the fasting and postprandial states, and platelet hyperactivity are risk factors for atherothrombosis development in T2D individuals. Lipidomic composition of lipoproteins can also be modified in the context of T2D, and therefor affect their functionality. Our objective was to determine the effect of TGRL from T2D patients in the fasting state and after a breakfast containing a fat rich in saturated fatty acids (SFA) from a different source (dairy vs vegetal oil) on aggregation of healthy platelets, as well as assessing the lipidomic composition, especially of sphingolipids (SL), of TGRL.

We first showed that TGRL from fasting T2D patients activate the arachidonic acid signaling pathway in platelets and increase their thromboxane B_2 (TxB_2) concentration and aggregation. We then designed a randomized parallel clinical trial that aimed to study the effect of TGRL from thirty T2D patients in fasting state and 4h after the ingestion of a breakfast containing 20g of lipids from dairy or vegetal oil on platelets, as well as the SL composition of the particles. We showed that the ingestion of 20g of saturated lipids induce an increase in plasma TG and ApoB-48 at 4h and modify the fatty acid (FA) composition of TGRL. Moreover, TGRL isolated in the fasting and postprandial state increase platelet aggregation and TxB_2 concentration similarly. Regarding TGRL SL composition, consumption of a fat rich in SFA led to an increase in total ceramides (Cer) content in TGRL, more precisely of Cer16:0, 22:0, 24:1 and 24:0 molecular species. There are also differences in the SL composition of TGRL from fasting T2D patients compared to particles from controls (increase in sphingomyelins, GM3 gangliosides, sphingosine-1-phosphate and lyso sphingomyelin contents).

This work highlights the probable implication of TGRL in atherothrombosis development in T2D patients, as well as the relevance of studying lipoproteins lipidome to identify new strategies for the prevention of cardiovascular complications associated with T2D. The mechanisms underlying the effects of TGRL SL composition and their interaction with platelets remain to be elucidated.

***Keywords*:** type 2 diabetes, atherothrombosis, cardiovascular risk, triglyceride-rich lipoproteins, platelets, sphingolipids, lipidomics

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire **CarMeN « Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition », INSERM U1060, INRA 1397, Université Lyon 1, INSA-Lyon** (Bâtiment IMBL, 11 av. Jean Capelle, 69621 Villeurbanne, France) sous la direction du **Dr. Catherine Calzada** et du **Dr. David Cheillan**. Cette thèse a donné lieu à la rédaction d'articles scientifiques et à la présentation des communications suivantes :

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

- **Boulet MM**, Cheillan D, Di Filippo M, Buisson C, Michalski MC, Moulin P, Calzada C. Large Triglyceride-Rich Lipoproteins from fasting patients with Type 2 diabetes activate platelets. ***Diabetes and Metabolism.*** 2020, 46 : 54-60. pii: S1262-3636(19)30059-X. doi: 10.1016/j.diabet.2019.03.002.

- Le Barz M*, **Boulet MM***, Calzada C, Cheillan D, Michalski MC. Alterations of endogenous sphingolipid metabolism in cardiometabolic diseases: Towards novel therapeutic approaches. ***Biochimie***. 2020, 169: 133-143. doi: 10.1016/j.biochi.2019.10.003. *contribution équivalente des 2 auteurs.

- Florens N, Calzada C, Lemoine S, **Boulet MM**, Guillot N, Barba C, Roux J, Delolme F, Page A, Poux JM, Laville M, Moulin P, Soulère L, Guebre-Egziabher F, Juillard L, Soulage CO. Chronic kidney disease increases carbonylation of HDL and is associated with impaired antiaggregant proprieties. En révision dans le ***Journal of the American Society of Nephrology***.

COMMUNICATIONS ORALES

- **Boulet MM**, Cheillan D, Di Filippo M, Michalski MC, Moulin P, Calzada C. Triglyceride rich lipoproteins (TGRL) from type 2 diabetes patients activate platelets. ***Congrès annuel de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose***, 20-22 juin 2018, Biarritz (France).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

COMMUNICATIONS AFFICHEES DISCUTEES

- **Boulet MM**, Cheillan D, Di Filippo M, Michalski MC, Moulin P, Calzada C. Triglyceride Rich Lipoproteins from type 2 diabetic patients activate platelets. ***87th European Atherosclerosis Society Congress***, 26-29 mai 2019, Maastricht (Pays-Bas).

- **Boulet MM**, Cheillan D, Di Filippo M, Michalski MC, Moulin P, Calzada C. Activation des plaquettes sanguines par les Lipoprotéines Riches en Triglycérides (LRT) de patients diabétiques de type 2. ***Congrès annuel de la Société Francophone du Diabète***, 26-29 mars 2019, Marseille (France).

COMMUNICATIONS AFFICHEES

- **Boulet MM**, Lê QH, Langrand C, Di Filippo M, Moulin P, Calzada C. Effets des HDL2 et HDL3 de patients diabétiques de type 2 sur l'agrégation plaquettaire. ***Congrès annuel de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose***, 19-21 juin 2019, Biarritz (France).

- **Boulet MM**, Cheillan D, Di Filippo M, Michalski MC, Moulin P, Calzada C. Les Lipoprotéines Riches en Triglycérides de patients diabétiques de type 2 activent les plaquettes. ***Journée Scientifique de l'école doctorale Sciences-Santé de Lyon (EDISS)***, 11 octobre 2018, Lyon (France).

- **Boulet MM**, Cheillan D, Di Filippo M, Michalski MC, Moulin P, Calzada C. Activation des plaquettes sanguines humaines par les lipoprotéines riches en triglycérides de patients diabétiques de type 2. ***Journée Scientifique de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL)***, 23 mai 2018, Clermont-Ferrand (France).

BOURSES

- Bourse de fin de thèse de 6 mois de la **Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose (NSFA)** obtenue lors du Congrès annuel de juin 2019 à Biarritz, France.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

- Young Investigator Fellowship de l'**European Atherosclerosis Society (EAS)** pour participer au 87e Congrès annuel de mai 2019 à Maastricht, Pays-Bas.

- Bourse de voyage de la **Société Francophone de Diabète (SFD)** pour participer au Congrès annuel de mars 2019 à Marseille, France.

ACTIVITE D'ENSEIGNEMENT ET D'ENCADREMENT

- Doctorante avec **Activité Complémentaire d'Enseignement (ACE)** :

    - Unité d'Enseignement de Biologie Cellulaire de l'Université Claude Bernard Lyon 1 pour les **Travaux Pratique de Biologie Cellulaire de la Licence Science de la Vie et de la Terre** de 1ère année durant les années scolaires 2017/2018 et 2018/2019.

    - Service Commun d'Enseignement des Langues de l'Université Claude Bernard Lyon 1 pour le cours de **Compétences Linguistiques 3 Anglais** à l'automne 2018.

- Encadrement de lycéens (4) pendant 1 semaine dans le cadre du **Programme Science-Académie** de l'association Un Peu de Bon Science ! du 9 au 13 avril 2018 et du 22 au 26 avril 2019.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier chaleureusement les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail. Merci au **Pr. Bruno Vergès** et au **Dr. Xavier Collet** d'avoir accepté d'être rapporteurs, ainsi qu'à la **Pr. Corinne Malpuech-Brugère** et au **Dr. Constance Boyer** d'avoir accepté de faire partie du jury.

Ensuite, j'aimerais remercier très sincèrement mes directeurs de thèse **Dr. Catherine Calzada** et **Dr. David Cheillan** pour avoir accepté de m'encadrer et m'avoir fait confiance durant ces années au doctorat. La formation du duo encadrant-doctorant peut sembler banale, mais elle peut avoir un impact exceptionnel sur une thèse, ce qui a été le cas pour moi. Je suis profondément reconnaissante d'avoir eu un support, ainsi qu'un apport scientifique incroyable, de la part de mes directeurs. Je remercie Catherine pour sa bienveillance, sa patience envers moi, sa compréhension et sa générosité à travers toutes les étapes de ma thèse, mais également au niveau personnel. J'ai aussi beaucoup apprécié qu'elle me laisse mon autonomie et me permette de développer mes propres méthodes de travail. Je sentais que nous formions une réelle équipe ce qui m'a donné beaucoup de confiance en moi durant la réalisation de mes travaux. Je remercie aussi David pour sa grande implication dans ma thèse qui allait aussi au-delà de l'aspect scientifique à lui seul. Il est également une personne extrêmement bienveillante, avec un dynamisme, une honnêteté et un grand sens de l'entraide que j'ai beaucoup appréciés. Travailler avec Catherine et David aura certainement été une des meilleures expériences de ma vie.

Je tiens également à remercier les responsables de mon équipe d'accueil, Dr. **Marie-Caroline Michalski** et Pr. **Philippe Moulin**, ainsi que le directeur du laboratoire CarMeN Dr **Hubert Vidal**, sans qui je n'aurais pas pu réaliser mon projet de faire un doctorat en France. Merci pour votre aide dès le tout début lorsque j'ai préparé le concours de l'EDISS et tout au long de mon doctorat. J'ai beaucoup apprécié le fait que malgré vos horaires chargés, vous restez accessibles et à l'écoute de tous. J'aimerais souligner l'aide inestimable que le Pr. Moulin a apporté dans l'élaboration et la réalisation du projet clinique de ma thèse. Merci pour votre grande implication qui a permis que le projet débute rapidement et que je puisse le compléter durant ma thèse, et également pour le partage de votre grande expérience autant en recherche que pour les aspects cliniques. J'en profite également pour remercier **Taïssia Lelekov-Boissard**, qui a effectué un travail remarquable au niveau du recrutement des patientes. Je tiens aussi à remercier chaleureusement **Mathilde Di Filippo** pour son aide précieuse tout au long de ma thèse. Un énorme merci également à **Magali Pettazzoni** et toute l'équipe de la plateforme de sphingolipidomique du Centre de Biologie Est, qui ont partagé tout leur

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

savoir-faire avec moi. Merci également à l'équipe du **CRNH Rhône-Alpes** de m'avoir permis d'obtenir de précieux échantillons et d'avoir grandement contribué à la mise en place du projet clinique.

Ce parcours au doctorat n'aurait assurément pas été le même sans des personnes extraordinaires que j'ai rencontrées au laboratoire et qui sont devenues tellement plus que des collègues de travail. D'abord **Charline**, la version française de moi-même qui m'a fait découvrir l'Auvergne, je ne sais sincèrement pas comment j'aurais pu faire pour réaliser ma thèse sans elle. C'est une personne tellement bienveillante, empathique, drôle et généreuse, sur qui on peut compter sans crainte et qui fait toujours le maximum pour aider les autres. Ecrire sur l'importance que notre amitié a pour moi serait très long, alors je dirai simplement : merci infiniment d'être toi et merci à la vie de t'avoir mise sur ma route ! Ensuite, ma petite **Chloé** qui est arrivée un peu plus tard et que j'ai tout de suite adoptée, qui est aussi devenue ma travel buddy et qui est une des personnes les plus faciles à vivre que je connaisse. Merci d'avoir aussi toujours été présente pour moi, pour les fous rires jusqu'à en pleurer, et tes conseils bien sages pour une petite jeunesse! **Mélanie**, ma bretonne préférée qui est arrivée au labo durant ma dernière année, mais que j'avais croisée au Québec durant ma maîtrise. Merci pour ton écoute et tous tes conseils souvent au sujet du doctorat et aussi au niveau personnel, tes petites mimiques adorables et tes histoires de toute sorte qui m'auront bien fait rire quand j'en avais besoin. Finalement **Cécile**, qui est rentrée du Québec durant ma dernière année, merci de m'avoir rapporté un petit bout de chez moi avec toi, pour ton énergie débordante et ton positivisme, et pour toutes nos discussions. Merci à vous les filles, peu importe où je me retrouverai sur la planète vous ferez toujours partie de ma vie ! Merci aussi à **Jimmy**, mon petit Bordelais tellement expressif, le seul capable de passer un weekend avec quatre filles sans perdre patience !

Merci à **Manon**, **Charlotte**, **Delphine**, **Maxence, Marine, Pierre, Mathias, Yuri, Agathe, Camille, Anne-Esther** et **Arthur** qui étaient au labo durant ma thèse et avec qui j'ai partagé de bons moments et des rires. J'aimerais aussi remercier beaucoup d'autres personnes du labo pour leur accueil lors de mon arrivée et pour les midis passés à rire, comparer les expressions québécoises et françaises, vouloir refaire le monde et à discuter de tout et de rien: **Françoise, Armelle, Fabienne, Monique, Céline, Isabelle, Marion, Annie** et **Nicolas**. J'ai beaucoup apprécié ces moments avec vous. Un merci particulier à **Patrick** et son enthousiasme quotidien, qui m'a sauvé à plusieurs reprises des insectes, des problèmes techniques avec mon ordinateur et avec qui il est agréable de discuter. Merci aussi à mes collègues du 2^{e} : **Baptiste, Patricia, Carole, Adina, Michel G., Michel L. et Nathalie**, il était toujours agréable de vous voir et de discuter avec vous. Je remercie **Evelyne** qui a toujours été bienveillante envers moi et qui était toujours prête à m'aider et me conseiller en cas de besoin.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Merci également à **Christophe** d'avoir participé à mon CST de 2e année et pour les discussions toujours avenantes.

J'aimerais aussi remercier des personnes à l'extérieur du laboratoire, sans qui cette aventure qu'a été la thèse en France n'aurait pas été la même. D'abord mes Français, **Michael L., Eric** et **Antoine** que j'ai rencontré à mon arrivée à Lyon qui ont aussi été présents pour moi tout au long de ma thèse, mais également dans ma vie lyonnaise en général. Merci à **Marjorie**, ma française que j'ai connue à Québec et **Michael R.** que j'ai connu à Lyon et qui est maintenant à Québec ! Merci aussi à mes amies de longue date du Québec, mes Gazelles, **mes amies d'enfance** d'avoir été là pour moi et de rester présentes autant que possible, même si je suis loin. Ma petite **Catherine**, mon amie depuis 10 ans maintenant et **Alisson** qui ont fait le trajet trans-Atlantique pour venir me voir. **Audrey**, ma petite Suisse, qui me donnait un petit bout du Québec en Europe et qui est toujours partante pour un voyage de filles, sans oublier mes autres nutribuddy **Marie-Hélène** et **JP**. Merci également à **Julien** et **Edo** qui sont entrés dans ma vie récemment, mais qui sont devenus des amis précieux.

Finalement, j'aimerais remercier mes **parents** de me supporter et de m'encourager dans mes projets même lorsque cela implique que leur fille déménage à 7000 kilomètres. Merci de toujours croire en moi et d'être toujours présents.

En résumé, merci à toutes les personnes qui ont été présentes de près ou de loin durant ma thèse, autant au niveau professionnel que personnel, en France et au Québec ! ♥

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

SOMMAIRE

RESUME ... 3

SUMMARY ... 4

REMERCIEMENTS ... 8

LISTE DES ABREVIATIONS ... 16

LISTE DES TABLEAUX ... 17

LISTE DES FIGURES ... 18

AVANT-PROPOS ... 21

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE ... 25

1. **LE DIABETE DE TYPE 2** ... 26
   a. Pathophysiologie du diabète de type 2 ... 26
   b. Diabète de type 2 et risque cardiovasculaire ... 27
2. **LES LIPOPROTEINES** ... 28
   a. Généralités ... 28
   b. Le transport des lipides exogènes par les chylomicrons ... 30
      i. Composition ... 31
      ii. Métabolisme et fonction ... 32
      iii. Remnants de chylomicrons ... 32
   c. La voie de transport endogène des lipides par les VLDL ... 33
      i. Composition ... 33
      ii. Métabolisme et fonction ... 34
   d. Autres classes de lipoprotéines ... 34
      i. Les LDL ... 34
      ii. Les HDL ... 34
   e. La lipoprotéine lipase ... 35
3. **PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DYSLIPIDEMIE DIABETIQUE** ... 36
4. **VARIATION DE LA LIPEMIE POSTPRANDIALE** ... 38
   a. Physiologie ... 39
   b. Classification, structure et composition des lipides alimentaires ... 40
   c. Effet de la composition en acides gras et de la structure des triglycérides dans les lipides alimentaires sur la lipémie postprandiale ... 43
   d. Matrice alimentaire contenant les lipides ... 44
   e. Lipémie postprandiale, diabète de type 2 et risque cardiovasculaire associé ... 45
5. **COMPOSITION LIPIDIQUE DES LIPOPROTEINES RICHES EN TRIGLYCERIDES** ... 46
   a. Introduction aux sphingolipides endogènes et alimentaires ... 47
      i. Biosynthèse des sphingolipides endogènes ... 48

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

ii. Les sources de sphingolipides alimentaires 50
iii. Digestion et absorption des sphingolipides alimentaires 52
iv. Sphingolipides alimentaires et prévention des maladies 52
v. Sphingolipides et diabète de type 2 53
b. Modification de la composition lipidique des lipoprotéines dans le diabète de type 2 56
c. Impacts fonctionnels de la modification de la composition lipidique des lipoprotéines 57
6. **LES PLAQUETTES SANGUINES** 58
a. Structure 58
b. Fonctions 59
i. Adhésion 59
ii. Activation 60
iii. Agrégation 61
c. Voies de signalisation plaquettaires 61
i. Les p38 Mitogen Activated Protein Kinase 62
ii. La phospholipase A_2 cytosolique et la cascade de l'acide arachidonique 62
iii. L'activation de la protéine kinase C et l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique par la phospholipase C 63
d. Récepteurs plaquettaires aux lipoprotéines 64
i. CD36 65
ii. Scavenger receptor-B1 66
e. La dysfonction plaquettaire dans le diabète de type 2 67
f. Lipoprotéines oxydées et activation plaquettaire 69
g. Etat postprandial et activation plaquettaire 70
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS 73
MATÉRIEL ET MÉTHODES 75
1. **INTERACTIONS PLAQUETTES ET LIPOPROTEINES RICHES EN TRIGLYCERIDES** 76
a. Matériel et réactifs 76
b. Appareils 76
c. Méthodes relatives au plasma et LRT 77
i. Isolement du plasma 77
ii. Dosage des ApoB-48 et B-100 du plasma et des LRT 77
iii. Ultracentrifugation à temps court du plasma 77
iv. Dosage des protéines des LRT 78
v. Dosages des lipides du plasma et des fractions de LRT 78
vi. Mesure du diamètre des particules dans les fractions de LRT 79
d. Méthodes relatives aux plaquettes 79

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

i. Isolement ... 79
ii. Dosage des protéines ... 80
iii. Mesure de l'agrégation ... 80
iv. Dosage du thromboxane B_2 ... 80
v. Analyse par immunoblot (western-blotting) des p38 MAPK et phospholipase A_2 cytosolique phosphorylées ... 81
2. **ANALYSE DE LA COMPOSITION LIPIDIQUE DU PLASMA ET DES LIPOPROTEINES RICHES EN TRIGLYCERIDES** ... 82
a. Matériel et réactifs ... 82
b. Appareils ... 82
c. Composition en acides gras des lipides totaux des LRT ... 83
i. Extraction lipidique ... 83
ii. Transméthylation des acides gras ... 83
iii. Analyse par chromatographie en phase gazeuse ... 83
d. Composition en SL du plasma et des LRT ... 84
i. Extraction lipidique ... 84
ii. Saponification et purification sur colonnes des SL ... 84
iii. Analyse en spectrométrie de masse en tandem ... 84
e. Composition en lysoSL et bases sphingoïdes du plasma et des LRT ... 85
3. **ETUDE CLINIQUE COMposition des liPoprotéines riches en trigLycérides (LRT) et activation plaquETtaire chez la femme diabétiquE (COMPLETE)** ... 87
a. Plan de l'étude et objectif ... 87
b. Les sujets ... 87
c. Critères d'exclusion ... 88
d. Calcul de l'effectif ... 89
e. Petit déjeuner test ... 89
4. **SUJETS SAINS A JEUN DE L'ETUDE FITABLE** ... 92
a. Critères d'inclusion ... 92
b. Critères d'exclusion ... 92
5. **ANALYSE STATISTIQUE** ... 94
PARTIE 1 : Activation des plaquettes par les LRT de patients diabétiques de type 2 à jeun ... 95
1. **RESULTATS** ... 96
a. Caractéristiques des patients DT2 et des donneurs sains ... 96
b. Caractérisation des fractions LRT ... 97
c. Effets des LRT de patients DT2 sur l'agrégation plaquettaire stimulée par le collagène et la concentration de TxB_2 ... 98

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

d. Effet des LRT de patients DT2 à jeun sur l'agrégation plaquettaire stimulée par la thrombine et la concentration de TxB_2 99

e. Effet des LRT de patients DT2 à jeun sur la phosphorylation de la p38 MAPK et de la $cPLA_2$ plaquettaires 100

2. **DISCUSSION** 102

PARTIE 2 : Étude COMposition des liPoprotéines riches en trigLycérides (LRT) et activation plaquETtaire chez la femme diabétiquE (COMPLETE) 105

1. **RESULTATS** 106

a. Caractéristiques des patientes diabétiques de type 2 du protocole COMPLETE 106

b. Composition en acides gras et sphingolipides des matières grasses contenues dans les petits déjeuners expérimentaux 107

c. Caractéristiques des fractions de lipoprotéines riches en triglycérides 109

d. Effet du petit déjeuner sur les paramètres postprandiaux et la composition en acides gras totaux des LRT de patientes diabétiques de type 2 109

e. Effets des LRT postprandiales de patients diabétiques de type 2 sur les plaquettes 113

i. Agrégation plaquettaire 113

ii. Concentration de thromboxane B_2 114

f. Sphingolipidomique du plasma de patientes diabétiques de type 2 à jeun et suite à un petit déjeuner riche en matière grasse de différentes sources 116

g. Sphingolipidomique des lipoprotéines riches en triglycérides de patientes diabétiques de type 2 à jeun et suite à un petit déjeuner riche en matière grasse de différentes sources 117

2. **DISCUSSION** 125

a. Modification postprandiale des paramètres plasmatiques et de la composition des LRT 125

b. Effet des LRT postprandiales de patientes DT2 sur les fonctions plaquettaires 128

c. Composition en sphingolipides du plasma des patientes DT2 suite à la consommation d'un petit déjeuner riche en matières grasses de source différente 131

d. Composition en sphingolipides des lipoprotéines riches en triglycérides de patientes DT2 à jeun et suite à la consommation d'un petit déjeuner riche en matières grasses de source différente 132

PARTIE 3 : Sphingolipidomique du plasma et des LRT des patientes DT2 comparativement à des volontaires saines 135

1. **RESULTATS** 136

a. Caractéristiques des patientes diabétiques de type 2 de COMPLETE et des volontaires saines de FiTABlé 136

b. Composition en sphingolipides, lysoSM et bases sphingoïdes du plasma de patientes diabétiques de type 2 et de volontaires saines 137

c. Composition en sphingolipides, lysoSM et bases sphingoïdes des LRT de patientes diabétiques de type 2 et de volontaires saines 138

2. **DISCUSSION** 141

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

a. Composition en sphingolipides, lysoSM et bases sphingoïdes du plasma de patientes diabétiques de type 2 et de volontaires saines 141

b. Composition en sphingolipides, lysoSM et bases sphingoïdes des LRT de patientes diabétiques de type 2 et de volontaires saines 142

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 145

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 149

ANNEXES 174

Large Triglyceride-Rich Lipoproteins from fasting patients with Type 2 Diabetes activate platelets. 175

Alterations of endogenous sphingolipid metabolism in cardiometabolic diseases: towards novel therapeutic approaches 199

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

LISTE DES ABREVIATIONS

AA *: acide arachidonique*
ADP *: adénosine 5'-diphosphate*
AG *: acide gras*
AGMI *: acides gras monoinsaturés*
AGPI *: acides gras polyinsaturés*
AGS *: acides gras saturés*
Akt/PKB *: protéine kinase B*
ApoA-I *: apoliporotéine A-I*
ApoB-100 *: apolipoprotéine B-100*
ApoB-48 *: apolipoprotéine B-48*
Cer *: céramides*
CETP *: cholesteryl ester transfer protein*
CM : *chylomicrons*
COX *: cyclooxygénase*
cPLA$_2$ *: phospholipase A$_2$ cytosolique*
CRNH-RA *: Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes*
DAG *: diacylglycérol*
DS *: donneurs sains*
DT2 *: diabète de type 2*
EC *: esters de cholestérol*
EFS *Etablissement Français du Sang*
ERK *: extracellular signal-regulated kinases*
FPI *: forfait de prestations intermédiaires*
GLP-1 *: glucagon-like peptide 1*
GM3 *: monosialodihexosylganglioside 3*
HbA1c : *hémoglobine glyquée*
HDL *high density lipoproteins*
HSPG *: heparan sulphate-proteoglycans*
IDL *: intermediate density lipoproteins*
IP3 *: inositol triphosphate*
JNK *: Jun kinase*
LC-MS/MS *: chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem*
LDL *: low density lipoproteins*
LDLr *: récepteur aux LDL*
LPL *: lipoprotéine lipase*
LRT *: lipoprotéines riches en triglycérides*
MAPK *: Mitogen Activated Protein Kinase*
MG *: matière grasse*
MTTP *: microsomal triglyceride transfer protein*
OMS : *Organisation Mondiale de la Santé*
oxLDL *: LDL oxydées*
PAR *: protease-activated receptor*
PC *: phosphatidylcholine*
PE *: phosphatidyléthanolamine*
PG *: prostaglandines*
PGHS *: prostaglandine G/H synthase*
PI *: phosphatidylinositol*
PKC *: protéine kinase C*
PL *: phospholipides*
PLA$_2$ *: phospholipases A$_2$*
PLC *: phospholipase C*
PP *: postprandial*
PPP *plasma pauvre en plaquettes*
PRP *plasma riche en plaquettes*
PS *: phosphatidylsérine*
PTC *: pâte à tartiner cacao-noisette*
RE : *réticulum endoplasmique*
S1P *: sphingosine-1-phosphate*
SFC *: solid fat content*
SL *: SL*
SM *: sphingomyéline*
Spho *: sphingosine*
SPT *: sérine palmitoyltransférase*
SR-BI *: récepteur « scavenger » de type I de classe B*
TG : *triglycérides*
TLR *: récepteurs toll-like*
TxA$_2$ *: thromboxane A$_2$*
TxB$_2$ *: thromboxane B$_2$*
VLDL *: very low density lipoproteins*
VS *: volontaires saines*
vWF *: facteur von Willebrand*

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: RESUME SUCCINCT DES FACTEURS DE RISQUE DE MALADIES CARDIOVASCULAIRES DANS LA POPULATION DIABETIQUE 28

TABLEAU 2: RESUME DES MODIFICATIONS PRINCIPALES DES LIPOPROTEINES DANS LE DIABETE DE TYPE 2 38

TABLEAU 3: FACTEURS INFLUENÇANT LA LIPEMIE POSTPRANDIALE 40

TABLEAU 4: DISTRIBUTION DES PRINCIPALES CLASSES DE LIPIDES ET DE SL PARMI LES LIPOPROTEINES 47

TABLEAU 5: CONTENU EN SPHINGOLIPIDES TOTAUX DE CERTAINS ALIMENTS 50

TABLEAU 6: SOURCES ALIMENTAIRES DE CERTAINES CLASSES DE SPHINGOLIPIDES 51

TABLEAU 7: LES PRINCIPAUX RECEPTEURS MEMBRANAIRES PLAQUETTAIRES IMPLIQUES DANS LE PROCESSUS D'AGREGATION 60

TABLEAU 8: PETIT DEJEUNER A BASE DE MATIERE GRASSE VEGETALE (HUILE DE PALME) 90

TABLEAU 9: PETIT DEJEUNER A BASE DE MATIERE GRASSE LAITIERE (BEURRE) 90

TABLEAU 10: PARAMETRES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES DES SUJETS 97

TABLEAU 11: CARACTERISTIQUES DU PLASMA ET DES FRACTIONS LRT DES PATIENTS DT2 97

TABLEAU 12: CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES DES PATIENTES DIABETIQUES DE TYPE 2 DE L'ETUDE COMPLETE 107

TABLEAU 13: COMPOSITION EN ACIDES GRAS TOTAUX DE LA PATE A TARTINER CACAO-NOISETTE ET DU BEURRE 108

TABLEAU 14: COMPOSITION EN SPHINGOLIPIDES DE LA PATE A TARTINER CACAO-NOISETTE ET DU BEURRE 108

TABLEAU 15: COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES LRT A JEUN ET 4 HEURES APRES L'INGESTION DES PETITS DEJEUNERS EXPERIMENTAUX 112

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: RESUME DU CONTEXTE ET DES OBJECTIFS DE L'ETUDE 23

FIGURE 2: PATHOPHYSIOLOGIE DU DIABETE DE TYPE 2 26

FIGURE 3: DENSITE ET TAILLE DES DIFFERENTES CLASSES DE LIPOPROTEINES 29

FIGURE 4: METABOLISME NORMAL DES LIPOPROTEINES 30

FIGURE 5: MOLECULES DE TRIGLYCERIDE ET DE PHOSPHOLIPIDE (PHOSPHATIDYLCHOLINE) 41

FIGURE 6: EXEMPLES DE MOLECULES D'ACIDES GRAS CLASSIFIEES EN FONCTION DE LEUR INSATURATION 42

FIGURE 7: METABOLISME PARTIEL DES SPHINGOLIPIDES 49

FIGURE 8: VOIES DE SIGNALISATION D'ACTIVATION PLAQUETTAIRE 64

FIGURE 9: FACTEURS IMPLIQUES DANS L'HYPERACTIVITE PLAQUETTAIRE CHEZ LES INDIVIDUS DIABETIQUES DE TYPE 2 . 68

FIGURE 10: EXEMPLE DE CHROMATOGRAMME D'UN ECHANTILLON D'ETALON DE LYSOSPHINGOLIPIDES 86

FIGURE 11: DESIGN DU PROTOCOLE CLINIQUE COMPLETE 91

FIGURE 12: L'AGREGATION ET LA CONCENTRATION DE TxB_2 DE PLAQUETTES STIMULEES PAR LE COLLAGENE SONT AUGMENTEES PAR LES LRT DE PATIENTS DT2. 99

FIGURE 13: L'AGREGATION ET LA CONCENTRATION DE TXB2 DANS DES PLAQUETTES STIMULEES PAR LA THROMBINE SONT AUGMENTEES PAR LES LRT DE PATIENTS DT2 100

FIGURE 14: LES LRT DE PATIENTS DT2 A JEUN ACTIVENT DE LA VOIE DE SIGNALISATION DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE DANS DES PLAQUETTES STIMULEES PAR LA THROMBINE 101

FIGURE 15: EFFET DE LA CONSOMMATION D'UN PETIT DEJEUNER RICHE EN MG SUR L'APOB-48 ET LES TG PLASMATIQUES 110

FIGURE 16: EFFET DE LA CONSOMMATION D'UN PETIT DEJEUNER RICHE EN MG SUR LES CONCENTRATIONS EN TG ET LE DIAMETRE DES LRT 111

FIGURE 17: MODIFICATION DE LA COMPOSITION EN CATEGORIES D'ACIDES GRAS DES LRT DE PATIENTES DT2 SUITE A LA CONSOMMATION DE PETITS DEJEUNERS RICHES EN MATIERES GRASSES DE DIFFERENTES SOURCES 112

FIGURE 18: L'AGREGATION PLAQUETTAIRE EST STIMULEE PAR LES LRT A JEUN ET EN POSTPRANDIAL CHEZ DES PATIENTES DT2 114

FIGURE 19: LA CONCENTRATION DE TxB_2 PLAQUETTAIRE EST AUGMENTEE PAR LES LRT DE PATIENTS DT2 A JEUN ET SUITE A UN PETIT DEJEUNER RICHE EN MG DE DIFFERENTES SOURCES 115

FIGURE 20: CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE CERAMIDES, SPHINGOMYELINES, GM3, SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE, LYSOSPHINGOMYELINE, SPHINGANINE ET SPHINGOSINE CHEZ LES PATIENTES DT2 A JEUN ET 4H APRES LA CONSOMMATION D'UN PETIT DEJEUNER RICHE EN MG DE SOURCE DIFFERENTE 117

FIGURE 21: CONCENTRATIONS DES CERAMIDES, SPHINGOMYELINES ET GM3 TOTAUX DES LRT DE PATIENTES DT2 A JEUN ET 4H APRES UN PETIT DEJEUNER RICHE EN MG DE DIFFERENTES SOURCES 118

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

FIGURE 22: CONCENTRATIONS DES ESPECES MOLECULAIRES DES CERAMIDES, SPHINGOMYELINES ET GM3 DES LRT DE PATIENTES DT2 A JEUN ET 4H APRES UN PETIT DEJEUNER RICHE EN MG DE DIFFERENTE SOURCE 120

FIGURE 23: CONCENTRATIONS DES CERAMIDES, SPHINGOMYELINES ET GM3 TOTAUX DES LRT DE PATIENTES DT2 A JEUN ET 4H APRES UN PETIT DEJEUNER RICHE EN MG DE DIFFERENTE SOURCE 121

FIGURE 24: CONCENTRATIONS DES ESPECES MOLECULAIRES DES CERAMIDES, SPHINGOMYELINES ET GM3 DES LRT DE PATIENTES DT2 A JEUN ET 4H APRES UN PETIT DEJEUNER RICHE EN MG DE DIFFERENTE SOURCE 123

FIGURE 25: CONCENTRATIONS DE LA S1P, LYSOSM, SPHA ET SPHO RAPPORTEES AU PLASMA ET A LA QUANTITE DE PROTEINES TOTALES DES LRT DE PATIENTES DT2 A JEUN ET 4H APRES UN PETIT DEJEUNER RICHE EN MG DE DIFFERENTE SOURCE 124

FIGURE 26: CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE SPHINGOLIPIDES, LYSOSPHINGOMYELINE ET BASES SPHINGOÏDES CHEZ LES PATIENTES DT2 ET LES VOLONTAIRES SAINES 137

FIGURE 27: CONCENTRATIONS DES ESPECES MOLECULAIRES DES CERAMIDES, SPHINGOMYELINES ET GM3 PLASMATIQUES DES PATIENTES DIABETIQUES DE TYPE 2 ET DES VOLONTAIRES SAINES 138

FIGURE 28: CONCENTRATIONS DE SPHINGOLIPIDES, LYSOSPHINGOMYELINE ET BASES SPHINGOÏDES DANS LES LRT DES PATIENTES DT2 ET DES VOLONTAIRES SAINES 139

FIGURE 29: CONCENTRATIONS DES ESPECES MOLECULAIRES DES CERAMIDES, SPHINGOMYELINES ET GM3 DANS LES LRT DES PATIENTES DIABETIQUES DE TYPE 2 ET DES VOLONTAIRES SAINES 140

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

AVANT-PROPOS

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Le diabète de type 2 (DT2) est une problématique de santé publique mondiale. En effet, cette maladie chronique a longtemps été associée au mode de vie occidental dans les pays industrialisés de l'Europe et de l'Amérique du Nord, cependant, la prévalence du DT2 a explosé dans les pays émergents, et dépasse maintenant celle des pays industrialisés (Federation 2019). De plus, un aspect également inquiétant de la croissance rapide de la prévalence du DT2 dans le monde est l'apparition de la maladie dans des populations de plus en plus jeunes, soit chez les enfants, les adolescents et les jeunes adultes (Maffi and Secchi 2017). Le DT2 est une maladie extrêmement complexe et son expansion mondiale peut s'expliquer par de nombreux facteurs inter-reliés (biologiques, environnementaux, sociaux-économiques, entres autres), qui ne sont pas tous bien compris encore à ce jour.

En plus de la perturbation du métabolisme glucidique au niveau des principaux organes insulino-sensibles (pancréas, foie, muscles, tissu adipeux), les individus DT2 présentent une panoplie d'autres altérations métaboliques qui touchent particulièrement les systèmes rénal et cardiovasculaire, autant au niveau macro que microvasculaire. En effet, le risque de complications cardiovasculaires variées telles que l'accident vasculaire-cérébral, l'infarctus du myocarde, en passant par la maladie coronarienne, l'athérosclérose et l'athérothrombose est augmenté dans cette population comparativement aux individus non-diabétiques. Mes travaux de thèse portent donc plus particulièrement sur les mécanismes impliqués dans le développement de l'athérothrombose chez les patients DT2. Il est reconnu depuis longtemps que l'hypertriglycéridémie (HTG) à jeun est un facteur de risque cardiovasculaire, mais au cours des dernières années, l'HTG postprandiale a émergé comme un facteur de risque indépendant des maladies cardiovasculaires (Bansal et al. 2007). De plus, il est connu que les plaquettes des individus DT2 sont hyperactives, donc plus sensibles aux stimuli qui provoqueraient leur agrégation (D'Angelo et al. 1984). Des travaux précédemment effectués au sein de notre laboratoire ont permis de démontrer que les LDL de patients DT2 stimulent l'agrégation plaquettaire alors que les HDL l'inhibent (Colas et al. 2011; Le et al. 2015) . De plus, des changements de composition lipidique de ces particules contribueraient à modifier leurs effets fonctionnels.

Dans ce contexte, l'objectif principal de mes travaux de thèse était de déterminer les effets des lipoprotéines riches en triglycérides (LRT) de patients DT2 avant et après un repas à base de matière grasse (MG) saturée de différentes sources (laitière vs végétale) sur l'activation et l'agrégation plaquettaires. L'objectif secondaire était de déterminer la composition lipidomique du plasma et des LRT des patients DT2, plus particulièrement la composition en acides gras (AG) et en sphingolipides (SL). Les objectifs de cette thèse sont illustrés dans la **Figure 1**.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

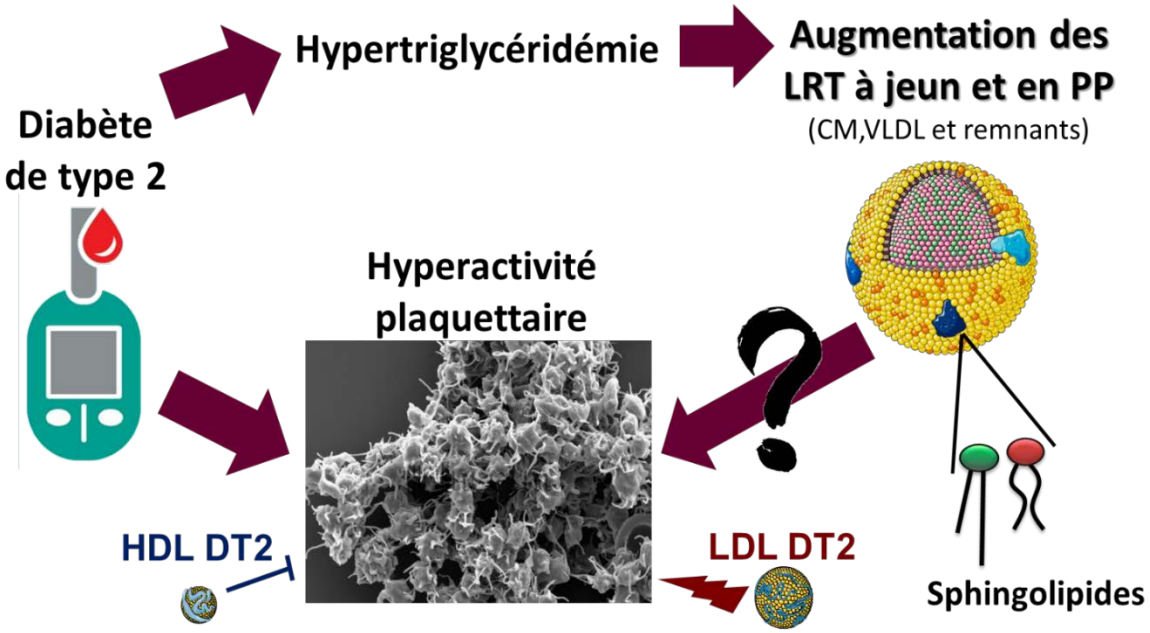


Figure 1: Résumé du contexte et des objectifs de l'étude
CM : chylomicrons, DT2: diabète de type 2, LRT : lipoprotéines riches en triglycérides, PP : postprandial, VLDL : very low density lipoproteins.

Afin de répondre à ces objectifs, la première partie de ce manuscrit est une revue bibliographique qui introduira les liens entre la physiopathologie du diabète, la perturbation du métabolisme lipidique, les lipoprotéines, la biologie cellulaire des plaquettes et le métabolisme des SL. Le travail expérimental ainsi que le protocole clinique mis en place seront décrits dans la deuxième partie. La troisième partie contiendra les résultats et la discussion de ceux-ci et sera divisée en trois sections : une sur l'effet des LRT de patients DT2 à jeun sur les plaquettes et les mécanismes moléculaires impliqués, la seconde sur le protocole clinique et la troisième sur la sphingolipidomique du plasma et des LRT. La quatrième et dernière partie contiendra les conclusions tirées de ces travaux ainsi que des pistes de perspectives.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

1.LE DIABETE DE TYPE 2

a. Pathophysiologie du diabète de type 2

Le diabète est une maladie chronique caractérisée par une production insuffisante d'insuline par le pancréas et/ou un phénomène de résistance à l'insuline entraînant l'augmentation du glucose sanguin, ce qui peut provoquer des complications à court et à long terme (OMS 2018). Il existe différents types de diabète dont la pathophysiologie est distincte, les principaux étant les types 1 et 2 et le diabète gestationnel. Le type 1, qui représente 5-10% de la population diabétique, est une maladie auto-immune, où les cellules bêta du pancréas productrices d'insuline sont détruites, et qui nécessitera l'administration d'insuline de source exogène. Le diabète gestationnel peut apparaître durant le 2^{e} ou 3^{e} trimestre de la grossesse et est déclaré lorsque le taux de glucose sanguin est supérieur à la normale (INSERM 2019). Finalement, le DT2, qui représenterait au moins 90% des cas de diabète, est une maladie hétérogène causée par de nombreux facteurs génétiques et environnementaux, dont l'incidence est fortement associée à la présence d'un surpoids ou d'une obésité, particulièrement au niveau abdominal. Le DT2 est caractérisé par une augmentation progressive de la concentration de glucose plasmatique causée par un défaut de sécrétion d'insuline combiné à une action de l'insuline altérée (Scheen 2003) (**Figure 2**). En effet, cette hyperglycémie implique un dysfonctionnement des cellules bêta du pancréas productrices d'insuline ainsi qu'une diminution de la sensibilité à l'insuline (appelée résistance à l'insuline) de nombreux tissus tels que le muscle, le foie et le tissu adipeux.

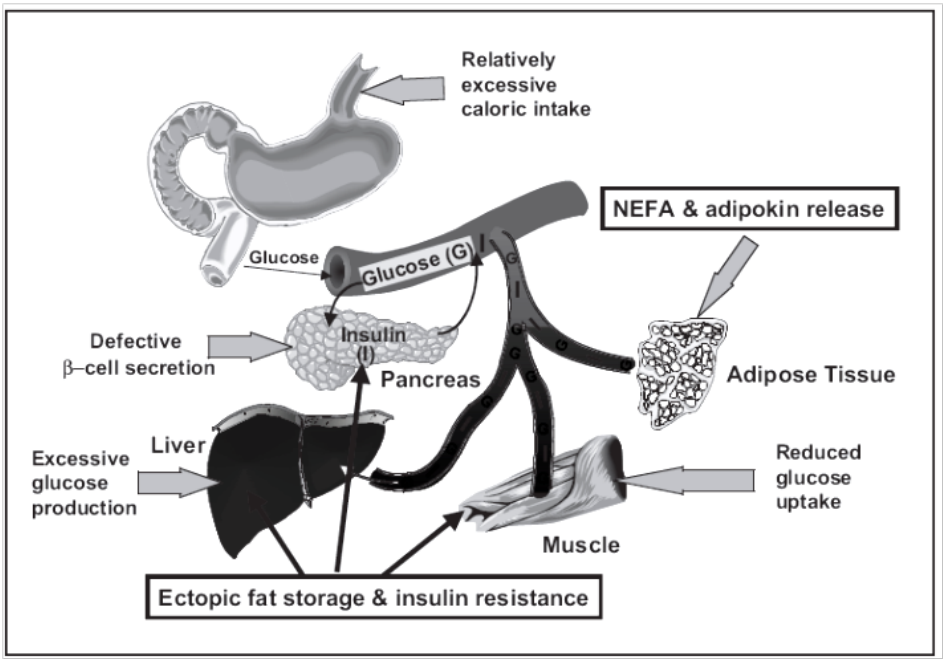


Figure 2: Pathophysiologie du diabète de type 2
Tirée de (Scheen 2003). NEFA : Non-esterified fatty acids

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Selon l'*American Diabetes Association* les critères diagnostiques du DT2 sont les suivants :

- Une hémoglobine glyquée (HbA1c) ≥6,5% suite à un test en laboratoire avec la méthode certifiée par le « *National Glycohemoglobin Standardization Program*» (NGSP) et standardisée selon les normes du «*Diabetes Control and Complications Trial*»(DCCT).

  OU
- Une glycémie à jeun (aucun apport calorique depuis au moins 8h) ≥7 mmol/L (1,26 g/L).

  OU
- Une glycémie postprandiale de ≥11,1 mmol/L (2,0 g/L), 2 heures suite à une charge orale de 75 grammes de glucose (OGTT) selon les critères de l'OMS.

  OU
- Chez un patient présentant les symptômes classiques d'hyperglycémie ou en crise hyperglycémique, un test aléatoire de glucose sanguin ≥11,1 mmol/L (2,0 g/L).
- En l'absence d'une hyperglycémie sans équivoque, les tests doivent être répétés pour confirmer le résultat.

Le DT2 est une maladie très étudiée, mais les mécanismes moléculaires impliqués dans sa pathophysiologie ne sont pas tous élucidés à ce jour. De plus, il est associé à de nombreuses complications macro et micro vasculaires, cardio-cérébrovasculaires, rénales, etc.

b. Diabète de type 2 et risque cardiovasculaire

Le DT2 représente un enjeu de santé publique majeur, puisqu'il est estimé que sa prévalence dans le monde a doublé dans les 20 dernières années. En effet, en 2015 la Fédération Internationale du Diabète estimait que la prévalence mondiale du diabète était de 415 millions (8,8% de la population) desquels 91% étaient atteints du diabète de type 2. Cette augmentation rapide et importante a également un coût substantiel pour le système de santé dans le monde, puisqu'il était estimé en 2010 que les coûts associés au DT2 étaient de 376 milliards de dollars américains, ce qui représente 12% des dépenses totales en santé (Herman 2017). Une des causes du coût faramineux du DT2 pour le système de santé est qu'il est associé à de nombreuses complications, particulièrement au niveau cardiovasculaire. En effet, les individus DT2 ont 2 à 4 fois plus de risques de développer des maladies vasculaires cérébrales, coronariennes et périphériques et il a été estimé qu'environ 32% des DT2 ont une maladie cardiovasculaire (Einarson et al. 2018). Les maladies cardiovasculaires sont aussi déclarées comme la première cause de mortalité dans cette population (Haffner et al. 1998; Einarson et al. 2018). De plus, il a été démontré que le risque cardiovasculaire relatif associé au diabète est plus élevé chez la femme que chez l'homme comparativement à des individus sans diabète (Norhammar and Schenck-Gustafsson 2013; Al-Salameh et al. 2019). Le lien

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

entre le DT2 et le développement des maladies cardiovasculaires est donc complexe et englobe de nombreux facteurs de risques indiqués dans le **Tableau 1**.

Tableau 1: Résumé succinct des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires dans la population diabétique
Adapté de (Martín-Timón et al. 2014)

Traditionnels	Dyslipidémie Hypertension Obésité/obésité abdominale Sédentarité Tabagisme
Non traditionnels	Résistance à l'insuline/Hyperinsulinémie Hyperglycémie postprandiale Variabilité de la glycémie Microalbuminurie Facteurs hématologiques et thrombogéniques : – Hyperactivation plaquettaire – Fibrinolyse diminuée : réduction de l'activateur tissulaire du plasminogène/augmentation de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1)) – Augmentation du fibrinogène Inflammation à bas bruit : – Protéine C-réactive ultrasensible augmentée Homocystéine et vitamines : – Homocystéine augmentée – Vitamines B9, B12 diminuées – Présence d'une déficience en vitamine D Dysfonction érectile Génétique et épigénétique : – Polymorphismes de l'haptoglobine – Polymorphismes du gène de l'apolipoprotéine E – Facteurs génétiques impliqués dans la surproduction d'apolipoprotéine C-III – Acétylation et méthylation de l'ADN

2.LES LIPOPROTEINES

a. Généralités

Les lipoprotéines sont des complexes sphériques hydrosolubles dont la fonction est le transport dans la circulation des lipides, qui sont des molécules insolubles dans les milieux biologiques. Elles sont donc formées de lipides, mais aussi d'apolipoprotéines, qui ont plusieurs fonctions essentielles dans la synthèse et le métabolisme des lipoprotéines. De plus, les apolipoprotéines contribuent au maintien de la structure, agissent comme des ligands, régulent la

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

formation des particules et activent ou inhibent des enzymes du métabolisme des lipoprotéines. La structure générale est organisée de manière similaire dans toutes les classes de lipoprotéines : des lipides neutres (des TG et du cholestérol estérifié) dans leur centre, entourés par une monocouche externe comprenant les apolipoprotéines et des lipides amphiphiles (surtout les phospholipides (PL) et le cholestérol non-estérifié ainsi que des SL) (Ana Jonas 2008).

Les lipoprotéines sont catégorisées en 5 classes en fonction de leur densité lorsqu'elles sont séparées par ultracentrifugation, qui est la méthode de référence pour les isoler du plasma : les chylomicrons (CM), les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines de basse densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL). De plus, leur diamètre est inversement corrélé à leur densité et peut varier de 5 à 1200 nanomètres (Feingold and Grunfeld 2000) (**Figure 3**).

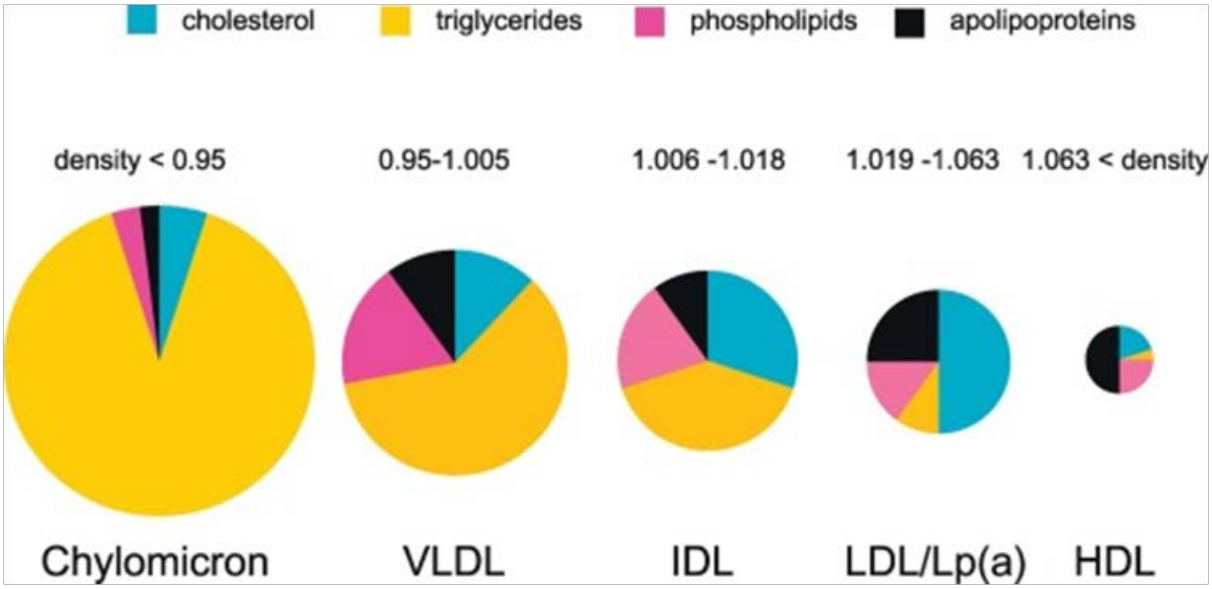


Figure 3: Densité et taille des différentes classes de lipoprotéines
Tirée de (Tada et al. 2019)

De manière générale, chaque classe de lipoprotéines a une fonction particulière : les CM, qui sont les plus grosses particules, sont synthétisés par l'intestin suite à l'ingestion de matières grasses et transportent majoritairement des triglycérides alimentaires aux tissus. Les VLDL quant à elles sont synthétisées par le foie pour effectuer le transport des triglycérides endogènes. Ensuite, les IDL sont issues de l'hydrolyse des VLDL et ne sont présentes dans la circulation que de manière très transitoire et seront converties en LDL. Ces dernières sont responsables du transport des esters de cholestérol au foie et aux autres tissus. Finalement, les HDL sont soit synthétisées et assemblées par le foie et l'intestin, mais elles peuvent également être issues de l'hydrolyse d'autres lipoprotéines en circulation ou des lipides des membranes cellulaires. Leur fonction principale est le transport inverse

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

du cholestérol, c'est-à-dire de récupérer l'excès de cholestérol dans les cellules pour le rapporter dans le foie afin qu'il soit métabolisé et excrété. Les lipoprotéines, dont le métabolisme est illustré dans la **Figure 4**, sont donc des particules très dynamiques qui interagissent avec de nombreux autres constituants de la circulation sanguine (Ana Jonas 2008). Les sections suivantes traiteront du transport des lipides exogènes (alimentaires) et endogènes par les CM et les VLDL, les classes de lipoprotéines comprises dans les LRT).

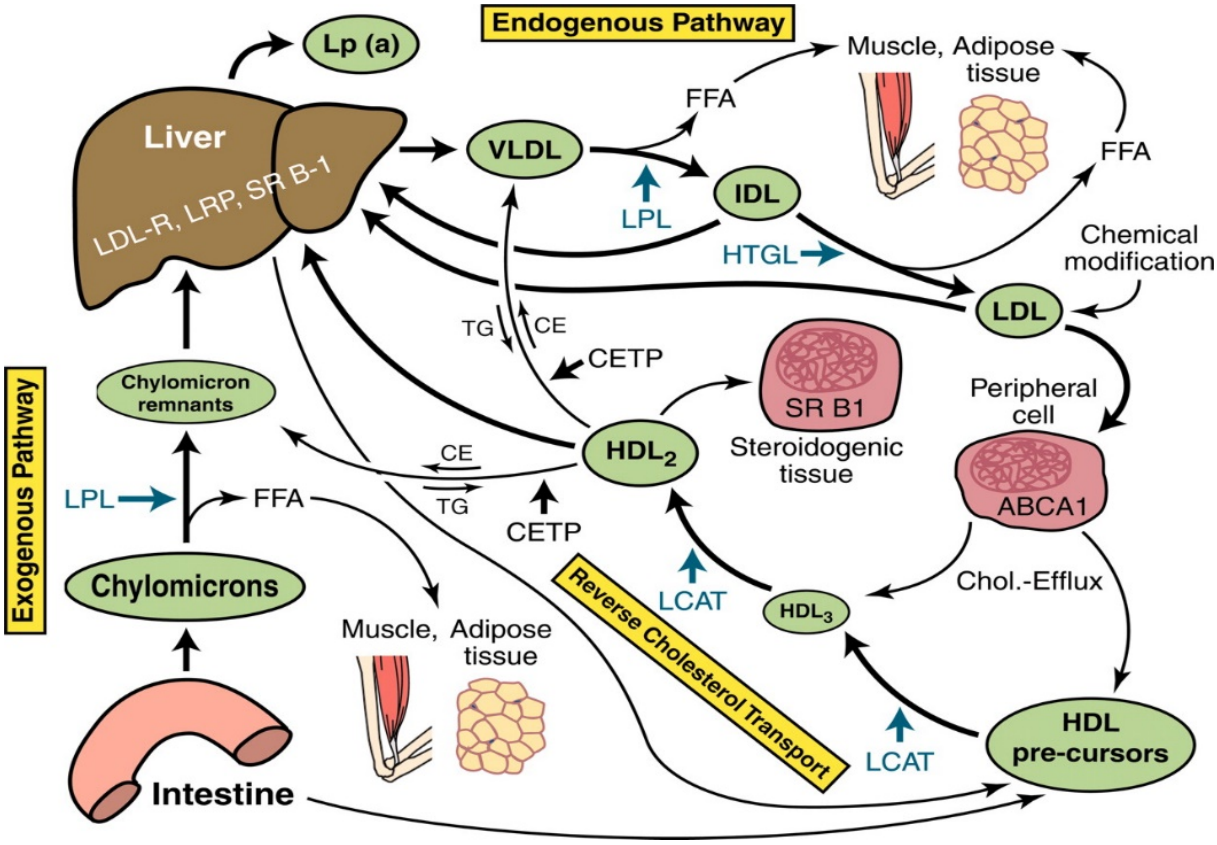


Figure 4: Métabolisme normal des lipoprotéines
Tirée de (Kwan et al. 2007). ABCA1, ATP binding cassette transporter 1; CE, cholesterol ester; CETP, cholesteryl ester transfer protein; FFA, free fatty acid; HTGL, hepatic triglyceride lipase; IDL, intermediate-density lipoprotein; LCAT, lecithin cholesterol acyltransferase; LDL-R, LDL receptor; Lp(a), lipoprotein(a); LPL, lipoprotein lipase; LRP, LDL-R–related protein; SRB1, scavenger receptor B1; TG, triglyceride.

b. Le transport des lipides exogènes par les chylomicrons

Cette voie débute avec la synthèse des CM et se produit principalement dans la partie jéjunale de l'intestin. Il a été démontré que la sécrétion de CM pauvres en lipides par les entérocytes se produit à l'état basal (Hayashi et al. 1990). La synthèse de particules enrichies en lipides est associée à la consommation de matières grasses qui sont majoritairement des triglycérides (TG), des phospholipides (PL) et du cholestérol. Ces lipides ne peuvent pas être absorbés tels quels par les

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

entérocytes et doivent d'abord être émulsifiés en fines gouttelettes lipidiques et hydrolysés par des lipases, ce qui produit du monoacyglycérol, du cholestérol libre, des lysoPL et des AG libres. Dans les entérocytes, les AG à chaînes courtes et moyennes sont sécrétés directement dans la veine porte et les AG à chaînes longues (longueur de chaîne >12 carbones) sont alors ré-estérifiés afin d'être assemblés en CM (van Greevenbroek and de Bruin 1998). L'acteur principal de l'assemblage des CM est l'apolipoprotéine B-48 (ApoB-48), qui est la seule ApoB synthétisée par l'intestin. Elle est produite par la troncation de l'ApoB-100, produite par le foie, dans laquelle un codon stop prématuré est inséré suite à un changement post-transcriptionnel induit par Apobec-1, et représente donc 48% de l'ApoB-100 (Anant and Davidson 2001). L'assemblage débutant par la formation de préCM, est réalisé dans le réticulum endoplasmique (RE) des entérocytes et se produit en deux étapes principales. D'abord, une portion de particule dense contenant l'ApoB-48, des phospholipides, du cholestérol ainsi qu'une petite quantité de TG et d'EC est produite et doit se déplacer de la membrane du RE jusque dans la lumière où elle pourra fusionner avec l'autre partie riche en TG et en EC et pauvre en protéines (Dash et al. 2015). En plus d'être dépendante de la quantité de TG ingérée, cette étape de l'assemblage des CM est également associée à la disponibilité de la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTTP) qui est une protéine du RE. La MTTP transfert les lipides à l'ApoB naissante et peut aussi interagir de manière physique avec l'ApoB (Hussain et al. 2012) pour l'aider à se placer dans une configuration structurale idéale pour accepter une quantité optimale de lipides (Jiang et al. 2008). La MTTP permet aussi d'augmenter le temps d'interaction entre l'ApoB-48 et les lipides avant sa dégradation (Jiang et al. 2008). Ensuite, les préCM sont transportés par des vésicules de transport de protéines vers la face *cis* de l'appareil de Golgi. Une fois entrés dans la lumière du Golgi, l'ApoA-I est incorporée dans les préCM (Siddiqi et al. 2006) et l'ApoB-48 est glycosylée (Berriot-Varoqueaux et al. 2001) pour terminer la formation du CM. Les particules doivent quitter l'appareil de Golgi, par contre peu d'information sont disponibles sur ce mécanisme, mais il est possible qu'elles soient transportées par des vésicules jusqu'à la membrane basolatérale de l'entérocytes (Xiao, Stahel, and Lewis 2019). La fusion de ces vésicules avec la membrane permet la libération des CM hors des cellules dans la lymphe mésentérique et leur transport jusqu'au conduit thoracique où ils pourront finalement atteindre la circulation via la veine sous-clavière (van Greevenbroek and de Bruin 1998).

i. Composition

Les CM sont les particules les plus grosses ayant la densité la plus faible (<0,930 g/ml). Ils contiennent plusieurs apolipoprotéines (A-I, A-II, A-IV, A-V, B-48, C-II, C-III et E), mais c'est l'ApoB-48 qui est la plus abondante et la plus importante pour leur structure et chaque particule n'en contient qu'une seule. De plus, la taille des CM est dépendante de la quantité de lipides ingérés et peut varier

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

de 75 à plus de 1000 nanomètres. Il est estimé que les CM contiennent 85-92% de TG, 6 à 12% de PL, 1 à 3% de cholestérol et 1 à 2% de protéines.

ii. Métabolisme et fonction

Lorsqu'ils sont sécrétés dans la circulation sanguine, les TG des CM sont rapidement hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) plasmatique en glycérol et en AG. En effet, ils ont une demi-vie estimée de seulement 4-6 minutes (Grundy and Mok 1976). Leur hydrolyse produit également des particules de plus petites tailles et riches en cholestérol appelés remnants de CM, de même que le transfert de certains constituants de leur surface, tels que des PL, du cholestérol et des apolipoprotéines, vers les HDL. Donc, le résultat de la voie de transport des lipides exogènes est le transfert des AG alimentaires aux muscles et au tissu adipeux, soit pour leur utilisation comme source d'énergie ou pour leur stockage. Le cholestérol quant à lui est récupéré par le foie pour être utilisé pour la fabrication des VLDL et des acides biliaires ou pour son retour à l'intestin via sa sécrétion dans la bile (Feingold and Grunfeld 2000).

iii. Remnants de chylomicrons

Concernant les remnants de CM, il existe beaucoup moins de données sur leur composition et leur métabolisme chez l'humain que pour les CM et les VLDL, possiblement parce qu'il est difficile de les isoler et de les marquer. Malgré cela, une étude a pu déterminer que le temps de clairance des remnants chez des sujets normolipidiques est de 18,8 minutes (Berr 1992). Comparativement aux CM, les remnants sont enrichis en cholestérol et sont considérés comme ayant un plus grand potentiel athérogène (Feingold and Grunfeld 2000). Ensuite, une étude de Björkegren *et al*. s'est intéressée à la composition des remnants comparativement à celle des VLDL à jeun et en postprandial. Il a été démontré que les remnants contiennent plus de TG, de phospholipides et de cholestérol que les VLDL à l'état basal. Cependant, seule la différence de contenu en phospholipides est maintenue en postprandial (Bjorkegren et al. 1998). De plus, tout comme pour les CM, leur composition en AG varie en fonction des matières grasses consommées, ce qui peut également affecter leur métabolisme (Lambert et al. 2001; Lambert, Botham, and Mayes 2007). L'hydrolyse des CM par la LPL entraîne la perte d'une partie de leur ApoC et un enrichissement en ApoE, et le ratio ApoE/ApoC est un déterminant de la clairance des remnants de CM par le foie. Les remnants interagissent alors avec le récepteur aux LDL (LDLr), se lient à des *heparan sulfate proteoglycans* (HSPGs) et sont internalisés directement par ou via le *LDL receptor-related protein 1* (LRP1) (Williams 2008).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

c. La voie de transport endogène des lipides par les VLDL

La voie endogène est assez similaire à la voie exogène, excepté pour l'étape de formation des particules et la provenance des TG transportés. En effet, la synthèse des VLDL est une des fonctions principales du foie et est dépendante de la disponibilité des TG (Fisher and Ginsberg 2002), qui sont synthétisés dans la lumière du RE en prévision d'un influx d'AG libres. Les AG utilisés par le foie proviennent majoritairement de 3 sources, soient des adipocytes, des remnants de CM ou sont apportés de l'intestin par la veine porte.

Comme pour les CM, la synthèse des VLDL se produit en 2 étapes et est particulièrement stimulée suite à un repas (Liang and Ginsberg 2001). D'abord, la translocation de l'ApoB-100 à travers la membrane du RE granuleux et son enrichissement partiel en lipides par la MTTP produisent des VLDL natives pauvres en lipides. Cette étape est dépendante des TG et une quantité importante d'ApoB-100 sera dégradée si la quantité de TG disponible est insuffisante (Raabe et al. 1999; Fisher et al. 2001). Ensuite, les VLDL natives fusionnent avec des particules riches en TG présentes dans le cytosol. Avant d'être sécrétés hors des hépatocytes, les VLDL doivent se déplacer du RE jusqu'au côté *cis* de l'appareil de Golgi. Pour ce faire, il est suggéré que les VLDL nécessitent une vésicule de transport particulière, puisqu'il est peu probable qu'elles puissent se déplacer à travers la membrane du RE en raison de leur large taille et qu'elles doivent être dirigées vers le Golgi (Kuge et al. 1994; Aridor and Balch 2000). En effet, les VLDL sont prises en charge par des vésicules de transport des VLDL (VTV) pour leur transfert jusqu'au Golgi, où elles subiront les dernières modifications nécessaires, soit la glycosylation et la phosphorylation de l'ApoB-100 (Bamberger and Lane 1990; Higgins 1988). Finalement, il est possible qu'une autre vésicule de transport soit nécessaire pour l'acheminement des VLDL matures jusqu'à la membrane plasmique pour leur sécrétion, mais peu de données sont disponibles à ce sujet (Tiwari and Siddiqi 2012).

i. Composition

Les VLDL sont des particules hétérogènes de taille variant entre 30-80 nm et sont divisées en 2 sous-classes, soient les VLDL1 qui sont plus larges et les VLDL2. Elles contiennent surtout de l'ApoB-100, qui est synthétisée exclusivement par le foie, mais également les Apo C-I, C-II, C-III et E (Feingold and Grunfeld 2000). Elles ont une densité un peu plus importante que les CM entre 0,930 et 1,006 g/ml. Il est estimé que les VLDL sont constituées d'environ 58-67% de TG, 24% de PL et 6-18% de cholestérol estérifié et libre (Maldonado et al. 2001; Ockner, Hughes, and Isselbacher 1969).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

ii. Métabolisme et fonction

Ensuite, une fois que les particules ont été sécrétées dans la circulation, le métabolisme des CM et des VLDL entre en compétition. En effet, la présence d'une concentration élevée de CM, en contexte de DT2 par exemple, peut inhiber la clairance des VLDL. En situation physiologique normale cependant, les VLDL sont hydrolysées pour former les IDL, qui sont plus riches en cholestérol et qui reçoivent de l'ApoE des HDL. Ces IDL sont soit directement captées par le foie grâce à la liaison de l'ApoE au LDL-R soit hydrolysées par la lipase hépatique pour former les LDL (Eriksson et al. 1991).

Il n'est pas encore clairement établi que l'hydrolyse des VLDL puisse produire des remnants, autres que les IDL et ultimement les LDL, comme pour celle des CM. En effet, Demant *et al.* ont démontré qu'environ 1/3 des VLDL2 sont converties en LDL pour moins de 20% de VLDL1 et que le temps de résidence dans le plasma des LDL issues des VLDL1 est augmenté comparativement à celles provenant des VLDL2 (Demant and Packard 1998). Aussi, Nakajima *et al.* ont récemment suggéré que l'ApoB-48 des CM pourrait être reconstituée et remodelée par le foie après une charge en lipides, en parallèle de la voie de formation de l'ApoB-100, pour produire des VLDL contenant de l'Apo-48, mais des études supplémentaires sur ce mécanisme potentiel seraient nécessaires (Nakajima, Tokita, and Tanaka 2019).

d. Autres classes de lipoprotéines

Cette section traitera de manière succincte de la composition et du métabolisme des classes de lipoprotéines autres que les LRT, sans toutefois faire mention des IDL.

i. Les LDL

Les LDL, dont la taille varie entre 18-25 nm, sont issues de l'hydrolyse des VLDL et contiennent donc une molécule d'ApoB-100 par particule. Elles transportent environ les 2/3 du cholestérol circulant, ce qui fait des LDL les particules les plus riches en EC et leur confère une densité entre 1,019-1,063 g/ml. Les LDL se fixent à leur récepteur LDL-R présent dans le foie et les tissus périphériques pour former un complexe LDL/LDL-R qui sera internalisé par endocytose (Brown and Goldstein 1986).Ensuite, les apolipoprotéines sont catabolisées en acides aminés tandis que le catabolisme des lipides produit des AG et du cholestérol non estérifié.

ii. Les HDL

Les HDL sont majoritairement produites par le foie, mais également en partie par l'intestin. Leur taille est inférieure à celle des LDL (de 5 à 12 nm) et leur apolipoprotéine principale est l'ApoA-I. Chaque particule de HDL peut contenir plusieurs ApoA-I, mais également de l'Apo A-II, A-IV, C-I, C-II,

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

C-III, et E. Elles jouent un rôle primordial dans le transport inverse du cholestérol, qui a pour but de ramener du cholestérol des tissus périphériques au foie. En effet, les muscles, les adipocytes ainsi que d'autres tissus, de même que les CM et les VLDL ont la capacité de transférer du cholestérol et des phospholipides aux HDL. Une fois qu'elles sont chargées en cholestérol et en phospholipides, leur densité est supérieure à celle des LDL (entre 1,063-1,210). La fonction des HDL dans le transport inverse du cholestérol leur confère des propriétés anti-athérogènes, en plus de posséder des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et anti-thrombotiques.

e. La lipoprotéine lipase

La LPL est l'enzyme principale du métabolisme des lipoprotéines dont la fonction principale est l'hydrolyse des TG des CM et des VLDL. Elle est synthétisée principalement dans les cellules musculaires et les adipocytes pour être ensuite transportée à la surface de la lumière des capillaires, processus médié par le *lipase maturation factor 1*. L'ancrage de la LPL à l'endothélium capillaire est assuré en partie par la *glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1* (GPIHBP1), mais surtout par des chaînes d'*heparan sulphate-proteoglycans* (HSPG), ce qui fait que l'héparine peut entrer en compétition avec l'interaction LPL-endothélium.

La LPL est activée par l'ApoC-II des CM et des VLDL et inhibée par l'ApoC-III, majoritairement contenue dans les HDL chez les individus ayant des concentrations normales de lipides sanguins, mais aussi dans les VLDL chez les individus ayant des taux élevés de TG (Sacks, Zheng, and Cohn 2011). L'hydrolyse des TG par la LPL produit des AG non-estérifiés (libres) et du 2-monoglycéride. Il a été suggéré que le mécanisme d'action de la LPL pour l'hydrolyse des TG des lipoprotéines se produit par des successions d'attachement et de détachement des molécules d'enzyme (Eisenberg and Rachmilewitz 1975). En effet, il a été démontré que jusqu'à environ 40 molécules de LPL peuvent agir en même temps sur leur substrat (Scow and Olivecrona 1977). Il est également possible que la LPL se détache complètement de l'endothélium pour partir dans la circulation sur certaines particules (Saxena, Witte, and Goldberg 1989) et de nouvelles molécules sont alors sécrétées pour remplacer celles qui sont perdues de cette façon. La LPL contenue sur les particules est majoritairement inactive et ce déplacement de l'enzyme pourrait prévenir un apport trop important d'AG aux tissus en cas de lipolyse excessive (Braun and Severson 1992).

Outre sa fonction d'hydrolyse des TG des lipoprotéines, la LPL a également la capacité de se lier simultanément aux lipoprotéines et à la surface des cellules, ce qui lui confère une action de pont non-catalytique et permet l'accumulation de lipoprotéines par les cellules. De plus, l'enzyme peut aussi servir de pont entre l'HSPG de la surface des monocytes et les cellules endothéliales des artères et donc jouer un rôle de protéines d'adhésion pour les monocytes (Mamputu, Desfaits, and Renier

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

1997). La LPL peut également stimuler la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires via son activité enzymatique, l'activation de la protéine kinase C (PKC) et sa liaison avec l'HSPG des cellules musculaires lisses vasculaires (Mamputu, Levesque, and Renier 2000). Finalement, la LPL pourrait également induire l'expression du gène TNF-α (Renier et al. 1994), stimuler l'expression de l'oxyde nitrique synthase des macrophages en synergie avec l'interferon-γ (Renier and Lambert 1995), activer la NAD(P)H oxydase endothéliale (Esenabhalu et al. 2002) et réduire la sécrétion d'ApoE (Lucas et al. 1997).

3.PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DYSLIPIDEMIE DIABETIQUE

En plus des perturbations du métabolisme glucidique, les patients DT2 présentent plusieurs anomalies du métabolisme lipidique. En effet, l'expression « dyslipidémie diabétique » est utilisée pour parler de l'ensemble des altérations du métabolisme lipidique caractéristique du DT2. Ces changements ne sont pas seulement quantitatifs, mais affectent également la qualité et la cinétique des particules lipoprotéiques de toutes les classes. Les caractéristiques principales de cette dyslipidémie sont l'augmentation des triglycérides plasmatiques combinée à la diminution du cholestérol des HDL et une augmentation des LDL petites et denses. La présente section vise donc à décrire de manière générale les modifications majeures associées à la présence du DT2 observées dans les différentes classes de lipoprotéines.

D'abord, une production augmentée de CM (Shojaee-Moradie et al. 2013) et une diminution de leur catabolisme (Adiels et al. 2005) sont observées. Une des causes de cette diminution de catabolisme est la diminution de l'activité de la LPL (Taskinen et al. 1982) ainsi qu'une augmentation des niveaux d'ApoC-III en condition d'insulinorésistance (Adiels et al. 2019). Le même phénomène d'augmentation de production et de diminution du catabolisme est observé pour les VLDL, plus particulièrement les VLDL1, ce qui contribue largement à l'hypertriglycéridémie (Johansen et al. 2016). Plus précisément, non seulement le nombre de VLDL1 est augmenté, la quantité de triglycérides qu'elles transportent est aussi plus importante, ce qui résulte en des particules d'encore plus grosse taille (Adiels et al. 2005).

L'hydrolyse des CM et des VLDL de plus grande taille mène à la production de remnants, qui sont des résidus de ces particules, et qui peuvent présenter environ 40 fois la quantité d'esters de cholestérol contenue dans les LDL (Proctor, Vine, and Mamo 2002). Cependant, ils sont de taille suffisamment petite pour pouvoir entrer dans la paroi vasculaire, ce qui suggère que ces particules

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

résiduelles ont un potentiel athérogène. En effet, le contenu en cholestérol des remnants est associé de manière indépendante à la prévalence de maladie coronarienne et une concentration élevée de remnants prédit la survenue d'événements cardiovasculaires indépendamment des autres facteurs de risque de maladie coronarienne (McNamara et al. 2001; Nguyen et al. 2017; Joshi et al. 2016). De plus, il a été démontré que la concentration des remnants est plus élevée chez des individus ayant un syndrome métabolique et un DT2 (Hirany et al. 2000; Satoh et al. 2005) et que leur contenu en cholestérol est corrélé aux concentrations de TG plasmatiques et aux concentrations de VLDL1 chez des individus DT2 (Taskinen and Boren 2015). Des études in vitro et chez l'animal suggèrent aussi qu'un défaut de captation des remnants au niveau du foie de souris DT2 dû à une production d'HSPG diminuée pourrait également contribuer à la dyslipidémie DT2 (Olsson et al. 2001; Ebara et al. 2000).

Plusieurs modifications des LDL sont également impliquées dans la dyslipidémie diabétique, malgré que leur concentration soit égale ou légèrement plus élevée comparativement aux individus non-diabétiques (Taskinen 2003). La taille des LDL de patients DT2 est diminuée, ce qui augmente leur potentiel athérogène (Verges 2005; Garvey et al. 2003). En effet, l'hypertriglycéridémie présente stimule la *cholesteryl ester transfer protein* (CETP) (Dullaart et al. 2015), entraînant une modification de la composition lipidique des LDL en augmentant leur contenu en esters de cholestérol (EC) (Guerin et al. 2001). Leur taille s'en retrouve alors réduite et leur densité augmentée, ce qui modifie profondément les caractéristiques de ces particules. Ensuite, leur catabolisme est aussi réduit, ce qui augmente le temps passé dans la circulation et donc les chances que ces particules de taille réduite se déposent dans les parois vasculaires (Duvillard et al. 2000). La glycation de l'ApoB contenue dans les LDL pourrait diminuer leur affinité pour leur récepteur et conséquemment leur dégradation, entre autres (Rabbani et al. 2010). Une des altérations majeures des LDL de DT2 est l'oxydation, qui est fortement associée au risque cardiovasculaire (Verges 2009). Les LDL oxydées ont aussi une affinité réduite pour leur récepteur, sont incorporées plus facilement dans les macrophages et contribuent à stimuler leur production de certaines cytokines, participant ainsi au processus inflammatoire de l'athérosclérose (Kita et al. 2001).

Finalement, les HDL d'individus DT2 subissent également les conséquences de l'hypertriglycéridémie et de l'hyperglycémie. Le nombre total de particules est réduit, particulièrement en raison d'une baisse importante des HDL de la sous-classe 2, qui sont plus larges que les HDL3, la concentration de ces dernières se trouvant moins affectée (Bergman, Gidez, and Eder 1986; Bakogianni et al. 2001). Comme pour les LDL, ces particules de petites tailles ont alors un risque plus important de se déposer dans la paroi des vaisseaux sanguins (Hermans et al. 2017). Contrairement aux LDL, le catabolisme des HDL est plus important suivant l'augmentation de l'activité de la lipase hépatique qui contrôle leur dégradation (Riemens et al. 2001; Rashid et al.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

2003). La stimulation de l'activité de la CETP contribue aussi à l'enrichissement des HDL en TG, les rendant des substrats encore plus intéressants pour la lipase hépatique (Girona et al. 2019). De plus, la fonctionnalité des HDL dont leur rôle majeur dans le transport inverse du cholestérol est aussi perturbé par la glycoxydation (Hedrick et al. 2000), de même que leurs propriétés antioxydantes (Nobecourt et al. 2005).

La dyslipidémie diabétique est donc un processus complexe associé au DT2 qui entraîne un ensemble de modifications majeures au niveau du métabolisme des lipoprotéines (**Tableau 2**). Il est à noter que le tissu adipeux y joue également un rôle important, malgré qu'il n'ait pas été discuté dans cette section.

Tableau 2: Résumé des modifications principales des lipoprotéines dans le diabète de type 2

Adapté de (Verges 2015)

Classes de lipoprotéines	Modification de la concentration plasmatique	Modifications qualitatives	Modifications cinétique et métabolique
CM	Augmentation	Peu de données chez l'humain	Production augmentée et catabolisme diminué
VLDL		−Augmentation de la proportion de VLDL1 −Glycation	
LDL	Aucune modification ou légère augmentation du LDL cholestérol	−Augmentation de la proportion des LDL petites et denses enrichies en TG −Augmentation de l'oxydation −Glycation	Catabolisme diminué
HDL	Diminution du HDL cholestérol	−Enrichissement en TG −Diminution du contenu en phospholipides, ApoE et ApoM −Glycation −Augmentation de l'oxydation	Catabolisme augmenté

4.VARIATION DE LA LIPEMIE POSTPRANDIALE

La lipémie est définie comme étant la concentration plasmatique des lipides circulants. Chez une personne en bonne santé, la lipémie est surtout affectée par l'ingestion d'un repas, particulièrement un repas contenant des matières grasses, mais d'autres facteurs peuvent également avoir un impact sur la lipémie tels que le sexe (Koutsari et al. 2004), la quantité de graisse viscérale

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

(Couillard et al. 1999), le rythme circadien (Romon et al. 1997) et le stress (Le Fur et al. 1999). De plus, l'importance des variations de la lipémie postprandiale en contexte de maladies métaboliques a été mise en évidence dans les dernières années.

a. Physiologie

L'état postprandial (PP) est décrit comme la période de temps comprenant et suivant l'ingestion d'un repas. Il est estimé que la quantité de lipides nécessaires pour augmenter de façon significative la lipémie PP d'un individu sain est environ de 20 à 50 g (Sanders 2003). En effet, il a été démontré que 5 à 15 grammes de lipides n'ont pas d'effet important sur la triglycéridémie postprandiale, ce qui suggère que ces quantités n'excèdent pas la capacité de clairance des TG de l'organisme (Dubois et al. 1998). Ensuite, à partir de 30 et jusqu'à 50 grammes de lipides ingérés, une relation linéaire dose-effet est observée (Dubois et al. 1998; Normand et al. 2001), mais elle ne persiste pas pour des quantités très élevées de lipides (1g/kg de poids ou environ 70-80 grammes) où seule une exacerbation de la lipémie est observée (Cohen, Noakes, and Benade 1988). En situation physiologique normale, lorsqu'une charge modérée de lipides est administrée (30-50 grammes) la lipémie augmente jusqu'à atteindre un pic au bout de 2-3 heures pour revenir à des valeurs basales après 6 heures en moyenne (Lairon 2008). Cependant, la consommation successive de 3 ou 4 repas par jour contribue à maintenir une lipémie augmentée au cours de la journée.

L'état PP est donc une condition très dynamique dans laquelle les humains passent la majorité de leur temps puisqu'il est estimé que les individus restent environ 18h en état post-absorptif dans une journée. En effet, la concentration de TG plasmatiques fluctue tout au long de la journée en réponse aux repas ingérés et ce n'est que tôt le matin qu'ils sont considérés comme étant au niveau basal, tandis que le cholestérol plasmatique ne varie pas de façon significative durant la journée. De plus, même suite à un jeûne d'une dizaine d'heures, les niveaux de TG sont beaucoup plus variables comparativement aux concentrations de cholestérol (Nakajima et al. 2011). Plus précisément, il a été observé 4h suite à un repas test chez des sujets normolipidiques une augmentation marquée de la quantité d'ApoB-48, tandis que la concentration d'ApoB totale reste relativement stable, ce qui suggère une diminution de la sécrétion de VLDL à ce moment (Otokozawa et al. 2009). La lipémie postprandiale peut être modulée par de nombreux facteurs non-modifiables et du mode de vie (**Tableau 3**). La clairance des TG plasmatiques est également très fortement influencée par la structure et la composition de l'aliment ou du repas consommé (Dias et al. 2017).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Tableau 3: Facteurs influençant la lipémie postprandiale
Adapté de (Lopez-Miranda, Williams, and Lairon 2007)

FACTEURS	EFFET SUR LA LIPEMIE POSTPRANDIALE
Alimentation	
– Quantité de lipides	↑↑↑
– Type de lipide du repas	↑/↓ (selon le type)
– Type de lipides de la diète habituelle	↑/↓ (selon le type)
– Glucides	↑↑
– Protéines	–/↓ (selon le type)
– Alcool	↑↑
– Fibres alimentaires	–/↓ (selon le type)
Mode de vie	
• Activité physique	↓↓
• Tabagisme	↑↑
Facteurs physiologiques	
• Sexe masculin	↑
• Âge	↑
• Statut post-ménopause	↑
Physiopathologie	
• Triglycéridémie à jeun	↑↑↑
• Obésité centrale	↑↑
• Résistance à l'insuline/Diabète de type 2	↑↑

b. Classification, structure et composition des lipides alimentaires

Tels que mentionnés précédemment, les TG, les PL et les stérols sont les classes de lipides retrouvés dans les aliments. Une grande majorité (95-98%) des lipides alimentaires sont fournis par les TG tandis que les PL contribuent à 3-5% de l'apport lipidique et les stérols sont présents en quantité minime dans l'alimentation. Les TG sont constitués de 3 AG estérifiés sur une molécule de glycérol, tandis que pour les PL, un des AG est substitué par un groupement phosphate (**Figure 5**). D'autres classes de lipides mineurs sont également retrouvés dans l'alimentation, tels que les SL et les glycolipides. Parmi les lipides alimentaires, les mono, di et triglycérides sont considérés comme des lipides neutres tandis que les PL, les SL et les glycolipides sont des lipides polaires. Ces derniers sont très utilisés dans l'industrie alimentaire en raison de leur rôle d'émulsifiant. Par exemple, la phosphatidylcholine (PC), qui est une classe de PL largement utilisée comme additif dans de nombreux aliments, est rapportée dans la liste des ingrédients par le terme générique de « lécithines ».

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Triglycéride **Phosphatidylcholine**

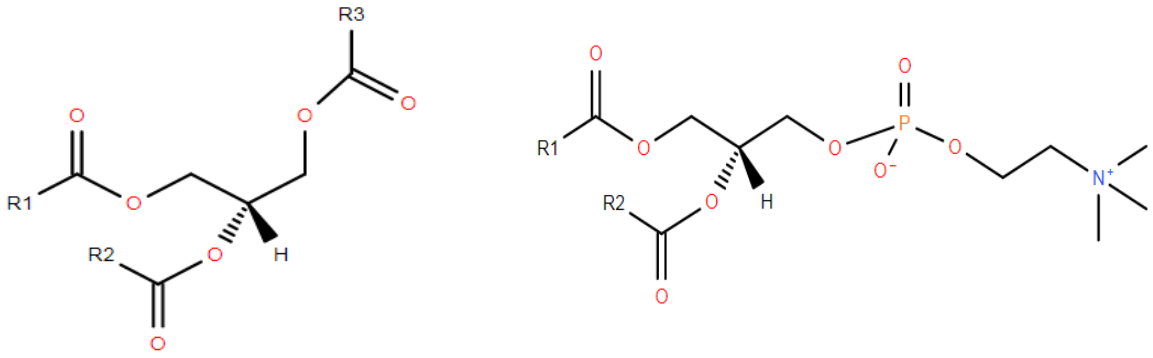


Figure 5: Molécules de triglycéride et de phospholipide (phosphatidylcholine)
Obtenues de (Sud M. 2006). R1, R2 et R3 représentent les chaînes de carbones des acides gras.

Les AG largement contenus dans les lipides alimentaires sont des molécules généralement linéaires constituées d'une chaîne hydrocarbonée plus ou moins longue, un groupement méthyle (CH_3) et un groupement carboxyle (COOH). La longueur de chaîne des AG contribue à leur nomenclature et peut varier de 4 à plus de 24, ainsi les AG comportant 4-6 carbones sont appelés à chaîne courte, les chaînes moyennes ont entre 8 et 12 carbones et ils sont considérés à chaînes longues à partir de plus de 12 carbones. Le nombre d'insaturations de la chaîne de carbone est également pris en compte pour la nomenclature, ce qui divise les AG en 3 catégories : saturés (AGS, sans double liaison), monoinsaturés (AGMI, 1 seule double liaison) et polyinsaturés (AGPI, à partir de 2 doubles liaisons) (**Figure 6**). Concernant les AGPI, des familles d'AG sont reconnues : les oméga-3 (n-3) et 6 (n-6), dont les précurseurs sont les acides alpha-linolénique et linoléique, respectivement. La nomenclature de ces familles d'AG est basée sur le numéro du premier atome de carbone impliqué dans la double liaison en partant du groupement méthyle terminal. Considérant les différents types de lipides présents dans l'alimentation, leur composition en AG ainsi que la matrice alimentaire dans laquelle ils sont peuvent donc avoir un impact sur la lipémie PP.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

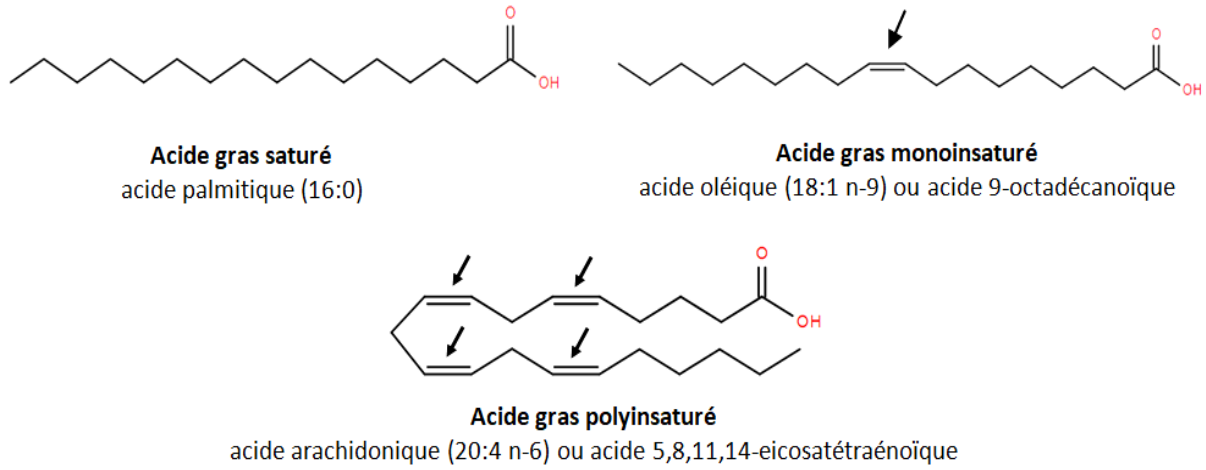


Figure 6: Exemples de molécules d'acides gras classifiées en fonction de leur insaturation
Obtenues de Lipid Maps (Sud M. 2006)

En plus de la composition en AG des lipides alimentaires, leur structure est aussi à considérer, plus particulièrement la position des AG sur la molécule de glycérol dans les TG et les PL. Trois positions sont possibles pour les AG des TG : deux externes (*sn-1* et *sn-3*) et une interne (*sn-2*), donnant une spécificité aux diverses matières grasses. Il existe plusieurs différences dans le positionnement des AG des TG des lipides alimentaires : par exemple, l'acide palmitique (16:0) contenu dans les TG de l'huile de palme et d'autres graisses d'origine végétale est surtout estérifié en position *sn-1* et *3*, tandis que dans la graisse de porc et la matière grasse laitière, ce même AG est plutôt en position *sn-2* (Zock et al. 1995; Michalski et al. 2013; DePeters et al. 2001). Lors de l'absorption, de manière générale les AG en position *sn-2* dans les TG sont favorisés, alors qu'il ne semble pas y avoir de spécificité pour les AG en positions externes (Ramírez, Amate, and Gil 2001) et les AG à chaînes courtes et moyennes sont absorbés plus facilement que les AG à chaînes longues (Schönfeld and Wojtczak 2016). Entre autre, il a été démontré que le lait maternel était mieux absorbé que les préparations pour nourrissons, en partie en raison de la présence d'acide palmitique en position *sn-2* (Tomarelli et al. 1968). Pour les PL, un des deux AG est souvent insaturé et estérifié en position *sn-2*, et les différentes classes de PL sont caractérisées par le groupement chimique attaché au groupement phosphate (choline (phosphatidylcholine, PC), éthanolamine (phosphatidyléthanolamine, PE), sérine (phosphatidylsérine, PS) ou inositol (phosphatidylinositol, PI)).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

c. Effet de la composition en acides gras et de la structure des triglycérides dans les lipides alimentaires sur la lipémie postprandiale

De nombreuses études ont comparé les effets des différents types d'AG (AGS, AGMI et AGPI) sur la lipémie PP. D'abord, les AGS à courtes et moyennes chaînes ne sont pas intégrés dans les TG des CM, puisqu'ils sont absorbés directement dans la circulation portale. De ce fait, ils ne contribuent que très faiblement à l'élévation de la lipémie PP (Furman et al. 1965). Ce sont donc les AG à longues chaînes (14 carbones et plus) qui entraînent une réponse PP significative. En général, il n'y a pas de différence majeure sur l'augmentation de l'ApoB-48 et de la quantité de TG des LRT suite à un repas riche en AGS, AGMI ou AGPI (Karupaiah and Sundram 2013; Bergeron and Havel 1995). Par contre, certaines sources d'AG peuvent influencer la réponse PP suite à un repas. En effet, des régimes riches en acides oléique (AGMI n-9) et linoléique (AGPI n-6) tendent à atténuer la lipémie PP comparativement à une diète riche en AGS provenant d'un mélange d'huile de palme et de beurre de cacao ou une diète de type nord européenne généralement plus riche en AGS (Roche et al. 1998; Jackson et al. 2005). De plus, les acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA), des AGPI n-3 à longues chaînes, ont un effet bénéfique de réduction de la lipémie PP par leur action d'augmentation de la clairance des CM (Oscarsson and Hurt-Camejo 2017; Park and Harris 2003), qui n'est pas observée avec l'acide alpha-linolénique (Svensson, Rosenquist, and Ohlsson 2011).

En plus du type d'AG, la question de la position des AG sur la molécule de glycérol et son effet sur la lipémie PP a aussi été investiguée avec le développement de matières grasses dites interestérifiées. Ce procédé consiste en la redistribution des AG des TG sur le glycérol par une action catalytique, ce qui peut possiblement modifier le point de fusion, ainsi qu'améliorer la compatibilité entre les différents TG et la plasticité de la matière grasse (De Kock et al. 2005). Chez l'animal, Renaud *et al.* ont observé que la consommation d'un régime de saindoux interestérifié (diminution de la proportion d'acide palmitique (16:0) en position *sn-2*) sur plusieurs mois par des rats induisait une lipémie PP plus faible (Renaud, Ruf, and Petithory 1995). Chez l'Homme, les résultats diffèrent : d'un côté, l'incorporation de l'acide palmitique dans les CM après 6 heures de digestion n'est pas affectée chez des adultes ayant consommé de l'huile de palme native, où l'acide palmitique est principalement en position *sn-1* et *3*, ou interestérifiée dans laquelle l'acide palmitique est redistribué en position *sn-2* (Yli-Jokipii et al. 2003). D'un autre côté, la lipémie PP était augmentée chez les sujets ayant ingéré l'huile de palme native en comparaison à l'huile de palme interestérifiée (Berry and Sanders 2007). Une explication possible pour les altérations de lipémie PP observées dans certaines études serait que la structure moléculaire des TG affecte la clairance des LRT par la LPL (Redgrave, Kodali, and Small 1988; Mortimer et al. 1994). En effet, l'activité lipolytique de la LPL

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

pourrait être diminuée lorsque les acides stéarique et palmitique sont en position *sn-2*, ce qui provoquerait une clairance ralentie des LRT.

Un aspect qui serait plus déterminant que la structure moléculaire des TG dans la modulation de la lipémie PP serait le taux de MG solide à température corporelle (*solid fat content* (SFC) à 37°C), qui impacterait davantage l'absorption. Un plus grand contenu en SFC pourrait limiter l'hydrolyse enzymatique des TG et par conséquent leur absorption (Michalski et al. 2013). Par exemple, Berry *et al.* ont observé que la consommation de beurre de karité natif induisait une lipémie PP plus importante que l'ingestion de beurre de karité interestérifié qui contient une plus grande proportion de SFC (Berry, Miller, and Sanders 2007).

d. Matrice alimentaire contenant les lipides

Les lipides font généralement partie intégrante des aliments, peuvent être ajoutés à ceux-ci ou utilisés pour la cuisson. Selon les autres constituants présents et les procédés employés pour produire les aliments, les lipides peuvent soit conserver leur organisation initiale ou se réorganiser. Ainsi, ils se retrouvent sous différentes formes dans l'alimentation :

- libres (phase continue homogène), comme les huiles ou le saindoux ;
- en émulsion : mélange hétérogène où les lipides sont sous forme de fines gouttelettes dans un autre liquide ou un gel, par exemple dans le lait ou le yaourt ;
- inclus dans une matrice solide glucidique ou protéique, tel que dans les biscuits et les fromages.

La cinétique de digestion et d'absorption des lipides peut donc être grandement affectée par la dispersion des gouttelettes lipidiques dans les aliments, leur taille et la composition de l'interface (Singh, Ye, and Ferrua 2015; Singh, Ye, and Horne 2009; Meynier and Genot 2017). En effet, Calvo-Lerma *et al*. ont effectué la digestion *in-vitro* de 52 aliments en condition physiologique (pH intestinal de 7 et une concentration biliaire de 10 mM). La lipolyse était optimale (90-100%) pour toutes les matrices alimentaires exceptées pour les particules lipidiques incluses dans une matière grasse solide représentées par un produit chocolaté, pour lesquelles une hydrolyse plus difficile des TG a été observée (Calvo-Lerma et al. 2018). Des résultats similaires ont été obtenus par Vors *et al*. où la consommation par des sujets sains et obèses de matière grasse émulsionnée a causé une apparition précoce ainsi qu'un pic plus important de CM et d'AG marqués au ^{13}C dans le plasma que lors de l'ingestion de matière grasse tartinée (Vors et al. 2013). Cet aspect de structure des lipides dans la matrice alimentaire peut donc offrir des possibilités intéressantes au niveau de certaines pathologies où l'absorption lipidique serait diminuée. Par contre, en contexte de désordre métabolique tels que

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

l'obésité ou le DT2, la consommation de matières grasses émulsionnées pourrait plutôt avoir un effet néfaste sur la lipémie PP.

e. Lipémie postprandiale, diabète de type 2 et risque cardiovasculaire associé

Hors la dyslipidémie diabétique et la diminution d'activité de la LPL qui contribuent à l'augmentation de la lipémie PP dans le DT2, la présence de la résistance à l'insuline pourrait également jouer un rôle non-négligeable. Annuzzi *et al.*, par exemple, ont comparé différents paramètres de la lipémie PP entre des sujets DT2 et des contrôles suite à un repas test administré lors d'un clamp glycémique hyperinsulinémique. L'augmentation plus importante des CM, VLDL et AG libres en PP chez les sujets DT2 comparativement aux contrôles suggère l'implication de la résistance à l'insuline, plus que l'hyperglycémie ou l'hyperinsulinémie (Annuzzi et al. 2004). De plus, plusieurs mécanismes étudiés chez l'animal sont suggérés pour expliquer l'effet de la résistance à l'insuline sur la lipémie PP. Entre autres, celle-ci pourrait réduire l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production de VLDL postprandiales (Lewis et al. 1993) ainsi que contribuer à la diminution de la dégradation de l'ApoB dans les hépatocytes (Sparks et al. 2013) sans oublier qu'il est bien établi que l'action d'hydrolyse de la LPL est diminuée chez les individus DT2.

Concernant le risque cardiovasculaire associé aux lipides et lipoprotéines, il a longtemps été pensé que seules les particules de petites tailles, les LDL et les HDL, étaient impliquées, jusqu'à ce que l'hypothèse du risque athérogène des CM et des VLDL soit proposée par Zilversmit il y a 40 ans (Zilversmit 1979). Plus récemment, Bansal *et al.* ont utilisé une cohorte de 26 509 femmes américaines en bonne santé (Women's Health Study) pour démontrer que les concentrations de TG non à jeun étaient associées à l'incidence d'événements cardiovasculaires, et ce indépendamment des facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels, tandis que cette même association avec les TG à jeun était atténuée par les facteurs de risques (Bansal et al. 2007). Dans une étude prospective d'observation pendant 15,5 ans d'une population japonaise, Iso *et al*. ont également montré que les concentrations de TG non à jeun étaient associées à l'incidence de maladies coronariennes (Iso et al. 2001). Des résultats similaires ont été observés pour une cohorte danoise d'hommes et de femmes suivis pendant 26 ans (Copenhagen City Heart Study) (Nordestgaard et al. 2007). Grâce à ces études, entre autres, il est maintenant indéniable que les concentrations de TG non à jeun contribuent au risque de développer des maladies cardiovasculaires à travers le monde. Cependant, à ce jour il n'y a pas de valeur de référence pour le risque cardiovasculaire associé au TG non à jeun, malgré la publication d'un consensus de *l'European Atherosclerosis Society* et de l'*European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* en 2016 qui recommande l'utilisation de prélèvement

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

sanguin non à jeun pour la détermination des bilans lipidiques de routine. Ce consensus suggère toutefois que la valeur seuil pour des concentrations de TG non à jeun anormales soit de 2 mmol/L et qu'il n'y ait pas de différence entre les niveaux de cholestérol à jeun et en PP (Nordestgaard et al. 2016).

Les individus DT2 sont particulièrement à risque de développer des maladies cardiovasculaires associées à la lipémie PP, entre autres en raison de la présence de la dyslipidémie diabétique qui entraîne une surproduction de CM et de VLDL tel que mentionné précédemment. Plus particulièrement, il a été suggéré que le risque de maladies cardiovasculaires associé à la lipémie PP proviendrait de la production de remnants de CM et de VLDL augmentée en condition d'HTG PP. En effet, il a été démontré que les particules contenant de l'ApoB ayant un diamètre jusqu'à 70 nm, soit les remnants de CM, les petits VLDL, les IDL, les LDL et la lipoprotéine (a), peuvent pénétrer la paroi vasculaire, même lorsque celle-ci est intacte (Sloop, Dory, and Roheim 1987). De plus, des études chez l'animal et l'humain ont montré que de l'ApoB-100 ainsi que de l'ApoB-48 peuvent être retrouvées dans la plaque d'athérosclérose (Proctor Spencer and Mamo John 2003; Nakano et al. 2008) et puisque les remnants contenant de l'ApoB sont riches en ApoE, ils n'auraient pas à subir d'oxydation pour être reconnus et incorporés par les macrophages, ce qui contribue également à accélérer le processus d'athérosclérose, surtout chez les individus DT2 (Tomono et al. 1994). Les mécanismes impliqués ne sont pas tous connus à ce jour, mais des pistes sont suggérées. Entre autres, une revue de littérature récente de Borén et Williams propose l'hypothèse de la « réponse à la rétention » qui stipule que ce ne serait pas le contenu en cholestérol des particules contenant de l'ApoB qui serait responsable du développement de l'athérosclérose, mais plutôt la rétention de ces particules et leur modification enzymatique dans la paroi vasculaire. Ces particules modifiées provoqueraient ensuite des réponses cellulaires qui accélèreraient la rétention de lipoprotéines supplémentaires et le développement de la lésion athérosclérotique (Boren and Williams 2016).

5.COMPOSITION LIPIDIQUE DES LIPOPROTEINES RICHES EN TRIGLYCERIDES

Il ne fait aucun doute que la composition lipidique des lipoprotéines est un élément important au niveau physiologique puisque ces particules sont un pont entre les sources exogènes et le métabolisme endogène des lipides. Leur composition peut donc être influencée par la diète, mais également par des situations pathophysiologiques variées. En règle générale, les lipides biologiques faisant partie des lipoprotéines sont divisés en 4 catégories (Cowart 2009):

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

- les lipides neutres, tels que les TG, qui servent surtout de source et de réserve d'énergie ;
- les stérols qui ont des fonctions dans la structure et la fluidité des membranes, la production d'hormones et dans la régulation cellulaire ;
- les glycérophospholipides qui sont les constituants majeurs des membranes cellulaires plasmatiques et qui servent de substrats pour la formation de lipides bioactifs tels que le diacylglycérol et les phosphoinositides ;
- les SL qui ont également des fonctions au niveau des membranes et de la signalisation cellulaire.

Les lipides neutres et les stérols ayant été précédemment discutés, cette partie sera concentrée sur les lipides mineurs, particulièrement les SL. Avec le développement des nouvelles techniques d'analyses par spectrométrie de masse, il est possible d'étudier de façon beaucoup plus détaillée la composition lipidique des lipoprotéines et ainsi déterminer leur composition en SL (**Tableau 4**).

Tableau 4: Distribution des principales classes de lipides et de SL parmi les lipoprotéines
Adapté de (Le Barz et al. 2019)

	VLDL	**LDL**	**HDL**
Distribution des classes de lipides majeurs (% du contenu total des lipoprotéines circulantes)			
Triglycérides	66	26	7
Esters de cholestérol	20	57	23
Cholestérol	7	69	24
Phospholipides	7	31	62
Distribution des classes de lipides mineurs (% du contenu total des lipoprotéines circulantes)			
Phosphatidylcholine	5-8	30-39	56-62
Sphingomyélines	3-7	33-50	43-64
Céramides	9-16	40-60	24-51
Sphingosine-1-phosphate	1-2	4-6	90-95
Glycosphingolipides	6-9	42-50	42-52

a. Introduction aux sphingolipides endogènes et alimentaires

Les SL sont des lipides complexes identifiés dès le 19^{e} siècle (Thudichum 1884) qui ont été conservés au cours de l'évolution chez les eucaryotes. Ils sont omniprésents chez l'Homme puisqu'ils sont des constituants des membranes cellulaires. De nombreuses maladies génétiques affectant la

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

synthèse et le catabolisme des SL mettent en évidence leur rôle dans le métabolisme cellulaire (Sandhoff 2013; Schulze and Sandhoff 2014; Astudillo et al. 2015). De manière générale, les SL sont des molécules contenant une base sphingoïde (un alcool gras aminé), qui est liée à un AG par une liaison amide (Merrill 2011). Ces molécules ont d'abord été considérées comme de simples constituants des membranes, mais les études effectuées depuis une vingtaine d'années ont bien prouvé que les SL sont des molécules de signalisation dans de nombreux processus biologiques importants tels que la croissance et la différenciation cellulaires, la prolifération et l'apoptose (Hammad 2011) et font également partie de la structure de toutes les classes de lipoprotéines (Iqbal et al. 2017).

i. Biosynthèse des sphingolipides endogènes

La biosynthèse des SL débute dans le réticulum endoplasmique, en général par la condensation d'une sérine et du palmitoyl-CoA par la sérine palmitoyltransférease (SPT), ce qui conduit, après quelques étapes, à la formation d'un céramide (Cer) (**Figure 7**). Le premier précurseur de tous les SL lors de la synthèse de novo est la 3-kétodihydrosphingosine qui sera ensuite réduite en dihydrosphingosine par la 3-kétodihydrosphingosine réductase. L'acylation de la dihydrosphingosine par l'action de 6 céramide synthases distinctes produira d'abord des dihydrocéramides, ayant des longueurs de chaînes variables, qui seront déshydrogénées par la dihydrocéramide désaturase pour former les Cer, molécules centrales dans le métabolisme des SL (Gault, Obeid, and Hannun 2010). Les Cer représentent aussi la structure de base des SL : une base sphingosine associée à une chaîne de carbone qui peut être de différentes longueurs. Il est donc important de garder en tête que chaque classe de SL contient de nombreuses espèces moléculaires en raison de la variation de longueur de cette chaîne carbonée (C16, C18, C20, etc. par exemple). Sur la base de ce céramide, la présence d'un groupement hydroxyle permet la synthèse d'un grand nombre d'espèces de SL différents en fonction du résidu qui sera greffé. Le plus abondant d'entre eux, la sphingomyéline (SM), est synthétisée par la condensation de la phosphocholine et d'un Cer, ce qui lui confère parfois la classification de PL. D'autres SL complexes peuvent être synthétisés à partir du Cer, tels que les glycosphingolipides qui sont formés par l'addition d'un ou plusieurs sucres à un Cer. Enfin, les gangliosides sont les SL les plus complexes avec une chaîne latérale pouvant comporter plusieurs types d'hexoses différents. Le plus simple d'entre eux est le ganglioside GM3 comportant 3 résidus sucrés (un glucose, un galactose et un acide sialique).

En plus de pouvoir être synthésisés *de novo*, des SL peuvent également être produits par la dégradation de la SM et des glycosphingolipides qui génèrera du Cer qui pourra être converti à nouveau en d'autres classes de SL. Il est également possible que le Cer perde sa chaîne de carbones ce qui résulte en la formation de sphingosine (Spho) qui pourra également être recyclée pour la

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

synthèse de SL ou phosphorylée pour produire la sphingosine-1-phosphate (S1P). Le métabolisme des SL est donc un processus hautement régulé qui peut produire des milliers de molécules qui auront des fonctions différentes selon leur composition moléculaire et leur structure. Il est également possible que la SPT puisse utiliser d'autres acides aminés que la sérine (alanine ou glycine), ce qui produit des SL dits atypiques, les deoxysphingolipides. Ces molécules ne contiennent pas de résidu hydroxyle, ce qui bloque la synthèse des autres classes de SPL. L'accumulation des deoxySL peut être toxique et intervenir dans divers contextes pathologiques mais ces situations ne seront pas traitées dans ce manuscrit.

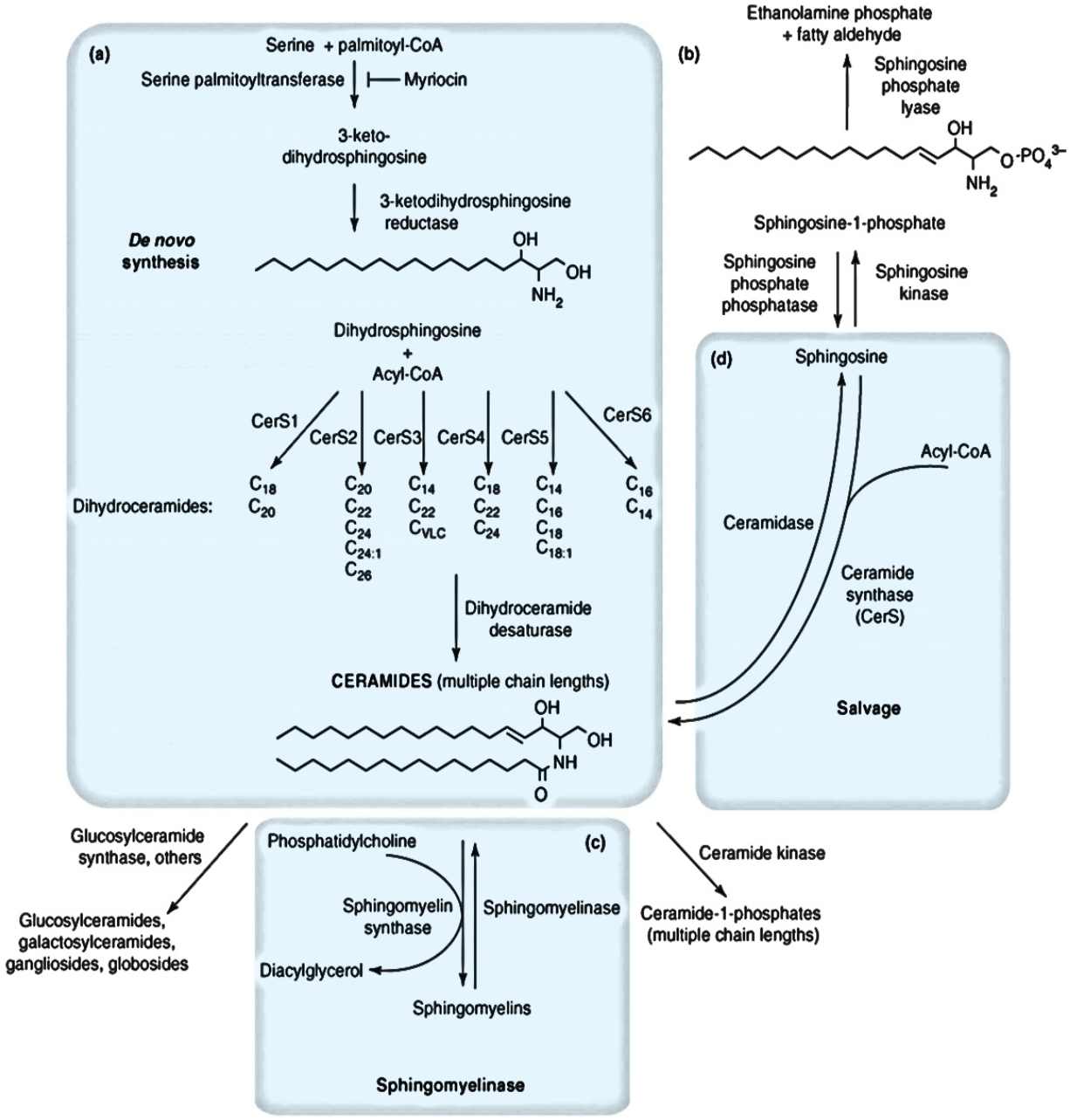


Figure 7: Métabolisme partiel des sphingolipides
Adaptée de (Cowart 2009). VLC : very long chain.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

ii. Les sources de sphingolipides alimentaires

Les informations concernant les quantités de SL dans l'alimentation restent encore très limitées, et il n'y a pas de données sur la perte possible de SL lors de la préparation des aliments, les variations saisonnières ou d'autres aspects de la chimie alimentaire. Malgré cela, puisque les SL sont des molécules omniprésentes dans les végétaux et les mammifères, ils sont particulièrement présents dans les viandes et poissons ainsi que les produits d'origine animale comme les œufs et les produits laitiers, mais aussi dans certains grains et fèves (**Tableau 5**).

Tableau 5: Contenu en sphingolipides totaux de certains aliments
Adapté de (Vesper et al. 1999)

Aliments	Contenu en SL (mmol/kg)	Consommation d'aliments par habitant (kg/an)	Consommation de SL par habitant (mmol/an)
Produits laitiers			
Lait entier (3,5%)	0,2	36	5,8
Lait allégé en matières grasses (<2%)	0,09	60	5,5
Crème (37%)	1,7	1	1,7
Fromage (29%)	1,3	12	15,9
Produits laitiers congelés (11%)	0,5	14	7,0
Lait évaporé et condensé (9%)	0,4	4	1,6
Beurre	0,5	2	9,2
Viandes, poissons et produits d'origine animale			
Bœuf et veau	0,4	29	11,3
Porc	0,4	23	8,1
Poulet	0,5	22	11,7
Dinde	0,4	6	2,3
Poisson	0,1	7	0,9
Œufs	2,3	14	31,5
Légumes			
Poivrons	0,04	3	0,1
Tomate	0,04	41	1,7
Pomme de terre	0,07	64	4,1
Patate douce	0,7	2	1,3
Epinards	0,07	0,3	0,02
Fèves de soja	2,4	ND	
Chou-fleur	0,2	1	0,2
Concombre	0,03	5	0,1
Laitue	0,05	10	0,5
Fruits			
Pomme	0,07	25	1,7
Orange	0,02	40	1,0
Arachide	0,08	3	0,2
Banane	0,02	13	0,3

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Céréales			
Farine de blé	0,6	66	38,0

En terme de contenu en différentes classes de SL dans les aliments, de manière générale, les produits d'origine animale contiennent plusieurs classes de SL complexes (SM, Cer et gangliosides), alors que les végétaux contiennent majoritairement des cérébrosides, qui sont aussi dans la famille des glycoSL (**Tableau 6**) (Schmelz 2000; Yunoki et al. 2008).

Tableau 6: Sources alimentaires de certaines classes de sphingolipides
Adapté de (Norris and Blesso 2017)

Sphingolipides	**Sources dans l'alimentation**	**Quantité (mg/100 g)**
Sphingomyélines	Lait de vache entier	9
	Bœuf	44-69
	Œufs	82
	Fromage cottage	139
	Maquereau	224
	Foie de volaille	291
Céramides	Fibre de riz	5.6
	Fève de soja	11,5
Cérébrosides	Fibre de riz	11,5
	Fève de soja	Variable (20-310)
	Maïs	11,5
	Amarante	39
Gangliosides	Lait de vache entier	0-11
	Maquereau	6,48
	Jaune d'œuf	18,9
	Foie de volaille	29
Consommation quotidienne totale estimée (aux Etats-Unis) : 200-400 mg/jour (Vesper et al. 1999)		

Toutefois, les SL alimentaires ne sont pas considérés comme des nutriments essentiels, puisque les cellules sont capables de faire la synthèse *de novo* de SL, et il n'y a pas de preuve qu'ils soient requis pour la croissance ou le développement chez l'animal. Des souris ayant été nourries avec une diète exempte de SL n'ont pas montré de signe de retard de croissance ou de changement au niveau de leur biochimie plasmatique (Schmelz et al. 1996). De plus, les SL alimentaires sembleraient sécuritaires pour des études de supplémentation. En effet, aucun effet délétère n'a été observé chez des rats ayant été nourris à long terme avec une diète contenant 1% du poids total sous forme de SM et de cérébrosides, une quantité qui n'est pas physiologique (Kobayashi et al. 1997).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

iii. Digestion et absorption des sphingolipides alimentaires

Actuellement, peu de données sont disponibles concernant le devenir des SL dans le tractus digestif. Il est toutefois connu que comparativement aux TG, la digestion de la SM, par exemple, est très lente, puisqu'il n'y a pas d'enzymes pancréatiques pour l'hydrolyser rapidement. Sa digestion dépend donc de la sphingomyélinase alcaline et de la céramidase neutre présentes au niveau de la muqueuse intestinale (Nilsson, Hertervig, and Duan 2003; Nilsson and Duan 2006). Dans l'intestin, les SL alimentaires complexes peuvent être hydrolysés en bases sphingoïdes qui seront incorporées par les cellules de la muqueuse. L'absorption des bases par les entérocytes serait assez faible, puisqu'il semblerait que les bases sphingoïdes, autres que la sphingosine, soient transportées à travers la membrane apicale des entérocytes par une glycoprotéine-P seulement après l'absorption (Sugawara 2013). Des études sur des patients iléostomisés démontrent que la digestion des SL est incomplète. En effet, Ohlsson *et al*. ont d'abord observé que les contenus de SM et de Cer présents dans les pertes de la stomie 8 heures après la consommation de 250 mg de SM laitière correspondait à 19 % de la dose de SM ingérée. Ils ont ensuite testé l'ajout de doses de SM laitière (50, 100 et 200 mg) similaires à celles qui pourraient être retrouvées dans un petit déjeuner normal et ont observé une augmentation des espèces moléculaires de SM, Cer et sphingosine dans les matières fécales (Ohlsson et al. 2010). Récemment, notre équipe a également obtenu des résultats similaires chez des patients iléostomisés ayant ingéré des PL laitiers. Ceux-ci ont augmenté les pertes de SM dans l'effluent iléal, qui représentent 20-25% de la quantité ingérée de SM laitière, et sont composées d'espèces à longue chaîne (> 20 atomes de carbones) (Vors et al. 2019).

iv. Sphingolipides alimentaires et prévention des maladies

Malgré sa digestion et son absorption faible, au niveau fonctionnel, l'implication de la SM dans le métabolisme du cholestérol est maintenant bien établie (Bittman et al. 1994; Ridgway 2000). Dans des modèles cellulaires, la SM stimule l'efflux de cholestérol (Jian et al. 1997) et affecte son estérification (Subbaiah and Liu 1993) ainsi que la synthèse des acides biliaires (Kuver 2010). Plus particulièrement, les extraits laitiers enrichis en PL et en SM d'origine laitière pourraient apporter des bénéfices au niveau métabolique. En effet, Kamili *et al.* ont montré que l'administration d'un extrait de PL laitiers contenant 22% de SM réduit l'accumulation de cholestérol d'origine intestinale dans le foie et augmente son excrétion fécale chez la souris sous diète riche en graisses (Kamili et al. 2010). Chez le rat, l'absorption intestinale du cholestérol et des matières grasses est réduite de manière dose-dépendante par la SM (Eckhardt et al. 2002). Cet effet semblerait spécifique de la SM laitière, puisque celle-ci a été montrée comme étant plus efficace que la SM d'œuf pour inhiber l'absorption intestinale de cholestérol. Une explication possible serait que la SM laitière contient une

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

plus forte proportion d'AG saturés et à très longue chaîne (> C22) que la SM d'œuf, ce qui pourrait réduire la lipolyse luminale, la solubilisation micellaire et le transfert des lipides des micelles à l'entérocyte (Noh and Koo 2004). Ensuite, une étude récente a démontré que la SM laitière augmente l'expression de protéines de jonction serrée des cellules intestinales, possiblement via une augmentation de l'expression de l'interleukine-8, sans toutefois avoir un effet sur la perméabilité intestinale (Milard et al. 2019). L'ingestion de lipides polaires laitiers par des patients iléostomisés diminue l'absorption du cholestérol et augmente l'efflux iléal de cholestérol tout en augmentant l'excrétion de SM dans l'intestin (Vors et al. 2019).

Outre les effets mentionnés des SL laitiers sur le métabolisme des lipides et au niveau intestinal, il y a un intérêt pour les SL d'origine laitière dans la prévention du cancer colorectal (Schmelz 2004). Par exemple, des études sur un modèle de souris avec cancer du côlon induit chimiquement ont montré que l'administration d'une diète contenant une concentration de SL similaire à celle du lait pendant 4 semaines contribue à réduire la formation de foyers de cryptes aberrantes, un des premiers changements morphologiques visibles de ce type de cancer (Schmelz et al. 1996; Dillehay et al. 1994). La SM laitière pourrait également jouer un rôle au niveau de la suppression de la progression d'un adénome bénin en adénocarcinome malin également chez la souris (Schmelz et al. 1996). Un rôle plus atypique et controversé des SL alimentaires concerne leur capacité à être des sites de liaison pour certaines bactéries et leurs toxines. Plus précisément, les gangliosides présents en grande quantité à la surface de la membrane apicale des entérocytes pourraient ainsi prévenir la translocation d'agents pathogènes dans la circulation. De même, les glycoSL et les SL alimentaires pourraient aussi lier des bactéries, virus et toxines pour les inactiver afin de prévenir leur passage à travers la muqueuse intestinale (Sprong, Hulstein, and Van der Meer 2001).

De plus en plus de preuves indiquent que les SL sont impliqués dans des processus pathophysiologiques variés et les SL alimentaires sont donc considérés comme des molécules avec un potentiel très intéressant pour la prévention des maladies. Cependant, pour l'instant la plupart des études sont réalisés sur des modèles *in vitro* et pré-cliniques. Il serait donc nécessaire de faire plus d'études d'intervention chez l'homme afin d'établir si les SL alimentaires ont vraiment un impact à ce niveau.

v. Sphingolipides et diabète de type 2

Il est maintenant très bien établi que les maladies métaboliques telles que le DT2 et l'obésité sont associées à une dérégulation de la synthèse et du transport des SL, entre autres. En effet, une des premières études à s'être intéressée aux concentrations de SL plasmatiques, plus

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

particulièrement des glycoSL, chez des patients DT2 date de 1975 (Kremer, Atzpodien, and Schnellbacher 1975). Depuis, de nombreuses études ont montré que les concentrations plasmatiques de plusieurs autres classes de SL (Cer, SM, S1P, GM3, entre autres) sont altérées chez les individus diabétiques comparativement aux non-diabétiques (Haus et al. 2009; Gorska, Dobrzyn, and Baranowski 2005; Carlsson et al. 2018; Sato et al. 2008) et que ces altérations sont associées au DT2 (Meikle et al. 2013; Chew et al. 2019; Lemaitre et al. 2018; Jensen et al. 2019). Des études chez l'animal et l'homme ont montré que les SL peuvent également s'accumuler dans les tissus insulino-sensibles tels que le foie et le muscle (Raichur et al. 2019; Kurek et al. 2014; Turinsky, O'Sullivan, and Bayly 1990). Enfin, les SL (certains dihydrocéramides, céramides et le GM3) pourraient également être de potentiels biomarqueurs du DT2 (Bertea et al. 2010; Wigger et al. 2017; Kurz et al. 2019; Lipina and Hundal 2015).

Dans un contexte de DT2, une des classes de SL les plus étudiées est celle des Cer, de nombreux travaux montrant leur implication dans la résistance à l'insuline. Plusieurs études ont montré que les Cer inhibent la voie de signalisation de l'insuline via Akt/protéine kinase B (PKB) (Stratford et al. 2004; Chavez et al. 2003), ainsi que la signalisation Akt/*endothelial nitric oxide synthase* qui permet la production d'oxyde nitrique au niveau de l'endothélium vasculaire (Xiao-Yun et al. 2009; Wang et al. 2013). Une diminution de la disponibilité de l'oxyde nitrique est caractéristique des patients ayant une maladie coronarienne et contribue à l'aggravation du développement de lésions athérosclérotiques (Dimmeler et al. 1999). De manière intéressante, l'effet inhibiteur de la signalisation insulinique était spécifique lors d'une surcharge en palmitate (AGS), comparativement à l'oléate (AGMI). Holland *et al*. ont aussi clairement démontré le rôle du Cer dans la résistance à l'insuline en infusant des rats avec des AGS provenant de l'huile de lard comparativement à des AGPI contenus dans l'huile de soja. Les deux types d'huile ont causé l'augmentation du diacylglycérol dans le muscle squelettique ainsi qu'une diminution de l'assimilation du glucose et de la phosphorylation Akt/PKB. Par contre, une augmentation du Cer musculaire a été observée seulement chez les rats infusés avec l'extrait de lard et le blocage de la voie de synthèse du Cer avec l'inhibiteur de la sérine palmitoyltransférase (SPT) a permis de restaurer l'assimilation du glucose et la phosphorylation Akt/PKB chez ces rats, mais n'a eu aucun effet chez les rats infusés avec l'huile de soja (Holland et al. 2007). Ces résultats illustrent bien que les mécanismes de développement de la résistance à l'insuline sont différents en fonction du type d'AG, mais que seuls les AGS provoquent le développement d'une insulino-résistance médiée par la synthèse augmentée du Cer.

En plus de leur contribution au développement de la résistance à l'insuline, les SL seraient également impliqués dans le dysfonctionnement de la cellule β pancréatique (Holland and Summers

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

2008; Boslem, Meikle, and Biden 2012). Plus précisément, l'augmentation du Cer a été observée dans des îlots pancréatiques de rats DT2 ; elle était associée à une augmentation des voies apoptotiques liées à la destruction auto-immune des cellules bêta et était diminuée avec un inhibiteur de la SPT (Shimabukuro, Zhou, et al. 1998). Encore une fois, la stimulation de la synthèse *de novo* de Cer et l'augmentation de l'expression de SPT dans les îlots s'est produite chez des rats traités avec une quantité élevée d'AG (Shimabukuro, Higa, et al. 1998).

L'excès d'AG, particulièrement lorsqu'ils proviennent du palmitate, semble être délétère en contexte de DT2. Puisque la première étape de la voie de synthèse des SL est la condensation du palmitoyl-CoA et de la sérine, il semblerait que leur biosynthèse serait particulièrement sensible aux concentrations de palmitate. En effet, la SPT serait très sensible à des changements mineurs de concentration de palmitoyl-CoA et comme elle est l'enzyme limitante pour la production de SL, l'augmentation de son activité augmenterait également directement la synthèse des SL (Cowart 2009; Deevska and Nikolova-Karakashian 2011). D'un autre côté, Watt *et al*. ont montré que la concentration de Cer hépatique suite à une infusion de lipides à base de carthame et de soja chez des humains sains, des rats, des souris ob/ob sous diète riche en graisses et des cellules hépatiques se retrouve augmentée, mais que la sécrétion de Cer dans le plasma s'en retrouverait stimulée. Il est suggéré que le foie serait sensible aux niveaux de Cer intracellulaire, et ainsi en augmenterait la sécrétion dans le plasma dans le but de se protéger des effets pathogènes d'une accumulation de Cer intracellulaire (Watt et al. 2012). Il serait donc possible que le métabolisme du Cer soit différent en contexte de DT2 et d'excès de palmitate et qu'il participe également à l'exacerbation des anomalies métaboliques associées.

Finalement, d'autres SL, le GM3 et la S1P, par exemple, émergent comme étant impliqués dans la résistance à l'insuline (Lipina and Hundal 2015; Fayyaz et al. 2014), et le dihydrocéramide pourrait être un biomarqueur potentiel du DT2 (Siddique et al. 2015). De plus, d'autres facteurs associés à la pathophysiologie du DT2, tels que la présence de cytokines inflammatoires, de facteurs de croissance et de stress oxydant, pourraient stimuler le métabolisme des SL (Goldkorn et al. 1998; Levy, Castillo, and Goldkorn 2006; Memon et al. 1998).

Il ne fait aucun doute que les SL jouent un rôle dans les maladies métaboliques et l'insulinorésistance, cependant, les mécanismes associés restent encore peu connus. La pathophysiologie du DT2 ainsi que le métabolisme des SL sont deux processus complexes et les études mécanistiques actuellement disponibles se concentrent souvent sur une classe de SL ou une partie de cette voie métabolique, ce qui complique l'identification de cible thérapeutique et le développement de potentiel traitement.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

b. Modification de la composition lipidique des lipoprotéines dans le diabète de type 2

La composition lipidique des lipoprotéines et l'impact qu'elle peut avoir sur leur fonctionnalité en contexte de maladies métaboliques est un sujet d'intérêt depuis plusieurs décennies. Cependant, des lacunes au niveau des informations présentes dans la littérature sont à prendre en compte. Certaines classes de lipoprotéines, les HDL et les LDL, ont fait l'objet de nombreux travaux, et récemment, un intérêt plus marqué s'est développé pour les LRT. De plus, une grande quantité de données concerne plutôt la composition en classes de lipides majeurs des lipoprotéines (TG, EC, cholestérol non-estérifié, PL totaux) et beaucoup moins celle des lipides mineurs (SL, classes de PL). Finalement, avec l'essor de technologies telles que la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), les analyses de composition lipidique ont pu être beaucoup plus étoffées, mais encore à ce jour, la grande majorité des études concerne surtout le plasma ou le sérum. Donc, beaucoup de données sur la composition lipidique détaillée, qu'il est possible d'appeler le lipidome, des LRT sont encore manquantes.

Dans un contexte de DT2, il a été démontré que la composition lipidique des HDL et des LDL est modifiée (Boon et al. 2013; Ståhlman et al. 2013; Kontush and Chapman 2008), ce qui entraîne des perturbations au niveau de leur fonctionnalité (Kontush, Lhomme, and Chapman 2013). Parmi ces modifications, les HDL de plus grande taille (HDL2) de jeunes hommes DT2 seraient déplétées en PL totaux (Gordon et al. 2013). Ensuite, la revue très complète de Kontush *et al* sur le lipidome des HDL et sa modification en présence de risque cardiovasculaire élevé rapporte aussi des modifications de composition en PL : une diminution du contenu en SM des HDL d'individus ayant des taux de cholestérol HDL abaissé et des patients avec une maladie cardiaque coronarienne (Kontush, Lhomme, and Chapman 2013). Un autre aspect important de la composition lipidique des HDL des invidus DT2 concerne la S1P. La glycation diminue les concentrations en S1P des HDL et une corrélation inverse a été démontrée entre le degré de glycation *in vivo* d'HDL de patients DT2, défini par l'HbA1c, et leur contenu en S1P (Brinck et al. 2016).

Concernant les LDL de sujets DT2 dyslipidémiques, une augmentation du diacylglycérol et une réduction du contenu en SM et EC a été rapportée ainsi qu'une diminution du cholestérol non-estérifié et des Cer dans la couche de lipides extérieure. Les proportions relatives des PC 16:0-20:3 et PC 18:0-20:3 étaient augmentées comparativement aux particules contrôles. Finalement, les TG des LDL de DT2 dyslipidémiques étaient enrichis en acide palmitique (16:0) et palmitoléique (16:1) et les quantités relatives des espèces possédant des AG à chaînes plus longues ou insaturées,

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

particulièrement l'acide linoléique (18:2 n-6) étaient inchangées ou diminuées (Ståhlman et al. 2012). Dans les VLDL, les modifications de composition lipidique étaient similaires à celles des LDL.

c. Impacts fonctionnels de la modification de la composition lipidique des lipoprotéines

Il a été démontré que des changements dans la composition en lipides des lipoprotéines peuvent affecter profondément leur fonctionnalité. Yancey *et al*. ont étudié l'effet de la modification du contenu en PC et SM des sous-classes d'HDL (HDL2 et 3) sur leur capacité à réguler l'influx et l'efflux de cholestérol dans des cellules exprimant SR-B1. Ils ont d'abord observé que les HDL2 stimulaient l'efflux de manière plus efficace comparativement aux HDL3 en raison de leur contenu plus élevé en PL. Ensuite, l'enrichissement des HDL3 avec de la PC (dimyristoyl-sn-glycérophosphocholine) a stimulé l'efflux de cholestérol comparativement aux HDL natives tandis que l'enrichissement des HDL3 en SM a plutôt eu un effet sur la stimulation de l'influx de cholestérol (Yancey et al. 2000). Au niveau cardiovasculaire, les HDL ont un effet vasodilateur reconnu qui serait dépendant de la S1P à leur surface, puisque celle-ci active la *nitric oxide synthase* des cellules endothéliales, favorisant la production d'oxyde nitrique et la vasorelaxation (Nofer et al. 2004). Il a été démontré que la glycation non-enzymatique des HDL pouvant être observée en contexte de DT2 altérait leurs fonctions anti-inflammatoires et leurs effets protecteurs au niveau vasculaire (Liu et al. 2012; Zheng et al. 2004). Tong *et al*. ont démontré que l'enrichissement *in vitro* de cellules endothéliales humaines avec des HDL glyquées enrichies en S1P permettait de restaurer les fonctions de protection vasculaires en augmentant l'expression de COX-2 de manière dose-dépendante (Tong et al. 2014).

Concernant les LDL, leur composition peut affecter leur capacité à s'agréger, ce qui peut jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose. Ruuth *et al.* ont récemment montré que les LDL plus susceptibles de s'agréger sont enrichies en SM et Cer, et contiennent moins de lysoPC et PC (Ruuth et al. 2018). Les particules au lipidome altéré peuvent aussi avoir une clairance plasmatique retardée. Chez des rats ayant été injectés avec des émulsions de TG mimant les CM, stabilisées soit avec 100% ou 50% de SM combiné avec de la PC de jaune d'œuf, la clairance était négligeable avec 100% de SM et très ralentie avec 50% (Redgrave et al. 1992). Par contre, lorsque l'émulsion était stabilisée avec la PC de jaune d'œuf seule, la clairance s'en trouvait grandement améliorée. Arimoto *et al.* ont obtenu des résultats similaires de retard de clairance avec des rats injectés avec une émulsion de trioléine-SM (ratio molaire de 2:1) (Arimoto, Matsumoto, et al. 1998). De plus, l'incorporation de SM dans l'émulsion a réduit la liaison des ApoE, C-II et C-III aux lipides de surface de l'émulsion, ce qui pourrait potentiellement avoir des conséquences fonctionnelles qui mériteraient d'être investiguées. Une explication possible pour la diminution de clairance est que la modification du lipidome des

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

lipoprotéines puisse affecter certaines enzymes de leur métabolisme, particulièrement la LPL (Arimoto, Matsumoto, et al. 1998; Arimoto, Saito, et al. 1998). Lobo *et al.* ont démontré que l'hydrolyse par la LPL des TG de particules contenant du cholestérol incluses dans une émulsion contenant un mélange de trioléine et 30% de SM pouvait être inhibée, mais cette inhibition n'est pas observée avec une concentration physiologique de SM de 15%. De même l'addition de cholestérol à des émulsions à base de PC et de trioléine augmente l'activité de la LPL. Par contre, la présence d'une concentration physiologique de SM (15%) dans cette même émulsion de particules a réduit l'activité de la LPL. De plus, l'hydrolyse des TG par la LPL se retrouve également augmentée lorsque des particules contenant des SM incorporées dans une émulsion et en l'absence de cholestérol sont pré-traitées avec de la sphingomyélinase et contiennent plus de céramides (Lobo and Wilton 1997). Considérant ces résultats dans l'étude des impacts de la modification de composition lipidique des HDL et des LDL, l'exploration des modifications du lipidome des LRT et des effets sur leur fonctionnalité dans le DT2 s'avère donc d'autant plus pertinente.

6.LES PLAQUETTES SANGUINES

Les plaquettes sont des cellules anucléées de forme discoïde qui sont essentielles à l'hémostase primaire et au processus de coagulation et dont le nombre varie entre 150 000 et 400 000 par µL de sang. Elles sont produites par la fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes formés dans la moelle osseuse (Behnke and Forer 1998). De ce fait, elles sont dépourvues d'ADN, mais contiennent des ARN messagers de mégacaryocytes (Newman et al. 1988) et peuvent effectuer la traduction (Kieffer et al. 1987).

a. Structure

Les plaquettes ont une membrane plasmique constituée de 60-80% de phospholipides (PL) dont les différentes classes sont organisées de manière spécifique entre les deux feuillets. Les PC et SM sont principalement situés dans le feuillet externe, tandis que les PE, PS et PI sont dans le feuillet interne, où ils servent de substrat des phospholipases. Les récepteurs de la thrombine, de l'adénosine 5'-diphosphate (ADP), du thromboxane A_2 (TxA_2) ainsi que différentes glycoprotéines sont également présents dans la membrane plasmique. La structure discoïde des plaquettes au repos est maintenue en place grâce à un faisceau de 8 à 24 microtubules de tubuline situés en périphérie interne de la membrane. Un réseau de microfilaments d'actine cytoplasmique et relié à la membrane est également présent et intervient dans la contraction, la dégranulation, la rétraction du caillot et l'émission de pseudopodes. Lors de l'activation, le changement de forme est causé par la polymérisation de l'actine et de la myosine du cytosquelette et les granules plaquettaires vont se

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

redistribuer, ce qui permet leur liaison avec des glycoprotéines membranaires. Ensuite, de nombreux composants des plaquettes sont contenus dans le cytoplasme : les granules α (qui eux-mêmes contiennent les molécules GPIIb-IIIa, P-sélectine, PECAM-1 et le facteur von Willebrand (vWF)), les granules denses (qui contiennent les nucléotides dont l'ADP, les ions calciques et la sérotonine), les mitochondries, les grains de glycogène, les lysosomes et les peroxysomes.

b. Fonctions

La fonction primaire des plaquettes est la régulation de l'hémostase et de la thrombose qui se produit en plusieurs étapes. Dans la circulation sanguine, les plaquettes se déplacent dans les vaisseaux tout en restant très près de de la paroi vasculaire afin que la réponse soit rapide si l'intégrité du vaisseau est altérée. De manière générale, lors d'une blessure vasculaire, la première étape consiste en l'adhésion de plaquettes à la matrice extracellulaire subendothéliale. Ensuite, une adhésion plus ferme se produira ainsi qu'un changement de forme plaquettaire pour produire un caillot ou thrombus. Finalement, les plaquettes activées dans le thrombus incorporeront des plaquettes environnantes ce qui résultera en un thrombus présentant un centre de plaquettes fermement liées entourées de plaquettes faiblement jointes. Les différentes étapes menant à l'agrégation plaquettaire seront détaillées dans les sections suivantes (Holinstat 2017).

Les plaquettes pourraient également intervenir dans d'autres mécanismes biologiques tels que l'immunité. En effet, il a été démontré récemment que les plaquettes expriment plusieurs récepteurs toll-like (TLR) (Hamzeh-Cognasse et al. 2018) dont le TLR4, dont le recrutement est essentiel pour l'induction des réponses immunitaires, et qu'elles auraient la capacité de faire de l'autophagie, mais il est incertain qu'elles puissent le faire dans la circulation sanguine (Ouseph et al. 2015). Une autre fonction plaquettaire importante concerne leur capacité à relâcher des microparticules dérivées de la membrane plasmique dans la circulation sanguine, qui pourraient contenir des micros ARN et des ARN messagers, ainsi que des enzymes, des protéines ou d'autres petites molécules (cytokines), et qui pourraient affecter les fonctions des autres cellules présentes dans les vaisseaux sanguins (Burnouf et al. 2014). Les plaquettes sont donc des cellules pouvant intervenir dans plusieurs processus biologiques et ont un rôle à jouer dans la physiopathologie et les complications cardiovasculaires associées au diabète de type 2.

i. Adhésion

La première étape de l'hémostase primaire consiste en l'adhésion des plaquettes à la matrice extracellulaire. En effet, si l'intégrité d'un vaisseau est compromise et que l'endothélium est lésé, plusieurs composants du vaisseau, tels que les différents types de collagène, le vWF et la

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

fibronectine, seront exposés et les plaquettes adhèreront au sous-endothélium. Les mécanismes d'adhésion sont différents en fonction du type de vaisseau, en raison de l'influence de la force de cisaillement. Dans les artères de petit diamètre ou sténosées et les artérioles où les forces de cisaillement sont élevées, l'adhésion dépend du vWF et les plaquettes pourront ensuite s'étaler pour augmenter l'adhérence au substrat (Kuwahara et al. 2002). D'un autre côté, en condition de forces de cisaillements faibles comme dans les artères de plus grand diamètre et les veines, l'adhésion se produit via le récepteur GPIa-IIa (α2β1) (Saelman et al. 1994).

ii. Activation

L'adhésion des plaquettes permet la sécrétion de plusieurs produits et facteurs pro-thrombotiques locaux qui stimuleront à leur tour l'activation (**Tableau 7**). Celle-ci est atteinte grâce à plusieurs voies de signalisation selon l'agoniste présent (ADP, thrombine, collagène entre autres) et par la production de TxA_2 par les plaquettes. L'activation plaquettaire se produit par l'intermédiaire d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG). Le complexe de récepteurs glycoprotéiques GP Ib-IX-V et le récepteur GPVI sont essentiels pour l'étape d'activation. En effet, l'exposition des plaquettes au collagène permet une forte activation, majoritairement via le récepteur GPVI et l'intégrine α2β1 (GPIa-IIa) (Nieswandt and Watson 2003). L'activation est aussi favorisée par la présence d'ADP libéré par les cellules endothéliales endommagées et les plaquettes activées, qui se lie aux RCPG P2Y1 et P2Y12. Il en est de même pour le TxA_2 produit par les plaquettes activées qui contribuera à l'activation de plaquettes supplémentaires via un RCPG. L'activation par la thrombine, qui convertit le fibrinogène inactif en fibrine et qui est l'agoniste le plus puissant, se fait par les *protease-activated receptor* 1 et 4 (PAR1 et PAR4) également via un RCPG (Kahn et al. 1999). PAR-1 induit l'activation en réponse à de faibles concentrations de thrombine alors qu'en présence de fortes concentrations de thrombine l'activation est induite par PAR-4 (Lova et al. 2004).

Tableau 7: Les principaux récepteurs membranaires plaquettaires impliqués dans le processus d'agrégation
Adapté de (Cimmino and Golino 2013)

Récepteurs	Agonistes	Rôle
Glycoprotéine Ib (GPIb)	vWF	Adhésion
Glycoprotéine Ia/IIa (GP Ia/IIa)	Collagène	Adhésion
Complexe glycoprotéine Ib-V-IX (GP Ib-V-IX)	Collagène	Adhésion
Glycoprotéine VI (GPVI)	Collagène	Adhésion Activation

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

P2Y1	ADP	Agrégation
P2Y12	ADP	Agrégation
Récepteur au thromboxane	TxA_2	Agrégation
Protease Activated Receptor (PAR)	Thrombine	Agrégation
Glycoprotéine IIb/IIIa (GP IIb/IIIa)	Fibrinogène	Agrégation

La liaison de ces récepteurs et l'activation des différentes voies de signalisation plaquettaires produisent des effets communs, soient l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et l'augmentation de l'activation des récepteurs intégrine d'adhésion, dont le récepteur GP IIb/IIIa, ce qui favorise l'agrégation (Yun et al. 2016). L'augmentation du calcium intracellulaire provoque des changements structuraux et fonctionnels, tels que le changement de la forme discoïde à un aspect plutôt sphérique et la formation de pseudopodes, la libération de leur contenu en granules α et denses et la production de TxA_2 (Rumbaut RE 2010; Mancuso and Santagostino 2017). Finalement, un autre mécanisme promoteur de l'agrégation se produit durant l'activation par la migration vers le feuillet externe des PL chargés négativement (PS) qui a pour effet d'activer des facteurs de coagulation et la formation de thrombine (Rumbaut RE 2010).

iii. Agrégation

La production de médiateurs tels que le TxA_2 et l'ADP par les plaquettes activées induit une boucle de rétroaction positive de recrutement et d'activation de plaquettes supplémentaires qui conduit à la formation du bouchon hémostatique. Cette étape finale est médiée par la liaison de protéines d'adhésion au récepteur GPIIb/IIIa, ainsi que d'autres glycoprotéines telles que la fibronectine, le vWF et la vitronectine. De plus, la liaison du GPIIb/IIIa au fibrinogène permet la formation de ponts entre les plaquettes adjacentes pour faciliter le maintien et l'agrégation (Mancuso and Santagostino 2017). Malgré qu'il ait été démontré que le fibrinogène et le vWF ont un rôle majeur dans le processus d'agrégation et de maintien du thrombus, les protéines secondaires sont également importantes. En effet, la formation d'agrégats reste possible par un mécanisme d'adhésion dépendant de la fibronectine chez des souris dépourvues de vWF et de fibrinogène (Ni et al. 2000; Ni et al. 2003).

c. Voies de signalisation plaquettaires

Les mécanismes d'activation et d'agrégation plaquettaires décrits précédemment se produisent par l'activation de plusieurs voies de signalisation majeures qui feront l'objet de cette section (**Figure 8**).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

i. Les p38 Mitogen Activated Protein Kinase

Les p38 Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) (α, β, γ et δ) font partie de la superfamille des sérine/thréonine protéines kinases (Pearson et al. 2001). Elles sont activées par différents stress environnementaux tels que les radiations ionisantes, les UV, les protéines de choc thermique, le choc osmotique, le stress oxydant ainsi que par les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNFα) et phosphorylent les résidus Ser et Thr de nombreux substrats. Les plaquettes contiennent toutes les isoformes de la p38MAPK (Borsch-Haubold et al. 1999) ainsi que les extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 (Papkoff et al. 1994) et JNK1 (Bugaud et al. 1999). La phosphorylation rapide des p38MAPK est stimulée par le collagène, la thrombine et le vWF et celle-ci est nécessaire pour l'activation de la phospholipase A_2 cytosolique ($cPLA_2$).

ii. La phospholipase A_2 cytosolique et la cascade de l'acide arachidonique

La superfamille des phospholipases A_2 (PLA_2), dont fait partie la $cPLA_2$, contient les PLA_2 sécrétées ($sPLA_2$), les PLA_2 indépendantes du Ca^{2+}, les $iPLA_2$, les « platelet activating factor » (PAF)-acétylhydrolases (PAF-AH) et les PLA_2 lysosomales (Burke and Dennis 2009). Elles effectuent l'hydrolyse spécifique de la liaison ester en position *sn-2* des PL pour donner un AG non estérifié et un lysophospholipide. En réponse à une grande variété de stimuli, la $cPLA_2$ de 85 kDa est essentielle à la libération de l'acide arachidonique (AA) des membranes. Cet AGPI n-6, qui représente 20% des AG des membranes des plaquettes (Marcus, Ullman, and Safier 1969), est constitué de 20 carbones et 4 liaisons éthylènes (20:4 n-6, 4 insaturations : carbones 5, 8, 11 et 14) et est estérifié en position *sn-2* des PL. L'AA est l'un des substrats les plus importants dans la synthèse de nombreux médiateurs biologiques. Pour accéder aux PL contenant l'AA, la $cPLA_2$ doit se transloquer du cytoplasme à la membrane (Evans et al. 2001) par son interaction avec un domaine de liaison aux lipides (Calcium/lipid-binding domain, CaLB), ce qui nécessite également la présente de Ca^{2+}.

Suite à sa libération de la membrane par la $cPLA_2$, l'AA peut alors être utilisé la prostaglandine G/H synthase (PGHS), la première enzyme de la cascade de l'AA. La PGHS possède des activités cyclooxygénase (COX) et hydroperoxydase et elle reconnaît spécifiquement les AG à 20 carbones possédant 3 doubles liaisons en 8, 11 et 14, dont l'AA, ce qui permet la production de plusieurs prostaglandines (PG) (Smith, Marnett, and DeWitt 1991). Il existe trois isoformes de COX: la COX-1 constitutive, la COX-2 inductible et la COX-3 (Chandrasekharan et al. 2002), mais les plaquettes n'expriment que la COX-1 (Vane, Bakhle, and Botting 1998; Patrignani et al. 1999). Grâce à cette activité COX, la PGHS convertit d'abord l'AA en PGG2 puis, avec son activité hydroperoxydase, en PGH2, ce dernier étant le précurseur de tous les prostanoïdes synthétisés par cette voie enzymatique. Le TxA_2 plaquettaire est alors synthétisé par la conversion du PGH2 par la thromboxane

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

synthase (Needleman et al. 1976). Puisque le TxA_2 a une demi-vie très courte d'environ 30 secondes, il est rapidement hydrolysé en thromboxane B_2 (TxB_2) inactif (Hamberg and Samuelsson 1974) après avoir induit de multiples réactions physiologiques nécessaires à l'hémostase primaire.

iii. L'activation de la protéine kinase C et l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique par la phospholipase C

Trois isoformes de phospholipase C (PLC) (β, γ et δ) sont présentes dans les plaquettes et l'activation de la PLC est induite par presque tous les agonistes, même si les récepteurs activés initialement sont différents (Brass, Shaller, and Belmonte 1987). Lors d'une activation par le collagène, les résidus tyrosine kinase de la PLCγ2 sont activés, tandis que la thrombine, l'ADP et le TxA_2 activent la PLCβ. L'activation de PLC dans les plaquettes produit de l'inositol triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG) à partir du phosphatidylinositol bisphosphate (PIP2) membranaire, des messagers secondaires qui sont essentiels pour l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique ainsi que l'activation de la PKC.

La liaison de l'IP3 à ses récepteurs du système tubulaire dense entraîne la libération et l'augmentation du calcium cytosolique (Irvine 1990) combinée à l'entrée d'un influx de calcium extracellulaire via les canaux TRPC (transient receptor potential cation channels) et les CRAC (Ca^{2+} release-activated calcium channels). Cette hausse du calcium cytosolique est responsable de l'interaction entre l'actine et la myosine ainsi que l'activation de la PKC, en plus de stimuler certaines voies de signalisation telles que les SFKs (Src family kinases) et la voie PI3K/Akt (Xiang et al. 2012).
Ensuite, le DAG permet la translocation membranaire et l'activation de la PKC. Cette dernière contribue à l'activation d'αIIbβ3 (Shattil and Brass 1987) et à la libération d'AA (Halenda and Rehm 1987) via la cascade p38MAPK et $cPLA_2$. De nombreuses isoformes de la PKC localisées dans le cytosol ou la membrane sont exprimées par les plaquettes : les PKC α, β et γ sont les isoformes conventionnelles dépendantes du calcium et du DAG, les isoformes PKC δ, θ, et η sont les nouvelles isoformes indépendantes du calcium, mais dépendantes du DAG et l'isoforme atypique ζ, est indépendante du calcium et du DAG. Parmi les isoformes conventionnelles, les PKCα, jouent un rôle majeur dans l'agrégation. Les nouvelles isoformes telles que PKCδ sont également impliquées dans l'activation d'αIIbβ3 et l'agrégation induite par le collagène. De plus, lors d'une stimulation par la thrombine, les PKC δ et θ sont impliquées dans la sécrétion du contenu des granules denses. Finalement, les PKCδ potentialisent l'activation des voies ERK et p38 MAPK (Yacoub et al. 2006) et la libération de thromboxane A_2.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

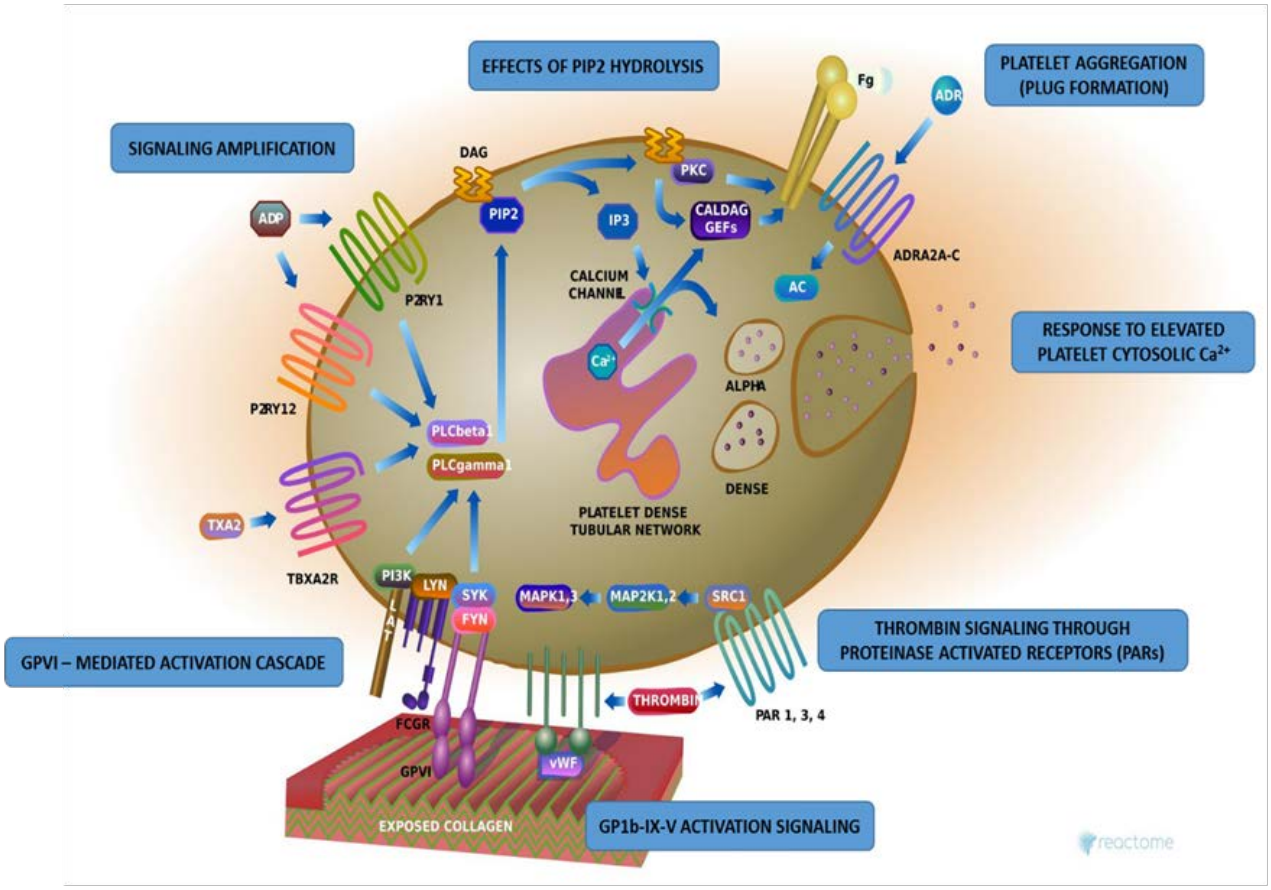


Figure 8: Voies de signalisation d'activation plaquettaire

Adaptée de The Reactome Pathway Knowledgebase (Fabregat et al. 2018). AC: acetylcholine; ADRA2A-C: alpha 2A-adrenergic receptor C; ADR: adrenaline; ADP: adenosine diphosphate; CAlDAG GEFs: calcium-diacylglycerol guanine nucleotide exchange factors; DAG: diacylglycerol; FCGR: Fc gamma receptor; Fg: fibrinogen; GPVI: glycoprotein VI; GP1b-IX-V: glycoprotein 1b-IX-V complex; IP3: inositol triphosphate; MAPK1, 3: mitogen-activated protein kinases 1, 3; MAP2K1: mitogen-activated protein kinase kinase 1 gene; PAR1, 3, 4: proteinase activated receptors 1, 3, 4; PIP2: phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; PKC: protein kinase C; PLCbeta1: phospholipase C beta 1; PLCgamma1: phospholipase C gamma 1; P2RY1: P2Y purinoceptor 1; P2RY12: P2Y purinoceptor 12; SRC1: steroid receptor coactivator-1; TBXA2R: thromboxane A2 Receptor; TxA_2: thromboxane A_2; vWF: vonWillebrand factor.

d. Récepteurs plaquettaires aux lipoprotéines

La capacité de liaison des lipoprotéines aux plaquettes via certains récepteurs est bien documentée, surtout pour les LDL et les HDL. En effet, afin de réguler la concentration de cholestérol intracellulaire ainsi que plasmatique, de nombreuses cellules possèdent des récepteurs aux LDL. Pour les plaquettes, l'apport en cholestérol se fait par les mégacaryocytes ou le plasma par leurs interactions avec les lipoprotéines, puisque celles-ci ne possèdent pas de noyaux et n'ont donc pas la capacité de synthétiser du cholestérol. La présente section traitera des principaux récepteurs plaquettaires qui permettent la liaison des lipoprotéines.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

i. CD36

Le récepteur CD36 est une glycoprotéine transmembranaire de la famille des « scavenger receptor » de classe B exprimé dans de nombreux types cellulaires en plus des plaquettes : les mégacaryocytes, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales microvasculaires, les adipocytes, les cellules épithéliales du rein, de la rétine, du sein et de l'intestin ainsi que par les myocytes et les cellules musculaires lisses (Febbraio, Hajjar, and Silverstein 2001). De nombreux ligands sont donc reconnus par le récepteur CD36 tels que la thrombospondine-1 (Asch et al. 1987), le collagène (Tandon, Kralisz, and Jamieson 1989), les AG à longue chaîne, les DAG microbiens et le peptide ß-amyloïde. Un des premiers rôles associés à CD36 est en lien avec sa fonction « éboueur » dans l'immunité, mais il a été démontré qu'il est aussi impliqué dans le transport des AG et la régulation de l'angiogenèse. En effet, dans les myocytes, CD36 capte les AG à longue chaîne libres qui sont utilisés pour la bêta-oxydation lors de la contraction musculaire (Dawson et al. 1997) alors qu'il contribue au stockage des lipides dans les adipocytes (Abumrad et al. 1993).

De par ses rôles dans le métabolisme des lipides, dont surtout le cholestérol, le récepteur CD36 est également impliqué dans des processus pathophysiologiques qui ne sont pas indépendants les uns des autres, particulièrement l'athérosclérose, l'activation plaquettaire et le diabète. Plus précisément, les LDL oxydées seraient impliquées dans le développement de l'athérosclérose en raison de leur contenu élevé en PL ou en lipides oxydés (oxystérols, PL oxydés), puisque des oxLDL délipidées ne sont pas reconnues par CD36 alors que des liposomes de PL anioniques le sont (Nicholson et al. 1995; Rigotti, Acton, and Krieger 1995; Ryeom et al. 1996). Des molécules de PC oxydées sont présentes dans la circulation de souris hyperlipémiques et pro-athérothrombotiques de même que chez des humains hyperlipémiques avec une maladie athérosclérotique connue ainsi que dans des plaques d'athérosclérose de souris et d'humains, mais ne sont que très peu détectées dans des segments d'artères sains (Podrez et al. 2007). L'affinité des PL oxydés pour CD36 (aussi définis comme des $oxPC_{CD36}$) pourrait être due à une particularité de leur structure moléculaire. En effet, l'AG insaturé en position *sn-2* de la PC est tronqué au site de la double liaison la plus proximale du PC qui contient soit un acide carboxylique terminal ou un aldéhyde avec une double liaison en position bêta et un alcool ou une cétone en position gamma (Silverstein et al. 2010). Ce phospholipide oxydé tronqué en position *sn-2* serait alors accessible pour se lier à CD36 puisqu'il pourrait dépasser de la surface des oxLDL dans la phase aqueuse en raison de sa nature hydrophile (Greenberg et al. 2008).

Concernant les interactions entre les lipoprotéines et les plaquettes, il est bien établi que les oxLDL se lient aux plaquettes via CD36, ce qui n'a pas été démontré clairement pour les LDL natives.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Par contre, les LDL natives peuvent modifier le métabolisme plaquettaire par l'activation de signaux de transduction ou par échanges lipidiques, ce qui pourrait modifier la composition en PL de la membrane plaquettaire soit par l'induction de la synthèse, la translocation, ou encore favoriser l'incorporation de PL de la circulation dans la membrane plaquettaire (Engelmann et al. 1996). Tel que mentionné précédemment, les PC oxydées contenues dans les oxLDL peuvent se lier à CD36, ce qui, en plus de favoriser le développement de l'athérosclérose, peut provoquer l'activation plaquettaire par différentes voies de signalisation : la cascade Src, Syk et la PLC-γ (Podrez et al. 2002; Zimman et al. 2014), la cascade de l'AA par p38MAK (Hackeng et al. 1999), l'expression de la P-sélectine et l'activation de l'intégrine αIIbβ3 (Podrez et al. 2007), mais également par la phosphorylation des Vav et de Jun kinase (JNK) (Magwenzi et al. 2015). De plus, les plaquettes interagissent avec les oxLDL et libèrent des chemokines qui favorisent l'athérosclérose (Siegel-Axel et al. 2008), démontrant bien l'importance du rôle des lipoprotéines sur les plaquettes dans les pathologies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose qui se retrouvent également en contexte de DT2.

En plus des LDL, il a également été rapporté que les HDL fortement oxydées par l'hypochlorite (Assinger et al. 2010) ainsi que les VLDL (Englyst et al. 2003) peuvent se lier aux plaquettes par CD36 et induire l'activation plaquettaire. Cependant, les études portant sur les effets d'activation plaquettaire par les VLDL sont encore peu nombreuses et les résultats sont discordants.

ii. Scavenger receptor-B1

Tout comme CD36 et comme son nom l'indique, le récepteur *scavenger* de type I de classe B (SR-BI) est une glycoprotéine membranaire qui fait partie de la famille des récepteurs « éboueurs » de classe B. Ce récepteur est exprimé par plusieurs types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les macrophages et les plaquettes, entres autres. SR-B1 est le récepteur de surface des cellules responsable de la captation des HDL, ce qui permet de fournir des EC aux cellules par la voie « sélective » d'uptake du cholestérol. En plus des HDL natives ou oxydées (Valiyaveettil et al. 2008), SR-B1 lie aussi les LDL (natives, acétylées ou oxydées) (Krieger 2001), les VLDL, les PL anioniques ou oxydés, les EC, les apolipoprotéines (apoA-I, apoA-II), la lipoprotéine(a) (Yang et al. 2013; Van Eck et al. 2008; Krieger 2001), les cellules apoptotiques (Li et al. 2005), les AGE (advanced glycation end products) (Ohgami et al. 2003), le peptide β-amyloïde (Cai et al. 2005) et l'apoE (Chroni et al. 2005), entres autres.

La fonction majeure de SR-B1 est son rôle dans le transport du cholestérol aux cellules ainsi que dans l'efflux de cholestérol cellulaire vers les HDL matures et de stimulation des échanges de cholestérol entre les cellules et les lipoprotéines (Ji et al. 1997; Yancey et al. 2003; Phillips 2014). Des

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

aspects déterminants pour l'affinité de SR-B1 vis-à-vis des différentes sous-classes de HDL, particulièrement les HDL2 et 3, sont la conformation de leur apolipoprotéine principale, l'ApoA-I, et leur structure. En effet, l'affinité de SR-B1 pour les HDL sera plus élevée pour les particules de plus grande taille (de Beer et al. 2001; Liadaki et al. 2000).

En plus de son rôle dans le métabolisme du cholestérol, SR-B1 est le récepteur plaquettaire des HDL et participe à la régulation de l'agrégation plaquettaire et de la thrombose, en particulier en conditions hyperlipémiques (Dole et al. 2008; Ma, Ashraf, and Podrez 2010). Par exemple, Imachi *et al.* ont démontré que l'agrégation plaquettaire était augmentée chez des patients DT2 avec athérosclérose chez qui l'expression de SR-B1 plaquettaire est diminuée (Imachi, Fukata, and Murao 2014). Il est connu que les HDL ont plutôt un effet antiagrégant sur les plaquettes, particulièrement les HDL3 qui se lient à SR-B1 (Nofer et al. 1998).L'effet antiagrégant des HDL3 serait dû à la présence de PL chargés négativement et à leur enrichissement en PS (Brodde et al. 2011). De plus, l'oxydation des HDL ne leur ferait pas perdre leur capacité d'inhibition de l'agrégation plaquettaire, ce qui pourrait aussi être associé aux PL oxydés, qui augmenterait la charge négative des particules et leur affinité pour SR-B1. Par contre, une forte oxydation des HDL modifierait leur structure et les ferait se lier à CD-36 sur les plaquettes et les macrophages (Assinger et al. 2010; Thorne et al. 2007).

e. La dysfonction plaquettaire dans le diabète de type 2

La relation entre le DT2 et l'hyperactivité plaquettaire est bien établie. En effet, les plaquettes de DT2 sont hyperagrégables (Ferreira et al. 2006) et produisent plus de TxA_2 (Davì et al. 1990), même en l'absence de complication cardiovasculaire (Vericel et al. 2004). Plusieurs mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dysfonction plaquettaire ont été suggérés incluant la présence d'une résistance à l'insuline, l'hyperglycémie, un stress oxydant associé et une dysfonction endothéliale (**Figure 9**).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

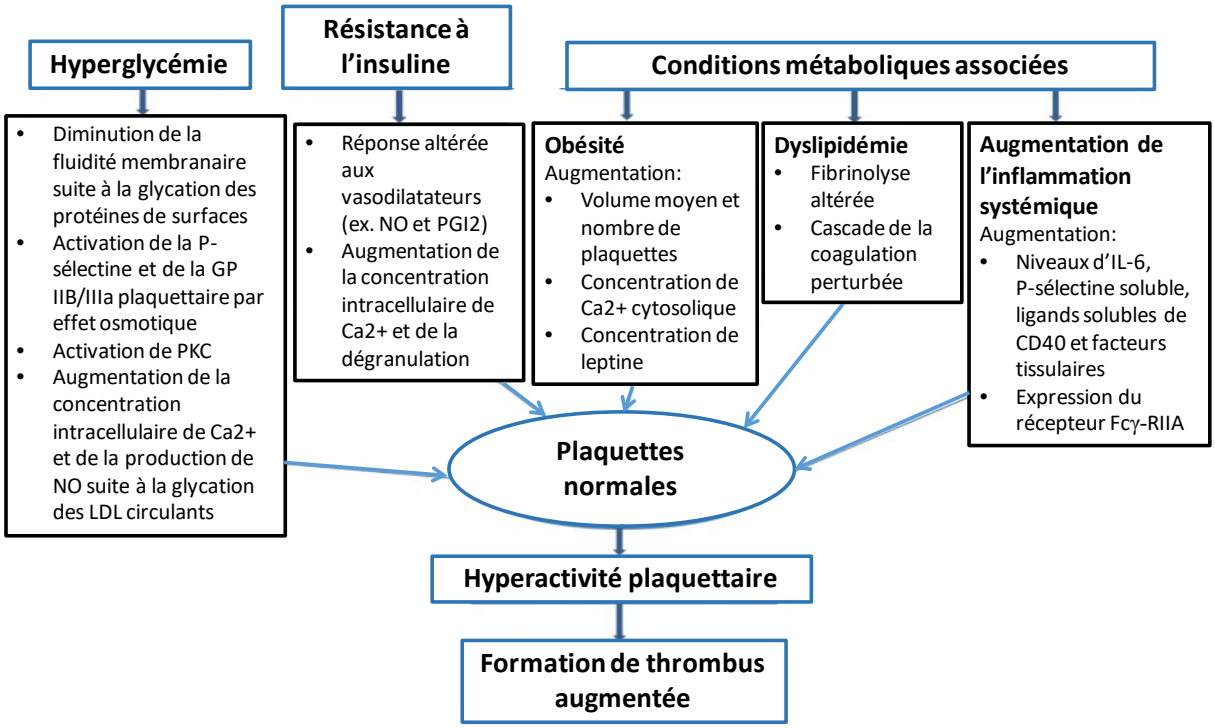


Figure 9: Facteurs impliqués dans l'hyperactivité plaquettaire chez les individus diabétiques de type 2
Tirée de (Kaur, Kaur, and Singh 2018)

Il a été démontré que l'insuline exerce un effet inhibiteur de l'activation plaquettaire, mais les mécanismes de cette action ne sont pas tous caractérisés. En effet, les plaquettes sont une cible de l'insuline, puisqu'elles ont conservé un récepteur fonctionnel à l'insuline capable de la lier et de l'autophosphoryler (Falcon et al. 1988). Une des actions principales de l'insuline sur les plaquettes est la réduction de l'agrégation stimulée par un agoniste via l'atténuation de l'augmentation du calcium intra-plaquettaire. La présence d'une résistance à l'insuline chez les patients DT2 cause une perte de cette fonction inhibitrice de l'activation (Voahanginirina November 18th 2015).

Ensuite, de nombreuses études se sont intéressées à l'effet de l'hyperglycémie sur les fonctions plaquettaires. La présence d'une hyperglycémie, même induite de manière aigüe, provoque une augmentation de l'activation plaquettaire en condition de forces de cisaillement élevées *in vitro* et *in vivo* (Gresele et al. 2003). De plus, l'hyperglycémie entraîne aussi la perturbation de l'homéostasie du calcium combinée à l'activation de la PKC, la diminution de la production d'oxyde nitrique et la formation d'anion superoxide, ce qui contribue à augmenter la sensibilité des plaquettes aux agonistes (Vinik et al. 2001; Assert et al. 2001; Li, Woo, and Bose 2001). Une action importante de l'hyperglycémie sur les plaquettes est la glycation non-enzymatique qu'elle provoque, ce qui a pour effet de modifier les protéines membranaires (Winocour 1992). L'expression des récepteurs de la P-sélectine et GpIIb/IIIa, entre autres, est augmentée, ce qui augmente la

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

disponibilité pour leurs ligands (Tschoepe et al. 1995; Watala et al. 1996). L'hyperglycémie joue également un rôle dans le développement du stress oxydant présent chez les patients DT2 en augmentant directement la production de radicaux libres issus du métabolisme du glucose et l'auto-oxydation qui peuvent activer des molécules telle que la PKC (Ha and Lee 2001). De plus, puisque le plasma des patients DT2 mal contrôlés est plus riche en radicaux libres, sa capacité antioxydante s'en retrouve donc diminuée (Tsai et al. 1994). Finalement, en situation normale, l'endothélium vasculaire contribue à la régulation de l'activité de composés pro-agrégants, tels que la thrombine, le collagène, l'ADP et le TxA_2, et libère des agents antiagrégants comme l'oxyde nitrique et une prostacycline (PGI_2) pour prévenir la formation de thrombus (Gryglewski, Botting, and Vane 1988). Par contre, chez les individus DT2, la libération des agents antiagrégants est diminuée ce qui contribue à la perte de contrôle des plaquettes et leur contact avec l'endothélium (Vinik et al. 2001).

f. Lipoprotéines oxydées et activation plaquettaire

L'oxydation des lipoprotéines est fréquemment observée chez les DT2, et leur interaction avec les plaquettes a des conséquences sur les fonctions de ces dernières. Il est bien établi que les LDL oxydées *in vitro* par le cuivre stimulent fortement l'activation plaquettaire et il a été démontré que l'augmentation de l'activation des voies de signalisation plaquettaire est dépendante du degré d'oxydation des particules et de la durée du contact entre les plaquettes et les oxLDL. En effet, l'incubation de plaquettes avec des LDL natives active la p38MAPK (sans modification de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire) au même niveau que lorsque les plaquettes sont incubées avec des particules oxydées par du sulfate de fer entre 1 et 15%. A partir de 16% d'oxydation, la phosphorylation de la p38 MAPK augmente jusqu'à être environ 6 fois plus importante dans des plaquettes traitées par des LDL oxydées à plus de 60% tandis que la mobilisation du Ca^{2+} est augmentée d'un peu de plus de 2 fois (Korporaal et al. 2005). La présence de LDL fortement oxydées par le cuivre cause le changement de forme des plaquettes et induit également une agrégation légère de l'ordre de 8-29%, et ce en l'absence de stimulation par un agoniste (Wraith et al. 2013). Les oxLDL isolées de patients DT2 ont aussi la capacité d'augmenter la phosphorylation des p38MAPK et de la $cPLA_2$ ainsi que la concentration de TxB_2 plaquettaire et de stimuler l'agrégation plaquettaire comparativement à des LDL de sujets sains pairés pour le sexe et l'âge (Calzada et al. 2007; Colas et al. 2011).

L'oxydation des HDL et leur effet sur les plaquettes ont également été étudiés, et il aurait été possible de croire que ces particules modifiées perdent leurs propriétés anti-agrégantes, ce qui n'est pourtant pas le cas. En effet, plusieurs groupes ont démontré que les HDL oxydées par le cuivre *in vitro* (oxHDL) conservent leurs propriétés anti-agrégantes. En effet, les oxHDL inhibent l'agrégation

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

plaquettaire comparativement aux HDL natives qui n'ont pas d'effet, et cet effet inhibiteur est augmenté avec des concentrations croissantes d'oxHDL (100 µg/ml-200 µg/ml) et lorsque les plaquettes sont exposées plus longtemps aux particules (5-30 minutes) (Valiyaveettil et al. 2008). Il en est de même pour des HDL isolées de patients porteurs d'abêtalipoprotéinémie, qui présentent une forte oxydation, mais qui conservent tout de même leur capacité à inhiber l'agrégation plaquettaire comparativement à des HDL de sujets sains (Calzada et al. 2013). Chez des patients DT2, l'analyse de la composition en lipides des HDL a montré que celles-ci contiennent des concentrations plus élevées dans leurs PL d'acides hydroxy-octadécadiénoïque (9-HODE et 13-HODE) et d'acide 15-hydroxy-eicosatétraénoïque (15-HETE), qui sont des métabolites oxydés des acides linoléique et arachidonique, respectivement, et qu'elles inhibent davantage l'agrégation plaquettaire comparativement à des HDL d'individus sains (Le et al. 2015).

Comparativement aux LDL et aux HDL, très peu d'études ont porté sur les effets des LRT sur les plaquettes et aucune n'a testé des particules isolées de patients DT2. Englyst *et al.* ont démontré que les VLDL de sujets normolipidiques (1 mg prot/ml) pouvaient stimuler la production de TxA_2 ainsi que l'agrégation induite par le collagène via leur liaison à CD36, puisque le blocage du récepteur par un anticorps monoclonal diminuait fortement les effets observés (Englyst et al. 2003).De plus, il a déjà été démontré que les LDL et les HDL pouvaient transférer des PL (PC, PE et SM) aux plaquettes (Engelmann et al. 1996; Ibrahim et al. 2006) et les VLDL le pourraient également (Ibrahim et al. 2007). Ce transfert de PL serait favorisé par la LPL, puisque la présence de l'enzyme et des VLDL stimule la production de TxB_2 plaquettaire, ce qui n'est pas le cas en présence de la LPL seule (Ibrahim et al. 2006). Il est assumé que les LRT ne restent pas assez longtemps en circulation pour subir l'oxydation comme les LDL et les HDL. Dans ce contexte, très peu d'études se sont intéressées aux VLDL oxydées *in vitro* (oxVLDL) et portent surtout sur leur interaction avec les macrophages. En effet, les oxVLDL pourraient perturber le métabolisme lipidique des macrophages en provoquant la diminution de la synthèse *de novo* de TG par les cellules comparativement au VLDL natives (Jong et al. 2000) ainsi que favoriser l'accumulation intracellulaire d'esters de cholestérol (Whitman et al. 1998).

g. Etat postprandial et activation plaquettaire

Une question importante concerne également l'impact potentiel de l'état PP, et l'augmentation de la lipémie associée, sur l'activation plaquettaire. De manière générale, chez le sujet sain, une lipémie PP accrue n'a pas d'effet majeur sur l'activation des plaquettes (Mikellidi A 2016). En effet, chez des sujets sains ayant ingéré un repas test gras, les seuls effets observés sur les plaquettes non stimulées par un agoniste sont une augmentation de la P-sélectine (Bröijersén et al.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

1998) et un changement de conformation dans sa forme activée du récepteur GPIIb-IIIa (Hyson et al. 2002) ou une inhibition de l'agrégation (Sinzinger and Berent 2012; Nimpf et al. 1989). Ces effets négligeables d'une lipémie PP augmentée chez des sujets sains pourrait être expliquée en partie par l'action inhibitrice des CM sur l'agrégation plaquettaire (Aviram and Brook 1987).

Cependant, le statut métabolique affecterait la réponse des plaquettes suite à un repas riche en matières grasses ou une charge orale de lipides. Chez des sujets hypertriglycéridémiques, la consommation d'un repas riche en matières grasses saturées augmente l'agrégation de leurs plaquettes stimulées avec de l'ADP comparativement à des plaquettes isolées de donneurs sains (Fuhrman, Brook, and Aviram 1986). Dans une étude similaire, les VLDL de sujets normolipidiques et hypertriglycéridémiques augmentent l'activation plaquettaire suite à la consommation d'un repas gras et cet effet est maintenu pour les sujets hypertriglycéridémiques 5 heures après le repas (Aviram, Fuhrman, and Brook 1986). En ce qui concerne les patients DT2, il a été démontré que l'état PP est associé avec une augmentation de l'activation plaquettaire (Razmara et al. 2007; Spectre et al. 2012). Par contre, le repas test utilisé dans ce contexte est majoritairement élevé en glucides et non pas en lipides.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

La revue de la littérature décrit une altération du métabolisme lipidique chez les individus DT2 qui contribue à augmenter leur risque cardiovasculaire. En effet, plusieurs classes de lipoprotéines subissent des modifications quantitatives et qualitatives qui sont impliquées dans le développement de complications cardiovasculaires associées au DT2. Toutefois, l'implication des LRT, qui sont un mélange hétérogène de plusieurs types de particules et dont la composition est influencée par l'alimentation et le métabolisme lipidique endogène, est méconnue. De plus, l'implication des SL dans les maladies cardiométaboliques en tant que molécules bioactives contenues dans les lipoprotéines nécessite d'être davantage investiguée. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse principale que les LRT de patients DT2 à jeun et en postprandial auraient un impact sur l'agrégation plaquettaire. Nous supposons aussi (i) que la composition en AG des LRT de patientes DT2 en postprandial serait modifiée et aurait un effet sur les fonctions plaquettaires, et (ii) que la composition sphingolipidomique des LRT de patientes DT2 serait différente selon la source de la MG consommée.

Dans un premier temps, nous avons effectué une étude *in vitro* dont les objectifs étaient de :

- Déterminer les effets des LRT de patients DT2 à jeun sur les plaquettes comparativement à des LRT de sujets sains ;
- Étudier les mécanismes impliqués dans l'effet des LRT de patients DT2 à jeun sur l'agrégation plaquettaire.

Afin de pouvoir tester nos hypothèses sur les LRT en phase PP, nous avons mis en place un protocole clinique avec les objectifs suivants :

- Caractériser les LRT de patientes DT2 à jeun et suite à un repas contenant des MG de sources différentes (végétale vs laitière) ;
- Établir les effets sur les plaquettes des LRT de patientes DT2 suite à la consommation d'un petit déjeuner contenant des MG de différentes sources comparativement à des LRT isolées à jeun ;
- Déterminer la composition sphingolipidomique du plasma et des LRT de patientes DT2 suite à la consommation d'un petit déjeuner contenant des MG de différentes sources comparativement au plasma et aux LRT isolées à jeun.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

1. INTERACTIONS PLAQUETTES ET LIPOPROTEINES RICHES EN TRIGLYCERIDES

a. Matériel et réactifs

- Anticorps polyclonaux anti-phospho-p38 MAPK, anti-phospho-cPLA2 et anti-β-actine, Cell Signaling Technology
- Collagène type I de tendons équins, Diagnostica Stago
- ECL Select Western Blotting Detection Kit, GE Healthcare
- Gels d'électrophorèse Critérion XT MOPS 12% Bis-Tris et 3-8% Tris-Acétate, tampon de migration, Bio-Rad
- Kit de dosage de l'apolipoprotéine B-48, FUJIFILM Wako Shibayagi Corporation
- Kit de dosage de l'apolipoprotéine B-100, Mabtech
- Kit de dosage du thromboxane B_2, Enzo Life Sciences
- Réactifs de dosage des protéines, Bio-Rad
- Thrombine de plasma humain, Sigma-Aldrich

b. Appareils

- Agrégomètre à transmission lumineuse, Chrono-log Corp.
- Automate ARCHITECT c16000, Abbott
- Balances, Mettler
- Centrifugeuse, Eppendorf
- pH-mètre Radiometer, Tacussel
- Spectrophotomètre lecteur de plaque, ThermoFisher
- Système d'électrophorèse Mini-Protean II et d'électrotransfert Mini-Trans Blot, Bio-Rad
- Système d'imagerie ImageMaster VDS-CL (logiciel Quantity One, BioRad), Amersham Pharmacia
- Ultracentrifugeuse Optima TL, rotor 100.2, Beckman Coulter
- ZetaSizer Nano S, Malvern Panalytical

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

c. Méthodes relatives au plasma et LRT

i. Isolement du plasma

Le sang des patients diabétiques est prélevé par un(e) infirmier(ère) du service d'Endocrinologie, Diabétologie, Maladies métaboliques et Nutrition du Groupement Hospitalier Est des Hospices Civils de Lyon et recueilli dans des tubes contenant un anticoagulant lyophilisé (1,8 mg d'EDTA/tube).

Le sang des volontaires sains de l'étuble FiTABlé est prélevé de la même façon que les patients diabétiques, excepté que l'étude s'est déroulée au Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes (CRNH-RA).

Le sang est immédiatement centrifugé à 1500 g durant 10 minutes à 4°C afin d'obtenir du plasma qui est ensuite stocké à -20°C et utilisé dans un délai court.

ii. Dosage des ApoB-48 et B-100 du plasma et des LRT

La détermination des concentrations d'ApoB-48 dans le plasma et les LRT est obtenue par méthode immuno-enzymatique avec des kits de dosage commerciaux (Shibayagi) qui consistent à mesurer l'augmentation de la turbidimétrie causée par la formation de complexes immuns insolubles entre les anticorps anti-apoB-48 et leur antigène dans les LRT et leurs remnants. Les échantillons sont incubés dans des puits tapissés d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'apoB-48. Suite à un lavage, un anticorps anti-apoB-48 conjugué à la biotine est ajouté suivi d'une seconde incubation qui permettra à l'anticorps de se lier avec l'apoB-48 captée auparavant. Une peroxydase de raifort conjuguée à de l'avidine est ajoutée. Après un lavage, un substrat chromogène (TétraMéthylBenzidine) est ajouté et réagira avec la peroxydase pour produire une couleur jaune dont l'absorbance sera mesurée par spectrophotométrie à 450 nm. L'absorbance est proportionnelle à la quantité d'apoB-48 présente dans les échantillons.

L'ApoB totale dans le plasma et les fractions LRT est mesurée par une méthode similaire par l'automate du Centre de Biologie Est des Hospices Civils de Lyon. Les concentrations d'ApoB-100 sont obtenues par soustraction de l'ApoB-48 à l'ApoB totale.

iii. Ultracentrifugation à temps court du plasma

La séparation des lipoprotéines par ultracentrifugation à temps courts est basée sur leurs différences de densité (Tong, Knapp, and VanRollins 1998). Leurs propriétés de flottaison sont différentes en fonction de la densité du milieu. Puisque les LRT sont les particules les moins denses, il n'est pas nécessaire d'ajuster la densité du plasma pour les isoler. Le plasma est déposé délicatement sous une couche d'eau distillée et ultracentrifugé à 9777 g pendant 1h à 12°C. Les 125 µL de la

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

couche supérieure correspondant aux LRT de densité <1.000 g/ml sont collectés et stockés à 4°C et sont utilisés en moins de 2 jours.

iv. Dosage des protéines des LRT

Le contenu protéique des LRT est déterminé par une réaction colorimétrique selon la méthode de Lowry basée sur les réactions combinées du biuret et du réactif de Folin-Ciocalteu (Lowry et al. 1951). En présence de cuivre et en milieu alcalin, le Folin-Ciocalteu à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate réagit avec les tyrosines et les tryptophanes pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret (NH_2-CO-NH-CO-NH_2). Ces réactifs forment un complexe entre deux liens peptidiques consécutifs qui absorbe fortement la lumière bleue. La lecture du dosage s'effectue par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 750 nm. Une gamme étalon est réalisée avec des concentrations connues et croissantes d'albumine bovine sérique (BSA). Chaque échantillon est dosé en duplicate.

v. Dosages des lipides du plasma et des fractions de LRT

Les concentrations de TG et de cholestérol dans le plasma et les fractions LRT sont mesurées par l'automate du Centre de Biologie Est des Hospices Civils de Lyon par méthode colorimétrique enzymatique.

1. Triglycérides

Les TG sont d'abord hydrolysés par une lipase pour libérer les AG libres et le glycérol. Ce dernier est phosphorylé par une glycérol kinase en présence d'ATP pour produire du glycérol-3-phosphate et de l'ADP. Le glycérol-3-phosphate est oxydé en dihydroxyacétone phosphate par la glycérol phosphate oxydase, ce qui produit également du peroxyde d'hydrogène qui réagit avec la 4-aminoantipyrine et le 4-chlorophénol lors d'une réaction catalysée par une peroxydase pour produire de la quinonéimine, un chromophore rouge, dont l'absorbance est mesurée à 500 nm. L'absorbance de la quinonéimine est proportionnelle à la concentration en TG de l'échantillon.

2. Cholestérol total

Les EC sont hydrolysés par la cholestérol estérase pour produire du cholestérol et des AG libres. Le cholestérol libre, incluant celui présent initialement dans l'échantillon, est oxydé par la cholestérol oxydase en présence d'oxygène pour former du cholestène-4-one-3 et du peroxyde d'hydrogène. Ce dernier se combine à l'acide hydroxybenzoïque et à la 4-aminoantipyrine pour former la quinonéimine, une molécule contenant des groupements chromophores qui absorbent à 500nm.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

3. Cholestérol HDL

Cette technique de dosage est basé sur l'accélération de la réaction catalysée par la cholestérol oxydase avec le cholestérol non-HDL par un détergent spécifique (n,n-bis (4-sulfobutyl)-m-toluidine-disodique). Lorsque le cholestérol non-HDL non estérifié entre en contact avec le premier réactif (cholestérol estérase, peroxydase de raifort, n,n-bis (4-sulfobutyl)-m-toluidine-disodique, accélérateur et acide ascorbique oxydase), il est soumis à une réaction enzymatique qui produit du peroxyde d'hydrogène qui sera dégradé par la peroxydase au cours d'une réaction incolore. Le second réactif (un détergent de cholestérol estérase et un coupleur chromogène) permet de solubiliser le cholestérol HDL et de le quantifier par la coloration résultante.

vi. Mesure du diamètre des particules dans les fractions de LRT

Le diamètre hydrodynamique des LRT a été mesuré avec un granulomètre Zetasizer par diffusion dynamique de la lumière qui permet de mesurer la diffusion des particules soumises au mouvement brownien afin de calculer une distribution de taille des particules basée sur la relation de Stokes-Einstein. Les paramètres utilisés sont : température : 25°C, indice de viscosité : 1,0658, indice de réfraction des LRT : 1,445, indice de réfraction de la phase aqueuse : 1,330.

d. Méthodes relatives aux plaquettes

i. Isolement

Les plaquettes sont isolées selon la méthode de Lagarde (Lagarde et al. 1980) à partir de sang de donneurs sains de l'Etablissement Français du Sang n'ayant pris aucun médicament pouvant interférer sur le fonctionnement normal des plaquettes (par exemple aspirine et anti-inflammatoires non stéroïdiens). Le sang est recueilli en présence d'anticoagulant CPD (acide citrique 15,6 mM; citrate de sodium 89,4 mM; phosphate monosodique 16,1 mM; dextrose 128,7 mM, pH 5,6, 1 volume de CPD pour 7 volumes de sang). Il est centrifugé pendant 17 minutes à 200g à 20°C. Le plasma riche en plaquettes (PRP) situé en phase supérieure est récupéré et est acidifié à pH 6,4 à l'aide d'acide citrique (0,15M) afin d'éviter l'agrégation spontanée des plaquettes pendant la deuxième centrifugation (900g pendant 12 minutes à 20°C). Le surnageant correspondant au plasma pauvre en plaquettes (PPP) est retiré et les culots plaquettaires sont suspendues à nouveau avec de la Tyrode-HEPES (NaCl 137 mM; KCl 12,7 mM; $NaHCO_3$ 11,9 mM; NaH_2PO_4, H_2O 0,41 mM; $MgCl_2$, 6 H_2O 1 mM; HEPES 5mM; glucose 5 mM) (pH 7,35). Les plaquettes sont laissées au minimum 1 heure au repos à température ambiante avant toute autre intervention.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

ii. Dosage des protéines

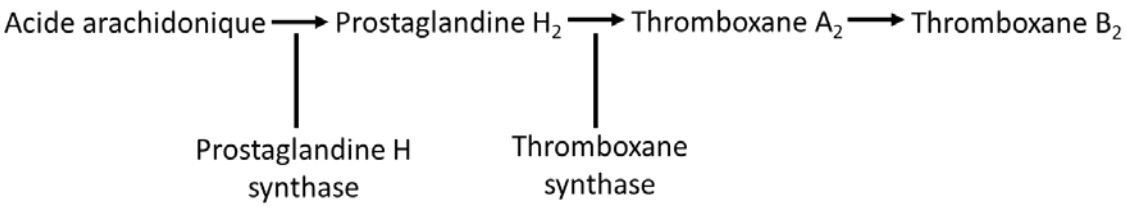
La concentration des protéines plaquettaires est quantifiée par la méthode de Bradford, une réaction colorimétrique qui utilise le bleu de Coomassie G250 qui absorbe à une longueur d'onde de 465 nm. La fixation covalente du colorant sur les résidus d'acides aminés (arginine, lysine et histidine) déplace l'absorption maximum à 595 nm et le nombre de charges positives portées par la protéine est approximativement proportionnel au nombre de molécules de pigment fixé par molécule de protéine. Une gamme étalon est réalisée avec des concentrations connues et croissantes d'albumine bovine sérique (BSA) et chaque échantillon est dosé en duplicate.

iii. Mesure de l'agrégation

L'agrégation des plaquettes isolées a été réalisée selon la méthode turbidimétrique de Born (Born 1962) dans un agrégomètre équipé d'une cellule photo-électrique couplé à un enregistreur qui permet de mesurer le changement de transmission lumineuse à travers la suspension plaquettaire suite à l'addition d'un agoniste. Le 0 % de transmission lumineuse est réglé avec 400 µL de suspension plaquettaire turbide et le 100% de transmission lumineuse (agrégation totale) est réglé avec le tampon Tyrode-HEPES. 400 µl de plaquettes à concentration physiologique sont pré-incubées à 37°C ; soit seules pendant 2 minutes ou en présence de LRT pendant 5 minutes. L'agrégation est mesurée durant 4 minutes à 37°C sous agitation (1000 tours/min) immédiatement après l'ajout de collagène ou de thrombine.

iv. Dosage du thromboxane B_2

Le TxB_2 est un marqueur biochimique d'activation plaquettaire, puisqu'il est un catabolite stable et inactif du TxA_2, issu de la voie de signalisation de l'AA :



Il est mesuré par dosage immuno-enzymatique compétitif colorimétrique (ELISA compétitif). Le dosage est réalisé sur une plaque 96 puits dont les fonds sont recouverts d'anticorps chèvre anti-lapin. Les échantillons plaquettaires dilués et les standards de TxB_2 sont déposés et les anticorps de lapin anti-TxB_2 ainsi que la phosphatase alcaline conjuguée au TxB_2 (la molécule compétitive) sont ajoutés. Puisque la quantité de TxB_2 conjugué à la phosphatase alcaline dans chaque puits est constante, la quantité de TxB_2 contenue dans les échantillons déterminera le ratio de liaison à

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

l'anticorps (TxB_2 de l'échantillon vs TxB_2 conjugué). La plaque est incubée à température ambiante et est ensuite lavée de sorte que les anticorps non liés soient éliminés. Le substrat chromogène de la phosphatase alcaline conjuguée au TxB_2 (p-nitrophényl phosphate) est ensuite ajouté dans les puits et la plaque est incubée 45 minutes à température ambiante. La quantité de substrat est proportionnelle à la quantité de TxB_2 conjugué à la phosphatase alcaline présente dans le puits, mais inversement proportionnelle à la quantité de TxB_2 présente dans les échantillons. Après arrêt de la réaction par acidification, la densité optique est lue à une longueur d'onde de 405 nm avec une correction à 680 nm et l'intensité de la couleur jaune est inversement proportionnelle à la concentration de TxB_2 contenue dans les échantillons.

v. Analyse par immunoblot (western-blotting) des p38 MAPK et phospholipase A_2 cytosolique phosphorylées

La suspension plaquettaire est centrifugée 5 minutes à 13000 g. Le surnageant est retiré et remplacé par 500 µL de solution de lyse (Trizma 20 mM, Triton-X100 1%, MgCl2 5mM, EGTA 2mM, pH=8 en présence d'inhibiteurs de phosphatases : Na4P2O7, 10 H2O 40mM, NaF 50 mM, Na3VO4 100µM et d'inhibiteurs de protéases : AEBSF 2mM, aprotinine 3µM, leupeptine 43µM, pepstatine 29µM). Les tubes sont vortexés puis placés dans la glace pendant 30 minutes au minimum. Après une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 13000 g, si aucun culot n'est observé, des aliquotes de 50µL sont préparées et conservées à -80°C. Suite à la lyse des plaquettes, les protéines sont dénaturées à 100°C pendant 5 min par ajout d'un tampon de dénaturation et séparées par électrophorèse sur gels de polyacrylamide 12% bis-Tris (pour la p38 MAPK) ou de 3-8% Tris-Acétates pré-coulés (pour la $cPLA_2$), réalisée dans un tampon de migration XT MOPS (Bio-Rad) à une tension constante de 200 V ou 150 V pendant environ 1h. Les protéines séparées sur gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose dans un tampon de transfert (Trizma 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20%) réfrigéré durant 30 minutes à une tension constante de 100 V. La membrane est rincée dans un tampon salin TBS-T (Trizma 20 mM, NaCl 137 mM, Tween 0,1%, pH 7,6) puis incubée durant 1h sous agitation dans du tampon de blocage (lait écrémé 5% préparé avec du TBS-T) afin de saturer les sites aspécifiques. Après plusieurs rinçages de la membrane dans du TBS-T, elle est incubée une nuit à 4°C avec des anticorps anti-phospho-p38 MAPK ou anti-phospho-$cPLA_2$ de lapin (dilués au 1:2500ème dans un tampon TBS-T contenant 1% de BSA), lavée dans du TBS-T puis incubée avec un anticorps secondaire polyclonal de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase de Raifort (1:5000ème dans un tampon TBS-T contenant 1% de BSA). La membrane est révélée par chimioluminescence grâce au kit ECL Select. Les bandes correspondant aux phospho-p38 MAPK et phospho-$cPLA_2$ sont visualisées avec une caméra ImageMaster VSD-CL et quantifiées avec le logiciel Quantity One. Les résultats sont normalisés en fonction des niveaux de protéines de la β-actine détectée avec la même technique.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

2.ANALYSE DE LA COMPOSITION LIPIDIQUE DU PLASMA ET DES LIPOPROTEINES RICHES EN TRIGLYCERIDES

a. Matériel et réactifs

- Cartouches SPE Oasis (MCX, 30 mg, 60 µm), Waters
- Colonnes Bond Elut C18 100mg, Agilent
- Colonnes C8 (Uptisphere 1120 Å, 3 µm, 2.1mmx 50 mm, Interchrom), Interchim
- SystèmeVacElut
- Tubes à hémolyse 5 ml
- Flacons d'injection et bouchons Interchrom, Interchim
- Standards internes de SL, bases sphingoïdes et lysoSL :
    - Céramide C17 (d18:1/17:0) (N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosine), Avanti Polar Lipids
    - C16 Sphingomyéline d31 (N-palmitoyl (d31)-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine), Avanti Polar Lipids
    - C18 GM3 d3 (N-Stearoyl Monosialoganglioside GM3-d3), Avanti Polar Lipids
    - Lyso Sphingomyéline (d17:1) (Sphingosylphosphorylcholine), Avanti Polar Lipids
    - Sphingosine-1-phosphate (d17:1) (D-erythro-sphingosine-1-phosphate), Avanti Polar Lipids
    - D-erythro-sphingosine C17, Avanti Polar Lipids
    - D-erythro-sphinganine C17, Avanti Polar Lipids

b. Appareils

- Bain à ultrasons, VWR
- Bain-marie, Memmert
- Chromatographe en phase gazeuse modèle HP6890 modèle G1530 Hewlett Packard
- Evaporateur, Pierce
- Logiciel Analyst version 1.6.2
- Sonicateur, Bioblock Scientific
- Spectromètre de masse en tandem Api 4500 Q-Trap (AbSciex) avec système HPLC Shimadzu

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

c. Composition en acides gras des lipides totaux des LRT

i. Extraction lipidique

La technique d'extraction liquide-liquide utilisée pour extraire les lipides totaux des LRT est basée sur le coefficient de partition entre la phase organique contenant les lipides (éthanol + chloroforme) et la phase aqueuse (H_2O). Un ratio LRT+H_2O/éthanol/chloroforme, (1:3:6, respectivement) est utilisé pour extraire les lipides totaux de 200 µL de LRT, avec l'ajout de 50 µM de BHT ainsi que de 1,2,3-triheptadecanoyl-sn-glycérol comme standard interne. Le mélange est centrifugé à 600 g durant 10 minutes à 15°C. La phase organique inférieure est prélevée, évaporée sous azote et conservée à -20°C. Une seconde extraction est effectuée sur la phase aqueuse restante et laissée à décanter pendant au moins 4h à 4°C. La seconde phase organique est poolée à la première, évaporée sous azote puis conservée à -20°C.

ii. Transméthylation des acides gras

Cette étape permet de séparer les AG du squelette où ils sont estérifiés, tout en les rendant volatils afin de permettre leur analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC). La réaction chimique de transméthylation, en présence d'un catalyseur (le trifluorure de bore, BF_3), permet de rompre la liaison ester pour en former une autre avec un groupement méthyle. D'abord, 250 µL de toluène/méthanol (40:60, v/v) et 250 µL de BF_3/méthanol (1,3 M, 10% dans le méthanol) sont ajoutés aux extraits de lipides totaux et les échantillons sont placés dans un bain sec à 100°C pendant 1h30. La réaction est arrêtée dans la glace pendant 5 minutes puis l'acidité du milieu est neutralisée par l'ajout de 1,5 mL de carbonate dipotassique 5% (K_2CO_3). L'extraction des AG méthylés est réalisée deux fois par 2 mL d'isooctane. Une centrifugation à 600 g de 10 minutes à 15°C permet de séparer la phase aqueuse de la phase organique et cette dernière est récupérée et évaporée sous azote. Les échantillons sont repris dans 50 µl d'isooctane pestipur.

iii. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

Les AG, dérivés sous forme d'esters méthyliques, sont analysés dans un chromatographe en phase gazeuse. 1 µL est injecté via un injecteur split/splitless (T = 230°C) dans une colonne capillaire (60 m x 0,25 mm). Les AG sont portés à ébullition et entraînés dans la colonne BPX 70 recouverte intérieurement d'un film de phase stationnaire (25 µm) par de l'hydrogène et interagissent avec la phase stationnaire selon leur polarité. Ils sont séparés en fonction de leur point d'ébullition et de leur affinité avec la phase stationnaire. La détection est réalisée par un détecteur à ionisation de flamme (T = 250°C). Le flux de la colonne arrive dans un brûleur alimenté en air et hydrogène. La combustion produit des ions responsables du courant ionique qui est transformé en tension avec un électromètre

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

pour donner un signal. La réponse est proportionnelle au nombre de carbones et de doubles liaisons π présentes dans les molécules détectées. Les différents AG sont identifiés selon leur temps de rétention comparativement à des standards injectés seuls. Le standard interne permet de quantifier chaque AG.

d. Composition en SL du plasma et des LRT

i. Extraction lipidique

La méthode d'extraction des lipides totaux pour la détermination de la composition en SL du plasma et des LRT est basée sur le même principe liquide-liquide utilisé dans la méthode pour déterminer la composition en AG des classes lipides. Un volume de 400 µL d'eau apyrogène ainsi que 2,5 ml de chloroforme/méthanol (1:2) et 50 µL d'un mélange de standards internes (détaillé dans la section matériel et réactifs) est ajouté au plasma (10 µL) ou aux LRT (100 µL). Après une centrifugation de 10 minutes à 1900 g, le surnageant contenant les lipides est récupéré, évaporé sous azote et les extraits secs sont stockés à -20°C.

ii. Saponification et purification sur colonnes des SL

Les SL sont extraits à partir d'1 mL de chloroforme/méthanol (1:2 v/v). Après centrifugation, les échantillons sont évaporés sous l'azote à 40°C. Les culots secs sont repris par 1,5 mL de chloroforme/méthanol (1:2 v/v) et sont soniqués sur glace pendant 30 minutes. Les échantillons sont saponifiés par de l'hydroxyde de potassium pendant 2 heures à 37°C, ce qui permet d'éliminer les TG et les glycérophospholipides. Les SL sont purifiés et dessalés sur une colonne SPE (extraction en phase solide) C18. L'élution est réalisée successivement avec du méthanol/eau (12:1) et par du chloroforme/méthanol (1:2 v/v). Les échantillons sont évaporés sous azote et sont repris par du chloroforme/méthanol (2:1 v/v) avant l'injection directe dans le MS/MS.

iii. Analyse en spectrométrie de masse en tandem

L'appareil de MS/MS est composé de trois parties montées en série : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur. Le liquide traverse un capillaire sur lequel une tension électrique élevée est appliquée et qui constitue la source d'ionisation. Des gouttelettes chargées se forment à la sortie du capillaire et le solvant s'évapore graduellement, ce qui entraîne une réduction de la taille des gouttelettes ainsi qu'une augmentation de la densité de charges à la surface. Les forces de répulsion entre les charges provoquent l'éclatement des gouttelettes et la production d'ions en phase gazeuse qui pourront entrer dans le MS/MS. L'analyseur est constitué de 3 quadripôles (Q1-Q2-Q3) qui sont des ensembles de quatre barreaux en aluminium ou en graphite alimentés en paires par une tension

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

alternative opposée. Ces tensions permettent de sélectionner les ions à analyser en fonction de leur masse. Le Q1 sert de filtre de masse afin d'isoler l'ion parent de la molécule d'intérêt qui sera ensuite fragmenté dans le Q2 par un gaz de collision (azote ou argon). Les fragments d'intérêts sont sélectionnés dans le Q3. Le mode d'acquisition utilisé est le MRM (Multiple Reaction Monitoring) qui permet une quantification spécifique des molécules en fonction de la masse de l'ion parent et de l'ion fils, on parle de transition ou MRM. Ainsi chaque espèce moléculaire a une transition qui lui est spécifique et il est possible de mesurer simultanément plusieurs dizaines de transition et donc de très nombreuses molécules.

Pour l'injection, chaque éluat est repris par 1 ml de phase mobile (chloroforme/méthanol (2:1 v/v)) et transféré dans un flacon d'injection. Chaque échantillon est étudié dans les méthodes suivantes:

Sphingolipide	**Méthode**	**Volume d'injection (µL)**
Céramides	MRM mode positif	2
Sphingomyélines	MRM mode positif	2
GM3	MRM mode négatif	20

La quantification relative est réalisée avec le logiciel Multiquant à l'aide des standards internes deutérés. Pour chacune des trois classes de SPL, 12 isoformes ont été quantifiés : C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C20:0, C20:1, C22:0, C22:1, C24:0, C24:1, C26:0 et C26:1. La quantité globale de chaque espèce de SL la somme des quantités obtenues pour chaque isoforme.

e. Composition en lysoSL et bases sphingoïdes du plasma et des LRT

L'extraction des lysoSL est effectuée selon la technique de Pettazzoni et al (Pettazzoni et al. 2017). D'abord, 200 µL sont précipités par 500µL de méthanol contenant le mélange de standards internes et 500 µL d'H_3PO_4 2% (v/v) sont ajoutés. Après centrifugation, le surnageant est transféré dans une cartouche SPE, préalablement conditionnée. Suite à deux lavages avec de l'acide formique 2% (v/v), les lysoSL sont élués successivement par des solutions de méthanol-acide formique à 2% et de méthanol-NH_4OH à 2%. Les échantillons sont évaporés sous azote et repris par la phase mobile (500 µL d'acétonitrile 37,5% contenant 0,2% d'acide formique) pour l'injection (volume d'injection : 25 µL). La chromatographie liquide en phase inversée est réalisée sur colonne C8 maintenue à 25˚C (phase A: acide formique 0,2% dans l'eau, phase B: acide formique 0,2% dans l'acétonitrile) avec un gradient produit à un débit de 0,4 mL/minute :

- initiation du gradient : 37,5% de phase A
- 0-4 minutes : 37,5-50% de phase B

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

- 4-8 minutes : 50% de phase B
- 8-8,5 minutes : 50-75% de phase B
- 8,5-9,5 minutes : 75% de phase B
- 9,5-10 minutes : 75%-37,5% de phase B
- 10-13 minutes : 37,5% de phase B

Les méthodes d'analyse sont les suivantes :

Lysosphingolipides et bases	Méthode	Volume d'injection (µL)
Lyso sphingomyéline	MRM mode positif	25
Sphingosine-1-phosphate	MRM mode négatif	25
Sphingosine	MRM mode positif	25
Sphinganine	MRM mode positif	25

La quantification est effectuée avec le logiciel Analyst version 1.6.2 et basée sur les standards internes et une courbe de calibration externe de 9 points.

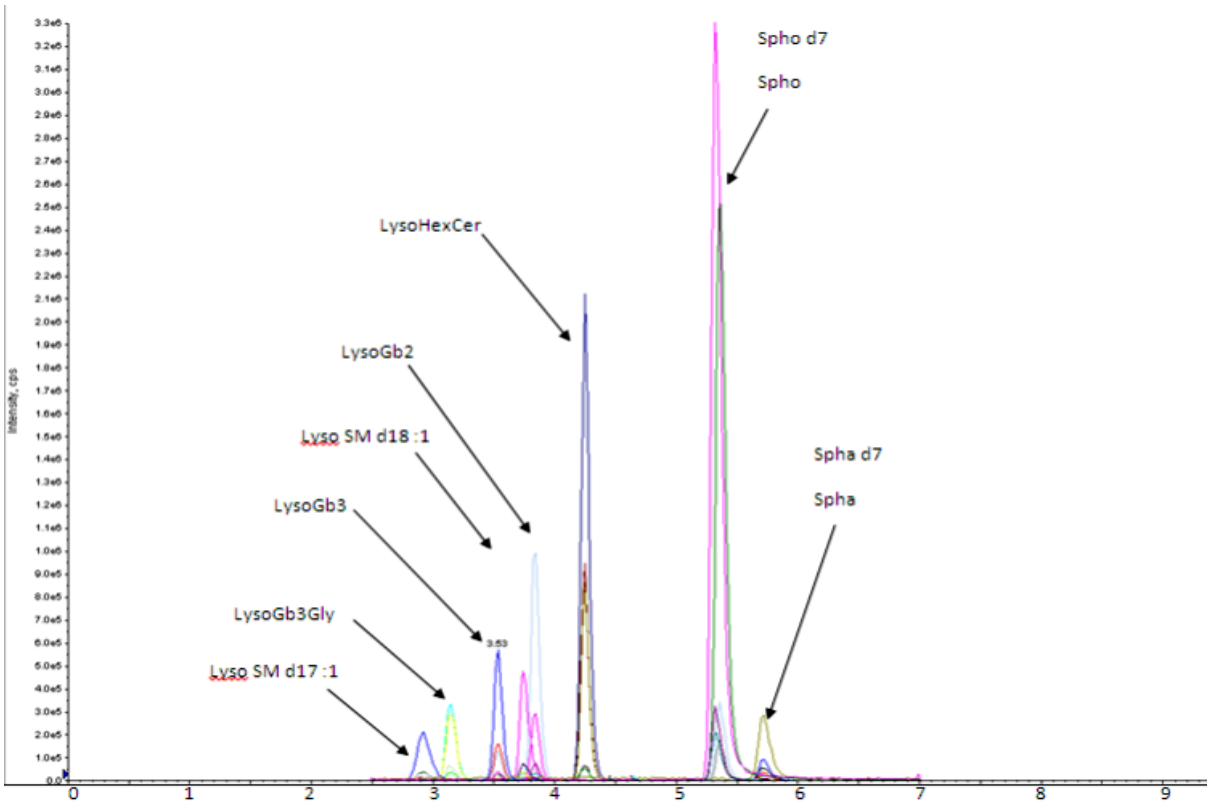


Figure 10: Exemple de chromatogramme d'un échantillon d'étalon de lysosphingolipides

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

3. Etude clinique COMposition des liPoprotéines riches en trigLycérides (LRT) et activation plaquETtaire chez la femme diabétiquE (COMPLETE)

a. Plan de l'étude et objectif

COMPLETE est une étude interventionnelle comparative randomisée selon l'attribution du type de matière grasse contenu dans le petit déjeuner test en deux bras parallèles chez 30 femmes diabétiques de type 2 (**Figure 11**). Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une étude interventionnelle à risques et contraintes minimes de catégorie 2, selon la loi Jardé, le promoteur étant « les Hospices Civils de Lyon » et l'investigateur principal le Pr. Philippe Moulin.

L'objectif de l'étude est de déterminer les effets sur l'activation plaquettaire des LRT isolées de femmes DT2, suite à un petit déjeuner riche en matière grasse de compositions différentes, par rapport aux LRT circulant à jeun.

Les patientes devaient donc fournir deux prélèvements de sang de 30 ml chacun, un le matin à jeun et le second 4 heures après la consommation d'un petit déjeuner riche en matières grasses (beurre ou pâte à tartiner, allocation randomisée). Les prélèvements de sang et l'administration du petit déjeuner test sont effectués lors d'un bilan annuel de diabète effectué en hôpital de jour où lors d'un passage en ambulatoire dans le cadre du forfait de prestations intermédiaires (FPI). Le petit déjeuner habituel a été remplacé par le petit déjeuner test riche en matières grasses.

b. Les sujets

Les patientes ont été pré-sélectionnées sur la base de l'horaire des rendez-vous en hôpital de jour ou en FPI pour bilan annuel de diabète. Celles qui répondaient aux critères d'inclusion et acceptaient de participer à l'étude ont reçu la notice d'information du protocole et le formulaire de consentement par la poste au moins 3 jours avant leur rendez-vous. Il n'y a donc pas eu de visite d'inclusion spécifique. Les patientes qui ont accepté de faire partie du protocole COMPLETE se sont présentées à jeun (12h) et des conseils sur le repas de la veille leur avaient été donnés avec la notice d'information et le formulaire de consentement. Lors de leur visite, l'Attachée de Recherche Clinique a vérifié que les participantes répondaient bien aux critères d'inclusion généraux et médicaux :

- Femme

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

- Age entre 50 et 80 ans inclusivement
- Ménopausée (absence de règles > 1 an)
- HbA1c ≥6,5 ou ≤10%
- Indice de Masse Corporelle (IMC) IMC ≥27 et ≤40 kg/m^2
- Sans antécédent d'hypertriglycéridémie majeure
- Poids ayant varié de moins de 4 kg sur les 3 derniers mois
- Patientes en prévention cardio-vasculaire primaire
- Sujet affilié au régime de protection sociale
- Sujet apte à comprendre l'information qui lui est donnée et ayant signé le formulaire de consentement éclairé
- Acceptant de se soumettre au protocole de l'étude en ingérant un petit déjeuner riche en lipides dont la composition est fixée et randomisée

c. Critères d'exclusion

Critères généraux :

- Sujet présentant des conditions médicales ou psychologiques instables qui, d'après l'investigateur, pourraient mener le sujet à être non compliant ou non coopératif pendant l'étude ou pouvant compromettre la sécurité ou la participation du sujet à l'étude (selon les articles L.1121-6, L.1121-8, L.1121-9 et L1122-1-2 du code de santé publique)
- Non-respect de la période d'exclusion d'une autre étude précisée dans le «fichier National des volontaires»
- Sujet majeur sous tutelle
- Sujet privé de sa liberté par décision judiciaire ou administrative

Critères médicaux :

- Insulinothérapie
- Prise de fibrates ou d'AG Oméga-3
- Utilisation de traitement hormonal substitutif de la ménopause
- Glycémie à jeun > 3 g/l le jour du repas test
- Consommation d'alcool excessive (≥3 équivalents verres de vin quotidien)
- Allergie alimentaire, ou intolérance alimentaire aux produits consommés lors de l'étude
- Régime alimentaire particulier (végétarien, végétalien, hyper-protéiné, etc.)
- Prise de compléments alimentaires dans la semaine précédant les explorations

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

- Antécédent de chirurgie bariatrique ou digestive modifiant l'absorption des lipides
- Patientes en prévention cardio-vasculaire secondaire

Critères de sortie prématurée :

- Renoncement du malade
- Refus d'ingérer le petit déjeuner prévu ou vomissement(s)
- Impossibilité d'attendre la 4ème heure pour le prélèvement

d. Calcul de l'effectif

En l'absence de données bibliographiques sur les effets des LRT de patientes diabétiques sur l'agrégation plaquettaire, le calcul de puissance a été établi sur des résultats préliminaires exploratoires de dosage de TxB_2 obtenus lors de tests d'activation plaquettaire en présence de LRT de patients DT2. Le calcul de l'effectif a donc été réalisé sur les écarts types de moyennes de concentrations de TxB_2 dans les plaquettes stimulées par des LRT de DT2 en utilisant la thrombine comme agoniste.

Pour un risque alpha à 0,05 et un risque beta à 0,20 sur la base d'un écart-type du dosage de TxB_2 de 805 pmol/10^9 plaquettes et d'une différence escomptée des moyennes de 30% (1100 pmol/10^9 plaquettes), le nombre de sujets à inclure serait de 10 pour chaque groupe. Ce calcul conservateur a été effectué sur une modélisation de test non apparié car nous ignorions l'amplitude de l'écart-type de la variation. Nous avons visé le recrutement de 15 sujets par groupe. Cet effectif est suffisant pour permettre la comparaison de l'effet des LRT selon le type de repas gras qui elle s'effectuera en mode non apparié en formulant l'hypothèse d'une différence de 25%.

e. Petit déjeuner test

Deux petits déjeuners expérimentaux (**Tableaux 8** et **9**) ont été testés au cours de cette étude : l'un riche en matière grasse laitière (beurre) et l'autre en matière grasse végétale de type huile de palme issue d'une pâte à tartiner cacao-noisette (PTC). Leur contenu en lipides est identique (20g) et ils sont isocaloriques et isoglucidiques, mais leur composition en AG est différente. Les produits non disponibles au sein des Hospices Civils de Lyon ont été achetés par le laboratoire puisqu'il s'agit de produits de consommation courante. Ils ont été conservés et consommés dans les conditions recommandées par le fabricant. Les aides-soignantes du service ont préparé et servi aux patientes les petits déjeuners tests à la place du petit déjeuner conventionnel proposé par les HCL. Les patientes avaient 20 minutes pour consommer le petit-déjeuner.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Tableau 8: Petit déjeuner à base de matière grasse végétale (huile de palme)

PETIT DEJEUNER PATE A TARTINER CACAO-NOISETTE							
Ingrédients	**Quantités**	**Energie (kcal)**	**Protéines (g)**	**Lipides (g)**	**AGS (g)**	**Glucides (g)**	**Sucres (g)**
Biscottes Pasquier	30 g (4 unités)	116	3,3	1,5	0,5	21,6	2,1
Pâte à tartiner cacao-noisette commerciale	60 g (4 barquettes)	323	3,8	18,5	15,9	34,5	33,8
Boisson chaude (café/thé)	200 ml (1 bol)	0	0	0	0	0	0
	Total	**439**	**7**	**20**	**16**	**57**	**36**

AGS : AG saturés

Tableau 9: Petit déjeuner à base de matière grasse laitière (beurre)

PETIT DEJEUNER BEURRE							
Ingrédients	**Quantités**	**Energie (kcal)**	**Protéines (g)**	**Lipides (g)**	**AGS (g)**	**Glucides (g)**	**Sucres (g)**
Biscottes Pasquier	30 g (4 unités)	116	3,3	1,5	0,5	21,6	2,1
Beurre 82% MG	22,5 g (2 plaquettes + ¼)	168	0,2	18,5	12,5	0,3	0,1
Confiture	30 g (1 barquette)	72	0,2	0,1	0	17,6	16,2
Jus d'orange	20 cl (1 briquette)	84	1,4	0	0	17,4	17,4
Boisson chaude (café/thé)	200 ml (1 bol)	0	0	0	0	0	0
	Total	**440**	**5**	**20**	**13**	**57**	**36**

AGS : AG saturés

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

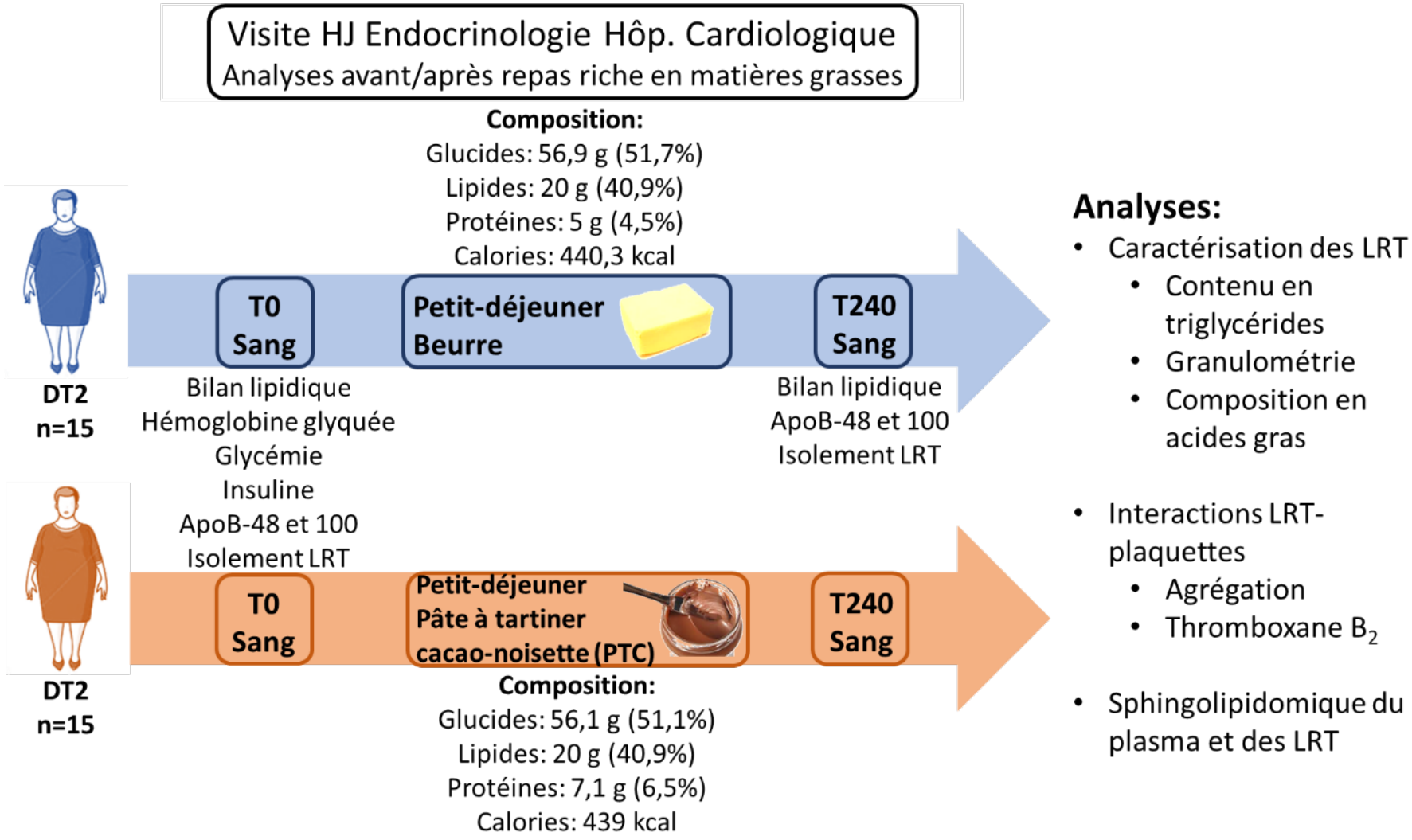


Figure 11: Design du protocole clinique COMPLETE
HJ : hôpital de jour

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

4.Sujets sains à jeun de l'étude FiTABlé

Puisque l'étude COMPLETE ne comportait pas de groupe de témoins, il a été possible d'obtenir des prélèvements sanguins de sujets sains à jeun afin de pouvoir comparer et valider certains résultats du projet COMPLETE. Nous avons utilisé du plasma de 6 sujets inclus dans une étude pilote du Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes (CRNH-RA) intitulée FiTABlé : Etude pilote de la signature métabolique du son de blé enrichi en ^{13}C, liée à la fermentation intestinale chez l'Homme : identification de nouveaux biomarqueurs.

a. Critères d'inclusion

- Sujet apte à comprendre l'information qui lui est donnée et ayant signé le formulaire de consentement éclairé
- Sujet ayant eu un examen médical préalable au cours de la visite de sélection
- Sujet sain
- Sexe féminin
- Age compris entre 20 et 40 ans (bornes incluses)
- Non-fumeur
- Index de masse corporelle compris entre 20 et 25 kg/m^2 (bornes incluses)
- Consommateur de fibres ≥ 18 g/jour
- Ne présentant ni allergie alimentaire, ni intolérance alimentaire aux produits de l'étude
- N'ayant pas de régime alimentaire particulier (végétarien, végétalien, hyperprotéiné, etc)
- Ayant une fréquence de selles allant de 1 à 2 par jour durant les 2 derniers mois
- Absence de pathologie décelable à l'examen clinique et à l'interrogatoire médical pouvant interférer avec les critères d'évaluation de l'étude
- Sujet sédentaire ou pratiquant une activité physique régulière stable durant la totalité de l'étude (maximum 4h par semaine)
- Acceptant de se soumettre au protocole de l'étude avec une journée d'hospitalisation de 24h
- Poids stable au cours des 3 derniers mois (+/- 5 % du poids corporel total)
- Affiliation à un régime de sécurité sociale.

b. Critères d'exclusion

Critères généraux :

- Sujet présentant des conditions médicales ou psychologiques instables qui, d'après l'investigateur, pourraient mener le sujet à être non compliant ou non coopératif pendant

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

l'étude ou pouvant compromettre la sécurité ou la participation du sujet à l'étude (selon les articles L.1121-6, L.1121-8, L.1121-9 et L1122-1-2 du code de santé publique).

- Non-respect de la période d'exclusion d'une autre étude précisée dans le « fichier National des volontaires »
- Sujet majeur sous tutelle
- Sujet privé de sa liberté par décision judiciaire ou administrative
- Sujet ayant dépassé le montant annuel d'indemnisations pour la participation à des protocoles de recherche
- Ne possédant pas de réfrigérateur et/ou de congélateur (nécessaire à la conservation des recueils d'urine et/ou de selles effectués à domicile)

Critères biologiques :

- Cholestérol sanguin total > 11 mmol/L ou triglycérides sanguins > 3 mmol/L
- Glycémie à jeun > 7 mmol/L
- CRP > 10 mg/L
- Mise en évidence d'une anomalie biologique jugée par l'investigateur comme cliniquement significative
- Transaminases (ASAT et ALAT) et gamma GT supérieures à 1,5 fois la limite supérieure à la normale

Critères médicaux et thérapeutiques :

- Antécédent de chirurgie bariatrique
- Antécédents de chirurgie digestive à l'exception de l'appendicectomie
- Sujet présentant des désordres gastro-intestinaux comme des ulcères, des diverticules ou des maladies intestinales inflammatoires
- Diabètes de type 1 ou 2
- Insuffisance rénale chronique
- Insuffisance hépatique chronique
- Gastroparésie connue, gastrectomie, colectomie
- Antécédents de maladie gastro-intestinale chronique avec malabsorption
- Insuffisance pancréatique externe
- Pathologie endocrinienne connue pouvant interférer avec le métabolisme des glucides (dysthyroïdies non contrôlées, acromégalie, hypercorticisme…)
- Sujet présentant une maladie intestinale organique

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

- Sujet ayant subi une antibiothérapie dans les 3 mois précédant l'étude pouvant interférer avec le transit ou le microbiote intestinal
- Sujet traité par un médicament pouvant interférer avec le métabolisme des glucides (corticoïdes, anorexigènes, pansements gastriques à haute dose)
- Sujet ayant une pathologie concomitante incompatible avec les contraintes du protocole ou pouvant interférer avec l'évaluation du critère principal
- PA en systolique non comprise entre 100 et 140 mmHg et en diastolique non comprise entre 50 et 90 mmHg
- Sujet suivant un régime amaigrissant ou souhaitant perdre du poids
- Femme enceinte ou souhaitant être enceinte ou allaitante (données d'interrogatoire)
- Alcoolisme ou abus ou dépendance à une autre drogue avérée. La consommation de plus de 3 boissons alcoolisées par jour est considérée comme abusive. Une boisson alcoolisée correspond à 30 mL de spiritueux, 120 mL de vin ou 330 mL de bière
- Don de sang dans les 2 mois précédant la visite de sélection
- Sujets consommant des compléments alimentaires
- Sujets refusant de suivre les consignes diététiques sur les 3 jours précédents la journée test

Critères de sortie prématurée :

- Prise d'un traitement non autorisé
- Apparition d'un critère de non-inclusion
- Mauvaise compliance et/ou observance des consignes diététiques évaluées lors des entretiens diététiques et médicaux ou lors de la réalisation des tests

5.Analyse statistique

Les valeurs des tableaux et figures représentent les moyennes ± erreur standard à la moyenne (SEM). La normalité de la distribution des variables a été déterminée à l'aide du test de normalité Shapiro-Wilk. Les différences entre les moyennes dans chaque groupe entre le T0 et le T240 sont obtenues en utilisant le T-test apparié ou le Wilcoxon en fonction de la normalité de la distribution des données. Les différences entre les moyennes des deltas de variation entre T240 et T0 pour chaque groupe sont définies en utilisant le T-test non-apparié ou le Mann-Whitney selon la distribution des données. Les différences sont considérées comme significatives lorsque $p<0,05$. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 8.0.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

PARTIE 1 :
Activation des plaquettes par les LRT de patients diabétiques de type 2 à jeun

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

1.RESULTATS

Tel que mentionné dans la section ***Physiopathologie de la dyslipidémie diabétique***, les patients DT2 présentent une production de LRT augmentée combinée à un retard de leur clairance et l'implication de ces anomalies au niveau du risque athérothrombotique n'est pas encore clairement établi.

Nous avons donc voulu tester dans un premier temps l'hypothèse que les LRT provenant de patients DT2 à jeun pouvaient avoir un effet sur l'activation des plaquettes issues de donneurs sains. Pour ce faire, nous avons mesuré plusieurs paramètres : l'agrégation de plaquettes isolées, la concentration de TxB_2 et la phosphorylation de la p38MAPK et la $cPLA_2$.

a. Caractéristiques des patients DT2 et des donneurs sains

Les patients DT2 ont été recrutés dans le département d'Endocrinologie, Maladies métaboliques, Diabète et Nutrition de l'Hôpital Louis Pradel (Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est). Le sang a été collecté suite à un jeûne nocturne de 12 heures. Les critères d'exclusion étaient la présence d'une maladie métabolique autre que le DT2 ainsi que des antécédents de complications cardiovasculaires documentés. Les patients étaient traités avec une ou plusieurs médications antidiabétiques : 92% prenaient de la metformine, 40% des sulfonylurés, 32% des gliptines, 24% des analogues du *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) et 28% de l'insuline. Une grande partie des patients (72%) avait une thérapie hypolipémiante : 64% prenaient des statines et 8% une combinaison de statines et d'ézétimibe. Comme indiqué dans le **Tableau 10**, l'âge moyen des patients DT2 était de 59,8 ans et leur IMC moyen dans la catégorie d'obésité (31,9 kg/m^2). Les paramètres associés au glucose sanguin et le bilan lipidique moyens étaient dans les limites normales puisque les patients DT2 bénéficient d'un suivi en cours.

Le groupe de donneurs sains (DS) était constitué d'individus non-diabétiques avec un statut de bonne santé globale, qui a été déterminé par un questionnaire confidentiel renseigné par un médecin de l'Etablissement Français du Sang avant le don de sang. Leur âge moyen était de 27,4 ans et le bilan lipidique était normal (**Tableau 10**).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Tableau 10: Paramètres cliniques et biologiques des sujets

Caractéristiques	DS	DT2
n (H/F)	7 (5/2)	25 (13/12)
Age (années)	27 ± 4[a]	59,8 ± 2
IMC (kg/m^2)	ND	31,9 ± 1,4
TG (mmol/L)	0,79 ± 0,14[a]	1,63 ± 0,20
c-HDL (mmol/L)	1,04 ± 0,07[a]	1,06 ± 0,05
c-LDL (mmol/L)	2,25 ± 0,27[a]	2,22 ± 0,20
Glycémie (mmol/L)	ND	9,0 ± 0,6
HbA_{1c} (%)	ND	7,8 ± 0,3

a: n=6
Les données représentent les moyennes ± SEM

b. Caractérisation des fractions LRT

Les caractéristiques du plasma et des fractions LRT isolées des patients DT2 sont indiquées dans le **Tableau 11**. La densité des particules prélevées suite à l'ultracentrifugation était inférieure à 1,000 g/mL et il a été possible de quantifier de l'ApoB-48 et de l'ApoB-100, ce qui indique la présence de CM, de leurs remnants et de grosses VLDL. Les particules avaient un diamètre hydrodynamique moyen de 205 nm, ce qui confirme leur taille élevée. Les ratios TG/ApoB totale et TG/cholestérol total indiquent que les fractions de LRT sont bien enrichies en TG, puisqu'ils sont environ 4 fois plus élevés comparativement au plasma.

Tableau 11: Caractéristiques du plasma et des fractions LRT des patients DT2

Caractéristiques	Plasma	Fractions LRT
Diamètre hydrodynamique (nm)	-	205 ± 15
ApoB-48 (mg/L)	15,2 ± 3,7[a]	0,94 ± 0,40[b]
ApoB-100 (mg/L)	1327,2 ± 126,8[a]	28,1 ± 5,2[b]
TG (mmol/L)	1,37 ± 0,16	0,16 ± 0,04
Cholestérol total (mmol/L)	3,89 ± 0,32	0,09 ± 0,01
Ratios (mg/L)		
ApoB-100/apoB-48	153,9 ± 42,0	42,4 ± 6,5
TG/cholestérol total	0,4 ± 0,04	4,0 ± 0,4
TG/apoB total	0,9 ± 0,1	4,2 ± 0,5

Moyennes ± SEM. n=10, a: n=9, b: n=7

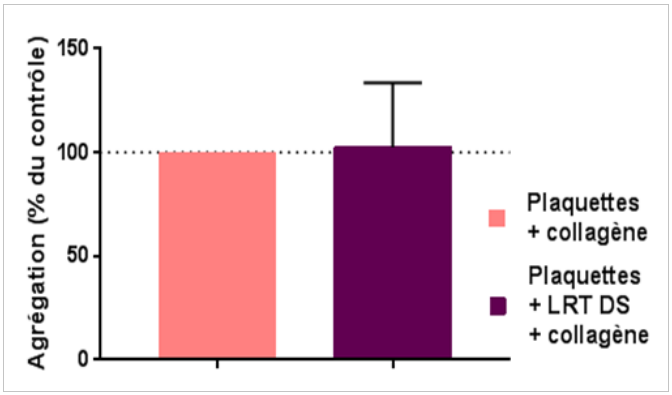
Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

c. Effets des LRT de patients DT2 sur l'agrégation plaquettaire stimulée par le collagène et la concentration de TxB_2

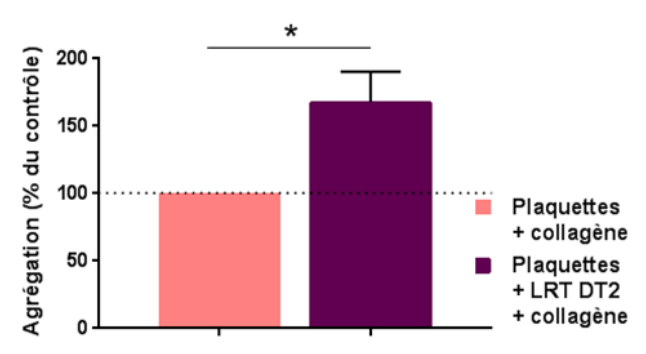
Les LRT de patients DT2 à jeun (25 µg de protéines/mL) augmentent l'agrégation plaquettaire stimulée par le collagène de 68% comparativement aux plaquettes seulement stimulées par le collagène. Le contrôle plaquettes + collagène est normalisé à 100%, pour considérer les variations interindividuelles dans la réponse des plaquettes au collagène, puisque les fractions LRT ont été testées sur différentes préparations plaquettaires provenant de plusieurs donneurs. Des concentrations similaires de LRT de donneurs sains (DS) n'ont pas d'effet sur l'agrégation plaquettaire (**Figure 12A et B**). L'ajout de LRT de DS ou de DT2 aux plaquettes sans stimulation par un agoniste n'a également eu aucun effet sur l'agrégation.

La pré-incubation de LRT de DT2 (25 µg/mL) avec des plaquettes stimulées par le collagène a également augmenté la synthèse de TxA_2 dans les plaquettes, mesuré par son catabolite stable le TxB_2. Tel qu'attendu, la concentration de TxB_2 est d'abord augmentée par la stimulation avec le collagène (+55%) et l'ajout des LRT de DT2 a entrainé une augmentation supplémentaire de 34% (**Figure 12C**).

A



B



Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

C

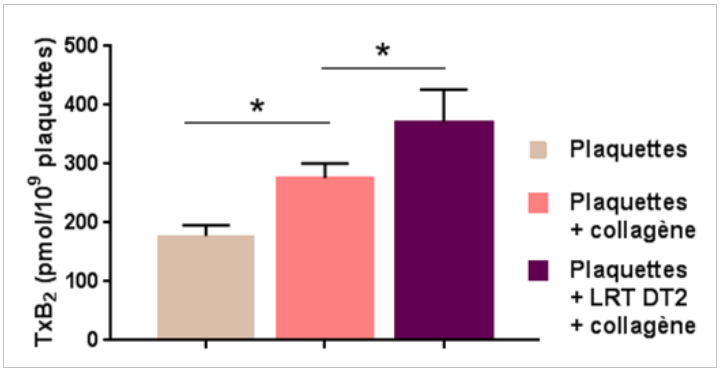


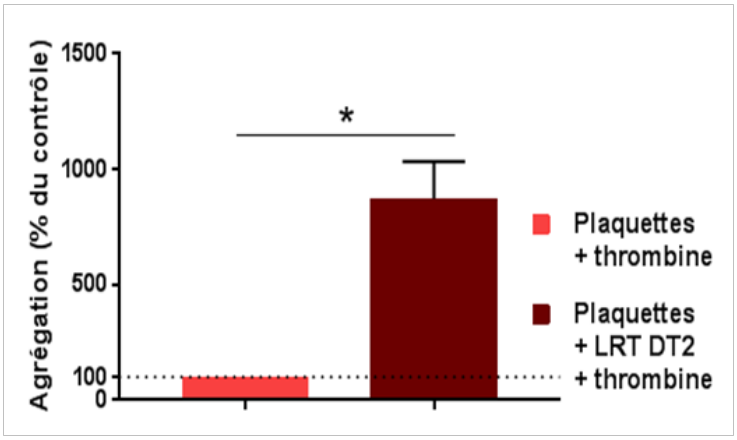
Figure 12: L'agrégation et la concentration de TxB_2 de plaquettes stimulées par le collagène sont augmentées par les LRT de patients DT2.
A) *Des plaquettes saines ont été incubées avec ou sans 25 µg protéines/mL de LRT de donneurs sains (DS) et stimulées avec 0,13 µg/mL ± 0,01 de collagène et agitées à 1000 rpm pendant 4 minutes à 37°C. Les résultats sont les moyennes ± SEM du pourcentage du contrôle représenté par les plaquettes seules stimulées par le collagène (n=7 DS). Plaquettes + LRT DS + collagène vs plaquettes + collagène : +2%, p=NS.*
B) *Des plaquettes saines ont été incubées avec des LRT de patients DT2 (25 µg/mL) et stimulées avec 0,17 µg/mL ± 0,02 de collagène et agitées à 1000 rpm pendant 4 minutes à 37°C. Les résultats sont les moyennes ± SEM du pourcentage du contrôle représenté par les plaquettes seules stimulées par le collagène. (n=25 patients DT2). Plaquettes + LRT DT2 + collagène vs plaquettes + collagène : +68%, *p < 0.05.*
C) *Des plaquettes saines ont été incubées pendant 30 minutes à 37°C avec ou sans 25 µg/mL de LRT de patients DT2 et stimulées avec 0,37 ± 0,04 µg/mL de collagène pendant 1 heure sous agitation douce. Les résultats sont les concentrations moyennes de TxB_2 (pmol/10^9 plaquettes ± SEM, n = 25 patients DT2). Plaquettes + collagène vs. Plaquettes + tyrode-HEPES: +55%, *p < 0.05; plaquettes + LRT DT2 + collagène vs plaquettes + collagène: +34%, *p < 0.05.*

d. Effet des LRT de patients DT2 à jeun sur l'agrégation plaquettaire stimulée par la thrombine et la concentration de TxB_2

Des mesures d'agrégation et des dosages de concentrations en TxB_2 ont aussi été faits en utilisant la thrombine comme agoniste. La pré-incubation des plaquettes avec 25 µg de protéines/mL de LRT de patients DT2 et une stimulation avec la thrombine a augmenté l'agrégation de presque 8 fois comparativement aux plaquettes seulement stimulées par la thrombine (100%) (**Figure 13A**). Suite à la stimulation forte des plaquettes avec la thrombine, la concentration de TxB_2 est 14,5 fois plus élevée comparativement aux plaquettes seules stimulées. Une augmentation additionnelle de 37% est observée lorsque les plaquettes ont été pré-incubées avec les LRT de DT2 et stimulées par la thrombine (**Figure 13B**).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

A



B

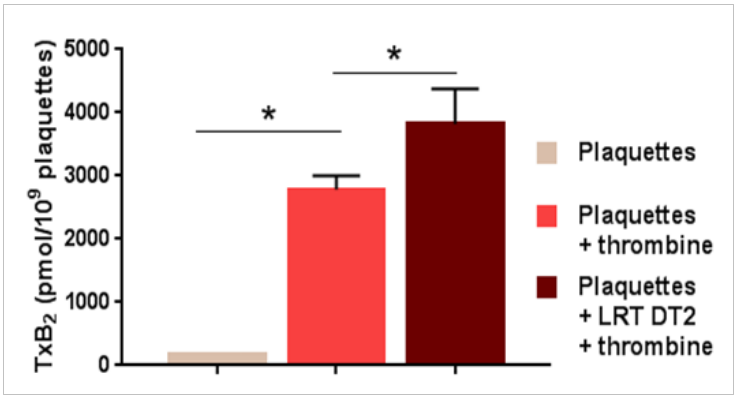


Figure 13: L'agrégation et la concentration de TxB2 dans des plaquettes stimulées par la thrombine sont augmentées par les LRT de patients DT2

A) *Des plaquettes saines ont été incubées avec 25 µg/mL de LRT de patients DT2 et stimulées avec 0,013 U/mL ± 0,001 de thrombine et agitées à 1000 rpm pendant 4 minutes à 37°C. Les résultats sont les moyennes ± SEM du pourcentage du contrôle représenté par les plaquettes seules stimulées par le collagène (n = 6 patients DT2; *p < 0.05). Plaquettes +LRT DT2 + thrombine vs plaquettes + thrombine : +771%, *p < 0.05.*

B) *Des plaquettes saines ont été pré-incubées pendant 30 minutes à 37°C avec ou sans 25 µg/mL de LRT de patients DT2 et stimulées avec 0,1 U/mL de thrombine pendant 1 heure à 37°C sous agitation douce. Les résultats sont les concentrations moyennes de TxB_2 (pmol/10^9 plaquettes ± SEM, n = 13 patients DT2). Plaquettes + collagène vs. Plaquettes + tyrode-HEPES: +1453%, *p < 0.05; plaquettes + LRT DT2 + collagène vs plaquettes + collagène: +37%, *p < 0.05.*

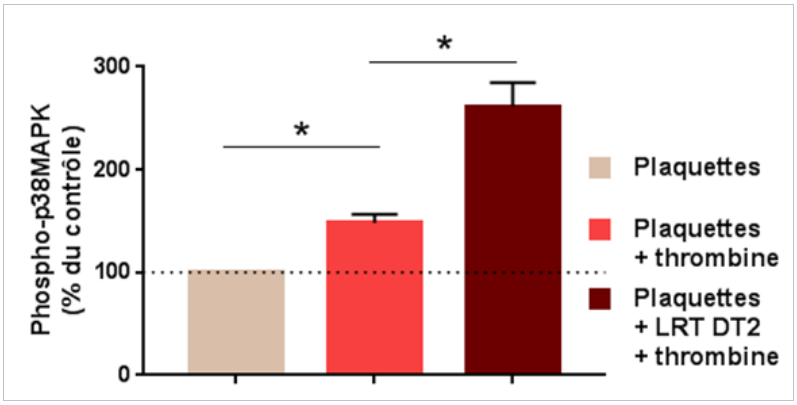
e. Effet des LRT de patients DT2 à jeun sur la phosphorylation de la p38 MAPK et de la $cPLA_2$ plaquettaires

La synthèse du TxA_2 requiert l'activation par la phosphorylation successive des enzymes p38 MAPK et $cPLA_2$ et c'est cette dernière qui permet la libération de l'AA des PL membranaires. Le

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

niveau de phosphorylation de ces deux enzymes dans les plaquettes pré-incubées avec des LRT de patients DT2 et stimulées avec la thrombine a donc été mesuré par immuno-détection. Les **Figures 14A** et **B** montrent que la phosphorylation des deux enzymes est augmentée suite à la stimulation par la thrombine et qu'une augmentation supplémentaire de la phosphorylation est observée lorsque les plaquettes ont été pré-incubées avec les LRT (25 µg/mL).

A



B

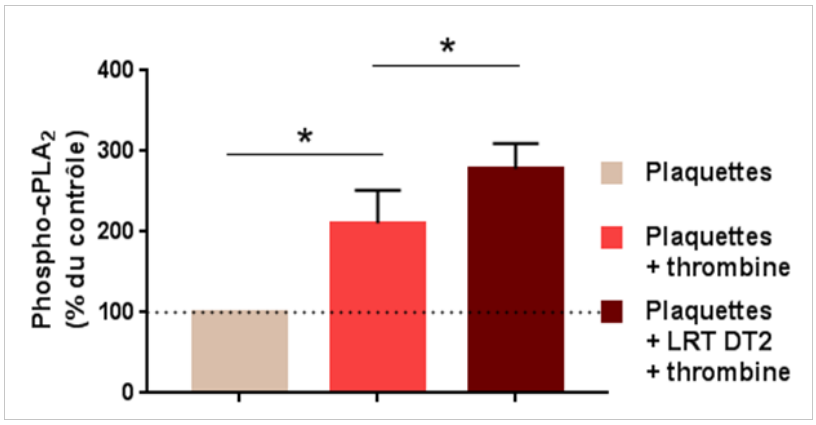


Figure 14: Les LRT de patients DT2 à jeun activent de la voie de signalisation de l'acide arachidonique dans des plaquettes stimulées par la thrombine

A et B) *Des plaquettes saines ont été pré-incubées pendant 30 minutes à 37°C en absence ou en présence de 25 µg/mL de LRT de patients DT2 à jeun puis pendant une heure à 37°C avec ou sans 0,09 ± 0,01 U/mL thrombine sous agitation douce. La phosphorylation de la p38 MAPK* ***(A)*** *et la cPLA2* ***(B)*** *a été mesuré après une séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et une détection par immunoblotting avec des anticorps anti-phospho-p38 MAPK et anti-phospho-cPLA₂ (n=6 et n=3, respectivement). Les bandes sont visualisées par vidéodensitométrie. Les résultats sont normalisés en fonction des niveaux de β-actine détectés avec la même technique. Les résultats sont les moyennes ± SEM en pourcentage du contrôle correspondant aux plaquettes seules non stimulées. Plaquettes + thrombine vs. plaquettes seules : * p < 0.05; plaquettes + LRT de DT2 +thrombine vs. plaquettes + thrombine : * p < 0.05.*

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

2.DISCUSSION

Pour cette première étude, nous nous sommes focalisés sur les LRT de patients DT2 à jeun et leurs effets sur les plaquettes, puisque leur métabolisme lipidique est altéré et le risque de développer des complications cardiovasculaires est plus important dans cette population comparativement aux individus non-diabétiques. Chez les individus sains, les CM et leurs remnants sont éliminés rapidement de la circulation et des concentrations négligeables d'ApoB-48 sont rapportées dans leur plasma (Otokozawa et al. 2009; Sakai et al. 2003). Il est donc très peu probable que ces particules soient impliquées dans des événements athérothrombotiques. En comparaison, chez des patients DT2 et/ou hypertriglycéridémiques, les LRT ont un temps de résidence dans la circulation plus élevé, ce qui pourrait augmenter leur potentiel athérothrombotique (Tomkin and Owens 2012). C'est pourquoi l'étude des interactions entre les LRT et les plaquettes est plus pertinente chez les DT2 plutôt que chez des individus sans anomalie du métabolisme lipidique. L'objectif de ces premiers travaux était donc de déterminer l'effet des LRT isolés du plasma de patients DT2 à jeun sur l'agrégation plaquettaire, mais également de caractériser ces fractions de LRT. Les fractions isolées de LRT sont de très faible densité (d<1,000 g/mL), sont enrichies en TG (ratio TG/cholestérol total de 4,2) et contiennent de l'ApoB-48 et de l'ApoB-100, ce qui indique la présence de CM et leur remnants et de grosses VLDL. De plus, le diamètre moyen indique que les particules sont de plus grande taille comparativement aux VLDL et aux remnants de CM d'individus sains, qui sont entre 30 et 80 nm (Feingold and Grunfeld 2000). Ces résultats concordent avec les observations faites chez les individus DT2 qui démontrent une augmentation de la production hépatique de VLDL1 (de plus grande taille) ainsi qu'une réduction de leur catabolisme (Verges 2015). De plus, les concentrations d'ApoB-48 et B-100 sont similaires à celles rapportées dans le plasma ainsi que les fractions de CM et de gros VLDL de patients DT2 (Bozzetto et al. 2011). La méthode d'ultracentrifugation utilisée a assuré qu'il n'y avait pas de contamination par les IDL et les LDL, en raison de leur densité élevée, il est également fort probable que les VLDL2 de densité plus élevée n'aient pas été isolés. De manière générale, nos résultats sur la présence et la caractérisation de particules riches en TG chez des patients DT2 sont en accord avec la littérature (Garvey et al. 2003; Carmena 2008; Hirano 2018).

Concernant les interactions LRT-plaquettes, nos résultats démontrent pour la première fois que des LRT de patients DT2 à jeun ont la capacité d'augmenter l'agrégation de plaquettes saines et fonctionnelles stimulées par un agoniste physiologique, en activant la voie de signalisation de l'AA. Beitz *et al.* ont observé que des VLDL isolés de patients atteints de maladie coronarienne à jeun

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

augmentent la production de TxA_2 plaquettaire dans le sang total de donneurs sains (Beitz et al. 1990). Plus récemment, Englyst *et al.* ont montré que des VLDL isolées d'individus sains en phase PP augmentent la concentration de TxB_2 de plaquettes (PRP) stimulées par le collagène comparativement aux plaquettes seules stimulées (Englyst et al. 2003). Un aspect important de la méthodologie de nos expériences est que les LRT de patients DT2 ont été testées sur des plaquettes isolées provenant d'individus sains. En effet, il est déjà bien documenté que les plaquettes de patients DT2 sont hyperactives, donc il aurait été incertain si les effets des LRT sur ces plaquettes auraient bel et bien été causés par les particules et non pas seulement par la dysfonction plaquettaire. De plus, l'utilisation de plaquettes isolées, comparativement à du sang total ou du PRP, prévient une interaction des plaquettes avec les autres cellules (ex. les érythrocytes) et protéines (ex. l'albumine) qui auraient pu stimuler l'agrégation. Le groupe de Yamazaki *et al*. avait en effet démontré que de l'ADP libéré par les érythrocytes pouvait augmenter l'activation des plaquettes (Yamazaki et al. 2005). Finalement, malgré que nos résultats ne permettent pas de conclure si une classe de lipoprotéines en particulier cause les effets sur les fonctions plaquettaires, nos fractions sont un mélange de différentes lipoprotéines de très faible densité représentatives de l'état physiologique des individus DT2 à jeun. La majorité des études sur les interactions LRT-plaquettes utilisent des LRT isolés en PP (Olufadi and Byrne 2006; Orth, Luley, and Wieland 1995; Englyst et al. 2003), ce qui limite la comparaison avec nos résultats, puisque la composition des LRT à jeun et en PP est probablement différente, ce qui pourrait également entraîner des effets différents sur l'agrégation plaquettaire.

Ces premiers résultats sur l'effet des LRT de patients DT2 à jeun soulignent l'implication potentielle de ces particules dans le développement de l'athérothrombose, mais soulèvent également des questions sur l'effet des LRT PP sur les plaquettes de même que l'impact de la composition en lipides du repas ingéré sur la composition des LRT et leur interaction avec les plaquettes.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

PARTIE 2 : Étude COMposition des liPoprotéines riches en trigLycérides (LRT) et activation plaquETtaire chez la femme diabétiquE (COMPLETE)

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

1.RESULTATS

Nous avons mis en place un protocole chez des patientes DT2 en phase PP, puisque nos résultats ont montré un effet pro-agrégant des LRT de patients DT2 à jeun et que les concentrations de TG non à jeun sont reconnues comme un facteur indépendant associé au risque cardiovasculaire chez les individus DT2. En effet, cette étude avait pour but de déterminer si les LRT de patients DT2 en phase PP avaient également la capacité d'augmenter l'agrégation et la concentration de TxB_2 plaquettaire. De plus, nous souhaitions étudier les LRT isolées chez des patients DT2 suite à un petit déjeuner riche en MG de différentes sources (laitière vs végétale) afin de voir si la composition des LRT pouvait être différente suivant la MG consommée et avoir un impact sur leur effet sur les plaquettes.

a. Caractéristiques des patientes diabétiques de type 2 du protocole COMPLETE

Le **Tableau 12** présente les caractéristiques des 30 patientes DT2, ainsi que les caractéristiques des patientes DT2 randomisées en 2 groupes de 15 patientes sur la base de la matière grasse consommée dans le petit-déjeuner test (beurre ou pâte à tartiner cacao-noisette (PTC)). Les patientes DT2 ont un âge moyen de 65,5 ans et un IMC moyen dans la catégorie d'obésité de classe I (34,1). Les paramètres associés au métabolisme du glucose sont supérieurs à la normale (HbA_{1C} : 7,8%, glycémie à jeun : 9 mmol/L) et le bilan lipidique est dans les limites de la normalité puisque la majorité des patientes sont sous médication hypolipémiante. En effet, 57% (17) des patientes ont une thérapie de statines seules et 1 patiente a une combinaison de molécules (statine + ézétimibe). Concernant la médication antidiabétique, 93% (28) des patientes sont sous metformine, 60% (18) sous sulfonylurées, 27% (8) sous gliptines, 37% (11) sous analogues du GLP-1 et 1 patiente est sous acarbose. Il n'y a pas de différence pour les paramètres anthropométriques et métaboliques entre les groupes randomisés sur la base de la MG consommée au petit-déjeuner.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Tableau 12: Caractéristiques cliniques et biologiques des patientes diabétiques de type 2 de l'étude COMPLETE

Caractéristiques	DT2 (n=30)	DT2 groupe PTC (n=15)	DT2 groupe Beurre (n=15)	p
Age (années)	65,5 ± 1,4	62,9 ± 2,3	68,1 ± 1,4	NS
IMC (kg/m^2)	34,1 ± 1,0	34,4 ± 1,7	33,9 ± 1,2	NS
Durée du diabète	12,9^b ± 1,4	12,5 ± 1,7	13,2^c ± 2,4	NS
Homéostasie du glucose				
HbA_{1c} (%)	7,8 ± 0,2	7,7 ± 0,3	7,8 ± 0,3	NS
Glycémie (mmol/L)	9,0 ± 0,7	8,8 ± 1,0	9,3 ± 0,9	NS
Insuline (mU/L)	12,3^a ± 1,3	11,2 ± 1,4	13,4^c± 2,3	NS
HOMA-IR	5,0^a ± 0.7	4,1 ± 0,4	5,9^c ± 1,4	NS
Lipides plasmatiques (mmol/L)				
Triglycérides	1,69 ± 0,1	1,53 ± 0,1	1,85 ± 0,3	NS
Cholestérol total	4,55 ± 0,2	4,49 ± 0,2	4,62 ± 0,2	NS
Cholestérol HDL	1,24 ± 0,1	1,27 ± 0,1	1,21 ± 0,1	NS
Cholestérol LDL	2,56 ± 0,1	2,53 ± 0,2	2,60 ± 0,2	NS
Apolipoprotéines B (g/L)				
ApoB totale	0,89^b± 0,04	0,86^c ± 0,1	0,92^c ± 0,1	NS
ApoB-100	0,88^b ± 0,04	0,85^c ± 0,05	0,91^c ± 0,1	NS
ApoB-48	0,006^b ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,006^d ± 0,001	NS

Moyennes ± SEM. a: n=29, b: n=28, c: n=14, d: n=13.

b. Composition en acides gras et sphingolipides des matières grasses contenues dans les petits déjeuners expérimentaux

La composition en AG de la pâte à tartiner et du beurre fournis aux patientes est indiquée dans le **Tableau 13.** Les deux AG majoritaires dans la PTC sont l'acide oléique (18:1 n-9) et l'acide palmitique (16:0) présents majoritairement dans l'huile de palme, MG principale de ce produit. Le beurre contient une majorité d'AG saturés à moyennes et longues chaînes (12:0, 14:0, 16:0, 18:0), dont le principal est l'acide palmitique (16:0), et le beurre contient 3 fois moins d'acide oléique (18:1 n-9) que la PTC.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Tableau 13: Composition en acides gras totaux de la pâte à tartiner cacao-noisette et du beurre

AG* (% molaire)	10:0	12:0	14:0	15:0	16:0	18:0	18:1 n-9	18:1 n-9 trans	18:2 n-6	18:3 n-3	20:0	22:0
PTC	0	0,1	0,9	0	33,2	6,5	45,2	4,3	8,3	0,2	0,3	0
Beurre	2,6	4,9	16,1	1,6	42,2	10,6	15,1	1,7	1,0	0,2	0,1	0,1

*Les AG mineurs ne sont pas listés

Le **Tableau 14** présente le contenu total et le détail des espèces moléculaires des SL contenus dans la PTC et le beurre.

Tableau 14: Composition en sphingolipides de la pâte à tartiner cacao-noisette et du beurre

	PTC												
	C16:1	**C16:0**	**C18:1**	**C18:0**	**C20:1**	**C20:0**	**C22:1**	**C22:0**	**C24:1**	**C24:0**	**C26:1**	**C26:0**	**Total**
							Céramides						
pmol/mg	0,03	0,39	0,06	0,09	0,02	0,06	0,01	0,11	0,03	0,08	0,01	0,01	0,9
% total	3,7	43,1	6,3	9,8	2,2	7,0	1,6	11,9	3,8	8,9	0,7	1,2	
							Sphingomyélines						
pmol/mg	0,2	5,8	0,2	1,1	0,1	2,0	1,1	6,6	1,7	3,9	0,1	0,2	23,0
% total	0,8	25,0	0,7	4,8	0,4	8,7	5,0	28,8	7,2	17,1	0,4	0,9	
							GM3						
pmol/mg	0,06	0,03	0,04	0,07	0,03	0,07	0,04	0,10	0,08	0,07	0,04	0,03	0,7
% total	9,0	4,8	6,6	11,0	4,5	11,1	6,5	14,4	12,0	10,1	5,9	4,2	

	Beurre												
	C16:1	**C16:0**	**C18:1**	**C18:0**	**C20:1**	**C20:0**	**C22:1**	**C22:0**	**C24:1**	**C24:0**	**C26:1**	**C26:0**	**Total**
							Céramides						
pmol/mg	0,13	14,04	0,16	1,32	0,02	0,37	0,17	6,37	1,28	7,29	0,02	0,13	31,1
% total	0,4	44,9	0,5	4,2	0,1	1,2	0,5	20,3	4,1	23,3	0,1	0,4	
							Sphingomyélines						
pmol/mg	1,1	39,6	0,8	6,7	0,7	34,0	12,6	143,9	28,6	121,6	1,6	4,8	395,9
% total	0,3	10,0	0,2	1,7	0,2	8,6	3,2	36,3	7,2	30,7	0,4	1,2	
							GM3						
pmol/mg	0,89	1,62	0,96	1,54	0,66	1,35	1,06	2,81	0,70	3,66	0,97	0,97	17,1
% total	5,2	9,4	5,6	8,9	3,8	7,9	6,2	16,4	4,1	21,3	5,6	5,7	

Par mg de MG, le beurre contient 35 fois plus de Cer, 17 fois plus de SM et 24 fois plus de GM3 que la PTC. En regardant la distribution des espèces moléculaires de chaque classe, la PTC contient surtout du Cer 16:0, 18:0 et 22:0, le beurre contient du 16:0 en proportion similaire, ainsi que du 22:0 et 24:0. Pour les SM, la PTC contient des proportions semblables de SM 16:0 et 22:0, ainsi que de la SM 24:0, alors que le beurre contient majoritairement des espèces à très longues chaînes (22:0 et 24:0). Finalement, les GM3 totaux de la PTC sont surtout répartis entre les espèces 18:0, 20:0, 22:0, 24:1 et 24:0, tandis que le beurre contient plutôt une majorité de GM3 à très

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

longues chaînes (C22:0 et C24:0). En utilisant une masse moléculaire approximative de 538, 751 et 747 g/mol pour les Cer, SM et GM3, respectivement, il est possible de calculer la quantité approximative en mg de SL contenue dans les MG.

La portion de 60g de PTC contient :

- 0,05 µmol (0,03 mg) de Cer ;
- 1,38 µmol (1,03 mg) de SM ;
- 0,04 µmol (0,03 mg) de GM3 ;

tandis que la portion de 22,5g de beurre contient :

- 0,70 µmol (0,38 mg) de Cer ;
- 8,91 µmol (6,70 mg) de SM ;
- 0,38 µmol (0,28 mg) de GM3.

c. Caractéristiques des fractions de lipoprotéines riches en triglycérides

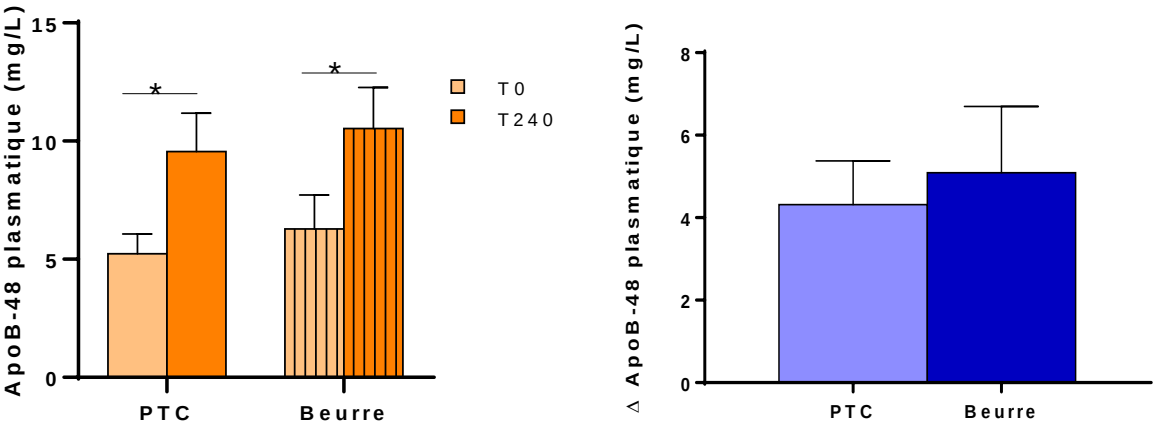
Les LRT isolés du plasma des DT2 à jeun ont un diamètre moyen de 146 nm et des concentrations moyennes en triglycérides de 0,07 mmol/L.

d. Effet du petit déjeuner sur les paramètres postprandiaux et la composition en acides gras totaux des LRT de patientes diabétiques de type 2

Au niveau plasmatique, l'ingestion du petit déjeuner riche en MG a provoqué l'augmentation significative des concentrations plasmatiques d'ApoB-48 (PTC : +78%, Beurre : +67%) et de TG (PTC : +33%, Beurre : +30%) (**Figure 15A et B**). L'augmentation de l'ApoB-48 et des TG est du même ordre quelle que soit la MG ingérée.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

A



B

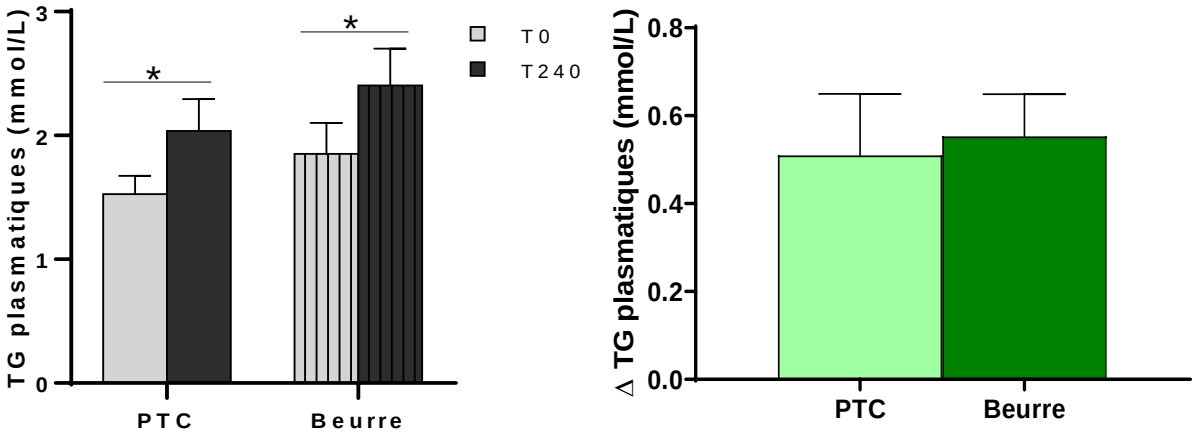


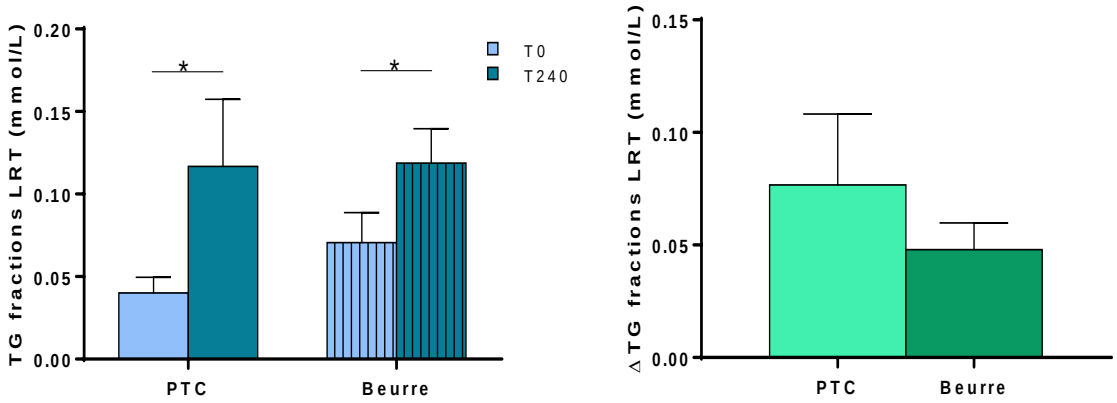
Figure 15: Effet de la consommation d'un petit déjeuner riche en MG sur l'ApoB-48 et les TG plasmatiques

*Les résultats sont les moyennes ± SEM. *p≤0,05.*

Suite à la consommation d'un petit déjeuner riche en MG, les concentrations en TG et le diamètre des LRT sont significativement augmentés (PTC : +200% et +10%, respectivement, beurre : +71% et +23%, **Figures 16A et B,** p<0,01 pour tous les paramètres dans les deux groupes). Le type de MG n'a pas d'effet sur le contenu en TG, mais le diamètre des LRT est plus élevé suite à la consommation du petit déjeuner riche en beurre (**Figure 16B**, p=0,004).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

A



B

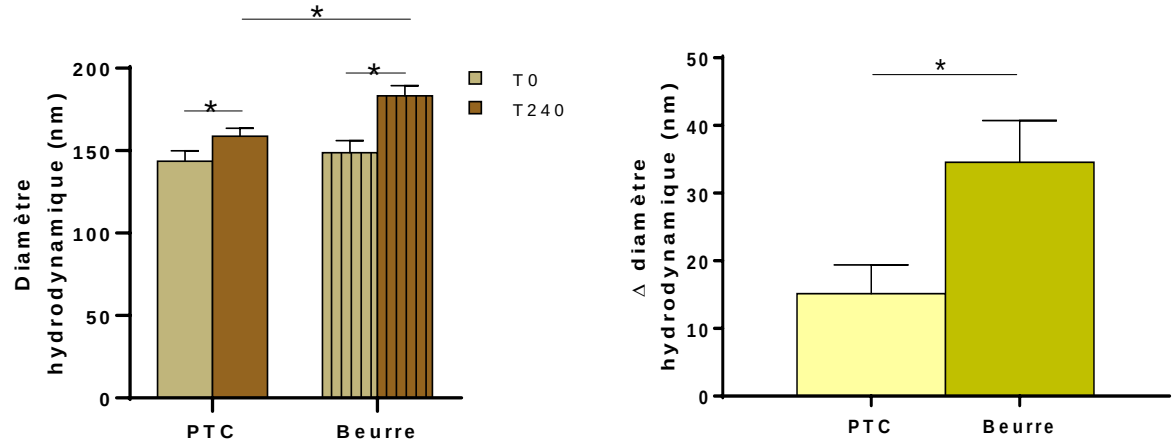


Figure 16: Effet de la consommation d'un petit déjeuner riche en MG sur les concentrations en TG et le diamètre des LRT
*Les résultats sont les moyennes ± SEM. *p≤0,05.*

Le **Tableau 15** présente la composition en AG des LRT à jeun et suite aux petits déjeuners. Les profils en acides gras des LRT ne sont pas différents en basal entre les groupes PTC et Beurre. Suite au petit déjeuner PTC, une augmentation importante des pourcentages molaires du 18:1 n-9 est observée associée à une diminution des pourcentages molaires des AGS (en particulier le 18 :0) et AGPI. Suite à l'ingestion du petit déjeuner beurre, les pourcentages molaires du 16 :0 mais aussi des 14 :0 et 12 :0 sont augmentés tandis que ceux des 18:2 n-6 et 20:4 n-6 sont diminués.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Tableau 15: Composition en acides gras des LRT à jeun et 4 heures après l'ingestion des petits déjeuners expérimentaux

Acides gras (% molaire)	PTC T0	PTC T240	p (PTCT240 vs PTCT0)	Beurre T0	Beurre T240	p (BeurreT240 vs BeurreT0)
12:0	0,07 ± 0,07	0,03 ± 0,03	NS	0,09 ± 0,06	0,38 ± 0,10	0,002
14:0	2,2 ± 0,1	1,4 ± 0,2	0,0007	1,8 ± 0,3	4,4 ± 0,5	<0,0001
15:0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	NS	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,02
16:0	29,1 ± 0,8	27,8 ± 0,5	0,004	28,6 ± 0,8	32,7 ± 0,5	0,0002
16:1 n-7	2,0 ± 0,3	1,6 ± 0,2	0,006	2,0 ± 0,4	2,2 ± 0,3	NS
18:0	16,5 ± 2,6	12,6 ± 2,0	0,02	16,1 ± 2,6	14,3 ± 2,1	NS
18:1 n-9	22,7 ± 1,2	32,5 ± 1,3	0,0001	24,7 ± 1,9	25,5 ± 1,3	NS
18:2 n-6	17,5 ± 1,8	16,1 ± 1,2	0,06	16,8 ± 1,3	12,3 ± 0,6	<0,0001
20:3 n-6	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	NS	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	NS
20:4 n-6	2,9 ± 0,4	2,5 ± 0,3	0,02	3,2 ± 0,2	2,4 ± 0,1	0,007
20:5 n-3	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	NS	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	NS
22:6 n-3	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,006	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	NS
24:0	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,05	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,009
24:1 n-9	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,09	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,04

Les résultats, exprimés en % molaire, représentent la moyenne ± SEM des principaux acides gras des LRT.

L'ingestion des MG a modifié la composition en AG totaux des LRT entre les deux groupes. La **Figure 17** montre la variation des proportions en AGS, AGMI et AGPI entre le T240 et le T0. Le contenu en AGS des LRT est augmenté suite à la consommation du petit déjeuner contenant le beurre, tandis qu'après le petit déjeuner PTC c'est le contenu en AGMI qui se retrouve augmenté.

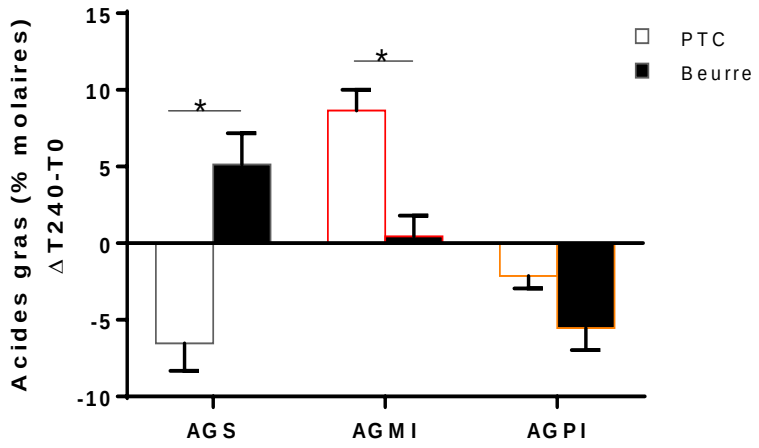


Figure 17: Modification de la composition en catégories d'acides gras des LRT de patientes DT2 suite à la consommation de petits déjeuners riches en matières grasses de différentes sources

*Les résultats sont les moyennes des deltas T240-T0 ± SEM. *p≤0,05.*

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

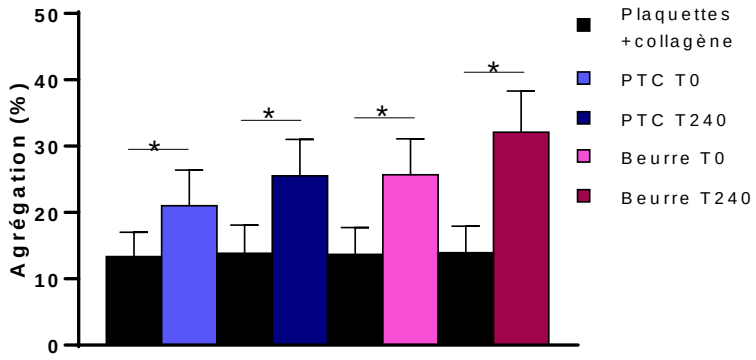
e. Effets des LRT postprandiales de patients diabétiques de type 2 sur les plaquettes

i. Agrégation plaquettaire

Nous confirmons que les LRT isolées des patientes DT2 à jeun augmentent l'agrégation plaquettaire stimulée par le collagène. Les LRT isolées en PP stimulent aussi l'agrégation plaquettaire comparativement aux plaquettes seules stimulées par le collagène (**Figure18A**).

Comme la réponse des plaquettes à un agoniste varie d'un donneur à l'autre et sur la durée de l'expérience, un contrôle de plaquettes seules stimulées par le collagène a été effectué avant chaque test d'agrégation de plaquettes pré-incubées avec des LRT à T0 ou T240 et stimulés par le collagène. Les résultats d'agrégation dans chaque groupe aux deux temps ont donc été normalisés en fonction de ces contrôles afin de permettre la comparaison entre les groupes (**Figure 18B**). Dans chaque groupe, l'agrégation des plaquettes pré-incubées avec des LRT et stimulées par le collagène n'est pas significativement différente entre T0 et T240. De plus, il n'y a pas de différence d'agrégation entre les plaquettes pré-incubées avec les LRT isolés suite à la consommation du beurre et stimulées par le collagène comparativement à l'agrégation des plaquettes pré-incubées avec les LRT isolés suite à l'ingestion de la PTC et stimulées par le collagène.

A



Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

B

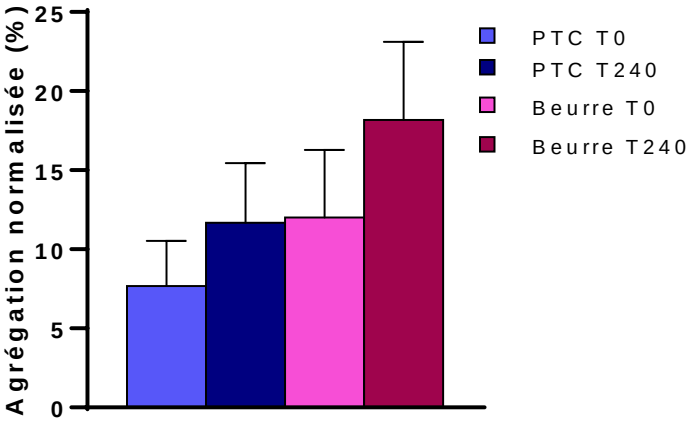


Figure 18: L'agrégation plaquettaire est stimulée par les LRT à jeun et en postprandial chez des patientes DT2

*Des plaquettes saines ont été incubées avec ou sans 25 µg/mL de LRT de patientes DT2 à T0 ou T240 et stimulées avec 0,125 µg/mL ± 0,02 de collagène et agitées à 1000 rpm pendant 4 minutes à 37°C. Les résultats sont les moyennes du pourcentage d'agrégation des plaquettes seules stimulées par le collagène (barres noires) ou des plaquettes pré-incubées avec les LRT et stimulées par le collagène (barres colorées) ± SEM, n=15 patientes DT2 par groupe (*p < 0,05).*

A) *Plaquettes + PTC T0 + collagène vs plaquettes + collagène : +62%, p=0,006 ; plaquettes + PTC T240 + collagène vs plaquettes + collagène : +86%, p=0,004 ; plaquettes + Beurre T0 + collagène vs plaquettes + collagène : +86%, p=0,005 ; plaquettes + Beurre T240 + collagène vs plaquettes + collagène : +129%, p=0,0006.*

B) *PTC T240 vs PTC T0 : +33%, p=NS ; Beurre T240 vs Beurre T0 : +50%, p=NS*

ii. Concentration de thromboxane B_2

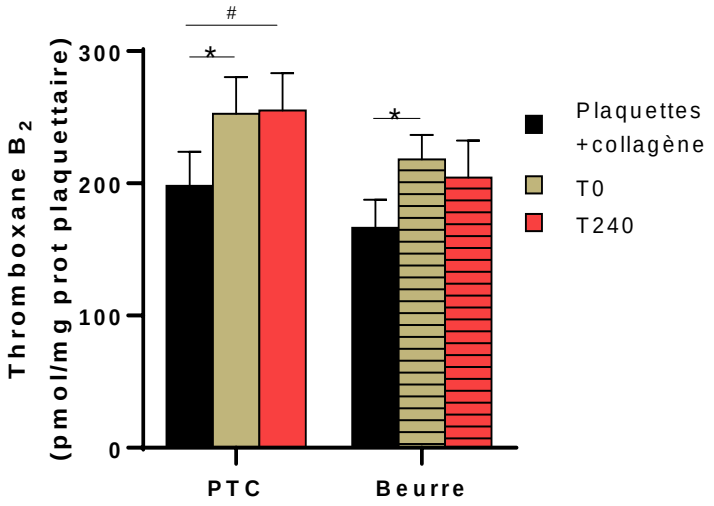
Les concentrations de thromboxane B_2 dans des plaquettes seules ou pré-incubées avec des LRT de patientes DT2 à jeun ou 4h après le petit déjeuner riche en MG et stimulées par le collagène ou la thrombine sont présentées dans la **Figure 19**. Lorsque les plaquettes ont été stimulées avec le collagène, les LRT isolées à T0 des deux groupes augmentent significativement et de manière similaire la concentration de TxB_2 plaquettaire comparativement aux plaquettes seules stimulées. Il n'y a pas de différence de concentration de TxB_2 entre les plaquettes pré-incubées avec les LRT isolées à T0 ou T240 dans chaque groupe ainsi qu'entre les groupes lorsque les plaquettes ont été incubées avec des LRT isolées après le petit déjeuner PTC ou Beurre (**Figure 19A**).

Lorsque les plaquettes ont été stimulées par la thrombine, la pré-incubation des plaquettes avec les LRT à T0 et T240 des deux groupes a augmenté la concentration de TxB_2 comparativement aux plaquettes seules stimulées, excepté pour les LRT isolées à T0 du groupe PTC, où une tendance à l'augmentation est observée (P=0,06). Les LRT isolées à jeun et en PP augmentent de manière

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

similaire la concentration de TxB_2 des plaquettes stimulées par la thrombine et il n'y a pas de différence entre les groupes lorsque les plaquettes stimulées par la thrombine sont pré-incubées avec des LRT postprandiales quel que soit le petit déjeuner (**Figure 19B**).

A



B

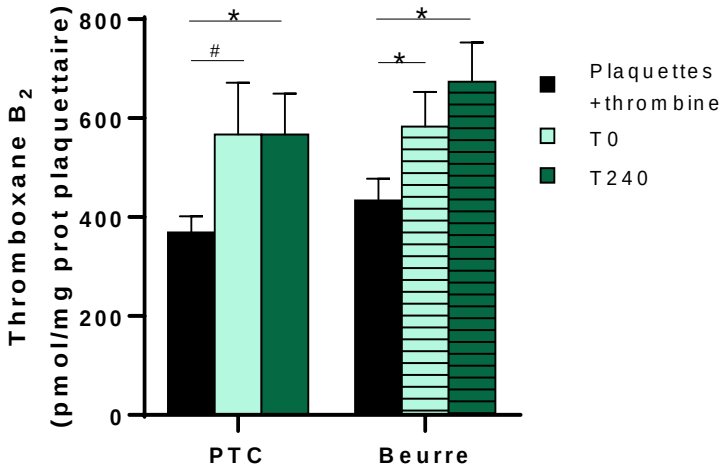


Figure 19: La concentration de TxB_2 plaquettaire est augmentée par les LRT de patients DT2 à jeun et suite à un petit déjeuner riche en MG de différentes sources

*Des plaquettes saines ont été incubées pendant 30 minutes à 37°C avec ou sans 25 µg/mL de LRT de patientes DT2 à T0 ou T240 et stimulées avec 0,5 µg/mL de collagène ou 0,1 U/mL de thrombine pendant 1 heure sous agitation douce. Les résultats sont les concentrations moyennes en pmol de TxB_2 par mg de protéines plaquettaires ± SEM, n = 15 patientes DT2 par groupe (*p < 0.05).*

***A)** Plaquettes + PTC T0 + collagène vs plaquettes + collagène : +28%, p=0,03 ; plaquettes + PTC T240 + collagène vs plaquettes + collagène : +29%, p=0,07 ; plaquettes + Beurre T0 + collagène vs plaquettes*

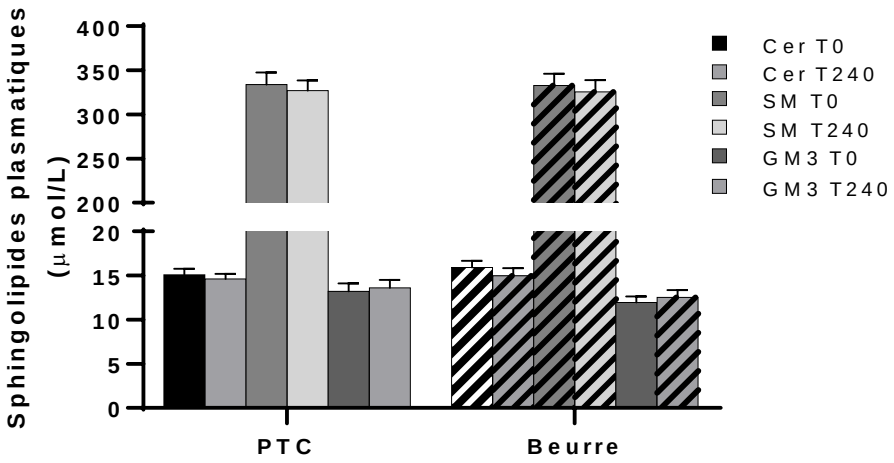
Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

+ collagène : +31%, p=0,01 ; plaquettes + Beurre T240 +collagène vs plaquettes + collagène : +23%, p=NS).
***B)** plaquettes + PTC T0 + thrombine vs plaquettes + thrombine : +54%, p=0,06 ; plaquettes + PTC T240 + thrombine vs plaquettes + thrombine : +54%, p=0,02 ; plaquettes + Beurre T0 + thrombine vs plaquettes + thrombine : +34%, p=0,007 ; plaquettes + Beurre T240 +thrombine vs plaquettes + thrombine : +55%, p=0,001).*

f. Sphingolipidomique du plasma de patientes diabétiques de type 2 à jeun et suite à un petit déjeuner riche en matière grasse de différentes sources

Les **Figures 20A** et **B** montrent la composition en Cer, SM et GM3 totaux, de même qu'en S1P, lysoSM, Spha et Spho dans le plasma des patientes DT2 à T0 et suite au petit déjeuner riche en MG de différentes sources. Il n'y a pas de différence entre les concentrations totales plasmatiques de toutes les classes de SL à jeun et suite à la consommation du petit déjeuner. Il n'y a également pas d'effet du type de MG ingérée. Les concentrations de lysoSL et des bases, particulièrement la lysoSM, sont minoritaires comparativement aux classes de SL.

A



Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

B

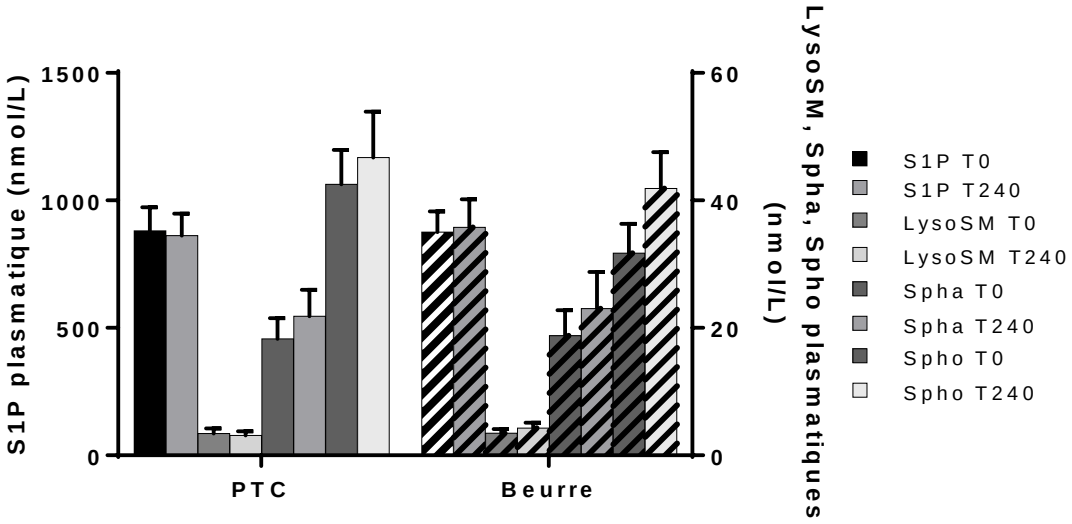


Figure 20: Concentrations plasmatiques de céramides, sphingomyélines, GM3, sphingosine-1-phosphate, lysosphingomyéline, sphinganine et sphingosine chez les patientes DT2 à jeun et 4h après la consommation d'un petit déjeuner riche en MG de source différente

*Les résultats obtenus par LC-MS/MS sont les moyennes ± SEM. *p≤0,05, n=15 patientes DT2 dans chaque groupe. Cer : céramides, SM : sphingomyélines, GM3 : gangliosides GM3, S1P : sphingosine-1-phosphate, lysoSM : lyso sphingomyléine, Spha : sphinganine, Spho : sphingosine.*

g. Sphingolipidomique des lipoprotéines riches en triglycérides de patientes diabétiques de type 2 à jeun et suite à un petit déjeuner riche en matière grasse de différentes sources

Les SL, lysosL ainsi que les bases sphingoïdes ont également été quantifiés dans les fractions de LRT des patientes DT2 à jeun et suite à l'ingestion du petit déjeuner. Pour ce qui est des concentrations totales des principales classes de SL, une augmentation des Cer et des SM totaux est observée suite à l'ingestion des deux petits déjeuners, sans modification significative au niveau des GM3. Bien que l'augmentation des Cer suite à l'ingestion du petit déjeuner PTC semble plus élevée comparativement au groupe beurre, celle-ci n'est pas significativement différente (**Figure 21**).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

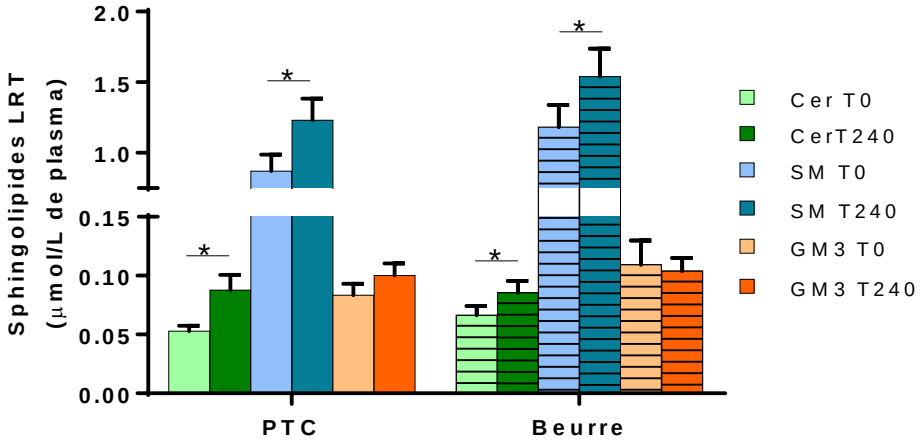
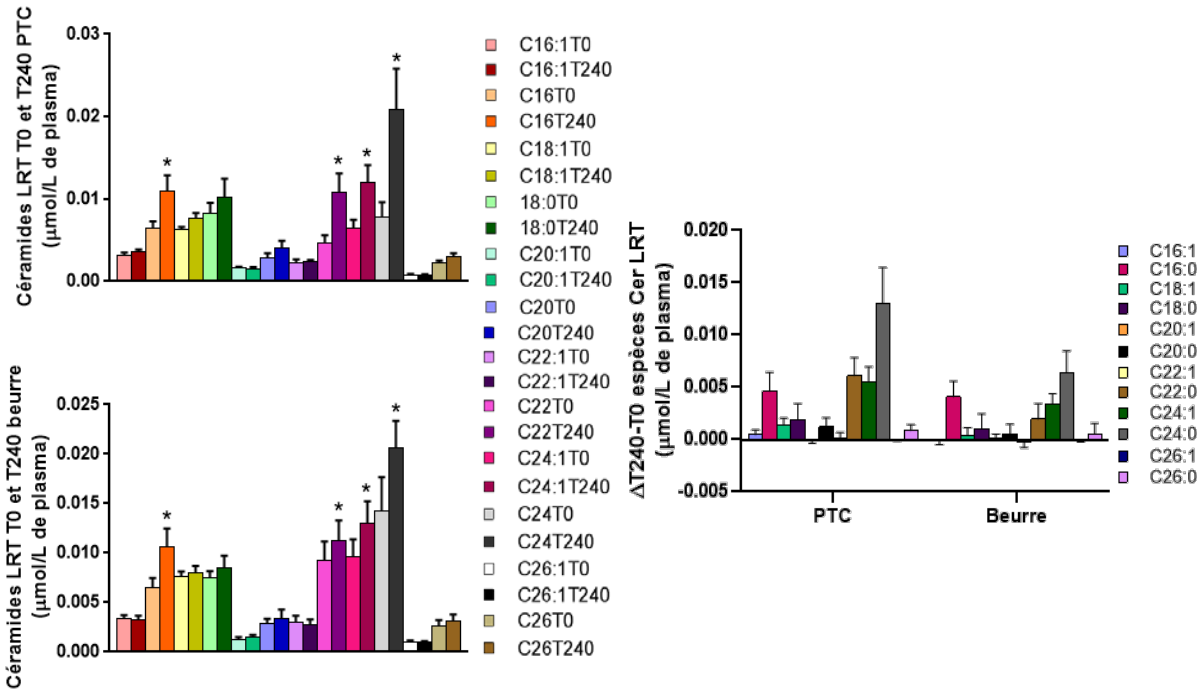


Figure 21: Concentrations des céramides, sphingomyélines et GM3 totaux des LRT de patientes DT2 à jeun et 4h après un petit déjeuner riche en MG de différentes sources
*Les résultats obtenus par MS/MS, exprimés en µmol/L de plasma, sont les moyennes ± SEM. *p≤0,05, n=15 patientes DT2 dans chaque groupe. Cer : céramides, SM : sphingomyélines, GM3 : gangliosides GM3.*

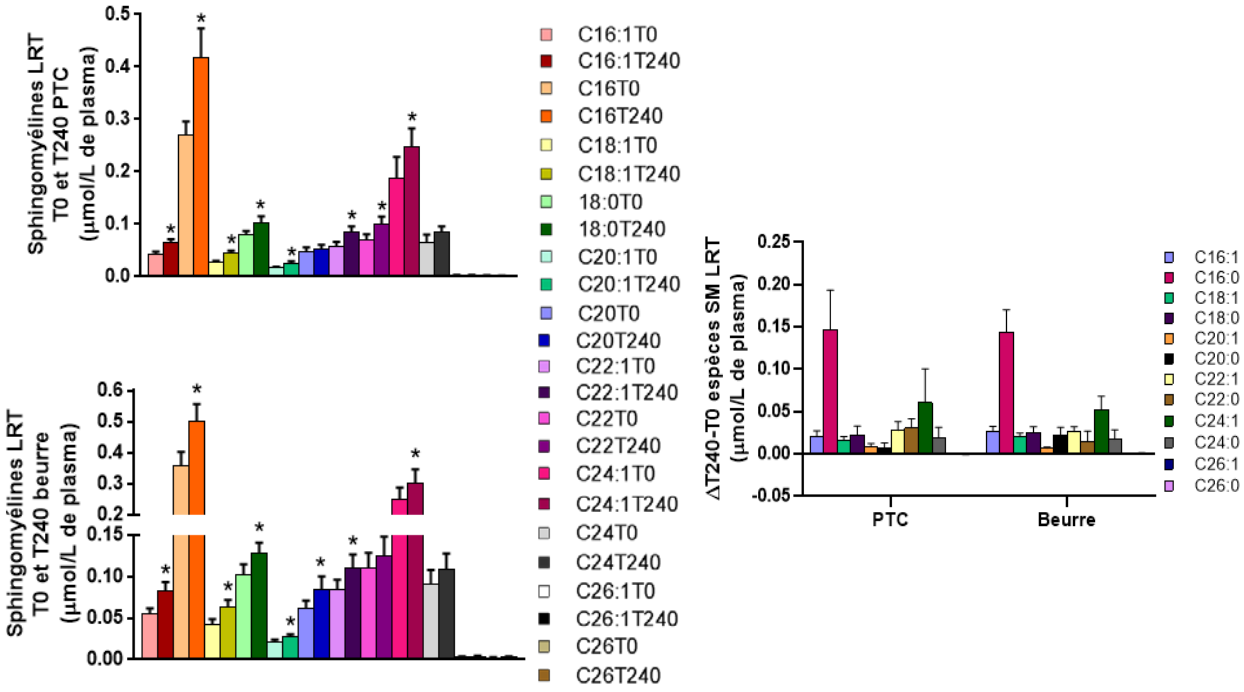
Lorsque le détail des espèces moléculaires exprimées en µmol/L de plasma de chaque classe de SL suite à l'ingestion du petit déjeuner est observé, les profils sont assez similaires entre les deux groupes. Pour les Cer, l'espèce 16:0, ainsi que certaines à très longues chaînes (22:0, 24:1 et 24:0) sont augmentées suite à la prise du petit déjeuner dans les deux groupes, particulièrement le Cer24:0 (**Figure 22A).** Pour les SM, presque toutes les espèces sont augmentées suite à la consommation des deux petits déjeuners (**Figure 22B**). Seul le Cer22:1 est augmenté à T240 dans le groupe PTC pour les GM3 (**Figure 22C**). Les deltas T240-T0 ne sont pas différents entre les deux groupes pour les espèces moléculaires de chaque classe, excepté le GM3 26:0 (**Figure 22C**).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

A



B



Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

C

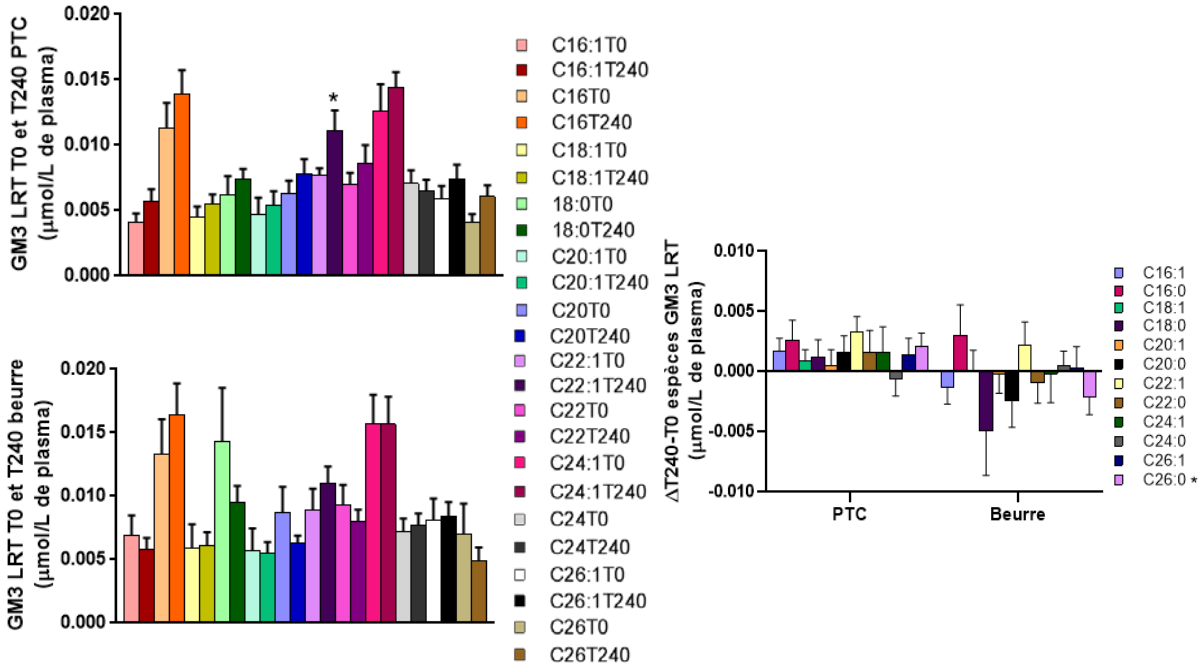


Figure 22: Concentrations des espèces moléculaires des céramides, sphingomyélines et GM3 des LRT de patientes DT2 à jeun et 4h après un petit déjeuner riche en MG de différente source

*Les résultats obtenus par MS/MS, exprimés en µmol/L de plasma, sont les moyennes ± SEM. *p≤0,05, n=15 patientes DT2 dans chaque groupe. Cer : céramides, SM : sphingomyélines, GM3 : gangliosides GM3.*

Les résultats des SL dans les LRT à jeun et en PP ont également été ajustés en fonction de la quantité de protéines totales des fractions. La concentration des Cer totaux est augmentée dans les LRT à T240 comparativement à T0 dans les deux groupes et la concentration de SM a tendance à être augmentée dans le groupe PTC seulement (**Figure 23**).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

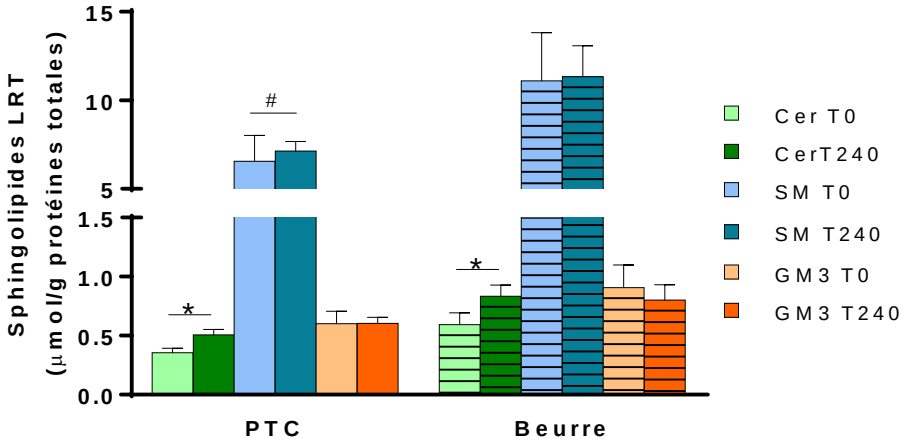
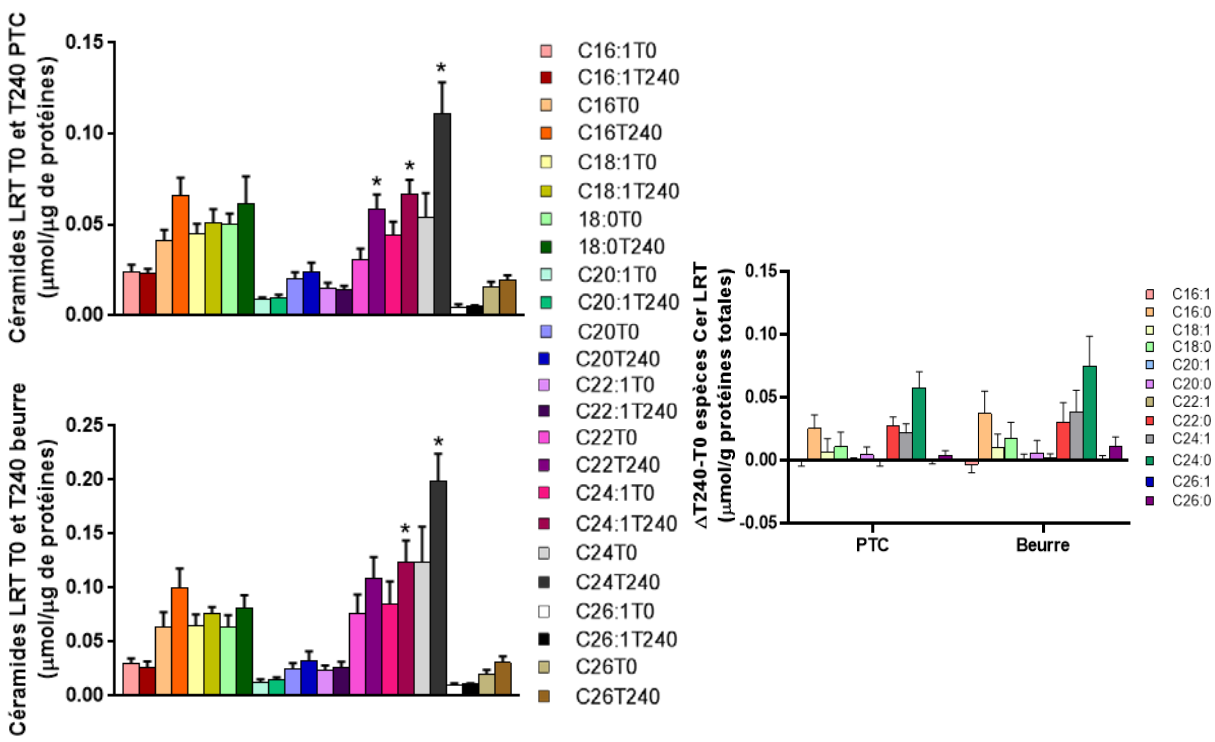


Figure 23: Concentrations des céramides, sphingomyélines et GM3 totaux des LRT de patientes DT2 à jeun et 4h après un petit déjeuner riche en MG de différente source
*Les résultats obtenus par MS/MS, exprimés en µmol/g de protéines totales, sont les moyennes ± SEM. *p≤0,05, #p=0,09, n=15 patientes DT2 dans chaque groupe. Cer : céramides, SM : sphingomyélines, GM3 : gangliosides GM3.*

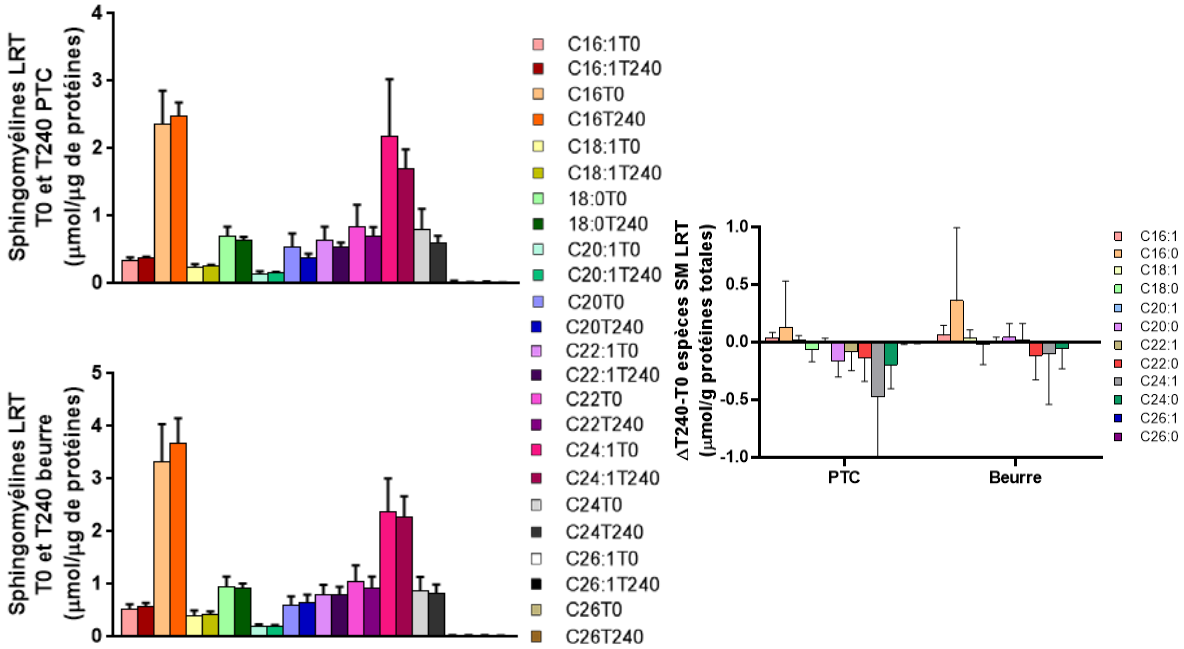
Au niveau des espèces moléculaires exprimées en µmol/g de protéines totales, des modifications sont présentes pour certaines espèces de Cer. En effet, suite à l'ingestion du petit déjeuner PTC, les concentrations de Cer22:0, Cer24:1 et Cer 24:0 sont plus élevées, tandis que suite au petit déjeuner beurre les concentrations de Cer24:1 et Cer24:0 sont significativement augmentées. La concentration de Cer16:0 après le petit déjeuner beurre a tendance à être augmentée également. Il n'y a cependant pas de différence au niveau des deltas T240-T0 pour chaque espèce entre les deux groupes (**Figure 24A**). Pour les espèces de SM et de GM3, il n'y a pas de différence significative entre le T240 et le T0 dans chaque groupe, ainsi que pour les deltas T240-T0 entre les groupes (**Figure 24B et C**).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

A



B



Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

C

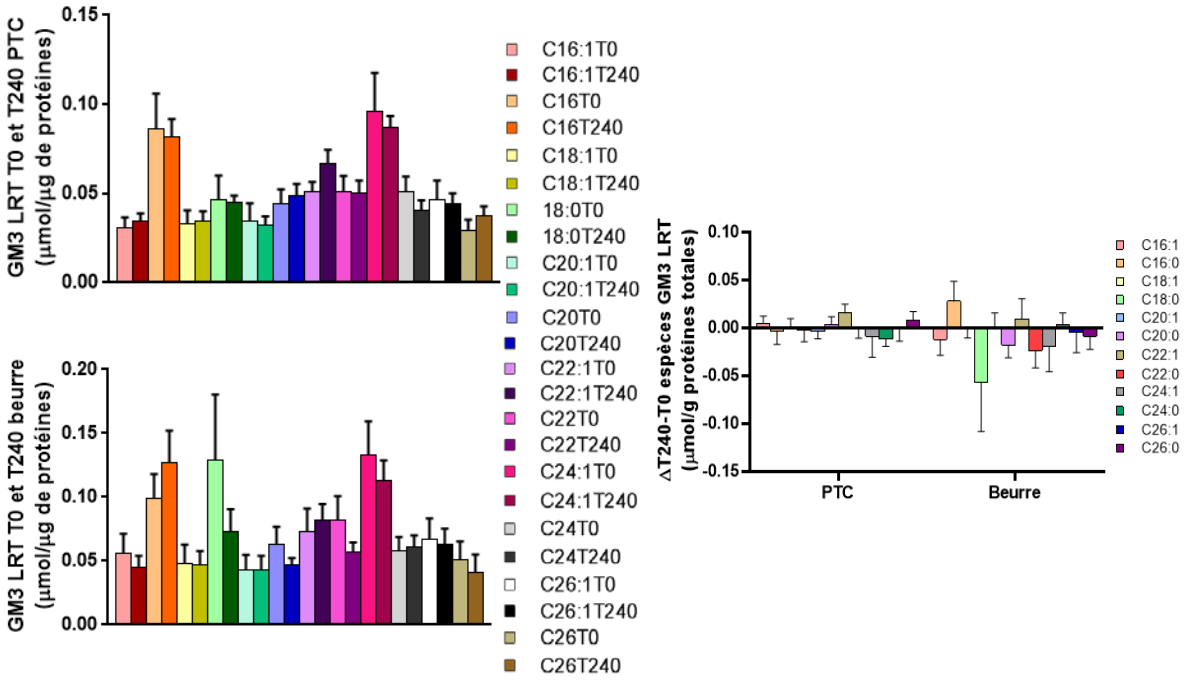


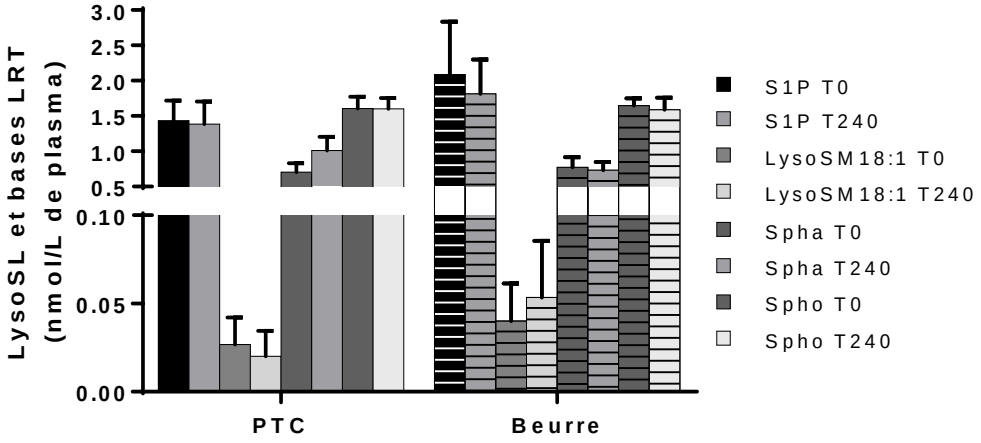
Figure 24: Concentrations des espèces moléculaires des céramides, sphingomyélines et GM3 des LRT de patientes DT2 à jeun et 4h après un petit déjeuner riche en MG de différente source

*Les résultats obtenus par MS/MS, exprimés en µmol/g de protéines totales, sont les moyennes ± SEM. *p≤0,05, n=15 patientes DT2 dans chaque groupe. Cer : céramides, SM : sphingomyélines, GM3 : gangliosides GM3.*

Finalement, il n'y a pas de différence entre les concentrations de S1P, lysoSM, Spha et Spho dans les LRT à jeun et en PP, ni selon le type de MG ingérée (**Figure 25A** et **B**).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

A



B

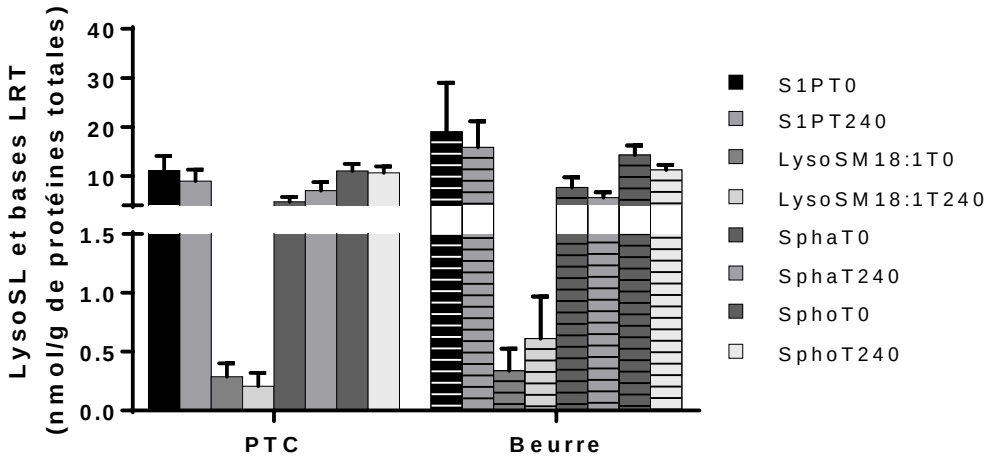


Figure 25: Concentrations de la S1P, lysoSM, Spha et Spho rapportées au plasma et à la quantité de protéines totales des LRT de patientes DT2 à jeun et 4h après un petit déjeuner riche en MG de différente source

*Les résultats obtenus par LC-MS/MS, exprimés en nmol/g de protéines totales, sont les moyennes ± SEM. *p≤0,05, n=15 patientes DT2 dans chaque groupe. S1P : sphingosine-1-phosphate, lysoSM : lyso sphingomyléine, Spha : sphinganine, Spho : sphingosine.*

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

2.DISCUSSION

a. Modification postprandiale des paramètres plasmatiques et de la composition des LRT

Le protocole COMPLETE avait pour objectif principal de déterminer l'effet des LRT de patientes DT2 produites en phase PP suite à l'ingestion d'un petit déjeuner riche en MG de sources différentes (laitière vs végétale) sur les plaquettes. Un objectif secondaire était d'étudier la composition détaillée en lipides, particulièrement en SL, des LRT suite à la consommation des deux MG comparativement aux LRT à jeun.

La consommation d'un petit déjeuner contenant 20 g de MG a induit une augmentation significative de l'ApoB-48 et des triglycérides plasmatiques de 63% et 31% respectivement, mesurée 4 heures après le repas, et sans effet du type de MG ingérée. Dubois *et al.* ont réalisé une étude cinétique de la lipémie post-prandiale chez des sujets jeunes sans surpoids ni obésité, non-diabétiques et normolipidiques à qui des repas tests contenant de 0 à 50 g de MG ont été administrés. Ils ont montré qu'une quantité de lipides de 15, 30, 40 et 50 g provoque une augmentation aigüe des TG plasmatiques dans les 2 premières heures suivant le repas, ainsi qu'un pic de concentration entre 2 et 3 heures en phase PP. Cependant, l'aire sous la courbe 7h-0 des TG plasmatiques n'était pas significativement différente du temps 0 suite au repas contenant 15g de lipides comparativement aux repas contenant 30, 40 et 50 g. De plus, le contenu en TG des CM suite au repas de 15 g était augmenté de seulement 0,2 mmol/L 2 heures après le repas tandis que suite aux repas contenant plus de lipides l'augmentation était de 0,5-,07 mmol/L et se maintenait entre 0,3 et 0,5 mmol/L 4 heures après le repas (Dubois et al. 1998). Nous avons observé une augmentation à T240 de la concentration de TG de 0,5 mmol/L dans les LRT. Il est donc intéressant de constater que l'ingestion d'une quantité modérée de lipides (20 g) chez des patientes DT2 a un effet significatif sur la lipémie 4 heures après le repas. Cette observation corrobore bien le fait que le métabolisme des LRT est perturbé en PP chez les individus DT2, puisqu'une quantité de 20 g de lipides peut entraîner une réponse qui nécessiterait environ 30-40 g de MG pour un individu sain. Cet apport en lipides, en plus d'être sous forme de produits de consommation courante, est réaliste pour un petit déjeuner comparativement à des repas très riches en MG ou des charges orales de lipides pouvant aller jusqu'à 1g/kg de poids corporel et souvent administré sous forme de lait fouetté ou de crème (Lairon, Lopez-Miranda, and Williams 2007). En effet, selon l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, l'apport énergétique quotidien recommandé provenant des lipides est de 35 à 40%, et il serait dépassé par 43% des adultes en

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

France (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation 2019). Concernant les paramètres PP de la patiente ayant un traitement avec de l'acarbose, un médicament qui ralentit l'absorption des glucides et ayant un effet hypolipémiant, l'augmentation de l'ApoB-48 et des TG en PP a pu être impactée. En effet, on observe une augmentation modérée de l'ApoB-48 et des TG plasmatiques de 38% et 21%, respectivement, qui est inférieure à la moyenne du groupe. Il faut cependant noter que cette patiente avait une concentration de TG plasmatiques déjà élevée en basal à 2,03 mmol/L. L'augmentation des TG des LRT était de 78%, ce qui est assez semblable à la moyenne pour le groupe (71%).

Le diamètre des particules est supérieur de 9% dans le groupe PTC et significativement plus élevé de 19% dans le groupe Beurre, malgré des contenus en TG et cholestérol similaires pour les deux groupes à T240. Les LRT que nous avons isolées sont un mélange de particules hétérogènes représentées par des CM, remnants de CM et grosses VLDL. La taille plus élevée des LRT après l'ingestion de beurre comparativement au PTC pourrait être le reflet d'une lipolyse moindre ou retardée des chylomicrons par la lipoprotéine lipase. Il a été démontré que l'ingestion de 40 g de beurre par des hommes en bonne santé induisait une moindre augmentation PP des TG dans le sérum et les CM. Les CM produits étaient de plus petite taille comparativement à ceux produits par la consommation d'un repas contenant la même quantité d'huile d'olive ou de tournesol (Mekki et al. 2002). Cependant, contrairement à l'étude de Mekki *et al.*, nous avons comparé deux MG saturées contenues dans une matrice alimentaire relativement similaire (solide). Martins *et al*. ont étudié l'effet de la taille et du nombre de CM sur leur clairance et ont conclu que malgré que les plus grosses particules soient métabolisées plus lentement, c'est plutôt leur nombre qui a un effet majeur sur leur clairance (Martins et al. 1996). Donc, puisqu'il n'y a pas de différence au niveau de la concentration d'ApoB-48 entre les groupes PTC et beurre, l'augmentation de la taille des particules suite au petit déjeuner beurre pourrait n'avoir qu'un effet négligeable sur leur clairance.

Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les augmentations des TG dans le plasma ou les LRT quelle que soit la MG ingérée. Nos résultats sont en accord avec ceux de Sciarrillo *et al*. qui ont montré que la consommation d'un repas contenant 61% des calories (51-84g) provenant de différents types de MG (beurre, huile de coco, huile d'olive et huile de colza) par des sujets minces ou obèses augmentaient de façon similaire les TG plasmatiques. Cette même étude a toutefois observé une réponse lipémique PP plus faible chez les femmes comparativement aux hommes ainsi qu'une corrélation positive entre l'aire sous la courbe d'augmentation des TG et l'IMC (Sciarrillo et al. 2019). Une étude faite sur 8 patients DT2 des deux sexes en surpoids (29 ± 3 kg/m^2) testant l'effet sur la lipémie PP de 3 produits laitiers de structure différente (beurre, fromage mozzarella et lait) n'a pas non plus observé de différence au niveau des concentrations de TG en PP.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Cependant, le pic d'augmentation des TG plasmatiques suite à l'ingestion du repas contenant le beurre se situait à 5 heures PP comparativement aux repas contenant la mozzarella et le lait où le pic est apparu après 4 heures (Clemente et al. 2003). Il est donc évident que de nombreux facteurs tels que le sexe, le poids, la présence ou non du DT2, le type et la structure de la MG ingérée ont tous un rôle à jouer dans la réponse lipémique PP.

Il est notable que la consommation du petit déjeuner riche en MG de différentes sources ait aussi causé des modifications de la composition en AG totaux des LRT. La composition des LRT à T0 n'est pas différente entre les deux groupes alors que la composition en AG à T240 reflète assez bien la composition en AG majoritaires de la MG ingérée dans chaque groupe. Les LRT produits suite à la consommation de la PTC sont enrichis en AGMI (surtout en acide oléique, 18:1 n-9) tandis que ceux produits suite à la consommation du beurre, sont enrichis en AGS (environ 60%) particulièrement en acide palmitique (16:0). La composition en AG des LRT de patientes DT2 se retrouve donc significativement modifiée après seulement une prise alimentaire renfermant des AG contenus dans 20 g de MG de différentes sources. Ces résultats supportent aussi les travaux démontrant que la structure des TG de chaque MG a un impact sur la composition des LRT PP. En effet, tel que mentionné dans la section **Classification, structure et composition des lipides alimentaires,** l'acide palmitique est surtout en position *sn-2* des TG dans le beurre, tandis qu'il est en position externe *sn-1* et *sn-3* des TG dans les MG d'origine végétale. Il a été montré chez l'animal que la position de l'AG, et en particulier du 16:0, en *sn-2* des TG a un effet déterminant sur son absorption et son incorporation dans les TG (Renaud, Ruf, and Petithory 1995; Innis, Dyer, and Lien 1997). En effet, les lipases gastrique et pancréatique hydrolysent les AG en positions 1 et 3 des TG alimentaires, ce qui produit des AG libres et des 2-monoglycérides qui sont absorbés et ré-estérifiés. Il est estimé que la voie du 2-monoglycéride produit environ 80% des TG qui seront synthétisés et sécrétés dans les CM (Small 1991). Une étude de Berry *et al.* a testé l'effet de 50 g d'huile palme native ou interinstérifiée contenue dans des muffins chez 20 homme en bonne santé. La concentration maximum de TG a été atteinte à 4h pour les 2 groupes. Par contre, la courbe de réponse était différente entre les groupes à 1, 2, 5 et 6 heures, où l'augmentation des TG plasmatiques était plus importante suite à la consommation de l'huile de palme native (Berry et al. 2007). De manière générale, les études portant sur l'effet PP des TG de structure différente chez l'humain ne permettent pas de tirer de conclusions claires sur une distribution préférentielle des AG dans les TG. Il est possible que ce soit le changement des caractéristiques physico-chimiques des MG qui résultent de la modification de structure des TG suite à l'interestérification, plutôt que la position des AG dans les TG en soi, qui serait un déterminant de la réponse lipémique en PP (Berry 2009).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Tholstrup *et al.* ont étudié la réponse lipémique de jeunes hommes en bonne santé suite à la consommation d'un repas test contenant 1g/kg de poids corporel de lipides (65-85 g), dont 40% de lipides totaux sous forme d'AGS, 41% d'AGMI et 19% d'AGPI. Ils ont observé que la concentration de TG dans les chylomicrons était augmentée 4 heures suite à la consommation du repas contenant les AGS sous forme d'acide myristique (14:0) comparativement à des repas tests contenant de l'acide palmitique (16:0) ou laurique (12:0) (Tholstrup et al. 2001). De manière générale, ces résultats indiquent que la composition en AG de la diète peut influencer la lipémie et la composition lipidique des LRT postprandiales.

b. Effet des LRT postprandiales de patientes DT2 sur les fonctions plaquettaires

Nous avons confirmé les résultats observés dans la première partie, soit que les LRT de DT2 à jeun augmentent l'agrégation plaquettaire de 64% en moyenne. Nous montrons aussi que les LRT produites suite aux deux petits déjeuners stimulent l'agrégation de manière significative comparativement aux plaquettes contrôles (PTC : +86%, beurre : +129%). Malgré une augmentation de 33% et 50% de l'agrégation dans les plaquettes stimulées par les LRT PP des groupes PTC et beurre comparativement aux LRT isolées à jeun, la différence entre l'agrégation à T240 et T0 n'est pas significative. Cette absence de significativité pourrait être due à une grande variabilité interindividuelle des LRT et de la réponse plaquettaire aux agonistes.

Plusieurs études ont porté sur l'effet de la lipémie PP suite à une charge lipidique (30-100g) sur la réponse des plaquettes en aigüe (Nordoy, Lagarde, and Renaud 1984; Fuhrman, Brook, and Aviram 1986; Hyson et al. 2002). Par exemple, Hyson *et al.* ont observé que 3,5 heures suite à un repas contenant 40% des calories provenant des lipides (30g), le pourcentage de plaquettes exprimant la P-sélectine, marqueur d'activation, est augmenté. Ces résultats permettent de conclure qu'une charge lipidique peut causer une activation des plaquettes, mais ne permettent pas de déterminer quel est le mécanisme sous-jacent cette activation. Dans ce contexte, il est donc étonnant que très peu d'études se sont intéressées à l'effet spécifique des LRT en PP sur les plaquettes isolées. Aviram *et al.* ont étudié l'effet sur l'agrégation plaquettaire de fractions de lipoprotéines isolées chez des hommes minces en bonne santé ou atteints d'une hyperlipoprotéinémie primaire de phénotype IV suite à un repas contenant 50g de MG riche en AGS (25g) ou en AGPI (38g). Les CM isolés suite aux deux repas et dans les deux groupes ont diminué l'agrégation de plaquettes isolées tandis que les VLDL isolées 3 heures après les deux repas ont augmenté l'agrégation stimulée par le collagène et cet effet était réduit après 5 heures chez les volontaires sains, mais pas chez les patients (Aviram, Fuhrman, and Brook 1986).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Nos résultats sur les effets des LRT postprandiales sur la concentration de TxB_2 plaquettaire confirment un effet activateur des LRT, avec des différences en fonction de l'agoniste utilisé, soit le collagène ou la thrombine. La fixation du collagène et de la thrombine sur leurs récepteurs propres va activer des voies de signalisation qui aboutissent à l'activation de la $cPLA_2$ et à la formation de TxA_2. Des concentrations faibles de collagène résultant en une faible stimulation et des concentrations plus élevées de thrombine stimulant plus fortement les plaquettes ont été choisies. Considérant que la concentration de collagène utilisée provoque une stimulation des plaquettes plus modérée que la concentration de thrombine testée, il est possible que l'effet des LRT à T240 ne soit observable qu'en condition de stimulation plus importante. Lorsque les plaquettes ont été pré-incubées avec les LRT des patientes DT2 isolées à T0 ou T240 et stimulées par de faibles concentrations de collagène augmentant de 30% le TxB_2, seuls les LRT obtenus à T0 ont augmenté de manière significative la concentration de TxB_2 comparativement aux plaquettes stimulées avec le collagène (PTC : +28% et beurre : 31%). Une tendance à l'augmentation est toutefois observée pour les plaquettes pré-incubées avec les LRT isolées suite à la consommation de la PTC. L'utilisation de la thrombine comme agoniste entraîne une stimulation des plaquettes plus proche de celle observée dans des plaquettes agrégées. La pré-incubation des plaquettes avec les LRT à T0 et T240 des deux groupes a provoqué une augmentation de la concentration de TxB_2 comparativement aux plaquettes seules. Toutes les augmentations sont significatives, exceptée une tendance qui est observée pour les LRT à T0 du groupe PTC.

Il est important de rappeler que les plaquettes utilisées sont des plaquettes saines, et que les effets des LRT isolées à jeun et suite à un repas riche en MG pourraient potentiellement être plus importants et nécessiter une stimulation moins intense sur des plaquettes de patients DT2 considérées comme étant déjà hyperactives en basal. Enfin, il serait également pertinent de doser d'autres paramètres de l'activation plaquettaire en plus de la concentration de TxB_2, tels que l'expression de la P-sélectine et/ou la concentration de calcium intracellulaire, afin d'avoir une meilleur idée d'ensemble des mécanismes par lesquels les LRT de patientes DT2 à jeun et/ou en PP peuvent affecter l'activation plaquettaire. Il est important de mentionner que les études publiées sur les interactions entre lipoprotéines PP et plaquettes varient énormément entre elles, ce qui complexifient grandement la comparaison des résultats.

L'impact de la consommation de repas riches en certains AG sur des paramètres hémostatiques et de fonction plaquettaire a également été étudié et les résultats sont assez variables d'une étude à l'autre (Duttaroy 2005). Une étude de Tholstrup *et al*. a porté sur l'effet de l'ingestion de repas tests (1g de lipides/kg de poids corporel pendant 6 jours) riches en acide stéarique (18:0) ou en AG trans 18:1 sur le facteur VII de coagulation, impliqué dans la génération de

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

la thrombine, chez de jeunes hommes en santé. Ils ont montré que tous les repas tests provoquaient une augmentation du facteur VII en PP. De plus, comparativement aux autres diètes, la diète riche en MG saturée a causé une réponse plus faible du facteur VII entre 2 et 6h, par contre l'activation était toujours présente entre 6 et 8h en postprandial (Tholstrup et al. 2003). De même, Sanders *et al.* (Sanders et al. 2000) ont montré une réponse lipémique postprandiale diminuée et une moindre activation du facteur VII suite à la consommation de MG (90g) riches en acide stéarique comparativement à des MG riches en acide oléique. En comparaison, Mennen *et al.* ont testé la réponse des TG plasmatiques et du facteur VII suite à 4 petits déjeuners contenant 50% des calories provenant des MG, mais ayant des composition en AG différentes, dans un groupe de 91 femmes de 60 ans et plus. La composition en AG des petits déjeuners était la suivante : un riche en acide palmitique (16:0, 21,7 g), un riche en acide stéarique (18:0, 18,6 g), et deux riches en acides linoléique (18:2) et linolénique (18:3), l'un avec un ratio 3 :1 (12,5:3,9 g) et l'autre avec un ratio 15:1 (18,8:1,2 g). Ils ont montré que les 4 petits déjeuners augmentent l'activation du facteur VII en PP de manière similaire sans effet de la composition en AG comparativement au petit déjeuner contrôle (Mennen et al. 1998). Encore une fois, des différences majeures au niveau méthodologique de ce type d'étude rendent la comparaison des résultats très limitée. Ainsi, plusieurs facteurs peuvent expliquer les différences de résultats entres les études, par exemple la quantité d'acide stéarique qui était de 20 g pour l'étude de Mennen *et al*., de 36 g pour celle de Sanders *et al*. et de 30-38 g pour Tholstrup *et al*. De plus, la source de l'AG utilisée était différente; soit naturelle pour Tholstrup *et al*., synthétique pour Sanders *et al*. et inconnue pour Mennen *et al*. Un autre exemple est l'effet de la composition en AG de la diète sur le *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) qui est l'inhibiteur physiologique majeur des activateurs de plasminogènes dans la circulation, donc le principal inhibiteur de la fibrinolyse. Bien que plusieurs études aient montré que ce paramètre n'est pas affecté par des changements en PP (Hunter et al. 2001; Tholstrup et al. 1999), un groupe a montré une augmentation de l'expression de PAI-1 dans des cellules endothéliales par des AGI contenus dans des VLDL, mais sans effet par les AGS (Nilsson et al. 1998). Byberg *et al*. ont étudié une cohorte de 871 hommes âgés en moyenne de 71 ans et ayant un IMC moyen de 26,3 (16,7–46,3). Ils ont montré des associations positives entre l'activité du PAI-1 et la quantité de MG totale consommée, ainsi que la consommation d'AGMI et d'AGPI, mais aucune association avec la consommation d'AGS (Byberg et al. 2001). D'un autre côté, une étude sur 108 adolescents obèses séparés en tertiles de consommation d'AGS (faible, modéré et élevé) a démontré que la consommation d'AGS était un facteur prédicteur indépendant des concentrations de PAI-1 (Masquio et al. 2014).

En résumé, en termes d'effets des LRT PP sur l'activation et l'agrégation plaquettaire, nous n'avons pas observé d'effet différent selon le type de MG saturée consommée, malgré une

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

modification de la composition en AG des LRT en PP. Il serait fort possible qu'un seul repas avec une quantité modérée de MG ne soit pas suffisant pour provoquer un changement suffisamment marqué dans la composition des LRT pouvant impacter l'effet des LRT sur la fonctionnalité des plaquettes. Une intervention à plus long terme avec différentes quantités et sources de lipides pourrait induire des effets plus prononcés. Par exemple, l'étude de Delgado-Lista *et al*. sur un groupe de 20 sujets jeunes et en bonne santé, incluait une pré-période de 28 jours avec une diète contrôlée, suivi de 3 repas test avec une charge en lipides de 1 g/kg et de composition en AG différentes espacés entre eux par une période de retour à la normale (Delgado-Lista et al. 2008). Ils ont observé que la consommation d'un repas riche en MG provoque un état PP pro-thrombotique avec l'augmentation de l'activateur tissulaire du plasminogène, des d-dimères, qui sont un produit de la dégradation de la fibrine, et du TxB_2. Cet effet était toutefois indépendant du type de MG ingérée, mais semblait atténué suite à l'ingestion de MG riches en AGMI (huile d'olive) ou en oméga-3 (noix) comparativement à une MG saturée (beurre).

c. Composition en sphingolipides du plasma des patientes DT2 suite à la consommation d'un petit déjeuner riche en matières grasses de source différente

De plus en plus d'études s'intéressent à l'effet de la diète sur le métabolisme des SL et ont démontré que l'alimentation pouvait avoir un impact sur la composition en SL du plasma et de certains tissus. Dans notre étude, les concentrations plasmatiques en SL totaux, lysoSL et bases sphingoïdes n'ont pas été modifiées suite à la consommation du petit-déjeuner par les patientes DT2 comparativement aux concentrations à jeun. Il est probable que la quantité de lipides administrée ainsi que la durée de l'intervention n'aient pas été suffisantes pour modifier la composition plasmatique en SL. En effet, Meikle *et al*. ont comparé, chez 21 hommes sans anomalie du métabolisme lipidique, l'effet sur la composition en lipides plasmatiques de la consommation pendant 4-6 semaines d'un petit déjeuner contenant 54 g de lipides, à base de produits laitiers ou de soja . Des modifications des lipides plasmatiques pendant la période postprandiale et entre les 2 types de repas ont été observées. Concernant les classes de SL, les concentrations de dihydrocéramides et SM ont été significativement augmentées 4h après le petit déjeuner riche en produits laitiers comparativement aux concentrations à jeun. Les concentrations des Cer, SM et GM3 totaux ont été diminuées 1h après le petit déjeuner soja avant de revenir à des valeurs basales 4 h suite au repas (Meikle et al. 2015). Une étude sur 18 hommes et des femmes en santé visant à explorer la réduction du risque de DT2 associé à une diète riche en acide oléique comparativement à une diète riche en acide palmitique a comparé l'effet de ces deux diètes sur le profil lipidomique du

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

plasma et du muscle. En effet, le palmitate contribue à la synthèse des céramides, tandis que l'oléate inhiberait leur synthèse. Les résultats ont démontré que les concentrations sériques de Cer dans le sérum et le muscle étaient augmentées suite à la consommation de repas riches en palmitate pendant 3 semaines (Kien et al. 2013). De plus, chez les femmes ayant consommé les repas riches en palmitate, les AG étaient moins captés par le tissu musculaire mais davantage utilisés pour la production d'acylcarnitines et de Cer. Dans l'étude prospective PREDIMED, où 980 participants à haut risque cardiovasculaire (environ 50% de DT2) étaient randomisés soit à une diète méditerranéenne supplémentée avec de l'huile d'olive extra vierge soit avec des noix ou à une diète contrôle ont montré que les concentrations plasmatiques de Cer n'étaient pas différentes entre les 3 groupes après 1 an d'intervention nutritionnelle (Wang et al. 2017). L'étude multicentrique de Lankinen *et al* dans les pays nordiques montre qu'il est possible de modifier le profil lipidomique avec une intervention nutritionnelle. 156 volontaires ayant un syndrome métabolique ont été inclus et ont consommé pendant 18-24 semaines une diète nordique « santé » ou une diète nordique traditionnelle. La diète nordique « santé » était composée de céréales complètes, fruits et légumes, baies, huiles végétales et margarines, poisson, viande et produits laitiers faibles en MG, tandis que la diète nordique traditionnelle était à base de produits céréaliers pauvres en fibres, tartinades à base de MG laitière et produits laitiers entiers, peu de poisson, aucune restriction sur les MG dans les viandes, ainsi qu'une quantité limitée de fruits, légumes et baies. Suite à ces interventions nutritionnelles, les concentrations de 3 espèces de Cer (18 :1/22:0, 18 :1/23:0 et 18 :1/24:0) ont été diminuées dans le groupe diète santé après 12 semaines, alors que ces espèces étaient augmentées dans le groupe diète traditionnelle. Par contre, ces changements ne sont plus observés après 24 semaines d'intervention (Lankinen et al. 2015).

d. Composition en sphingolipides des lipoprotéines riches en triglycérides de patientes DT2 à jeun et suite à la consommation d'un petit déjeuner riche en matières grasses de source différente

Très peu d'études sont publiées sur les effets de l'alimentation sur le profil en SL des lipoprotéines comparativement aux SL du plasma. Dans le cadre du projet COMPLETE, nous avons effectué la sphingolipidomique des LRT postprandiales de manière assez approfondie, puisque nous avons quantifié 12 espèces moléculaires dans les Cer, SM et GM3 ainsi que la S1P, lysoSM, Spha et Spho. Suite à la consommation des 2 petits déjeuners, les concentrations en Cer et en SM totales (exprimées en µmol/L de plasma) sont augmentées dans les fractions LRT à T240 ainsi que les concentrations d'ApoB-48 plasmatique et des TG des LRT, suggérant que ces augmentations de SL pourraient être le reflet du nombre de particules lipoprotéiques plus élevé à T240. Cependant, les

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

concentrations de GM3 ne sont pas significativement différentes après la consommation du petit déjeuner, ce qui peut suggérer une déplétion en GM3 des particules qui maintiendrait les concentrations apparentes stables ou légèrement abaissées. Ces modifications des Cer et SM totaux ne seraient pas associées à un type de MG saturée ingérée, mais plutôt à la consommation d'une MG de type saturée en soi, puisque les deltas T240-T0 ne sont pas différents entre les deux groupes et la composition en SL des LRT en PP ne reflète pas le profil des espèces majoritaires dans les MG. Une modification de la composition lipidique de la surface des particules pourrait potentiellement impacter l'effet des LRT sur les fonctions plaquettaires, par exemple. Il est connu que des échanges dynamiques de lipides, particulièrement de PL, se produisent entre les lipoprotéines et les plaquettes (Ibrahim et al. 2006), ce qui soulève certaines questions : Est-ce que des échanges de SL entre les LRT et les plaquettes pourraient également se produire? Serait-il possible que des modifications de la composition de surface des LRT en certains lipides bioactifs, entres autres, puissent modifier leur interaction avec les plaquettes?

Au niveau des espèces moléculaires des céramides, de manière intéressante, les espèces 16:0 ainsi que certaines espèces à très longue chaîne (22:0, 24:0 et 24:1) de Cer sont augmentées à T240 dans les deux groupes et restent toujours plus élevées après ajustement pour la quantité de protéines totales, ce qui suggère un enrichissement de ces espèces dans les particules. A notre connaissance, une seule étude a recherché les effets d'un repas riche en AGS à base de crème fouettée (80% lipides, 10% glucides, 10% protéines) sur la composition des HDL à jeun et en phase postprandiale chez 16 volontaires sains. 6h après le repas comparativement aux valeurs basales à jeun, les HDL sont enrichies en Apo A-I, TG, phospholipides (16 espèces de phosphatidylcholines sur 25) ainsi que quelques espèces de SL (Cer22:0 et 24:0, lactosylcéramides et SM 14:0).

Récemment, une étude de Law *et al.* rapporte certains effets néfastes des Cer à très longues chaînes au niveau métabolique et cellulaire chez la souris. Une augmentation des Cer à très longue chaîne est observée dans les cardiomyocytes de souris C57bl6J placées sous diète riche en graisses pendant 18 semaines, et la surexpression de la céramide synthase 2 (qui permet la synthèse des Cer à très longue chaîne) provoque une dysfonction mitochondriale et l'apoptose des cellules (Law et al. 2018). Cependant, l'implication des Cer à très longues chaînes dans la résistance à l'insuline est encore controversée. Raichu *et al.* ont utilisé des souris céramides synthase 2 knockout hétérozygotes, ce qui provoque une diminution des Cer C24 combinée à une augmentation compensatoire des Cer 16:0. L'utilisation de la myriocine, un inhibiteur spécifique de la sérine-palmitoyl transférase, sur ces souris a causé une diminution des espèces de Cer et la disparition de la résistance à l'insuline, ce qui suggère que ce n'est pas la modification des C24 qui module la résistance à l'insuline, mais plutôt l'augmentation compensatoire des C16:0 (Raichur et al. 2014).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Chez l'Homme, une étude prospective incluant 12 cohortes d'individus (n=52 150) dont 14 422 étaient des patients DT2 provenant d'Islande, Taïwan, États-Unis, Europe, Finlande, Australie et France a montré que des concentrations plus élevées d'AGS à très longues chaînes (20:0, 22:0 et 24:0) sont associées à un risque plus faible de DT2. Cette association est particulièrement intéressante, puisque le taux de synthèse *de novo* des Cer est dépendant de la disponibilité des AGS à longues chaînes (Merrill 2002), ce qui peut supporter l'hypothèse de Raichur *et al*. concernant l'implication des Cer 16:0 dans l'insulino-résistance plutôt que les Cer à très longues chaînes. Nous observons une augmentation significative du Cer 16:0 suite à l'ingestion des deux types de MG saturées qui est toujours présente suite à l'ajustement pour la quantité de protéines totales, mais qui n'atteint plus la significativité et pour laquelle il est difficile d'extrapoler sur la possible implication au niveau métabolique.

Finalement, afin de mieux comprendre l'impact potentiel de la composition des LRT en SL dans un contexte de maladies métaboliques, il est pertinent de s'intéresser au métabolisme des SL au niveau intestinal. Il a été démontré que l'acide palmitique augmente la MTTP dans des cultures d'hépatocytes primaires (Konstantynowicz-Nowicka et al. 2015). Dans ce contexte, Iqbal *et al.* ont montré sur des cellules hépatiques Huh-7 qu'un inhibiteur de la MTTP inhibe la sécrétion de TG, Cer, PC et SM radiomarqués de 100, 90, 63 et 36% respectivement et que la présence de MTTP augmente le transfert entre des vésicules donneurs et receveurs de trioléine, Cer et SM radiomarqués. Ils suggèrent donc que la MTTP pourrait participer à la régulation des concentrations des Cer et des SM plasmatiques en permettant le transfert de ces lipides aux LRT dans les hépatocytes et les entérocytes, ce qui contribuerait à faciliter leur sécrétion (Iqbal et al. 2015).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

PARTIE 3 : Sphingolipidomique du plasma et des LRT des patientes DT2 comparativement à des volontaires saines

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

1.Résultats

a. Caractéristiques des patientes diabétiques de type 2 de COMPLETE et des volontaires saines de FiTABlé

Le **Tableau 16** présente les caractéristiques des patientes DT2 de COMPLETE comparativement aux volontaires saines (VS) du protocole FiTABlé. Les VS de l'étude FiTABlé ont un âge moyen de 29,7 ans et un IMC moyen dans la fourchette normale (23,2), significativement différents des patientes DT2. Leurs paramètres métaboliques à jeun confirment qu'elles ne présentent pas de désordres métaboliques comme un diabète ou une dyslipidémie. Les patientes DT2 présentent des valeurs basales de triglycéridémie, de cholestérol LDL et de glycémie à jeun supérieures comparativement aux sujets saines tandis que la valeur de cholestérol HDL n'est pas significativement différente entre les deux groupes.

Tableau 16: Caractéristiques cliniques et biologiques des volontaires saines de l'étude FiTABlé et des patientes DT2 de l'étude COMPLETE à T0

Caractéristiques	VS (n=6)	DT2 (n=30)	p
Age (années)	29,7 ± 1,7	65,5 ± 1,4	<0,0001
IMC (kg/m^2)	23,2 ± 0,9	34,1 ± 1,0	<0,0001
Durée du diabète	NA	12,9[b] ± 1,4	-
Homéostasie du glucose			
HbA_{1c} (%)	NA	7,8 ± 0,2	-
Glycémie (mmol/L)	4,6 ± 0,1	9,0 ± 0,7	<0,0001
Insuline (mU/L)	NA	12,3[a] ± 1,3	-
HOMA-IR	NA	5,0[a] ± 0.7	-
Lipides plasmatiques (mmol/L)			
Triglycérides	0,60 ± 0,1	1,69 ± 0,1	<0,0001
Cholestérol total	3,4 ± 0,6	4,55 ± 0,2	0,02
Cholestérol HDL	1,1 ± 0,3	1,24 ± 0,1	NS
Cholestérol LDL	1,4 ± 0,3	2,56 ± 0,1	0,002

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

b. Composition en sphingolipides, lysoSM et bases sphingoïdes du plasma de patientes diabétiques de type 2 et de volontaires saines

Nous avons eu l'opportunité d'utiliser les plasmas obtenus des VS du protocole FiTABlé afin de comparer les compositions en SL du plasma des patientes DT2 de COMPLETE avec celles de contrôles. La **Figure 26** présente les concentrations de Cer, SM et GM3 totaux (**Figure 26A**), S1P, lysoSM, Spha et Spho (**Figure 26B**) du plasma des VS et des DT2 à jeun. Chez les patientes DT2, les concentrations de Cer et de GM3 sont plus élevées que celles des VS tandis que la concentration de SM est similaire entre les deux groupes. La concentration de lysoSM est diminuée chez les DT2 comparativement aux VS alors que les concentrations en bases sphingoïdes sont similaires.

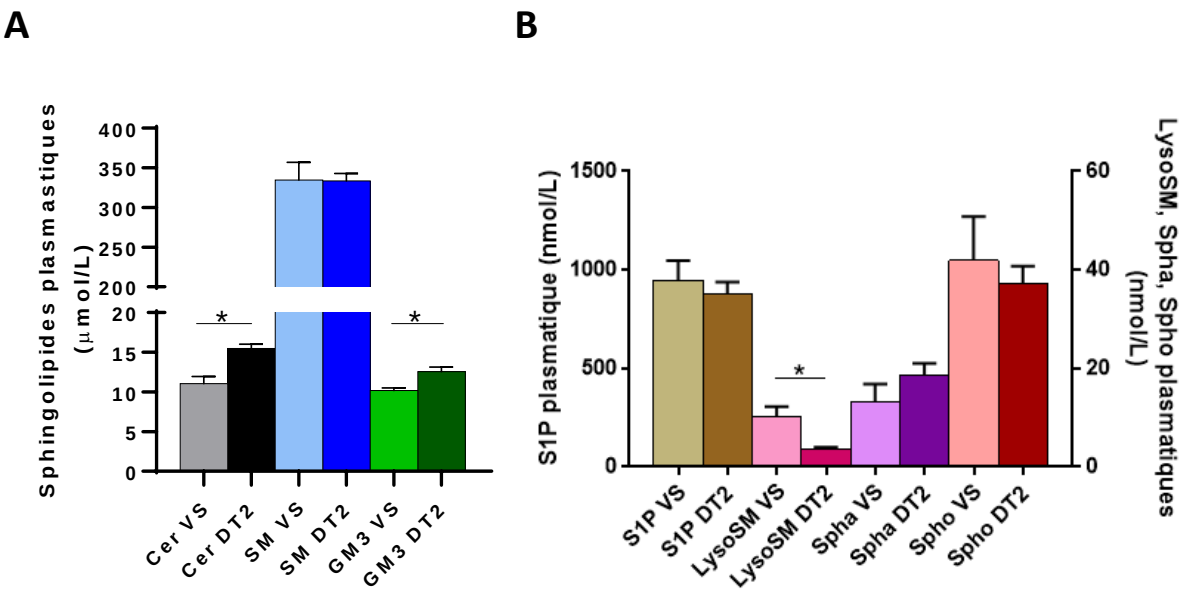


Figure 26: Concentrations plasmatiques de sphingolipides, lysosphingomyéline et bases sphingoïdes chez les patientes DT2 et les volontaires saines
*Les résultats sont les moyennes ± SEM. *p≤0,05, n=30 patientes DT2 et n=6 VS. Cer : céramides, SM : sphingomyélines, GM3 : gangliosides GM3, S1P : sphingosine-1-phosphate, lysoSM : lyso sphingomyléine, Spha : sphinganine, Spho : sphingosine.*

La **Figure 27** présente le détail des espèces moléculaires de chaque classe de SL des patientes DT2 comparativement aux VS. Pour les Cer, la majorité des espèces de 20 carbones et moins sont légèrement diminuées dans le plasma des DT2, tandis que les espèces à très longues chaînes de plus de 22 carbones (excepté le Cer22:1 et Cer26:1) sont augmentées, particulièrement le Cer24:0. Malgré que le total des SM ne soit pas différent entre les DT2 et les VS, les espèces à longues chaînes insaturées à 16 et 18 carbones sont significativement augmentées pour les DT2. Pour les GM3, les espèces saturées de 18, 20, 22 et 24 carbones sont plus élevées dans le plasma des DT2.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

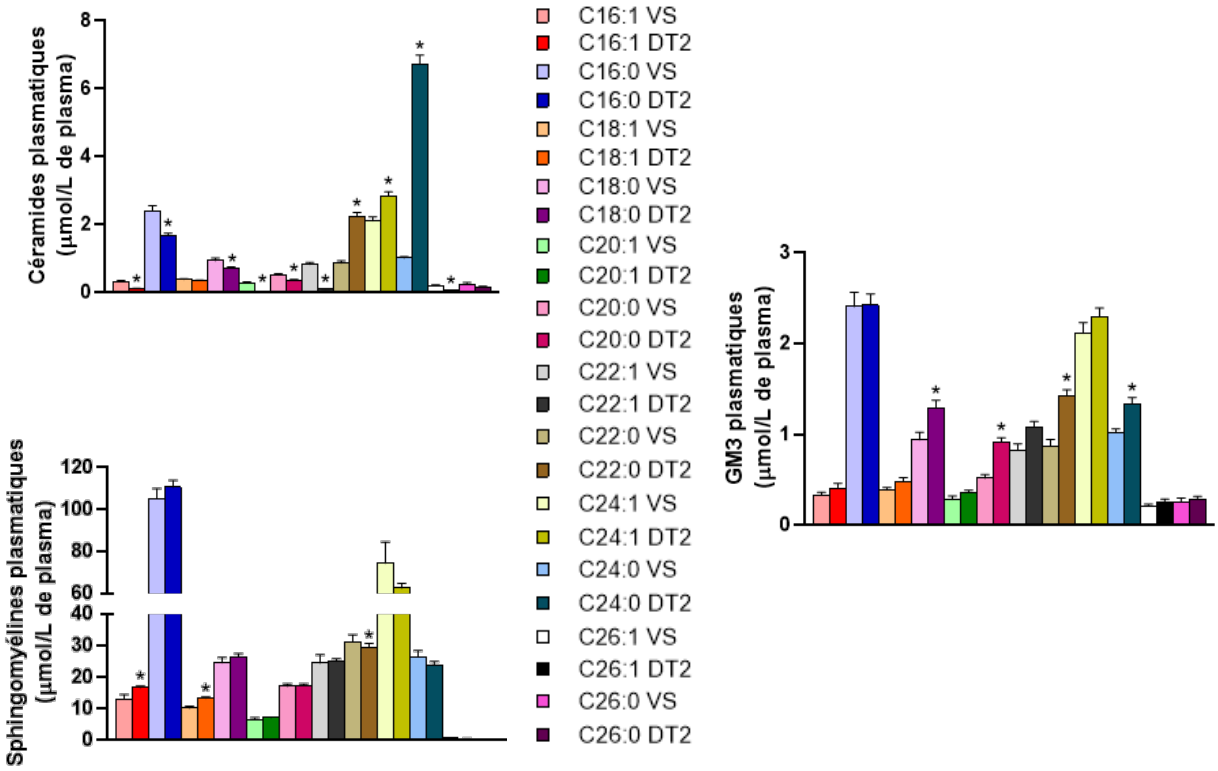


Figure 27: Concentrations des espèces moléculaires des céramides, sphingomyélines et GM3 plasmatiques des patientes diabétiques de type 2 et des volontaires saines
*Les résultats sont les moyennes ± SEM. *p≤0,05, n=30 patientes DT2 et n=6 VS.*

c. Composition en sphingolipides, lysoSM et bases sphingoïdes des LRT de patientes diabétiques de type 2 et de volontaires saines

La **Figure 28** présente la composition en SL totaux (**A**), lysoSM et bases sphingoïdes (**B**) des LRT isolées chez les VS de l'étude FiTABlé et les patientes DT2 de COMPLETE à jeun. Lorsque les résultats sont exprimés en µmol/L de plasma, les concentrations en SM et en GM3 totaux des LRT de patientes DT2 sont significativement augmentées comparativement aux concentrations des VS. Ces augmentations sont toujours présentes après ajustement des valeurs pour la concentration de protéines totales, mais ne sont plus significatives. Pour le lysoSM et les bases, les concentrations de S1P et de lysoSM sont significativement plus élevées dans les LRT des patientes DT2 comparativement aux VS lorsqu'elles sont exprimées en nmol/L de plasma, mais l'augmentation de lysoSM n'est plus significative après ajustement pour la concentration de protéines totales.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

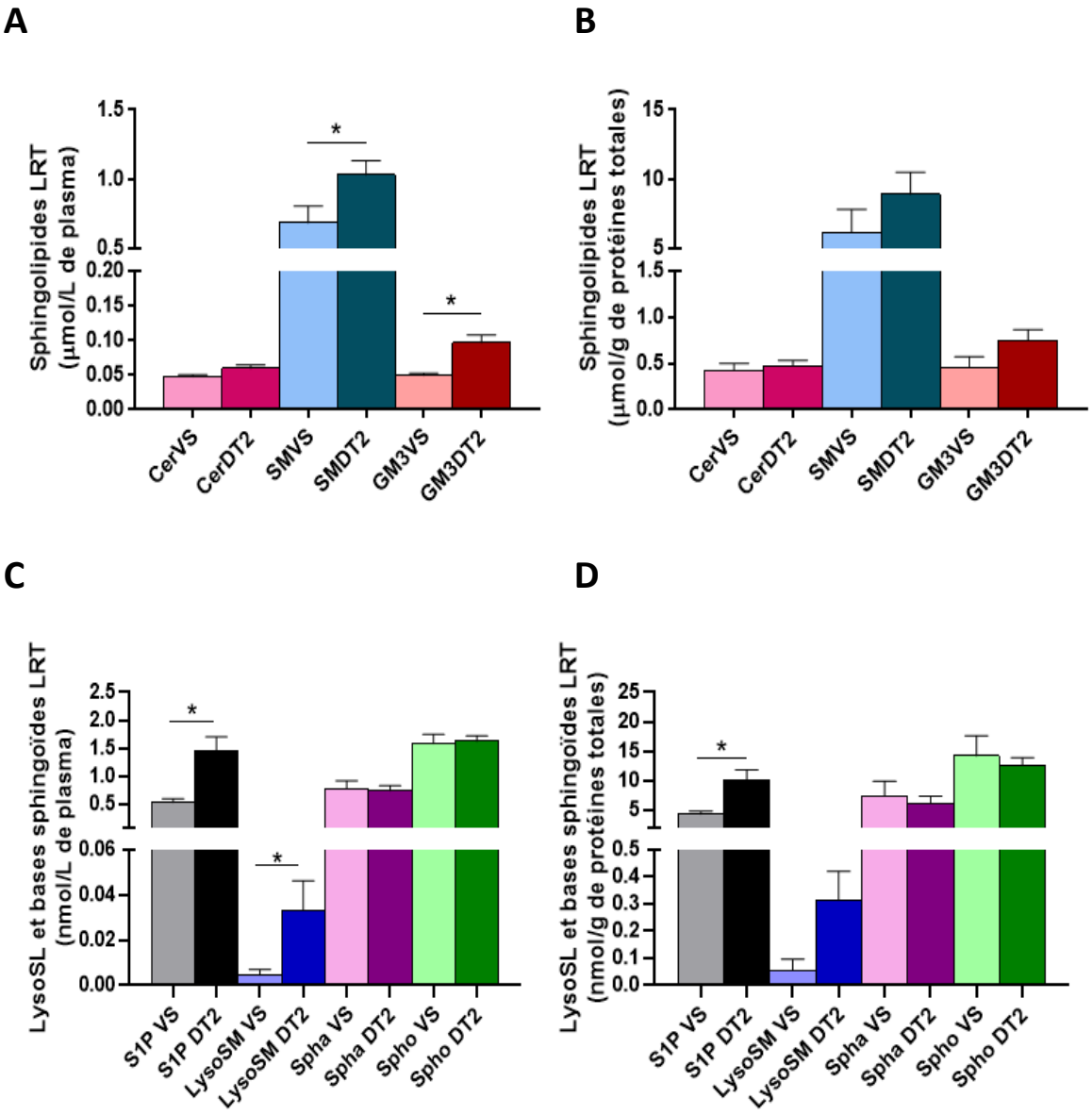


Figure 28: Concentrations de sphingolipides, lysosphingomyéline et bases sphingoïdes dans les LRT des patientes DT2 et des volontaires saines

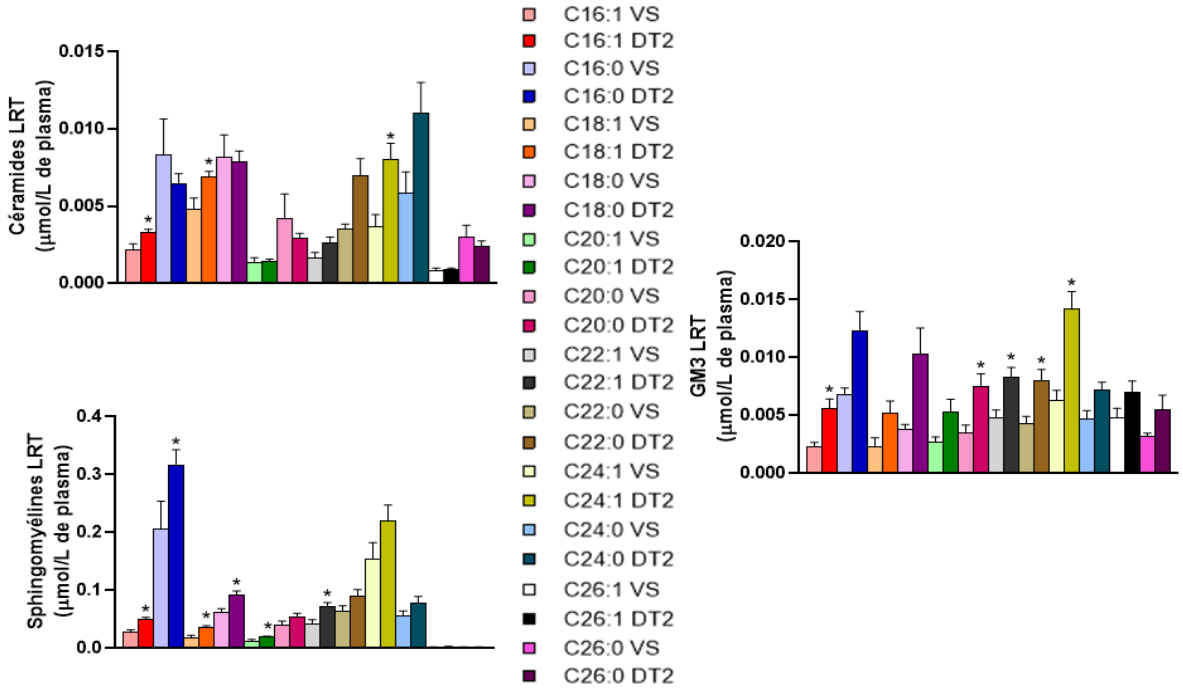
*Les résultats, exprimés en µ(n)mol/L de plasma (A et C) ou en µ(n)moles/g de protéines totales (C et D), sont les moyennes ± SEM. *p≤0,05, n=30 patientes DT2 et n=6 VS. Cer : céramides, SM : sphingomyélines, GM3 : gangliosides GM3, S1P : sphingosine-1-phosphate, lysoSM : lyso sphingomyléine, Spha : sphinganine, Spho : sphingosine.*

Le détail des espèces moléculaires de chaque classe de SL contenue dans les LRT des patientes DT2 comparativement aux VS est présenté dans la **Figure 29**. Lorsque les résultats sont exprimés en µmol/L de plasma, les Cer16:1, Cer18:1 et Cer24:1 sont significativement augmentées dans les LRT de DT2, malgré que la différence entre les concentrations totales de Cer ne soit pas significative. Les espèces à longues chaînes de SM sont toutes augmentées pour les DT2, excepté le SM20:0, ainsi que le SM22:1. De plus, le SM16:0 est l'espèce majoritaire autant pour les DT2 que pour les VS. Pour les GM3, toutes les espèces sont plus élevées chez les DT2, mais celles pour

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

lesquelles les augmentations sont significatives sont les 16:1, 20:0, 22:1, 22:0 et 24:1. Les différences ne sont plus significatives lorsque les résultats sont ajustés pour la concentration de protéines totales.

A



B

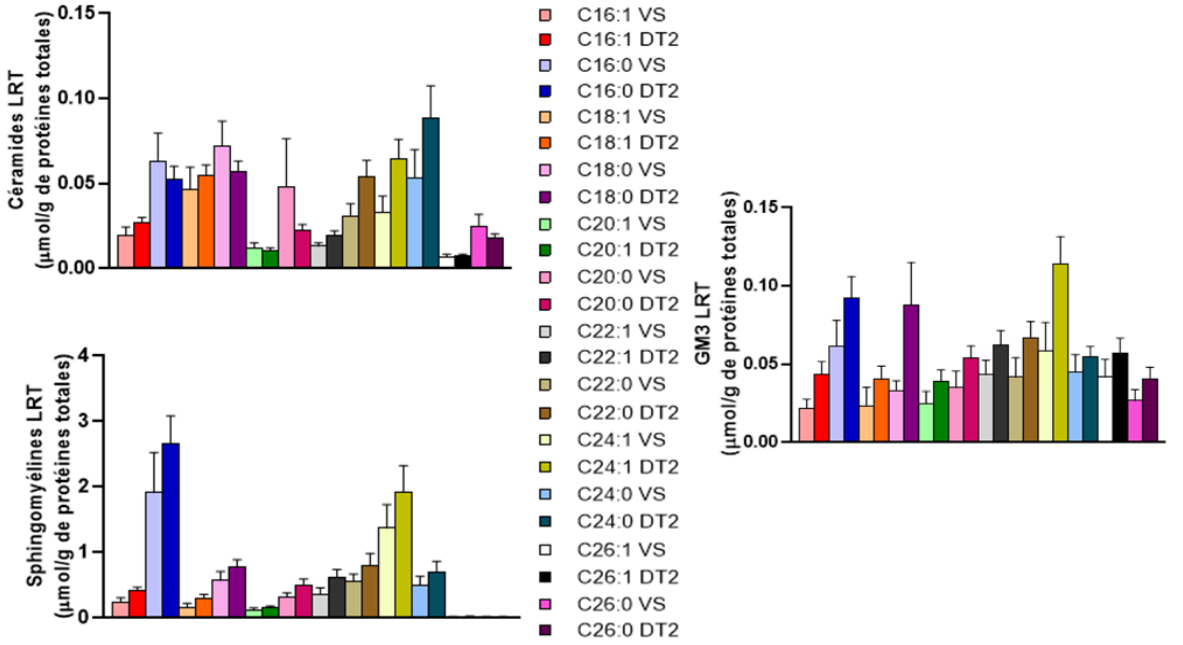


Figure 29: Concentrations des espèces moléculaires des céramides, sphingomyélines et GM3 dans les LRT des patientes diabétiques de type 2 et des volontaires saines
*Les résultats sont les moyennes ± SEM. *p≤0,05, n=30 patientes DT2 et n=6 VS.*

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

2.DISCUSSION

a. Composition en sphingolipides, lysoSM et bases sphingoïdes du plasma de patientes diabétiques de type 2 et de volontaires saines

Le développement de la lipidomique et des techniques de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) a permis d'analyser des milliers d'espèces lipidiques. Certaines espèces de sphingolipides seraient associées aux événements cardiovasculaires associés au DT2, indépendamment des autres facteurs de risque et à la résistance à l'insuline.

D'abord, à des fins de validation de nos résultats avec ce qui est rapporté dans la littérature, nous avons comparé les concentrations plasmatiques à jeun des Cer, SM et GM3 ainsi que de la S1P, la lysoSM, la Spha et la Spho des patientes de COMPLETE avec celles de 6 femmes en bonne santé incluses dans l'étude Fitablé. Nous observons une augmentation des Cer et des GM3, ce qui concorde avec les données actuelles (Lipina and Hundal 2015; Haus et al. 2009; Lopez et al. 2013) et une concentration de SM inchangée chez les patientes DT2. Alors que certaines études rapportent une diminution des SM plasmatiques chez des patients DT2 (Xu et al. 2013; Sui et al. 2019), comparativement à des volontaires non-diabétiques, une étude montre une augmentation des SM plasmatiques dans un groupe de patients DT2 non médicamentées comparativement à des contrôles sains (Shui et al. 2013). Dans cette même étude, il n'y avait pas de différence entre les concentrations de SM totales entre un groupe de DT2 sous médication hypoglycémiante comparativement aux contrôles (Shui et al. 2013). En général, la concentration de SM plasmatique est plutôt associée au développement de l'athérosclérose et a été identifiée comme un facteur de risque indépendant de maladie coronarienne (Nelson et al. 2006).

Au niveau des espèces moléculaires du plasma de chaque classe de SL, il est possible de constater que la concentration de la majorité des espèces de Cer varie beaucoup entre les DT2 et les VS. Haus *et al.* ont quantifié certaines espèces de Cer (18:1, 18:0, 20:0, 24:1, et 24:0) dans le plasma de 13 patients DT2 obèses et de 14 contrôles sains. Ils ont déterminé que les espèces majoritaires de Cer dans le plasma sont les Cer24:1 et 24:0, ce qui concorde avec nos résultats et ceux d'autres groupes (Ichi et al. 2006; Drobnik et al. 2003). Ils ont observé une augmentation significative de la concentration totale de Cer plasmatiques chez les DT2, de même que pour les espèces Cer18:0, 20:0 et 24:1. La concentration de l'espèce C24:0 est également plus élevée dans le plasma des DT2, mais la différence n'est pas significative. Chez les DT2, nous observons plutôt une diminution des espèces Cer18:0 et 20:0 qui sont plutôt minoritaires comparativement aux espèces C24:1 et C24:0, donc potentiellement plus difficiles à quantifier. Cette étude rapporte également une corrélation négative entre la sensibilité à l'insuline et la concentration plasmatique de Cer totaux et des espèces Cer18:0,

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

20:0, 24:1 et 24:0 (Haus et al. 2009). De plus, dans des cellules INS-1 β (lignée dérivée de cellules bêta sécrétrices d'insuline) exposées à un état de glucolipotoxicité, la formation d'espèces de dihydroCer 18 :0, 22 :0 et 24 :1, qui sont des précurseurs des Cer, étaient augmentée (Veret et al. 2011).

Au niveau des GM3, il est intéressant d'observer que ce sont seulement les concentrations d'espèces saturées (18:0, 20:0, 22:0, 24:0) qui sont significativement plus élevées dans le plasma des patientes DT2. Ces résultats se rapprochent de ceux de Shui *et al.* qui ont quantifié les mêmes espèces de GM3 dans le plasma de patients DT2 et de contrôles, mais qui ont séparé certaines espèces selon la base sphingoïde (Spha (18:0) ou Spho (18:1)) et également séparé les patients DT2 en 3 groupes selon le traitement. Pour le groupe de DT2 sous médication hypoglycémiante sans insuline (comparable à notre groupe de patientes DT2), des augmentations significatives des espèces saturées de 18-24 carbones, ainsi que des espèces 18:1, 20:1 et une diminution des 22:1 et 24:1 ont été observées. De plus, les concentrations des espèces de GM3 18:1/20:0, 18:1/22:1, 18:1/24:0 et 18:0/24:0 sont positivement corrélées avec le taux de glucose à jeun et corrélées négativement avec l'indicateur HOMA de fonction des cellules bêta (HOMA2-%β) (Shui et al. 2013).

Pour ce qui est des lysoSL et des bases sphingoïdes, seule la concentration de lysoSM se retrouve diminuée dans le plasma des patientes DT2 comparativement aux VS. Il est rapporté que la lysoSM est surtout associée aux HDL en circulation ('The LIPID MAPS® Lipidomics Gateway') et les individus DT2 présentent fréquemment des taux diminués d'HDL-cholestérol ainsi qu'une diminution de la taille de ces particules. De plus, il est possible de stipuler que le métabolisme des SL est perturbé en contexte de DT2 et qu'un surplus potentiel de SM puisse être hydrolysé pour la formation de Cer et de GM3, ce qui maintiendrait des concentrations de SM relativement stables, mais causerait l'augmentation des Cer et des GM3 observée. Cette hypothèse peut être supportée par l'étude de Górska *et al*. qui ont observé une augmentation de l'activité de la sphingomyélinase sécrétoire dépendante au Zn^{2+} , qui hydrolyse la SM en Cer et en phosphocholine, dans le sérum de patients DT2 (Gorska, Baranczuk, and Dobrzyn 2003).

b. Composition en sphingolipides, lysoSM et bases sphingoïdes des LRT de patientes diabétiques de type 2 et de volontaires saines

A notre connaissance, la comparaison de la composition en SL totaux, lysoSL et bases sphingoïdes de LRT de patientes DT2 et de VS n'a jamais été publiée jusqu'à maintenant. Les LRT de DT2 possèdent des concentrations en SM et GM3 totaux augmentées comparativement aux volontaires saines, de même qu'en S1P et lysoSM, malgré la perte de significativité des différences pour certaines classes après ajustement pour la concentration de protéines totales. Tel que mentionné précédemment, des études ont observé des associations entre la SM plasmatique et le

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

développement de l'athérosclérose, tandis que le GM3 a été rapporté comme étant associé à la résistance à l'insuline.

Le détail des espèces de chaque classe de SL contenue dans les LRT à T0 des patientes DT2 et des VS montre une augmentation significative ou non de toutes les espèces de SM et de GM3 dans les LRT de DT2, tandis que le profil des espèces est plus disparate pour les Cer. En raison de leur rôle de molécules bioactives, des modifications de la composition en espèces de SL des lipoprotéines pourraient entraîner des changements au niveau de l'activation de certaines voies de signalisation dans les cellules. Dans des travaux très récents, Hammad *et al.* ont exposé des podocytes (cellules épithéliales du glomérule rénal) à des LDL et des HDL2 et 3 enrichies en Cer16:0 et ont ensuite effectué une analyse du transcriptome des cellules par séquençage de l'ARN. Ils ont observé que plusieurs voies de signalisation cellulaires, telles que la voie des jonctions d'adhérences, des SL, de l'insuline, de mTOR et de du TNF, étaient surtout affectées par les LDL enrichies en Cer16:0 comparativement aux HDL2 et 3 enrichies et en correspondance avec leur contrôle respectif (particules natives) (Hammad et al. 2020).

En ce qui concerne la S1P, les données actuelles sont plus mitigées, puisqu'il semble que sa concentration plasmatique chez les individus DT2 puisse être influencée par l'obésité, particulièrement au niveau viscéral (Tanaka, Kanazawa, and Sugimoto 2018) et la présence de maladie coronarienne (Zeng et al. 2018). La S1P aurait des effets divergents sur le développement de l'insulino-résistance en fonction du tissu (foie, muscle squelettique, pancréas) (Fayyaz, Japtok, and Kleuser 2014). De plus, il a été démontré que des plaquettes exposées à de la S1P extracellulaire changent de forme et s'agrègent (Yatomi et al. 1997). Nous observons une augmentation de la concentration de S1P dans les LRT de patientes DT2 comparativement au VS. Cependant, la majorité de la S1P en circulation est liée à l'albumine et aux HDL, qui ont plutôt un effet anti-agrégant. Finalement, très peu d'informations sont disponibles sur la lysoSM, mis à part un rôle potentiel dans la régulation du tonus vasculaire (vasoconstriction et vasodilatation) et la pression sanguine (Ross et al. 2014). Puisque les SL sont majoritairement transportés par les lipoprotéines en circulation, il semble essentiel de mieux comprendre les impacts potentiels d'une modification de leur composition au niveau des mécanismes impliqués dans physiopathologie des maladies métaboliques.

De manière générale, il est intéressant de constater que les LRT de patientes DT2 pourraient être enrichies en certaines classes de SL (SM, lysoSM, et S1P) ayant des implications dans le développement de la résistance à l'insuline, l'athérosclérose et autres complications cardiovasculaires. Toutefois, les résultats concernant la sphingolipidomique du plasma et des LRT des patientes DT2 comparativement aux VS doivent être interprétés avec retenue considérant le peu de patientes contrôles dans le groupe VS.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

La première partie de mes travaux de thèse a permis de montrer que des particules larges, de très faible densité et enrichies en TG sont présentes dans la circulation de patients DT2 à jeun. De plus, ces LRT augmentent la concentration de TxB_2, un marqueur biochimique d'activation plaquettaire, et l'agrégation de plaquettes saines en activant la voie de signalisation de l'acide arachidonique. Afin de détailler davantage les mécanismes, il serait intéressant d'identifier le ou les récepteurs impliqués, de même que possiblement d'autres voies de signalisation plaquettaires. Il serait également pertinent de faire des expériences similaires en utilisant des plaquettes hyperactives de patients DT2 afin de voir si leur agrégation serait également stimulée par les LRT.

Ensuite, la mise en place du protocole COMPLETE a permis de générer des résultats très originaux sur la composition lipidique détaillée des LRT de patients DT2 à jeun et suite à un petit déjeuner contenant une quantité réaliste de MG de source laitière ou végétale, ainsi que sur l'effet de ces particules sur des plaquettes saines. D'abord, une quantité de 20g de lipides (41% des calories totales) est suffisante pour augmenter de manière significative les paramètres PP (apoB48, TG) du plasma et des particules et pour modifier la composition en AG des LRT PP reflétant la composition en AG de la MG ingérée. Ensuite, les LRT présentes en basal et suite au petit déjeuner stimulent l'activation et l'agrégation plaquettaire de manière similaire indépendamment de la source de MG ingérée. Ces résultats soulignent l'importance de mettre en place des stratégies afin de diminuer les remnants de LRT dans cette population, qui sont présents en basal, mais également de fournir des recommandations nutritionnelles concernant les apports en MG, afin de prévenir les réponses lipémiques trop importantes en PP. L'intervention nutritionnelle en aigüe n'a pas modifié la composition en SL du plasma, mais des changements modérés ont été observés au niveau des LRT, ce qui laisse croire qu'un repas plus riche en MG pourrait produire une modification de composition en SL plus notable. Certes, les SL constituent une proportion de lipides mineurs dans les LRT, par contre, la fonction de lipide bioactif de certaines classes et molécules leur confère un potentiel intéressant en termes de prévention des maladies métaboliques et des complications associées. Dans le but de mieux comprendre l'impact de la composition en SL des LRT sur leur interaction avec les plaquettes, il serait possible de mettre au point des expériences d'enrichissement *in vitro* des LRT, et des autres classes de lipoprotéines, en SL d'intérêt. De plus, nous prévoyons de faire la phospholipidomique des LRT des patientes de l'étude COMPLETE à T0 et T240, puisque ces lipides sont également d'intérêt et certaines molécules et processus de leur métabolisme sont communs au métabolisme des SL.

En conclusion, les résultats du protocole COMPLETE sont exploratoires et originales, puisque l'étude a été réalisée en aigüe et à notre connaissance aucune étude n'a testé l'effet de LRT de patientes DT2 à jeun et suite à un repas contenant une MG de source différente en quantité réaliste et contenue dans des produits de consommation courante. De plus, la composition

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

sphingolipidomique des LRT présentes à jeun et sécrétées en PP chez des DT2 n'avait également pas été déterminée. Les conclusions de l'étude COMPLETE offrent donc plusieurs pistes d'exploration au niveau de l'importance d'étudier la lipidomique des lipoprotéines dans un contexte de maladie métabolique tel que le DT2, de même que l'interaction de ces particules avec les autres composants du sang (plaquettes, globules rouges, macrophages, par exemple) et leur possible implication dans les complications cardiovasculaires associées au DT2.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Abumrad, N. A., M. R. el-Maghrabi, E. Z. Amri, E. Lopez, and P. A. Grimaldi. 1993. 'Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36', *J Biol Chem*, 268: 17665-8.

Adiels, M., J. Boren, M. J. Caslake, P. Stewart, A. Soro, J. Westerbacka, B. Wennberg, S. O. Olofsson, C. Packard, and M. R. Taskinen. 2005. 'Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 1697-703.

Adiels, M., M. R. Taskinen, E. Bjornson, L. Andersson, N. Matikainen, S. Soderlund, J. Kahri, A. Hakkarainen, N. Lundbom, C. Sihlbom, A. Thorsell, H. Zhou, K. H. Pietilainen, C. Packard, and J. Boren. 2019. 'Role of apolipoprotein C-III overproduction in diabetic dyslipidaemia', *Diabetes Obes Metab*, 21: 1861-70.

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. 2019. 'Les lipides', Accessed 30 janvier. https://www.anses.fr/fr/content/les-lipides.

Al-Salameh, Abdallah, Philippe Chanson, Sophie Bucher, Virginie Ringa, and Laurent Becquemont. 2019. 'Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes: A Review of Sex-Related Differences in Predisposition and Prevention', *Mayo Clinic Proceedings*, 94: 287-308.

Ana Jonas, Michael C. Phillips. 2008. 'Lipoprotein structure.' in Jean E. Vance Dennis E. Vance (ed.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Fifth Edition)* (Elsevier).

Anant, S., and N. O. Davidson. 2001. 'Molecular mechanisms of apolipoprotein B mRNA editing', *Curr Opin Lipidol*, 12: 159-65.

Annuzzi, G., C. De Natale, C. Iovine, L. Patti, L. Di Marino, S. Coppola, S. Del Prato, G. Riccardi, and A. A. Rivellese. 2004. 'Insulin resistance is independently associated with postprandial alterations of triglyceride-rich lipoproteins in type 2 diabetes mellitus', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24: 2397-402.

Aridor, M., and W. E. Balch. 2000. 'Kinase signaling initiates coat complex II (COPII) recruitment and export from the mammalian endoplasmic reticulum', *J Biol Chem*, 275: 35673-6.

Arimoto, I., H. Saito, Y. Kawashima, K. Miyajima, and T. Handa. 1998. 'Effects of sphingomyelin and cholesterol on lipoprotein lipase-mediated lipolysis in lipid emulsions', *J Lipid Res*, 39: 143-51.

Arimoto, Itaru, Chizuko Matsumoto, Masafumi Tanaka, Keiichirou Okuhira, Hiroyuki Saito, and Tetsurou Handa. 1998. 'Surface composition regulates clearance from plasma and triolein lipolysis of lipid emulsions', *Lipids*, 33: 773-79.

Asch, A. S., J. Barnwell, R. L. Silverstein, and R. L. Nachman. 1987. 'Isolation of the thrombospondin membrane receptor', *J Clin Invest*, 79: 1054-61.

Assert, R., G. Scherk, A. Bumbure, V. Pirags, H. Schatz, and A. F. Pfeiffer. 2001. 'Regulation of protein kinase C by short term hyperglycaemia in human platelets in vivo and in vitro', *Diabetologia*, 44: 188-95.

Assinger, Alice, Franz Koller, Werner Schmid, Maria Zellner, Rita Babeluk, Elisabeth Koller, and Ivo Volf. 2010. 'Specific binding of hypochlorite-oxidized HDL to platelet CD36 triggers proinflammatory and procoagulant effects', *Atherosclerosis*, 212: 153-60.

Astudillo, L., F. Sabourdy, N. Therville, H. Bode, B. Segui, N. Andrieu-Abadie, T. Hornemann, and T. Levade. 2015. 'Human genetic disorders of sphingolipid biosynthesis', *J Inherit Metab Dis*, 38: 65-76.

Aviram, M., and J. G. Brook. 1987. 'Platelet activation by plasma lipoproteins', *Prog Cardiovasc Dis*, 30: 61-72.

Aviram, M., B. Fuhrman, and J. G. Brook. 1986. 'Postprandial plasma lipoproteins in normal and hypertriglyceridaemic subjects and their in vitro effect on platelet activity: differences between saturated and polyunsaturated fats', *Scand J Clin Lab Invest*, 46: 571-9.

Bakogianni, M. C., C. A. Kalofoutis, K. I. Skenderi, and A. T. Kalofoutis. 2001. 'Clinical evaluation of plasma high-density lipoprotein subfractions (HDL2, HDL3) in non-insulin-dependent diabetics with coronary artery disease', *J Diabetes Complications*, 15: 265-9.

Bamberger, M. J., and M. D. Lane. 1990. 'Possible role of the Golgi apparatus in the assembly of very low density lipoprotein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 2390-94.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Bansal, S., J. E. Buring, N. Rifai, S. Mora, F. M. Sacks, and P. M. Ridker. 2007. 'Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women', *JAMA*, 298: 309-16.

Behnke, O., and A. Forer. 1998. 'From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream', *Eur J Haematol Suppl*, 61: 3-23.

Beitz, A., N. A. Nikitina, C. Giessler, J. Beitz, V. P. Masaev, N. A. Perova, and H. J. Mest. 1990. 'Modulation of TXA2 generation of platelets by human lipoproteins', *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 40: 57-61.

Bergeron, Nathalie, and Richard J. Havel. 1995. 'Influence of Diets Rich in Saturated and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids on the Postprandial Responses of Apolipoproteins B-48, B-100, E, and Lipids in Triglyceride-Rich Lipoproteins', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15: 2111-21.

Bergman, M., L. I. Gidez, and H. A. Eder. 1986. 'High-density lipoprotein subclasses in diabetes', *Am J Med*, 81: 488-92.

Berr, F. 1992. 'Characterization of chylomicron remnant clearance by retinyl palmitate label in normal humans', *J Lipid Res*, 33: 915-30.

Berriot-Varoqueaux, N., A. H. Dannoura, A. Moreau, N. Verthier, A. Sassolas, G. Cadiot, A. Lachaux, A. Munck, J. Schmitz, L. P. Aggerbeck, and M. E. Samson-Bouma. 2001. 'Apolipoprotein B48 glycosylation in abetalipoproteinemia and Anderson's disease', *Gastroenterology*, 121: 1101-8.

Berry, S. E. 2009. 'Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease', *Nutr Res Rev*, 22: 3-17.

Berry, S. E., R. Woodward, C. Yeoh, G. J. Miller, and T. A. Sanders. 2007. 'Effect of interesterification of palmitic acid-rich triacylglycerol on postprandial lipid and factor VII response', *Lipids*, 42: 315-23.

Berry, Sarah E. E., and Thomas A. B. Sanders. 2007. 'Influence of triacylglycerol structure of stearic acid-rich fats on postprandial lipaemia', *Proceedings of the Nutrition Society*, 64: 205-12.

Berry, Sarah EE, George J Miller, and Thomas AB Sanders. 2007. 'The solid fat content of stearic acid–rich fats determines their postprandial effects', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85: 1486-94.

Bertea, Mariana, Markus F. Rütti, Alaa Othman, Jaqueline Marti-Jaun, Martin Hersberger, Arnold von Eckardstein, and Thorsten Hornemann. 2010. 'Deoxysphingoid bases as plasma markers in Diabetes mellitus', *Lipids in Health and Disease*, 9: 84.

Bittman, Robert, Chandraprakash Reddy Kasireddy, Peter Mattjus, and J. Peter Slotte. 1994. 'Interaction of Cholesterol with Sphingomyelin in Monolayers and Vesicles', *Biochemistry*, 33: 11776-81.

Bjorkegren, J., F. Karpe, R. W. Milne, and A. Hamsten. 1998. 'Differences in apolipoprotein and lipid composition between human chylomicron remnants and very low density lipoproteins isolated from fasting and postprandial plasma', *J Lipid Res*, 39: 1412-20.

Boon, J., A. J. Hoy, R. Stark, R. D. Brown, R. C. Meex, D. C. Henstridge, S. Schenk, P. J. Meikle, J. F. Horowitz, B. A. Kingwell, C. R. Bruce, and M. J. Watt. 2013. 'Ceramides contained in LDL are elevated in type 2 diabetes and promote inflammation and skeletal muscle insulin resistance', *Diabetes*, 62: 401-10.

Boren, J., and K. J. Williams. 2016. 'The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity', *Curr Opin Lipidol*, 27: 473-83.

Born, G. V. 1962. 'Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal', *Nature*, 194: 927-9.

Borsch-Haubold, A. G., F. Ghomashchi, S. Pasquet, M. Goedert, P. Cohen, M. H. Gelb, and S. P. Watson. 1999. 'Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in platelets is mediated by multiple stress-activated protein kinase pathways', *Eur J Biochem*, 265: 195-203.

Boslem, Ebru, Peter J. Meikle, and Trevor J. Biden. 2012. 'Roles of ceramide and sphingolipids in pancreatic β-cell function and dysfunction', *Islets*, 4: 177-87.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Bozzetto, L., G. Annuzzi, G. D. Corte, L. Patti, P. Cipriano, A. Mangione, G. Riccardi, and A. A. Rivellese. 2011. 'Ezetimibe beneficially influences fasting and postprandial triglyceride-rich lipoproteins in type 2 diabetes', *Atherosclerosis*, 217: 142-8.

Brass, L. F., C. C. Shaller, and E. J. Belmonte. 1987. 'Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C mediated by platelet thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin', *J Clin Invest*, 79: 1269-75.

Braun, J. E., and D. L. Severson. 1992. 'Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase', *Biochem J*, 287 (Pt 2): 337-47.

Brinck, Jonas W., Aurélien Thomas, Estelle Lauer, François R. Jornayvaz, Marie-Claude Brulhart-Meynet, Jean-Christophe Prost, Zoltan Pataky, Patrik Löfgren, Johan Hoffstedt, Mats Eriksson, Camilla Pramfalk, Sandrine Morel, Brenda R. Kwak, Miranda van Eck, Richard W. James, and Miguel A. Frias. 2016. 'Diabetes Mellitus Is Associated With Reduced High-Density Lipoprotein Sphingosine-1-Phosphate Content and Impaired High-Density Lipoprotein Cardiac Cell Protection', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36: 817-24.

Brodde, M. F., S. J. Korporaal, G. Herminghaus, M. Fobker, T. J. Van Berkel, U. J. Tietge, H. Robenek, M. Van Eck, B. E. Kehrel, and J. R. Nofer. 2011. 'Native high-density lipoproteins inhibit platelet activation via scavenger receptor BI: role of negatively charged phospholipids', *Atherosclerosis*, 215: 374-82.

Bröijersén, Anders, Fredrik Karpe, Anders Hamsten, Alison H. Goodall, and Paul Hjemdahl. 1998. 'Alimentary lipemia enhances the membrane expression of platelet P-selectin without affecting other markers of platelet activation', *Atherosclerosis*, 137: 107-13.

Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 1986. 'A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis', *Science*, 232: 34-47.

Bugaud, F., F. Nadal-Wollbold, S. Levy-Toledano, J. P. Rosa, and M. Bryckaert. 1999. 'Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets', *Blood*, 94: 3800-5.

Burke, John E., and Edward A. Dennis. 2009. 'Phospholipase A2 biochemistry', *Cardiovascular drugs and therapy*, 23: 49-59.

Burnouf, T., H. A. Goubran, M. L. Chou, D. Devos, and M. Radosevic. 2014. 'Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine', *Blood Rev*, 28: 155-66.

Byberg, L., A. Smedman, B. Vessby, and H. Lithell. 2001. 'Plasminogen activator inhibitor-1 and relations to fatty acid composition in the diet and in serum cholesterol esters', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 2086-92.

Cai, L., M. C. de Beer, F. C. de Beer, and D. R. van der Westhuyzen. 2005. 'Serum amyloid A is a ligand for scavenger receptor class B type I and inhibits high density lipoprotein binding and selective lipid uptake', *J Biol Chem*, 280: 2954-61.

Calvo-Lerma, Joaquim, Victoria Fornés-Ferrer, Ana Heredia, and Ana Andrés. 2018. 'In Vitro Digestion of Lipids in Real Foods: Influence of Lipid Organization Within the Food Matrix and Interactions with Nonlipid Components', *Journal of food science*, 83: 2629-37.

Calzada, C., L. Coulon, D. Halimi, E. Le Coquil, V. Pruneta-Deloche, P. Moulin, G. Ponsin, E. Vericel, and M. Lagarde. 2007. 'In vitro glycoxidized low-density lipoproteins and low-density lipoproteins isolated from type 2 diabetic patients activate platelets via p38 mitogen-activated protein kinase', *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 1961-4.

Calzada, C., E. Vericel, R. Colas, N. Guillot, G. El Khoury, J. Drai, A. Sassolas, N. Peretti, G. Ponsin, M. Lagarde, and P. Moulin. 2013. 'Inhibitory effects of in vivo oxidized high-density lipoproteins on platelet aggregation: evidence from patients with abetalipoproteinemia', *FASEB J*, 27: 2855-61.

Carlsson, E. R., J. L. G. Grundtvig, S. Madsbad, and M. Fenger. 2018. 'Changes in Serum Sphingomyelin After Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery Are Related to Diabetes Status', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9: 172.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Carmena, R. 2008. 'High Risk of Lipoprotein Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus', *Revista Espanola de Cardiologia*, 8: 18-24.

Chandrasekharan, N. V., H. Dai, K. L. Roos, N. K. Evanson, J. Tomsik, T. S. Elton, and D. L. Simmons. 2002. 'COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 13926-31.

Chavez, J. A., T. A. Knotts, L. P. Wang, G. Li, R. T. Dobrowsky, G. L. Florant, and S. A. Summers. 2003. 'A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids', *J Biol Chem*, 278: 10297-303.

Chew, W. S., F. Torta, S. Ji, H. Choi, H. Begum, X. Sim, C. M. Khoo, E. Y. H. Khoo, W. Y. Ong, R. M. Van Dam, M. R. Wenk, E. S. Tai, and D. R. Herr. 2019. 'Large-scale lipidomics identifies associations between plasma sphingolipids and T2DM incidence', *JCI Insight*, 5.

Chroni, A., T. J. Nieland, K. E. Kypreos, M. Krieger, and V. I. Zannis. 2005. 'SR-BI mediates cholesterol efflux via its interactions with lipid-bound ApoE. Structural mutations in SR-BI diminish cholesterol efflux', *Biochemistry*, 44: 13132-43.

Cimmino, G., and P. Golino. 2013. 'Platelet biology and receptor pathways', *J Cardiovasc Transl Res*, 6: 299-309.

Clemente, G., M. Mancini, F. Nazzaro, G. Lasorella, A. Rivieccio, A. M. Palumbo, A. A. Rivellese, L. Ferrara, and R. Giacco. 2003. 'Effects of different dairy products on postprandial lipemia', *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 13: 377-83.

Cohen, J. C., T. D. Noakes, and A. J. Benade. 1988. 'Serum triglyceride responses to fatty meals: effects of meal fat content', *Am J Clin Nutr*, 47: 825-7.

Colas, R., A. Sassolas, M. Guichardant, C. Cugnet-Anceau, M. Moret, P. Moulin, M. Lagarde, and C. Calzada. 2011. 'LDL from obese patients with the metabolic syndrome show increased lipid peroxidation and activate platelets', *Diabetologia*, 54: 2931-40.

Couillard, C., N. Bergeron, D. Prud'homme, J. Bergeron, A. Tremblay, C. Bouchard, P. Mauriege, and J. P. Despres. 1999. 'Gender difference in postprandial lipemia : importance of visceral adipose tissue accumulation', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 2448-55.

Cowart, L. A. 2009. 'Sphingolipids: players in the pathology of metabolic disease', *Trends Endocrinol Metab*, 20: 34-42.

D'Angelo, A., P. Micossi, P. M. Mannucci, B. Garimberti, F. Franchi, and G. Pozza. 1984. 'Increased production of platelet thromboxane B2 in non-insulin-dependent diabetes. Relationship to vascular complications', *Eur J Clin Invest*, 14: 83-6.

Dash, S., C. Xiao, C. Morgantini, and G. F. Lewis. 2015. 'New Insights into the Regulation of Chylomicron Production', *Annu Rev Nutr*, 35: 265-94.

Davì, Giovanni, Isabella Catalano, Maurizio Averna, Alberto Notarbartolo, Antonio Strano, Giovanni Ciabattoni, and Carlo Patrono. 1990. 'Thromboxane Biosynthesis and Platelet Function in Type II Diabetes Mellitus', *New England Journal of Medicine*, 322: 1769-74.

Dawson, D. W., S. F. Pearce, R. Zhong, R. L. Silverstein, W. A. Frazier, and N. P. Bouck. 1997. 'CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells', *J Cell Biol*, 138: 707-17.

de Beer, M. C., D. M. Durbin, L. Cai, A. Jonas, F. C. de Beer, and D. R. van der Westhuyzen. 2001. 'Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI', *J Lipid Res*, 42: 309-13.

De Kock, Jan, Wim De Greyt, Véronique Gibon, and Marc Kellens. 2005. 'Développements récents en matières de raffinage et de modifications : élimination des contaminants dans les huiles alimentaires et réduction du taux d'acides gras trans', *OCL*, 12: 378-84.

Deevska, G. M., and M. N. Nikolova-Karakashian. 2011. 'The twists and turns of sphingolipid pathway in glucose regulation', *Biochimie*, 93: 32-8.

Delgado-Lista, J., J. Lopez-Miranda, B. Cortes, P. Perez-Martinez, A. Lozano, R. Gomez-Luna, P. Gomez, M. J. Gomez, J. Criado, F. Fuentes, and F. Perez-Jimenez. 2008. 'Chronic dietary fat

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

intake modifies the postprandial response of hemostatic markers to a single fatty test meal', *Am J Clin Nutr*, 87: 317-22.

Demant, T., and C. Packard. 1998. 'In vivo studies of VLDL metabolism and LDL heterogeneity', *European heart journal*, 19 Suppl H: H7-10.

DePeters, E. J., J. B. German, S. J. Taylor, S. T. Essex, and H. Perez-Monti. 2001. 'Fatty acid and triglyceride composition of milk fat from lactating Holstein cows in response to supplemental canola oil', *J Dairy Sci*, 84: 929-36.

Dias, Cintia Botelho, Paul J. Moughan, Lisa G. Wood, Harjinder Singh, and Manohar L. Garg. 2017. 'Postprandial lipemia: factoring in lipemic response for ranking foods for their healthiness', *Lipids in Health and Disease*, 16: 178-78.

Dillehay, D. L., S. K. Webb, E. M. Schmelz, and A. H. Merrill, Jr. 1994. 'Dietary sphingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in CF1 mice', *J Nutr*, 124: 615-20.

Dimmeler, Stefanie, Ingrid Fleming, Beate Fisslthaler, Corinna Hermann, Rudi Busse, and Andreas M. Zeiher. 1999. 'Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation', *Nature*, 399: 601-05.

Dole, V. S., J. Matuskova, E. Vasile, A. Yesilaltay, W. Bergmeier, M. Bernimoulin, D. D. Wagner, and M. Krieger. 2008. 'Thrombocytopenia and platelet abnormalities in high-density lipoprotein receptor-deficient mice', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28: 1111-6.

Drobnik, Wolfgang, Gerhard Liebisch, Franz-Xaver Audebert, Dieter Fröhlich, Thomas Glück, Peter Vogel, Gregor Rothe, and Gerd Schmitz. 2003. 'Plasma ceramide and lysophosphatidylcholine inversely correlate with mortality in sepsis patients', *J Lipid Res*, 44: 754-61.

Dubois, C., G. Beaumier, C. Juhel, M. Armand, H. Portugal, A. M. Pauli, P. Borel, C. Latge, and D. Lairon. 1998. 'Effects of graded amounts (0-50 g) of dietary fat on postprandial lipemia and lipoproteins in normolipidemic adults', *Am J Clin Nutr*, 67: 31-8.

Dullaart, R. P., R. de Vries, A. J. Kwakernaak, F. Perton, and G. M. Dallinga-Thie. 2015. 'Increased large VLDL particles confer elevated cholesteryl ester transfer in diabetes', *Eur J Clin Invest*, 45: 36-44.

Duttaroy, Asim K. 2005. 'Postprandial activation of hemostatic factors: Role of dietary fatty acids', *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 72: 381-91.

Duvillard, L., F. Pont, E. Florentin, C. Galland-Jos, P. Gambert, and B. Verges. 2000. 'Metabolic abnormalities of apolipoprotein B-containing lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes: a stable isotope kinetic study', *Eur J Clin Invest*, 30: 685-94.

Ebara, T., K. Conde, Y. Kako, Y. Liu, Y. Xu, R. Ramakrishnan, I. J. Goldberg, and N. S. Shachter. 2000. 'Delayed catabolism of apoB-48 lipoproteins due to decreased heparan sulfate proteoglycan production in diabetic mice', *J Clin Invest*, 105: 1807-18.

Eckhardt, E. R., D. Q. Wang, J. M. Donovan, and M. C. Carey. 2002. 'Dietary sphingomyelin suppresses intestinal cholesterol absorption by decreasing thermodynamic activity of cholesterol monomers', *Gastroenterology*, 122: 948-56.

Einarson, T. R., A. Acs, C. Ludwig, and U. H. Panton. 2018. 'Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017', *Cardiovasc Diabetol*, 17: 83.

Eisenberg, S., and D. Rachmilewitz. 1975. 'Interaction of rat plasma very low density lipoprotein with lipoprotein lipase-rich (postheparin) plasma', *J Lipid Res*, 16: 341-51.

Engelmann, B., C. Kogl, R. Kulschar, and B. Schaipp. 1996. 'Transfer of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin from low- and high-density lipoprotein to human platelets', *Biochem J*, 315 (Pt 3): 781-9.

Englyst, N. A., J. M. Taube, T. J. Aitman, T. P. Baglin, and C. D. Byrne. 2003. 'A novel role for CD36 in VLDL-enhanced platelet activation', *Diabetes*, 52: 1248-55.

Eriksson, M, B Angelin, P Henriksson, S Ericsson, S Vitols, and L Berglund. 1991. 'Metabolism of lipoprotein remnants in humans. Studies during intestinal infusion of fat and cholesterol in subjects with varying expression of the low density lipoprotein receptor', *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*, 11: 827-37.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Esenabhalu, V. E., M. Cerimagic, R. Malli, K. Osibow, S. Levak-Frank, M. Frieden, W. Sattler, G. M. Kostner, R. Zechner, and W. F. Graier. 2002. 'Tissue-specific expression of human lipoprotein lipase in the vascular system affects vascular reactivity in transgenic mice', *Br J Pharmacol*, 135: 143-54.

Evans, J. H., D. M. Spencer, A. Zweifach, and C. C. Leslie. 2001. 'Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes', *J Biol Chem*, 276: 30150-60.

Fabregat, A., S. Jupe, L. Matthews, K. Sidiropoulos, M. Gillespie, P. Garapati, R. Haw, B. Jassal, F. Korninger, B. May, M. Milacic, C. D. Roca, K. Rothfels, C. Sevilla, V. Shamovsky, S. Shorser, T. Varusai, G. Viteri, J. Weiser, G. Wu, L. Stein, H. Hermjakob, and P. D'Eustachio. 2018. 'The Reactome Pathway Knowledgebase', *Nucleic Acids Res*, 46: D649-d55.

Falcon, C., G. Pfliegler, H. Deckmyn, and J. Vermylen. 1988. 'The platelet insulin receptor: detection, partial characterization, and search for a function', *Biochem Biophys Res Commun*, 157: 1190-6.

Fayyaz, S., J. Henkel, L. Japtok, S. Kramer, G. Damm, D. Seehofer, G. P. Puschel, and B. Kleuser. 2014. 'Involvement of sphingosine 1-phosphate in palmitate-induced insulin resistance of hepatocytes via the S1P2 receptor subtype', *Diabetologia*, 57: 373-82.

Fayyaz, S., L. Japtok, and B. Kleuser. 2014. 'Divergent Role of Sphingosine 1-Phosphate on Insulin Resistance', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34: 134-47.

Febbraio, Maria, David P. Hajjar, and Roy L. Silverstein. 2001. 'CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism', *The Journal of Clinical Investigation*, 108: 785-91.

International Diabetes Federation. 2019. "IDF diabetes atlas". 9th ed. Brussels, Belgium.

Feingold, K. R., and C. Grunfeld. 2000. 'Introduction to Lipids and Lipoproteins.' in K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, R. McLachlan, J. E. Morley, M. New, L. Perreault, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer, D. L. Trence, A. Vinik and D. P. Wilson (eds.), *Endotext* (MDText.com, Inc.: South Dartmouth (MA)).

Ferreira, Irlando Andrade, Astrid I.M. Mocking, Marion A.H. Feijge, Gertie Gorter, Timon W. van Haeften, Johan W.M. Heemskerk, and Jan-Willem N. Akkerman. 2006. 'Platelet Inhibition by Insulin Is Absent in Type 2 Diabetes Mellitus', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26: 417-22.

Fisher, E. A., and H. N. Ginsberg. 2002. 'Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins', *J Biol Chem*, 277: 17377-80.

Fisher, E. A., M. Pan, X. Chen, X. Wu, H. Wang, H. Jamil, J. D. Sparks, and K. J. Williams. 2001. 'The triple threat to nascent apolipoprotein B. Evidence for multiple, distinct degradative pathways', *J Biol Chem*, 276: 27855-63.

Fuhrman, B., J. G. Brook, and M. Aviram. 1986. 'Increased platelet aggregation during alimentary hyperlipemia in normal and hypertriglyceridemic subjects', *Ann Nutr Metab*, 30: 250-60.

Furman, Robert H., R. Palmer Howard, Osvaldo J. Brusco, and Petar Alaupovic. 1965. 'Effects of medium chain length triglyceride (MCT) on serum lipids and lipoproteins in familial hyperchylomicronemia (dietary fat-induced lipemia) and dietary carbohydrate-accentuated lipemia', *J Lab Clin Med*, 66: 912-26.

Garvey, W. T., S. Kwon, D. Zheng, S. Shaughnessy, P. Wallace, A. Hutto, K. Pugh, A. J. Jenkins, R. L. Klein, and Y. Liao. 2003. 'Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance', *Diabetes*, 52: 453-62.

Gault, Christopher R., Lina M. Obeid, and Yusuf A. Hannun. 2010. 'An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown', *Advances in experimental medicine and biology*, 688: 1-23.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Girona, J., N. Amigo, D. Ibarretxe, N. Plana, C. Rodriguez-Borjabad, M. Heras, R. Ferre, M. Gil, X. Correig, and L. Masana. 2019. 'HDL Triglycerides: A New Marker of Metabolic and Cardiovascular Risk', *Int J Mol Sci*, 20.

Goldkorn, T., N. Balaban, M. Shannon, V. Chea, K. Matsukuma, D. Gilchrist, H. Wang, and C. Chan. 1998. 'H2O2 acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells', *J Cell Sci*, 111 (Pt 21): 3209-20.

Gordon, Scott M., W. Sean Davidson, Elaine M. Urbina, Lawrence M. Dolan, Anna Heink, Huaiyu Zang, L. Jason Lu, and Amy S. Shah. 2013. 'The Effects of Type 2 Diabetes on Lipoprotein Composition and Arterial Stiffness in Male Youth', *Diabetes*, 62: 2958-67.

Gorska, M., E. Baranczuk, and A. Dobrzyn. 2003. 'Secretory Zn2+-dependent sphingomyelinase activity in the serum of patients with type 2 diabetes is elevated', *Horm Metab Res*, 35: 506-7.

Gorska, M., A. Dobrzyn, and M. Baranowski. 2005. 'Concentrations of sphingosine and sphinganine in plasma of patients with type 2 diabetes', *Med Sci Monit*, 11: Cr35-8.

Greenberg, M. E., X. M. Li, B. G. Gugiu, X. Gu, J. Qin, R. G. Salomon, and S. L. Hazen. 2008. 'The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes', *J Biol Chem*, 283: 2385-96.

Gresele, P., G. Guglielmini, M. De Angelis, S. Ciferri, M. Ciofetta, E. Falcinelli, C. Lalli, G. Ciabattoni, G. Davi, and G. B. Bolli. 2003. 'Acute, short-term hyperglycemia enhances shear stress-induced platelet activation in patients with type II diabetes mellitus', *J Am Coll Cardiol*, 41: 1013-20.

Grundy, S. M., and H. Y. Mok. 1976. 'Chylomicron clearance in normal and hyperlipidemic man', *Metabolism*, 25: 1225-39.

Gryglewski, R. J., R. M. Botting, and J. R. Vane. 1988. 'Mediators produced by the endothelial cell', *Hypertension*, 12: 530-48.

Guerin, M., W. Le Goff, T. S. Lassel, A. Van Tol, G. Steiner, and M. J. Chapman. 2001. 'Atherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL(1) and dense LDL in type 2 diabetes : impact of the degree of triglyceridemia', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 282-8.

Ha, Hunjoo, and Hi Bahl Lee. 2001. 'Oxidative stress in diabetic nephropathy: Basic and clinical information', *Current Diabetes Reports*, 1: 282-87.

Hackeng, C. M., I. A. Relou, M. W. Pladet, G. Gorter, H. J. van Rijn, and J. W. Akkerman. 1999. 'Early platelet activation by low density lipoprotein via p38MAP kinase', *Thromb Haemost*, 82: 1749-56.

Haffner, S. M., S. Lehto, T. Ronnemaa, K. Pyorala, and M. Laakso. 1998. 'Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction', *N Engl J Med*, 339: 229-34.

Halenda, S. P., and A. G. Rehm. 1987. 'Thrombin and C-kinase activators potentiate calcium-stimulated arachidonic acid release in human platelets', *Biochem J*, 248: 471-5.

Hamberg, M., and B. Samuelsson. 1974. 'Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71: 3400-4.

Hammad, S. M. 2011. 'Blood sphingolipids in homeostasis and pathobiology', *Adv Exp Med Biol*, 721: 57-66.

Hammad, Samar M., Waleed O. Twal, Ehtesham Arif, Andrea J. Semler, Richard L. Klein, and Deepak Nihalani. 2020. 'Transcriptomics Reveal Altered Metabolic and Signaling Pathways in Podocytes Exposed to C16 Ceramide-Enriched Lipoproteins', *Genes*, 11: 178.

Hamzeh-Cognasse, H., P. Berthelot, B. Tardy, B. Pozzetto, T. Bourlet, S. Laradi, O. Garraud, and F. Cognasse. 2018. 'Platelet toll-like receptors are crucial sensors of infectious danger moieties', *Platelets*, 29: 533-40.

Haus, J. M., S. R. Kashyap, T. Kasumov, R. Zhang, K. R. Kelly, R. A. Defronzo, and J. P. Kirwan. 2009. 'Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance', *Diabetes*, 58: 337-43.

Hayashi, H., K. Fujimoto, J. A. Cardelli, D. F. Nutting, S. Bergstedt, and P. Tso. 1990. 'Fat feeding increases size, but not number, of chylomicrons produced by small intestine', *Am J Physiol*, 259: G709-19.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Hedrick, C. C., S. R. Thorpe, M. X. Fu, C. M. Harper, J. Yoo, S. M. Kim, H. Wong, and A. L. Peters. 2000. 'Glycation impairs high-density lipoprotein function', *Diabetologia*, 43: 312-20.

Herman, W. H. 2017. 'The global agenda for the prevention of type 2 diabetes', *Nutr Rev*, 75: 13-18.

Hermans, M. P., K. D. Amoussou-Guenou, E. Bouenizabila, S. S. Sadikot, S. A. Ahn, and M. F. Rousseau. 2017. 'Size, density and cholesterol load of HDL predict microangiopathy, coronary artery disease and beta-cell function in men with T2DM', *Diabetes Metab Syndr*, 11: 125-31.

Higgins, Joan A. 1988. 'Evidence that during very low density lipoprotein assembly in rat hepatocytes most of the triacylglycerol and phospholipid are packaged with apolipoprotein B in the Golgi complex', *FEBS Letters*, 232: 405-08.

Hirano, T. 2018. 'Pathophysiology of Diabetic Dyslipidemia', *J Atheroscler Thromb*, 25: 771-82.

Hirany, S., D. O'Byrne, S. Devaraj, and I. Jialal. 2000. 'Remnant-like particle-cholesterol concentrations in patients with type 2 diabetes mellitus and end-stage renal disease', *Clin Chem*, 46: 667-72.

Holinstat, Michael. 2017. 'Normal platelet function', *Cancer metastasis reviews*, 36: 195-98.

Holland, W. L., J. T. Brozinick, L. P. Wang, E. D. Hawkins, K. M. Sargent, Y. Liu, K. Narra, K. L. Hoehn, T. A. Knotts, A. Siesky, D. H. Nelson, S. K. Karathanasis, G. K. Fontenot, M. J. Birnbaum, and S. A. Summers. 2007. 'Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance', *Cell Metab*, 5: 167-79.

Holland, William L., and Scott A. Summers. 2008. 'Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism', *Endocr Rev*, 29: 381-402.

Hunter, K. A., L. C. Crosbie, G. W. Horgan, G. J. Miller, and A. K. Dutta-Roy. 2001. 'Effect of diets rich in oleic acid, stearic acid and linoleic acid on postprandial haemostatic factors in young healthy men', *Br J Nutr*, 86: 207-15.

Hussain, M. M., P. Rava, M. Walsh, M. Rana, and J. Iqbal. 2012. 'Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein', *Nutr Metab (Lond)*, 9: 14.

Hyson, Dianne A., Teresa G. Paglieroni, Theodore Wun, and John C. Rutledge. 2002. 'Postprandial Lipemia is Associated With Platelet and Monocyte Activation and Increased Monocyte Cytokine Expression in Normolipemic Men', *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 8: 147-55.

Ibrahim, S., C. Calzada, V. Pruneta-Deloche, M. Lagarde, and G. Ponsin. 2007. 'The transfer of VLDL-associated phospholipids to activated platelets depends upon cytosolic phospholipase A2 activity', *J Lipid Res*, 48: 1533-8.

Ibrahim, S., A. Djimet-Baboun, V. Pruneta-Deloche, C. Calzada, M. Lagarde, and G. Ponsin. 2006. 'Transfer of very low density lipoprotein-associated phospholipids to activated human platelets', *J Lipid Res*, 47: 341-8.

Ichi, I., K. Nakahara, Y. Miyashita, A. Hidaka, S. Kutsukake, K. Inoue, T. Maruyama, Y. Miwa, M. Harada-Shiba, M. Tsushima, and S. Kojo. 2006. 'Association of ceramides in human plasma with risk factors of atherosclerosis', *Lipids*, 41: 859-63.

Imachi, Hitomi, Youko Fukata, and Koji Murao. 2014. 'Decreased expression of platelet human scavenger receptor class B type I in patients with type 2 diabetes mellitus', *Journal of diabetes investigation*, 5: 345-46.

Innis, S. M., R. A. Dyer, and E. L. Lien. 1997. 'Formula containing randomized fats with palmitic acid (16:0) in the 2-position increases 16:0 in the 2-position of plasma and chylomicron triglycerides in formula-fed piglets to levels approaching those of piglets fed sow's milk', *J Nutr*, 127: 1362-70.

INSERM. 2019. 'Diabète de type 2'. https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/diabete-type-2.

Iqbal, J., M. T. Walsh, S. M. Hammad, M. Cuchel, P. Tarugi, R. A. Hegele, N. O. Davidson, D. J. Rader, R. L. Klein, and M. M. Hussain. 2015. 'Microsomal Triglyceride Transfer Protein Transfers and Determines Plasma Concentrations of Ceramide and Sphingomyelin but Not Glycosylceramide', *J Biol Chem*, 290: 25863-75.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Iqbal, J., M. T. Walsh, S. M. Hammad, and M. M. Hussain. 2017. 'Sphingolipids and Lipoproteins in Health and Metabolic Disorders', *Trends Endocrinol Metab*, 28: 506-18.

Irvine, R. F. 1990. ''Quantal' Ca2+ release and the control of Ca2+ entry by inositol phosphates--a possible mechanism', *FEBS Lett*, 263: 5-9.

Iso, H., Y. Naito, S. Sato, A. Kitamura, T. Okamura, T. Sankai, T. Shimamoto, M. Iida, and Y. Komachi. 2001. 'Serum triglycerides and risk of coronary heart disease among Japanese men and women', *Am J Epidemiol*, 153: 490-9.

Jackson, K. G., E. J. Wolstencroft, P. A. Bateman, P. Yaqoob, and C. M. Williams. 2005. 'Greater enrichment of triacylglycerol-rich lipoproteins with apolipoproteins E and C-III after meals rich in saturated fatty acids than after meals rich in unsaturated fatty acids', *Am J Clin Nutr*, 81: 25-34.

Jensen, P. N., A. M. Fretts, C. Yu, A. N. Hoofnagle, J. G. Umans, B. V. Howard, C. M. Sitlani, D. S. Siscovick, I. B. King, N. Sotoodehnia, B. McKnight, and R. N. Lemaitre. 2019. 'Circulating sphingolipids, fasting glucose, and impaired fasting glucose: The Strong Heart Family Study', *EBioMedicine*, 41: 44-49.

Ji, Y., B. Jian, N. Wang, Y. Sun, M. L. Moya, M. C. Phillips, G. H. Rothblat, J. B. Swaney, and A. R. Tall. 1997. 'Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux', *J Biol Chem*, 272: 20982-5.

Jian, B., M. de la Llera-Moya, L. Royer, G. Rothblat, O. Francone, and J. B. Swaney. 1997. 'Modification of the cholesterol efflux properties of human serum by enrichment with phospholipid', *J Lipid Res*, 38: 734-44.

Jiang, Z. Gordon, Yuhang Liu, M. Mahmood Hussain, David Atkinson, and C. James McKnight. 2008. 'Reconstituting initial events during the assembly of apolipoprotein B-containing lipoproteins in a cell-free system', *Journal of molecular biology*, 383: 1181-94.

Johansen, Rakel F., Esben Søndergaard, Lars Peter Sørensen, Anne Grethe Jurik, Jens S. Christiansen, and Søren Nielsen. 2016. 'Basal and insulin-regulated VLDL1 and VLDL2 kinetics in men with type 2 diabetes', *Diabetologia*, 59: 833-43.

Jong, M. C., W. L. Hendriks, L. C. van Vark, V. E. Dahlmans, J. E. Groener, and L. M. Havekes. 2000. 'Oxidized VLDL induces less triglyceride accumulation in J774 macrophages than native VLDL due to an impaired extracellular lipolysis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 144-51.

Joshi, Parag H., Arif A. Khokhar, Joseph M. Massaro, Seth T. Lirette, Michael E. Griswold, Seth S. Martin, Michael J. Blaha, Krishnaji R. Kulkarni, Adolfo Correa, Ralph B. D'Agostino, Sr., Steven R. Jones, Peter P. Toth, and Group Lipoprotein Investigators Collaborative Study. 2016. 'Remnant Lipoprotein Cholesterol and Incident Coronary Heart Disease: The Jackson Heart and Framingham Offspring Cohort Studies', *Journal of the American Heart Association*, 5: e002765.

Kahn, M. L., M. Nakanishi-Matsui, M. J. Shapiro, H. Ishihara, and S. R. Coughlin. 1999. 'Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin', *J Clin Invest*, 103: 879-87.

Kamili, Alvin, Elaine Wat, Rosanna W. S. Chung, Sally Tandy, Jacquelyn M. Weir, Peter J. Meikle, and Jeffrey S. Cohn. 2010. 'Hepatic accumulation of intestinal cholesterol is decreased and fecal cholesterol excretion is increased in mice fed a high-fat diet supplemented with milk phospholipids', *Nutrition & Metabolism*, 7: 90.

Karupaiah, T., and K. Sundram. 2013. 'Modulation of human postprandial lipemia by changing ratios of polyunsaturated to saturated (P/S) fatty acid content of blended dietary fats: a cross-over design with repeated measures', *Nutr J*, 12: 122.

Kaur, Raminderjit, Manpreet Kaur, and Jatinder Singh. 2018. 'Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies', *Cardiovascular diabetology*, 17: 121-21.

Kieffer, N., J. Guichard, J. P. Farcet, W. Vainchenker, and J. Breton-Gorius. 1987. 'Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets', *Eur J Biochem*, 164: 189-95.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Kien, C. Lawrence, Janice Y. Bunn, Matthew E. Poynter, Robert Stevens, James Bain, Olga Ikayeva, Naomi K. Fukagawa, Catherine M. Champagne, Karen I. Crain, Timothy R. Koves, and Deborah M. Muoio. 2013. 'A lipidomics analysis of the relationship between dietary fatty acid composition and insulin sensitivity in young adults', *Diabetes*, 62: 1054-63.

Kita, T., N. Kume, M. Minami, K. Hayashida, T. Murayama, H. Sano, H. Moriwaki, H. Kataoka, E. Nishi, H. Horiuchi, H. Arai, and M. Yokode. 2001. 'Role of oxidized LDL in atherosclerosis', *Ann N Y Acad Sci*, 947: 199-205; discussion 05-6.

Kobayashi, Tetsuyuki, Tetsuya Shimizugawa, Tomomi Osakabe, Shiro Watanabe, and Harumi Okuyama. 1997. 'A LONG-TERM FEEDING OF SPHINGOLIPIDS AFFECTED THE LEVELS OF PLASMA CHOLESTEROL AND HEPATIC TRIACYLGLYCEROL BUT NOT TISSUE PHOSPHOLIPIDS AND SPHINGOLIPIDS', *Nutrition Research*, 17: 111-14.

Konstantynowicz-Nowicka, Karolina, Ewa Harasim, Marcin Baranowski, and Adrian Chabowski. 2015. 'New evidence for the role of ceramide in the development of hepatic insulin resistance', *PLoS One*, 10: e0116858-e58.

Kontush, A., and M. J. Chapman. 2008. 'Why is HDL functionally deficient in type 2 diabetes?', *Curr Diab Rep*, 8: 51-9.

Kontush, A., M. Lhomme, and M. J. Chapman. 2013. 'Unraveling the complexities of the HDL lipidome', *J Lipid Res*, 54: 2950-63.

Korporaal, S. J., G. Gorter, H. J. van Rijn, and J. W. Akkerman. 2005. 'Effect of oxidation on the platelet-activating properties of low-density lipoprotein', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 867-72.

Koutsari, C., A. Zagana, I. Tzoras, L. S. Sidossis, and A. L. Matalas. 2004. 'Gender influence on plasma triacylglycerol response to meals with different monounsaturated and saturated fatty acid content', *European Journal of Clinical Nutrition*, 58: 495-502.

Kremer, G. J., W. Atzpodien, and E. Schnellbacher. 1975. 'Plasma glycosphingolipids in diabetics and normals', *Klin Wochenschr*, 53: 637-8.

Krieger, M. 2001. 'Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems', *J Clin Invest*, 108: 793-7.

Kuge, O., C. Dascher, L. Orci, T. Rowe, M. Amherdt, H. Plutner, M. Ravazzola, G. Tanigawa, J. E. Rothman, and W. E. Balch. 1994. 'Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments', *J Cell Biol*, 125: 51-65.

Kurek, Krzysztof, Dominika M. Piotrowska, Patrycja Wiesiołek-Kurek, Bartłomiej Łukaszuk, Adrian Chabowski, Jan Górski, and Małgorzata Żendzian-Piotrowska. 2014. 'Inhibition of ceramide de novo synthesis reduces liver lipid accumulation in rats with nonalcoholic fatty liver disease', *Liver International*, 34: 1074-83.

Kurz, Jennifer, Michael J. Parnham, Gerd Geisslinger, and Susanne Schiffmann. 2019. 'Ceramides as Novel Disease Biomarkers', *Trends in Molecular Medicine*, 25: 20-32.

Kuver, Rahul. 2010. 'Bioactive sphingolipids in the biliary tract: Relevance for cholesterol gallstone disease', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25: 1020-23.

Kuwahara, M., M. Sugimoto, S. Tsuji, H. Matsui, T. Mizuno, S. Miyata, and A. Yoshioka. 2002. 'Platelet shape changes and adhesion under high shear flow', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22: 329-34.

Kwan, Bonnie C.H., Florian Kronenberg, Srinivasan Beddhu, and Alfred K. Cheung. 2007. 'Lipoprotein Metabolism and Lipid Management in Chronic Kidney Disease', *Journal of the American Society of Nephrology*, 18: 1246-61.

Lagarde, M., P. A. Bryon, M. Guichardant, and M. Dechavanne. 1980. 'A simple and efficient method for platelet isolation from their plasma', *Thromb Res*, 17: 581-8.

Lairon, D., J. Lopez-Miranda, and C. Williams. 2007. 'Methodology for studying postprandial lipid metabolism', *European Journal of Clinical Nutrition*, 61: 1145-61.

Lairon, Denis. 2008. 'LIPÉMIE POSTPRANDIALE : RÉPONSES AUX NUTRIMENTS ET CONSÉQUENCES PHYSIO-PATHOLOGIQUES', *Cahier de Nutrition et de Diététique*, 43: 186-90.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Lambert, Marc S., MichaeL. A. Avella, Yoel Berhane, Elaine Shervill, and Kathleen M. Botham. 2001. 'The fatty acid composition of chylomicron remnants influences their binding and internalization by isolated hepatocytes', *Eur J Biochem*, 268: 3983-92.

Lambert, Marc S., Kathleen M. Botham, and Peter A. Mayes. 2007. 'Modification of the fatty acid composition of dietary oils and fats on incorporation into chylomicrons and chylomicron remnants', *British Journal of Nutrition*, 76: 435-45.

Lankinen, M., U. Schwab, M. Kolehmainen, J. Paananen, H. Nygren, T. Seppanen-Laakso, K. Poutanen, T. Hyotylainen, U. Riserus, M. J. Savolainen, J. Hukkanen, L. Brader, M. Marklund, F. Rosqvist, K. Hermansen, L. Cloetens, G. Onning, I. Thorsdottir, I. Gunnarsdottir, B. Akesson, L. O. Dragsted, M. Uusitupa, and M. Oresic. 2015. 'A Healthy Nordic Diet Alters the Plasma Lipidomic Profile in Adults with Features of Metabolic Syndrome in a Multicenter Randomized Dietary Intervention', *J Nutr*, 146: 662-72.

Law, Brittany A., Xianghai Liao, Kelsey S. Moore, Abigail Southard, Patrick Roddy, Ruiping Ji, Zdzislaw Szulc, Ala Bielawska, P. Christian Schulze, and L. Ashley Cowart. 2018. 'Lipotoxic very-long-chain ceramides cause mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and cell death in cardiomyocytes', *The FASEB Journal*, 32: 1403-16.

Le Barz, M., M. M. Boulet, C. Calzada, D. Cheillan, and M. C. Michalski. 2019. 'Alterations of endogenous sphingolipid metabolism in cardiometabolic diseases: towards novel therapeutic approaches', *Biochimie*.

Le Fur, C., M. Romon, P. Lebel, P. Devos, A. Lancry, L. Guedon-Moreau, J. C. Fruchart, and J. Dallongeville. 1999. 'Influence of mental stress and circadian cycle on postprandial lipemia', *Am J Clin Nutr*, 70: 213-20.

Le, Q. H., M. El Alaoui, E. Vericel, B. Segrestin, L. Soulere, M. Guichardant, M. Lagarde, P. Moulin, and C. Calzada. 2015. 'Glycoxidized HDL, HDL enriched with oxidized phospholipids and HDL from diabetic patients inhibit platelet function', *J Clin Endocrinol Metab*, 100: 2006-14.

Lemaitre, R. N., C. Yu, A. Hoofnagle, N. Hari, P. N. Jensen, A. M. Fretts, J. G. Umans, B. V. Howard, C. M. Sitlani, D. S. Siscovick, I. B. King, N. Sotoodehnia, and B. McKnight. 2018. 'Circulating Sphingolipids, Insulin, HOMA-IR, and HOMA-B: The Strong Heart Family Study', *Diabetes*, 67: 1663-72.

Levy, M., S. S. Castillo, and T. Goldkorn. 2006. 'nSMase2 activation and trafficking are modulated by oxidative stress to induce apoptosis', *Biochem Biophys Res Commun*, 344: 900-5.

Lewis, G. F., K. D. Uffelman, L. W. Szeto, and G. Steiner. 1993. 'Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals', *Diabetes*, 42: 833-42.

Li, X. A., L. Guo, J. L. Dressman, R. Asmis, and E. J. Smart. 2005. 'A novel ligand-independent apoptotic pathway induced by scavenger receptor class B, type I and suppressed by endothelial nitric-oxide synthase and high density lipoprotein', *J Biol Chem*, 280: 19087-96.

Li, Y., V. Woo, and R. Bose. 2001. 'Platelet hyperactivity and abnormal Ca(2+) homeostasis in diabetes mellitus', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280: H1480-9.

Liadaki, K. N., T. Liu, S. Xu, B. Y. Ishida, P. N. Duchateaux, J. P. Krieger, J. Kane, M. Krieger, and V. I. Zannis. 2000. 'Binding of high density lipoprotein (HDL) and discoidal reconstituted HDL to the HDL receptor scavenger receptor class B type I. Effect of lipid association and APOA-I mutations on receptor binding', *J Biol Chem*, 275: 21262-71.

Liang, J., and H. N. Ginsberg. 2001. 'Microsomal triglyceride transfer protein binding and lipid transfer activities are independent of each other, but both are required for secretion of apolipoprotein B lipoproteins from liver cells', *J Biol Chem*, 276: 28606-12.

'The LIPID MAPS® Lipidomics Gateway'. https://www.lipidmaps.org/.

Lipina, C., and H. S. Hundal. 2015. 'Ganglioside GM3 as a gatekeeper of obesity-associated insulin resistance: Evidence and mechanisms', *FEBS Lett*, 589: 3221-7.

Liu, D., L. Ji, D. Zhang, X. Tong, B. Pan, P. Liu, Y. Zhang, Y. Huang, J. Su, B. Willard, and L. Zheng. 2012. 'Nonenzymatic glycation of high-density lipoprotein impairs its anti-inflammatory effects in innate immunity', *Diabetes Metab Res Rev*, 28: 186-95.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Lobo, L. I., and D. C. Wilton. 1997. 'Combined effects of sphingomyelin and cholesterol on the hydrolysis of emulsion particle triolein by lipoprotein lipase', *Biochim Biophys Acta*, 1349: 122-30.

Lopez-Miranda, José, Christine Williams, and Denis Lairon. 2007. 'Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism', *British Journal of Nutrition*, 98: 458-73.

Lopez, X., A. B. Goldfine, W. L. Holland, R. Gordillo, and P. E. Scherer. 2013. 'Plasma ceramides are elevated in female children and adolescents with type 2 diabetes', *J Pediatr Endocrinol Metab*, 26: 995-8.

Lova, P., F. Campus, R. Lombardi, M. Cattaneo, F. Sinigaglia, C. Balduini, and M. Torti. 2004. 'Contribution of protease-activated receptors 1 and 4 and glycoprotein Ib-IX-V in the G(i)-independent activation of platelet Rap1B by thrombin', *J Biol Chem*, 279: 25299-306.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. 'Protein measurement with the Folin phenol reagent', *J Biol Chem*, 193: 265-75.

Lucas, M., P. H. Iverius, D. K. Strickland, and T. Mazzone. 1997. 'Lipoprotein lipase reduces secretion of apolipoprotein E from macrophages', *J Biol Chem*, 272: 13000-5.

Ma, Y., M. Z. Ashraf, and E. A. Podrez. 2010. 'Scavenger receptor BI modulates platelet reactivity and thrombosis in dyslipidemia', *Blood*, 116: 1932-41.

Maffi, P., and A. Secchi. 2017. 'The Burden of Diabetes: Emerging Data', *Dev Ophthalmol*, 60: 1-5.

Magwenzi, Simbarashe, Casey Woodward, Katie S. Wraith, Ahmed Aburima, Zaher Raslan, Huw Jones, Catriona McNeil, Stephen Wheatcroft, Nadira Yuldasheva, Maria Febbriao, Mark Kearney, and Khalid M. Naseem. 2015. 'Oxidized LDL activates blood platelets through CD36/NOX2–mediated inhibition of the cGMP/protein kinase G signaling cascade', *Blood*, 125: 2693-703.

Maldonado, Eduardo N., José R. Romero, Begoña Ochoa, and Marta I. Aveldaño. 2001. 'Lipid and fatty acid composition of canine lipoproteins', *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 128: 719-29.

Mamputu, J. C., A. C. Desfaits, and G. Renier. 1997. 'Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells', *J Lipid Res*, 38: 1722-9.

Mamputu, Jean-Claude, Luc Levesque, and Geneviève Renier. 2000. 'Proliferative Effect of Lipoprotein Lipase on Human Vascular Smooth Muscle Cells', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20: 2212-19.

Mancuso, M. E., and E. Santagostino. 2017. 'Platelets: much more than bricks in a breached wall', *Br J Haematol*, 178: 209-19.

Marcus, A. J., H. L. Ullman, and L. B. Safier. 1969. 'Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets', *J Lipid Res*, 10: 108-14.

Martín-Timón, Iciar, Cristina Sevillano-Collantes, Amparo Segura-Galindo, and Francisco Javier Del Cañizo-Gómez. 2014. 'Type 2 diabetes and cardiovascular disease: Have all risk factors the same strength?', *World journal of diabetes*, 5: 444-70.

Martins, I. J., B. C. Mortimer, J. Miller, and T. G. Redgrave. 1996. 'Effects of particle size and number on the plasma clearance of chylomicrons and remnants', *J Lipid Res*, 37: 2696-705.

Masquio, D. C., A. de Piano, R. M. Campos, P. L. Sanches, F. C. Corgosinho, J. Carnier, L. M. Oyama, C. M. do Nascimento, M. T. de Mello, S. Tufik, and A. R. Damaso. 2014. 'Saturated fatty acid intake can influence increase in plasminogen activator inhibitor-1 in obese adolescents', *Horm Metab Res*, 46: 245-51.

McNamara, J. R., P. K. Shah, K. Nakajima, L. A. Cupples, P. W. Wilson, J. M. Ordovas, and E. J. Schaefer. 2001. 'Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk factor in women: results from the Framingham Heart Study', *Atherosclerosis*, 154: 229-36.

Meikle, P. J., C. K. Barlow, N. A. Mellett, P. A. Mundra, M. P. Bonham, A. Larsen, D. Cameron-Smith, A. Sinclair, P. J. Nestel, and G. Wong. 2015. 'Postprandial Plasma Phospholipids in Men Are Influenced by the Source of Dietary Fat', *J Nutr*, 145: 2012-8.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Meikle, P. J., G. Wong, C. K. Barlow, J. M. Weir, M. A. Greeve, G. L. MacIntosh, L. Almasy, A. G. Comuzzie, M. C. Mahaney, A. Kowalczyk, I. Haviv, N. Grantham, D. J. Magliano, J. B. Jowett, P. Zimmet, J. E. Curran, J. Blangero, and J. Shaw. 2013. 'Plasma lipid profiling shows similar associations with prediabetes and type 2 diabetes', *PLoS One*, 8: e74341.

Mekki, N., M. Charbonnier, P. Borel, J. Leonardi, C. Juhel, H. Portugal, and D. Lairon. 2002. 'Butter differs from olive oil and sunflower oil in its effects on postprandial lipemia and triacylglycerol-rich lipoproteins after single mixed meals in healthy young men', *J Nutr*, 132: 3642-9.

Memon, R. A., W. M. Holleran, A. H. Moser, T. Seki, Y. Uchida, J. Fuller, J. K. Shigenaga, C. Grunfeld, and K. R. Feingold. 1998. 'Endotoxin and cytokines increase hepatic sphingolipid biosynthesis and produce lipoproteins enriched in ceramides and sphingomyelin', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 1257-65.

Mennen, L., M. de Maat, G. Meijer, P. Zock, D. Grobbee, F. Kok, C. Kluft, and E. Schouten. 1998. 'Factor VIIa response to a fat-rich meal does not depend on fatty acid composition: a randomized controlled trial', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 599-603.

Merrill, A. H., Jr. 2002. 'De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway', *J Biol Chem*, 277: 25843-6.

———. 2011. 'Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics', *Chem Rev*, 111: 6387-422.

Meynier, Anne, and Claude Genot. 2017. 'Molecular and structural organization of lipids in foods: their fate during digestion and impact in nutrition', *OCL*, 24: D202.

Michalski, M. C., C. Genot, C. Gayet, C. Lopez, F. Fine, F. Joffre, J. L. Vendeuvre, J. Bouvier, J. M. Chardigny, and K. Raynal-Ljutovac. 2013. 'Multiscale structures of lipids in foods as parameters affecting fatty acid bioavailability and lipid metabolism', *Prog Lipid Res*, 52: 354-73.

Mikellidi A, Nomikos T. 2016. 'Postprandial activation of platelets as a possible mechanism for the development of atherosclerosis', *Hell J Atheroscler*, 7: 13-26.

Milard, M., A. Penhoat, A. Durand, C. Buisson, E. Loizon, E. Meugnier, K. Bertrand, F. Joffre, D. Cheillan, L. Garnier, S. Viel, F. Laugerette, and M. C. Michalski. 2019. 'Acute effects of milk polar lipids on intestinal tight junction expression: towards an impact of sphingomyelin through the regulation of IL-8 secretion?', *J Nutr Biochem*, 65: 128-38.

Mortimer, B. C., D. J. Holthouse, I. J. Martins, R. V. Stick, and T. G. Redgrave. 1994. 'Effects of triacylglycerol-saturated acyl chains on the clearance of chylomicron-like emulsions from the plasma of the rat', *Biochim Biophys Acta*, 1211: 171-80.

Nakajima, K., T. Nakano, Y. Tokita, T. Nagamine, A. Inazu, J. Kobayashi, H. Mabuchi, K. L. Stanhope, P. J. Havel, M. Okazaki, M. Ai, and A. Tanaka. 2011. 'Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons', *Clin Chim Acta*, 412: 1306-18.

Nakajima, Katsuyuki, Yoshiharu Tokita, and Akira Tanaka. 2019. 'Hypothesis II: The majority of VLDL-apoB48 remnants in postprandial plasma are derived from the liver, not from the intestine', *Clinica Chimica Acta*, 490: 12-16.

Nakano, T., K. Nakajima, M. Niimi, M. Q. Fujita, Y. Nakajima, S. Takeichi, M. Kinoshita, T. Matsushima, T. Teramoto, and A. Tanaka. 2008. 'Detection of apolipoproteins B-48 and B-100 carrying particles in lipoprotein fractions extracted from human aortic atherosclerotic plaques in sudden cardiac death cases', *Clin Chim Acta*, 390: 38-43.

Needleman, P., S. Moncada, S. Bunting, J. R. Vane, M. Hamberg, and B. Samuelsson. 1976. 'Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A2 from prostaglandin endoperoxides', *Nature*, 261: 558-60.

Nelson, Jennifer Clark, Xian-Cheng Jiang, Ira Tabas, Alan Tall, and Steven Shea. 2006. 'Plasma Sphingomyelin and Subclinical Atherosclerosis: Findings from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis', *American Journal of Epidemiology*, 163: 903-12.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Newman, P. J., J. Gorski, G. C. White, 2nd, S. Gidwitz, C. J. Cretney, and R. H. Aster. 1988. 'Enzymatic amplification of platelet-specific messenger RNA using the polymerase chain reaction', *J Clin Invest*, 82: 739-43.

Nguyen, S. V., T. Nakamura, M. Uematsu, D. Fujioka, K. Watanabe, Y. Watanabe, J. E. Obata, K. Nakamura, and K. Kugiyama. 2017. 'Remnant lipoproteinemia predicts cardiovascular events in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease', *J Cardiol*, 69: 529-35.

Ni, H., C. V. Denis, S. Subbarao, J. L. Degen, T. N. Sato, R. O. Hynes, and D. D. Wagner. 2000. 'Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen', *J Clin Invest*, 106: 385-92.

Ni, Heyu, Peter S. T. Yuen, Jessie M. Papalia, Jane E. Trevithick, Takao Sakai, Reinhard Fässler, Richard O. Hynes, and Denisa D. Wagner. 2003. 'Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 2415-19.

Nicholson, A. C., S. Frieda, A. Pearce, and R. L. Silverstein. 1995. 'Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15: 269-75.

Nieswandt, B., and S. P. Watson. 2003. 'Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?', *Blood*, 102: 449-61.

Nilsson, A, E Hertervig, and RD Duan. 2003. 'Nutrition and Biochemistry of Phospholipids'.

Nilsson, Åke, and Rui-Dong Duan. 2006. 'Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin', *J Lipid Res*, 47: 154-71.

Nilsson, L., C. Banfi, U. Diczfalusy, E. Tremoli, A. Hamsten, and P. Eriksson. 1998. 'Unsaturated fatty acids increase plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 1679-85.

Nimpf, J., E. Malle, B. Leopold, H. Wurm, and G. M. Kostner. 1989. 'Postprandial hyperlipemia inhibits platelet aggregation without affecting prostanoid metabolism', *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 37: 7-13.

Nobecourt, E., S. Jacqueminet, B. Hansel, S. Chantepie, A. Grimaldi, M. J. Chapman, and A. Kontush. 2005. 'Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia', *Diabetologia*, 48: 529-38.

Nofer, J. R., M. van der Giet, M. Tolle, I. Wolinska, K. von Wnuck Lipinski, H. A. Baba, U. J. Tietge, A. Godecke, I. Ishii, B. Kleuser, M. Schafers, M. Fobker, W. Zidek, G. Assmann, J. Chun, and B. Levkau. 2004. 'HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3', *J Clin Invest*, 113: 569-81.

Nofer, J. R., M. Walter, B. Kehrel, S. Wierwille, M. Tepel, U. Seedorf, and G. Assmann. 1998. 'HDL3-mediated inhibition of thrombin-induced platelet aggregation and fibrinogen binding occurs via decreased production of phosphoinositide-derived second messengers 1,2-diacylglycerol and inositol 1,4,5-tris-phosphate', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 861-9.

Noh, S. K., and S. I. Koo. 2004. 'Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats', *J Nutr*, 134: 2611-6.

Nordestgaard, B. G., M. Benn, P. Schnohr, and A. Tybjaerg-Hansen. 2007. 'Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women', *JAMA*, 298: 299-308.

Nordestgaard, B. G., A. Langsted, S. Mora, G. Kolovou, H. Baum, E. Bruckert, G. F. Watts, G. Sypniewska, O. Wiklund, J. Boren, M. J. Chapman, C. Cobbaert, O. S. Descamps, A. von Eckardstein, P. R. Kamstrup, K. Pulkki, F. Kronenberg, A. T. Remaley, N. Rifai, E. Ros, and M. Langlois. 2016. 'Fasting is not routinely required for determination of a lipid profile: clinical and laboratory implications including flagging at desirable concentration cut-points-a joint consensus statement from the European Atherosclerosis Society and European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine', *European heart journal*, 37: 1944-58.

Nordoy, A., M. Lagarde, and S. Renaud. 1984. 'Platelets during alimentary hyperlipaemia induced by cream and cod liver oil', *Eur J Clin Invest*, 14: 339-45.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Norhammar, A., and K. Schenck-Gustafsson. 2013. 'Type 2 diabetes and cardiovascular disease in women', *Diabetologia*, 56: 1-9.

Normand, S., Y. Khalfallah, C. Louche-Pelissier, C. Pachiaudi, J. M. Antoine, S. Blanc, M. Desage, J. P. Riou, and M. Laville. 2001. 'Influence of dietary fat on postprandial glucose metabolism (exogenous and endogenous) using intrinsically (13)C-enriched durum wheat', *Br J Nutr*, 86: 3-11.

Norris, Gregory H., and Christopher N. Blesso. 2017. 'Dietary and Endogenous Sphingolipid Metabolism in Chronic Inflammation', *Nutrients*, 9: 1180.

Ockner, Robert K., Faith B. Hughes, and Kurt J. Isselbacher. 1969. 'Very low density lipoproteins in intestinal lymph: origin, composition, and role in lipid transport in the fasting state', *The Journal of Clinical Investigation*, 48: 2079-88.

Ohgami, N., A. Miyazaki, M. Sakai, A. Kuniyasu, H. Nakayama, and S. Horiuchi. 2003. 'Advanced glycation end products (AGE) inhibit scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport: a new crossroad of AGE to cholesterol metabolism', *J Atheroscler Thromb*, 10: 1-6.

Ohlsson, Lena, Erik Hertervig, Bo AG Jönsson, Rui-Dong Duan, Lena Nyberg, Rikard Svernlöv, and Åke Nilsson. 2010. 'Sphingolipids in human ileostomy content after meals containing milk sphingomyelin', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91: 672-78.

Olsson, U., A. C. Egnell, M. R. Lee, G. O. Lunden, M. Lorentzon, M. Salmivirta, G. Bondjers, and G. Camejo. 2001. 'Changes in matrix proteoglycans induced by insulin and fatty acids in hepatic cells may contribute to dyslipidemia of insulin resistance', *Diabetes*, 50: 2126-32.

Olufadi, R., and C. D. Byrne. 2006. 'Effects of VLDL and remnant particles on platelets', *Pathophysiol Haemost Thromb*, 35: 281-91.

OMS. 2018. 'Diabetes'. who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes.

Orth, M., C. Luley, and H. Wieland. 1995. 'Effects of VLDL, chylomicrons, and chylomicron remnants on platelet aggregability', *Thromb Res*, 79: 297-305.

Oscarsson, J., and E. Hurt-Camejo. 2017. 'Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and their mechanisms of action on apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans: a review', *Lipids Health Dis*, 16: 149.

Otokozawa, S., M. Ai, M. R. Diffenderfer, B. F. Asztalos, A. Tanaka, S. Lamon-Fava, and E. J. Schaefer. 2009. 'Fasting and postprandial apolipoprotein B-48 levels in healthy, obese, and hyperlipidemic subjects', *Metabolism*, 58: 1536-42.

Ouseph, M. M., Y. Huang, M. Banerjee, S. Joshi, L. MacDonald, Y. Zhong, H. Liu, X. Li, B. Xiang, G. Zhang, M. Komatsu, Z. Yue, Z. Li, B. Storrie, S. W. Whiteheart, and Q. J. Wang. 2015. 'Autophagy is induced upon platelet activation and is essential for hemostasis and thrombosis', *Blood*, 126: 1224-33.

Papkoff, J., R. H. Chen, J. Blenis, and J. Forsman. 1994. 'p42 mitogen-activated protein kinase and p90 ribosomal S6 kinase are selectively phosphorylated and activated during thrombin-induced platelet activation and aggregation', *Mol Cell Biol*, 14: 463-72.

Park, Y., and W. S. Harris. 2003. 'Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance', *J Lipid Res*, 44: 455-63.

Patrignani, P., M. G. Sciulli, S. Manarini, G. Santini, C. Cerletti, and V. Evangelista. 1999. 'COX-2 is not involved in thromboxane biosynthesis by activated human platelets', *J Physiol Pharmacol*, 50: 661-7.

Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb. 2001. 'Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions', *Endocr Rev*, 22: 153-83.

Pettazzoni, M., R. Froissart, C. Pagan, M. T. Vanier, S. Ruet, P. Latour, N. Guffon, A. Fouilhoux, D. P. Germain, T. Levade, C. Vianey-Saban, M. Piraud, and D. Cheillan. 2017. 'LC-MS/MS multiplex analysis of lysosphingolipids in plasma and amniotic fluid: A novel tool for the screening of sphingolipidoses and Niemann-Pick type C disease', *PLoS One*, 12: e0181700.

Phillips, M. C. 2014. 'Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux', *J Biol Chem*, 289: 24020-9.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Podrez, E. A., E. Poliakov, Z. Shen, R. Zhang, Y. Deng, M. Sun, P. J. Finton, L. Shan, B. Gugiu, P. L. Fox, H. F. Hoff, R. G. Salomon, and S. L. Hazen. 2002. 'Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36', *J Biol Chem*, 277: 38503-16.

Podrez, Eugene A., Tatiana V. Byzova, Maria Febbraio, Robert G. Salomon, Yi Ma, Manojkumar Valiyaveettil, Eugenia Poliakov, Mingjiang Sun, Paula J. Finton, Brian R. Curtis, Juhua Chen, Renliang Zhang, Roy L. Silverstein, and Stanley L. Hazen. 2007. 'Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype', *Nature medicine*, 13: 1086-95.

Proctor, S. D., D. F. Vine, and J. C. Mamo. 2002. 'Arterial retention of apolipoprotein B(48)- and B(100)-containing lipoproteins in atherogenesis', *Curr Opin Lipidol*, 13: 461-70.

Proctor Spencer, D., and C. L. Mamo John. 2003. 'Intimal Retention of Cholesterol Derived From Apolipoprotein B100– and Apolipoprotein B48–Containing Lipoproteins in Carotid Arteries of Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23: 1595-600.

Raabe, M., M. M. Veniant, M. A. Sullivan, C. H. Zlot, J. Bjorkegren, L. B. Nielsen, J. S. Wong, R. L. Hamilton, and S. G. Young. 1999. 'Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice', *J Clin Invest*, 103: 1287-98.

Rabbani, N., M. V. Chittari, C. W. Bodmer, D. Zehnder, A. Ceriello, and P. J. Thornalley. 2010. 'Increased glycation and oxidative damage to apolipoprotein B100 of LDL cholesterol in patients with type 2 diabetes and effect of metformin', *Diabetes*, 59: 1038-45.

Raichur, S., B. Brunner, M. Bielohuby, G. Hansen, A. Pfenninger, B. Wang, J. C. Bruning, P. J. Larsen, and N. Tennagels. 2019. 'The role of C16:0 ceramide in the development of obesity and type 2 diabetes: CerS6 inhibition as a novel therapeutic approach', *Mol Metab*, 21: 36-50.

Raichur, S., S. T. Wang, P. W. Chan, Y. Li, J. Ching, B. Chaurasia, S. Dogra, M. K. Ohman, K. Takeda, S. Sugii, Y. Pewzner-Jung, A. H. Futerman, and S. A. Summers. 2014. 'CerS2 haploinsufficiency inhibits beta-oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance', *Cell Metab*, 20: 687-95.

Ramírez, M., L. Amate, and A. Gil. 2001. 'Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources', *Early Human Development*, 65: S95-S101.

Rashid, S., T. Watanabe, T. Sakaue, and G. F. Lewis. 2003. 'Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity', *Clin Biochem*, 36: 421-9.

Razmara, M., P. Hjemdahl, M. Yngen, C. G. Ostenson, N. H. Wallen, and N. Li. 2007. 'Food intake enhances thromboxane receptor-mediated platelet activation in type 2 diabetic patients but not in healthy subjects', *Diabetes Care*, 30: 138-40.

Redgrave, T. G., D. R. Kodali, and D. M. Small. 1988. 'The effect of triacyl-sn-glycerol structure on the metabolism of chylomicrons and triacylglycerol-rich emulsions in the rat', *J Biol Chem*, 263: 5118-23.

Redgrave, T. G., V. Rakic, B. C. Mortimer, and J. C. Mamo. 1992. 'Effects of sphingomyelin and phosphatidylcholine acyl chains on the clearance of triacylglycerol-rich lipoproteins from plasma. Studies with lipid emulsions in rats', *Biochim Biophys Acta*, 1126: 65-72.

Renaud, S. C., J. C. Ruf, and D. Petithory. 1995. 'The positional distribution of fatty acids in palm oil and lard influences their biologic effects in rats', *J Nutr*, 125: 229-37.

Renier, G., and A. Lambert. 1995. 'Lipoprotein lipase synergizes with interferon gamma to induce macrophage nitric oxide synthetase mRNA expression and nitric oxide production', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15: 392-9.

Renier, G., E. Skamene, J. B. DeSanctis, and D. Radzioch. 1994. 'Induction of tumor necrosis factor alpha gene expression by lipoprotein lipase', *J Lipid Res*, 35: 271-8.

Ridgway, Neale D. 2000. 'Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1484: 129-41.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Riemens, S. C., A. van Tol, L. M. Scheek, and R. P. Dullaart. 2001. 'Plasma cholesteryl ester transfer and hepatic lipase activity are related to high-density lipoprotein cholesterol in association with insulin resistance in type 2 diabetic and non-diabetic subjects', *Scand J Clin Lab Invest*, 61: 1-9.

Rigotti, A., S. L. Acton, and M. Krieger. 1995. 'The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids', *J Biol Chem*, 270: 16221-4.

Roche, H. M., A. Zampelas, J. M. Knapper, D. Webb, C. Brooks, K. G. Jackson, J. W. Wright, B. J. Gould, A. Kafatos, M. J. Gibney, and C. M. Williams. 1998. 'Effect of long-term olive oil dietary intervention on postprandial triacylglycerol and factor VII metabolism', *Am J Clin Nutr*, 68: 552-60.

Romon, M., C. Le Fur, P. Lebel, J. L. Edme, J. C. Fruchart, and J. Dallongeville. 1997. 'Circadian variation of postprandial lipemia', *Am J Clin Nutr*, 65: 934-40.

Ross, Jessica S., Sarah B. Russo, Georgia C. Chavis, and Lauren A. Cowart. 2014. 'Sphingolipid regulators of cellular dysfunction in Type 2 diabetes mellitus: a systems overview', *Clinical Lipidology*, 9: 553-69.

Rumbaut RE, Thiagarajan P. 2010. 'Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis.' in (Morgan & Claypool Life Sciences: San Rafael (CA)).

Ruuth, M., S. D. Nguyen, T. Vihervaara, M. Hilvo, T. D. Laajala, P. K. Kondadi, A. Gistera, H. Lahteenmaki, T. Kittila, J. Huusko, M. Uusitupa, U. Schwab, M. J. Savolainen, J. Sinisalo, M. L. Lokki, M. S. Nieminen, A. Jula, M. Perola, S. Yla-Herttula, L. Rudel, A. Oorni, M. Baumann, A. Baruch, R. Laaksonen, D. F. J. Ketelhuth, T. Aittokallio, M. Jauhiainen, R. Kakela, J. Boren, K. J. Williams, P. T. Kovanen, and K. Oorni. 2018. 'Susceptibility of low-density lipoprotein particles to aggregate depends on particle lipidome, is modifiable, and associates with future cardiovascular deaths', *European heart journal*, 39: 2562-73.

Ryeom, S. W., R. L. Silverstein, A. Scotto, and J. R. Sparrow. 1996. 'Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium may be mediated by the scavenger receptor CD36', *J Biol Chem*, 271: 20536-9.

Sacks, F. M., C. Zheng, and J. S. Cohn. 2011. 'Complexities of plasma apolipoprotein C-III metabolism', *J Lipid Res*, 52: 1067-70.

Saelman, E. U., H. K. Nieuwenhuis, K. M. Hese, P. G. de Groot, H. F. Heijnen, E. H. Sage, S. Williams, L. McKeown, H. R. Gralnick, and J. J. Sixma. 1994. 'Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin)', *Blood*, 83: 1244-50.

Sakai, N., Y. Uchida, K. Ohashi, T. Hibuse, Y. Saika, Y. Tomari, S. Kihara, H. Hiraoka, T. Nakamura, S. Ito, S. Yamashita, and Y. Matsuzawa. 2003. 'Measurement of fasting serum apoB-48 levels in normolipidemic and hyperlipidemic subjects by ELISA', *J Lipid Res*, 44: 1256-62.

Sanders, T. A., T. de Grassi, G. J. Miller, and J. H. Morrissey. 2000. 'Influence of fatty acid chain length and cis/trans isomerization on postprandial lipemia and factor VII in healthy subjects (postprandial lipids and factor VII)', *Atherosclerosis*, 149: 413-20.

Sanders, Tom A. B. 2003. 'Dietary fat and postprandial lipids', *Current Atherosclerosis Reports*, 5: 445-51.

Sandhoff, K. 2013. 'Metabolic and cellular bases of sphingolipidoses', *Biochem Soc Trans*, 41: 1562-8.

Sato, Takashige, Yutaka Nihei, Masakazu Nagafuku, Seiichi Tagami, Rina Chin, Mitsunobu Kawamura, Shigeru Miyazaki, Makoto Suzuki, Shu-ichi Sugahara, Yasuyuki Takahashi, Atsuko Saito, Yasuyuki Igarashi, and Jin-ichi Inokuchi. 2008. 'Circulating levels of ganglioside GM3 in metabolic syndrome: A pilot study', *Obesity Research & Clinical Practice*, 2: 231-38.

Satoh, Akira, Hisashi Adachi, Makoto Tsuruta, Yuji Hirai, Akiko Hiratsuka, Mika Enomoto, Kumiko Furuki, Asuka Hino, Tomohiro Takeuchi, and Tsutomu Imaizumi. 2005. 'High Plasma Level of Remnant-Like Particle Cholesterol in the Metabolic Syndrome', *Diabetes Care*, 28: 2514-18.

Saxena, U., L. D. Witte, and I. J. Goldberg. 1989. 'Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids', *J Biol Chem*, 264: 4349-55.

Scheen, A. J. 2003. 'Pathophysiology of type 2 diabetes', *Acta Clin Belg*, 58: 335-41.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Schmelz, E. M. 2004. 'Sphingolipids in the chemoprevention of colon cancer', *Front Biosci*, 9: 2632-9.

Schmelz, E. M., D. L. Dillehay, S. K. Webb, A. Reiter, J. Adams, and A. H. Merrill, Jr. 1996. 'Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine: implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis', *Cancer Res*, 56: 4936-41.

Schmelz, Eva M. 2000. 'Dietary sphingomyelin and other sphingolipids in health and disease', *Nutrition Bulletin*, 25: 135-39.

Schönfeld, Peter, and Lech Wojtczak. 2016. 'Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective', *J Lipid Res*, 57: 943-54.

Schulze, H., and K. Sandhoff. 2014. 'Sphingolipids and lysosomal pathologies', *Biochim Biophys Acta*, 1841: 799-810.

Sciarrillo, Christina M., Nicholas A. Koemel, Patrick M. Tomko, Katherine B. Bode, and Sam R. Emerson. 2019. 'Postprandial Lipemic Responses to Various Sources of Saturated and Monounsaturated Fat in Adults', *Nutrients*, 11: 1089.

Scow, R. O., and T. Olivecrona. 1977. 'Effect of albumin on products formed from chylomicron triacylclycerol by lipoprotein lipase in vitro', *Biochim Biophys Acta*, 487: 472-86.

Shattil, S. J., and L. F. Brass. 1987. 'Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators', *J Biol Chem*, 262: 992-1000.

Shimabukuro, M., M. Higa, Y. T. Zhou, M. Y. Wang, C. B. Newgard, and R. H. Unger. 1998. 'Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression', *J Biol Chem*, 273: 32487-90.

Shimabukuro, M., Y. T. Zhou, M. Levi, and R. H. Unger. 1998. 'Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 2498-502.

Shojaee-Moradie, F., Y. Ma, S. Lou, R. Hovorka, and A. M. Umpleby. 2013. 'Prandial hypertriglyceridemia in metabolic syndrome is due to an overproduction of both chylomicron and VLDL triacylglycerol', *Diabetes*, 62: 4063-9.

Shui, Guanghou, Sin Man Lam, Jeffrey Stebbins, Jun Kusunoki, Xinrui Duan, Bowen Li, Wei Fun Cheong, Danny Soon, Ronan P. Kelly, and Markus R. Wenk. 2013. 'Polar lipid derangements in type 2 diabetes mellitus: potential pathological relevance of fatty acyl heterogeneity in sphingolipids', *Metabolomics*, 9: 786-99.

Siddiqi, S. A., S. Siddiqi, J. Mahan, K. Peggs, F. S. Gorelick, and C. M. Mansbach, 2nd. 2006. 'The identification of a novel endoplasmic reticulum to Golgi SNARE complex used by the prechylomicron transport vesicle', *J Biol Chem*, 281: 20974-82.

Siddique, M. M., Y. Li, B. Chaurasia, V. A. Kaddai, and S. A. Summers. 2015. 'Dihydroceramides: From Bit Players to Lead Actors', *J Biol Chem*, 290: 15371-9.

Siegel-Axel, D., K. Daub, P. Seizer, S. Lindemann, and M. Gawaz. 2008. 'Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis', *Cardiovasc Res*, 78: 8-17.

Silverstein, R. L., W. Li, Y. M. Park, and S. O. Rahaman. 2010. 'Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis', *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 121: 206-20.

Singh, H., A. Ye, and D. Horne. 2009. 'Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion', *Prog Lipid Res*, 48: 92-100.

Singh, Harjinder, Aiqian Ye, and Maria J. Ferrua. 2015. 'Aspects of food structures in the digestive tract', *Current Opinion in Food Science*, 3: 85-93.

Sinzinger, H., and R. Berent. 2012. 'Platelet function in the postprandial period', *Thromb J*, 10: 19.

Sloop, C. H., L. Dory, and P. S. Roheim. 1987. 'Interstitial fluid lipoproteins', *J Lipid Res*, 28: 225-37.

Small, D. M. 1991. 'The effects of glyceride structure on absorption and metabolism', *Annu Rev Nutr*, 11: 413-34.

Smith, W. L., L. J. Marnett, and D. L. DeWitt. 1991. 'Prostaglandin and thromboxane biosynthesis', *Pharmacol Ther*, 49: 153-79.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Sparks, Janet D., Colleen O'Dell, Jeffrey M. Chamberlain, and Charles E. Sparks. 2013. 'Insulin-dependent apolipoprotein B degradation is mediated by autophagy and involves class I and class III phosphatidylinositide 3-kinases', *Biochemical and biophysical research communications*, 435: 616-20.

Spectre, Galia, Claes-Göran Östenson, Nailin Li, and Paul Hjemdahl. 2012. 'Postprandial platelet activation is related to postprandial plasma insulin rather than glucose in patients with type 2 diabetes', *Diabetes*, 61: 2380-84.

Sprong, R. Corinne, Marco F. E. Hulstein, and Roelof Van der Meer. 2001. 'Bactericidal Activities of Milk Lipids', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 1298.

Ståhlman, M., H. T. Pham, M. Adiels, T. W. Mitchell, S. J. Blanksby, B. Fagerberg, K. Ekroos, and J. Borén. 2012. 'Clinical dyslipidaemia is associated with changes in the lipid composition and inflammatory properties of apolipoprotein-B-containing lipoproteins from women with type 2 diabetes', *Diabetologia*, 55: 1156-66.

Ståhlman, Marcus, Björn Fagerberg, Martin Adiels, Kim Ekroos, John M. Chapman, Anatol Kontush, and Jan Borén. 2013. 'Dyslipidemia, but not hyperglycemia and insulin resistance, is associated with marked alterations in the HDL lipidome in type 2 diabetic subjects in the DIWA cohort: Impact on small HDL particles', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831: 1609-17.

Stratford, S., K. L. Hoehn, F. Liu, and S. A. Summers. 2004. 'Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B', *J Biol Chem*, 279: 36608-15.

Subbaiah, P. V., and M. Liu. 1993. 'Role of sphingomyelin in the regulation of cholesterol esterification in the plasma lipoproteins. Inhibition of lecithin-cholesterol acyltransferase reaction', *J Biol Chem*, 268: 20156-63.

Sud M., Fahy E., Cotter D., Brown A., Dennis E., Glass C., Murphy R., Raetz C., Russell D., and Subramaniam S. 2006. 'LMSD: LIPID MAPS structure database', *Nucleic Acids Research 35, D527-32*.

Sugawara, Tatsuya. 2013. 'Digestion and Absorption of Sphingolipids as Functional Food Components', *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*, 66: 177-83.

Sui, Jing, Mingqian He, Yue Wang, Xinrui Zhao, Yizhi He, and Bingyin Shi. 2019. 'Sphingolipid metabolism in type 2 diabetes and associated cardiovascular complications', *Experimental and therapeutic medicine*, 18: 3603-14.

Svensson, J., A. Rosenquist, and L. Ohlsson. 2011. 'Postprandial lipid responses to an alpha-linolenic acid-rich oil, olive oil and butter in women: a randomized crossover trial', *Lipids Health Dis*, 10: 106.

Tada, Hayato, Atsushi Nohara, Akihiro Inazu, Hiroshi Mabuchi, and Masa-aki Kawashiri. 2019. 'Remnant lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease', *Clinica Chimica Acta*, 490: 1-5.

Tanaka, S., I. Kanazawa, and T. Sugimoto. 2018. 'Visceral fat accumulation is associated with increased plasma sphingosine-1-phosphate levels in type 2 diabetes mellitus', *Diabetes Res Clin Pract*, 143: 146-50.

Tandon, N. N., U. Kralisz, and G. A. Jamieson. 1989. 'Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion', *J Biol Chem*, 264: 7576-83.

Taskinen, M. R. 2003. 'Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice', *Diabetologia*, 46: 733-49.

Taskinen, M. R., and J. Boren. 2015. 'New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes', *Atherosclerosis*, 239: 483-95.

Taskinen, M. R., E. A. Nikkila, T. Kuusi, and K. Harmo. 1982. 'Lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins in untreated type 2 (insulin-independent) diabetes associated with obesity', *Diabetologia*, 22: 46-50.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Tholstrup, T., P. Marckmann, J. Hermansen, G. Holmer, and B. Sandstrom. 1999. 'Effect of modified dairy fat on fasting and postprandial haemostatic variables in healthy young men', *Br J Nutr*, 82: 105-13.

Tholstrup, T., G. J. Miller, A. Bysted, and B. Sandstrom. 2003. 'Effect of individual dietary fatty acids on postprandial activation of blood coagulation factor VII and fibrinolysis in healthy young men', *Am J Clin Nutr*, 77: 1125-32.

Tholstrup, T., B. Sandstrom, A. Bysted, and G. Holmer. 2001. 'Effect of 6 dietary fatty acids on the postprandial lipid profile, plasma fatty acids, lipoprotein lipase, and cholesterol ester transfer activities in healthy young men', *Am J Clin Nutr*, 73: 198-208.

Thorne, Rick F., Nizar M. Mhaidat, Kylie J. Ralston, and Gordon F. Burns. 2007. 'CD36 is a receptor for oxidized high density lipoprotein: Implications for the development of atherosclerosis', *FEBS Letters*, 581: 1227-32.

Thudichum, John Louis William. 1884. 'A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain: Based Throughout upon Original Researches', *Glasgow Medical Journal*, 22: 363-64.

Tiwari, Samata, and Shadab A. Siddiqi. 2012. 'Intracellular Trafficking and Secretion of VLDL', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32: 1079-86.

Tomarelli, R. M., B. J. Meyer, J. R. Weaber, and F. W. Bernhart. 1968. 'Effect of positional distribution on the absorption of the fatty acids of human milk and infant formulas', *J Nutr*, 95: 583-90.

Tomkin, G. H., and D. Owens. 2012. 'The chylomicron: relationship to atherosclerosis', *Int J Vasc Med*, 2012: 784536.

Tomono, S., S. Kawazu, N. Kato, T. Ono, C. Ishii, Y. Ito, M. Shimizu, M. Shimoyama, T. Nakano, and K. Nakajima. 1994. 'Uptake of remnant like particles (RLP) in diabetic patients from mouse peritoneal macrophages', *J Atheroscler Thromb*, 1: 98-102.

Tong, H., H. R. Knapp, and M. VanRollins. 1998. 'A low temperature flotation method to rapidly isolate lipoproteins from plasma', *J Lipid Res*, 39: 1696-704.

Tong, Xunliang, Pu Lv, Anna V. Mathew, Donghui Liu, Chenguang Niu, Yan Wang, Liang Ji, Jizhao Li, Zhiwei Fu, Bing Pan, Subramaniam Pennathur, Lemin Zheng, and Yining Huang. 2014. 'The compensatory enrichment of sphingosine -1- phosphate harbored on glycated high-density lipoprotein restores endothelial protective function in type 2 diabetes mellitus', *Cardiovascular diabetology*, 13: 82-82.

Tsai, Elaine C, Irl B Hirsch, John D Brunzell, and Alan Chait. 1994. 'Reduced Plasma Peroxyl Radical Trapping Capacity and Increased Susceptibility of LDL to Oxidation In Poorly Controlled IDDM', *Diabetes*, 43: 1010-14.

Tschoepe, D., E. Driesch, B. Schwippert, H. K. Nieuwenhuis, and F. A. Gries. 1995. 'Exposure of adhesion molecules on activated platelets in patients with newly diagnosed IDDM is not normalized by near-normoglycemia', *Diabetes*, 44: 890-4.

Turinsky, J., D. M. O'Sullivan, and B. P. Bayly. 1990. '1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo', *J Biol Chem*, 265: 16880-5.

Valiyaveettil, M., N. Kar, M. Z. Ashraf, T. V. Byzova, M. Febbraio, and E. A. Podrez. 2008. 'Oxidized high-density lipoprotein inhibits platelet activation and aggregation via scavenger receptor BI', *Blood*, 111: 1962-71.

Van Eck, M., M. Hoekstra, R. Out, I. S. Bos, J. K. Kruijt, R. B. Hildebrand, and T. J. Van Berkel. 2008. 'Scavenger receptor BI facilitates the metabolism of VLDL lipoproteins in vivo', *J Lipid Res*, 49: 136-46.

van Greevenbroek, M. M., and T. W. de Bruin. 1998. 'Chylomicron synthesis by intestinal cells in vitro and in vivo', *Atherosclerosis*, 141 Suppl 1: S9-16.

Vane, J. R., Y. S. Bakhle, and R. M. Botting. 1998. 'Cyclooxygenases 1 and 2', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 38: 97-120.

Veret, J., N. Coant, E. V. Berdyshev, A. Skobeleva, N. Therville, D. Bailbe, I. Gorshkova, V. Natarajan, B. Portha, and H. Le Stunff. 2011. 'Ceramide synthase 4 and de novo production of ceramides with specific N-acyl chain lengths are involved in glucolipotoxicity-induced apoptosis of INS-1 beta-cells', *Biochem J*, 438: 177-89.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Verges, B. 2005. 'New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes', *Diabetes Metab*, 31: 429-39.

———. 2009. 'Lipid modification in type 2 diabetes: the role of LDL and HDL', *Fundam Clin Pharmacol*, 23: 681-5.

———. 2015. 'Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we?', *Diabetologia*, 58: 886-99.

Vericel, E., C. Januel, M. Carreras, P. Moulin, and M. Lagarde. 2004. 'Diabetic patients without vascular complications display enhanced basal platelet activation and decreased antioxidant status', *Diabetes*, 53: 1046-51.

Vesper, H., E. M. Schmelz, M. N. Nikolova-Karakashian, D. L. Dillehay, D. V. Lynch, and A. H. Merrill, Jr. 1999. 'Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition', *J Nutr*, 129: 1239-50.

Vinik, A. I., T. Erbas, T. S. Park, R. Nolan, and G. L. Pittenger. 2001. 'Platelet dysfunction in type 2 diabetes', *Diabetes Care*, 24: 1476-85.

Voahanginirina, Randriamboavonjy. November 18th 2015. 'Mechanisms Involved in Diabetes-Associated Platelet Hyperactivation, The Non-Thrombotic Role of Platelets in Health and Disease, Steve Kerrigan and Niamh Moran.' in IntechOpen (ed.).

Vors, C., G. Pineau, L. Gabert, J. Drai, C. Louche-Pelissier, C. Defoort, D. Lairon, M. Desage, S. Danthine, S. Lambert-Porcheron, H. Vidal, M. Laville, and M. C. Michalski. 2013. 'Modulating absorption and postprandial handling of dietary fatty acids by structuring fat in the meal: a randomized crossover clinical trial', *Am J Clin Nutr*, 97: 23-36.

Vors, Cécile, Laurie Joumard-Cubizolles, Manon Lecomte, Emmanuel Combe, Lemlih Ouchchane, Jocelyne Drai, Ketsia Raynal, Florent Joffre, Laure Meiller, Mélanie Le Barz, Patrice Gaborit, Aurélie Caille, Monique Sothier, Carla Domingues-Faria, Adeline Blot, Aurélie Wauquier, Emilie Blond, Valérie Sauvinet, Geneviève Gésan-Guiziou, Jean-Pierre Bodin, Philippe Moulin, David Cheillan, Hubert Vidal, Béatrice Morio, Eddy Cotte, Françoise Morel-Laporte, Martine Laville, Annick Bernalier-Donadille, Stéphanie Lambert-Porcheron, Corinne Malpuech-Brugère, and Marie-Caroline Michalski. 2019. 'Milk polar lipids reduce lipid cardiovascular risk factors in overweight postmenopausal women: towards a gut sphingomyelin-cholesterol interplay', *Gut*: gutjnl-2018-318155.

Wang, A., C. Li, J. Liao, M. Dong, Z. Xiao, and M. Lei. 2013. 'Ceramide mediates inhibition of the Akt/eNOS pathway by high levels of glucose in human vascular endothelial cells', *J Pediatr Endocrinol Metab*, 26: 31-8.

Wang, D. D., E. Toledo, A. Hruby, B. A. Rosner, W. C. Willett, Q. Sun, C. Razquin, Y. Zheng, M. Ruiz-Canela, M. Guasch-Ferre, D. Corella, E. Gomez-Gracia, M. Fiol, R. Estruch, E. Ros, J. Lapetra, M. Fito, F. Aros, L. Serra-Majem, C. H. Lee, C. B. Clish, L. Liang, J. Salas-Salvado, M. A. Martinez-Gonzalez, and F. B. Hu. 2017. 'Plasma Ceramides, Mediterranean Diet, and Incident Cardiovascular Disease in the PREDIMED Trial (Prevencion con Dieta Mediterranea)', *Circulation*, 135: 2028-40.

Watala, C., K. Gwozdzinski, E. Pluskota, T. Pietrucha, B. Walkowiak, Z. Trojanowski, and C. S. Cierniewski. 1996. 'Diabetes mellitus alters the effect of peptide and protein ligands on membrane fluidity of blood platelets', *Thromb Haemost*, 75: 147-53.

Watt, M. J., A. C. Barnett, C. R. Bruce, S. Schenk, J. F. Horowitz, and A. J. Hoy. 2012. 'Regulation of plasma ceramide levels with fatty acid oversupply: evidence that the liver detects and secretes de novo synthesised ceramide', *Diabetologia*, 55: 2741-46.

Whitman, Stewart C., Cynthia G. Sawyez, David B. Miller, Bernard M. Wolfe, and Murray W. Huff. 1998. 'Oxidized type IV hypertriglyceridemic VLDL-remnants cause greater macrophage cholesteryl ester accumulation than oxidized LDL', *J Lipid Res*, 39: 1008-20.

Wigger, L., C. Cruciani-Guglielmacci, A. Nicolas, J. Denom, N. Fernandez, F. Fumeron, P. Marques-Vidal, A. Ktorza, W. Kramer, A. Schulte, H. Le Stunff, R. Liechti, I. Xenarios, P. Vollenweider, G. Waeber, I. Uphues, R. Roussel, C. Magnan, M. Ibberson, and B. Thorens. 2017. 'Plasma Dihydroceramides Are Diabetes Susceptibility Biomarker Candidates in Mice and Humans', *Cell Rep*, 18: 2269-79.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Williams, Kevin Jon. 2008. 'Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids', *The Journal of Clinical Investigation*, 118: 3247-59.

Winocour, Peter D. 1992. 'Platelet Abnormalities in Diabetes Mellitus', *Diabetes*, 41: 26-31.

Wraith, K. S., S. Magwenzi, A. Aburima, Y. Wen, D. Leake, and K. M. Naseem. 2013. 'Oxidized low-density lipoproteins induce rapid platelet activation and shape change through tyrosine kinase and Rho kinase-signaling pathways', *Blood*, 122: 580-9.

Xiang, B., G. Zhang, L. Stefanini, W. Bergmeier, T. K. Gartner, S. W. Whiteheart, and Z. Li. 2012. 'The Src family kinases and protein kinase C synergize to mediate Gq-dependent platelet activation', *J Biol Chem*, 287: 41277-87.

Xiao-Yun, X., C. Zhuo-Xiong, L. Min-Xiang, H. Xingxuan, E. H. Schuchman, L. Feng, X. Han-Song, and L. An-Hua. 2009. 'Ceramide mediates inhibition of the AKT/eNOS signaling pathway by palmitate in human vascular endothelial cells', *Med Sci Monit*, 15: Br254-61.

Xiao, Changting, Priska Stahel, and Gary F. Lewis. 2019. 'Regulation of Chylomicron Secretion: Focus on Post-Assembly Mechanisms', *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 7: 487-501.

Xu, Fengguo, Subramaniam Tavintharan, Chee Fang Sum, Kaing Woon, Su Chi Lim, and Choon Nam Ong. 2013. 'Metabolic Signature Shift in Type 2 Diabetes Mellitus Revealed by Mass Spectrometry-based Metabolomics', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98: E1060-E65.

Yacoub, D., J. F. Theoret, L. Villeneuve, H. Abou-Saleh, W. Mourad, B. G. Allen, and Y. Merhi. 2006. 'Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release', *J Biol Chem*, 281: 30024-35.

Yamazaki, M., S. Uchiyama, Y. Xiong, T. Nakano, T. Nakamura, and M. Iwata. 2005. 'Effect of remnant-like particle on shear-induced platelet activation and its inhibition by antiplatelet agents', *Thromb Res*, 115: 211-8.

Yancey, P. G., A. E. Bortnick, G. Kellner-Weibel, M. de la Llera-Moya, M. C. Phillips, and G. H. Rothblat. 2003. 'Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 712-9.

Yancey, P. G., M. de la Llera-Moya, S. Swarnakar, P. Monzo, S. M. Klein, M. A. Connelly, W. J. Johnson, D. L. Williams, and G. H. Rothblat. 2000. 'High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI', *J Biol Chem*, 275: 36596-604.

Yang, X. P., M. J. Amar, B. Vaisman, A. V. Bocharov, T. G. Vishnyakova, L. A. Freeman, R. J. Kurlander, A. P. Patterson, L. C. Becker, and A. T. Remaley. 2013. 'Scavenger receptor-BI is a receptor for lipoprotein(a)', *J Lipid Res*, 54: 2450-7.

Yatomi, Y., S. Yamamura, F. Ruan, and Y. Igarashi. 1997. 'Sphingosine 1-phosphate induces platelet activation through an extracellular action and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid', *J Biol Chem*, 272: 5291-7.

Yli-Jokipii, K. M., U. S. Schwab, R. L. Tahvonen, J. P. Kurvinen, H. M. Mykkanen, and H. P. Kallio. 2003. 'Chylomicron and VLDL TAG structures and postprandial lipid response induced by lard and modified lard', *Lipids*, 38: 693-703.

Yun, Seong-Hoon, Eun-Hye Sim, Ri-Young Goh, Joo-In Park, and Jin-Yeong Han. 2016. 'Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers', *BioMed research international*, 2016: 9060143-43.

Yunoki, Keita, Takuya Ogawa, Jisaburo Ono, Rumiko Miyashita, Kazuhiko Aida, Yuji Oda, and Masao Ohnishi. 2008. 'Analysis of Sphingolipid Classes and Their Contents in Meals', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72: 222-25.

Zeng, Sha-Sha, Fan Lu, Yu Zhang, Jian-Lin Du, Song-Bai Deng, and Qiang She. 2018. 'The effects of sphingosine-1-phosphate (S1P) and CD69 on the pathogenesis of type 2 diabetes complicated by coronary heart disease', *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 9: 9621-29.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Zheng, L., B. Nukuna, M. L. Brennan, M. Sun, M. Goormastic, M. Settle, D. Schmitt, X. Fu, L. Thomson, P. L. Fox, H. Ischiropoulos, J. D. Smith, M. Kinter, and S. L. Hazen. 2004. 'Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease', *J Clin Invest*, 114: 529-41.

Zilversmit, D. B. 1979. 'Atherogenesis: a postprandial phenomenon', *Circulation*, 60: 473-85.

Zimman, A., B. Titz, E. Komisopoulou, S. Biswas, T. G. Graeber, and E. A. Podrez. 2014. 'Phosphoproteomic analysis of platelets activated by pro-thrombotic oxidized phospholipids and thrombin', *PLoS One*, 9: e84488.

Zock, P. L., J. H. de Vries, N. J. de Fouw, and M. B. Katan. 1995. 'Positional distribution of fatty acids in dietary triglycerides: effects on fasting blood lipoprotein concentrations in humans', *Am J Clin Nutr*, 61: 48-55.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

ANNEXES

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Publié dans Diabetes and Metabolism 2020

Large Triglyceride-Rich Lipoproteins from fasting patients with Type 2 Diabetes activate platelets

Boulet Marie Michèle[1], Cheillan David[1,2], Di Filippo Mathilde[1,2], Buisson Charline[1], Michalski Marie-Caroline[1], Moulin Philippe[1,3], Calzada Catherine[1].

[1]Univ-Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM U1060, INRA U1397, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, IMBL, 69621 Villeurbanne, France.

[2]Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire Grand Est, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, 69677 Bron, France.

[3]Fédération d'endocrinologie, Maladies Métaboliques, Diabète et Nutrition, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, 69677, Bron, France.

Address for correspondence and reprint requests:

Catherine Calzada, Ph.D.

Inserm U.1060, Université de Lyon

CarMeN Laboratory

INSA Lyon-Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides

11 avenue Jean Capelle 69621 Villeurbanne, France

Tel: (33) 4 72 43 84 79

Email: catherine.calzada@insa-lyon.fr

doi: 10.1016/j.diabet.2019.03.002

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

ABSTRACT

Aim. Type 2 diabetic (T2D) patients present risk factors for atherothrombosis such as fasting hypertriglyceridemia and platelet hyperactivity. Our objective was to determine the effect of large triglyceride-rich lipoproteins (large TGRL) from fasting T2D patients on platelet aggregation and, if any, to identify the signaling pathway involved. **Methods.** Large TGRL were isolated from the plasma of 25 T2D patients by ultra-centrifugation (d<1.000). Platelets were isolated from healthy blood donors and suspended in buffer. Platelets were pre-incubated in the presence or absence of TGRL and stimulated with either collagen or thrombin. Platelet aggregation and the arachidonic acid (AA) signaling pathway were studied. **Results.** Fasting T2D large TGRL were mostly of hepatic origin (ApoB-100/ApoB-48 ratio of 42 ± 7) and were enriched in TG (TG/total ApoB ratio of 4.2 ± 0.5). They potentiated agonist-stimulated platelet aggregation (collagen: +68%, p<0.05, thrombin: +771%, p<0.05). It should be mentioned that TGRL from the plasma of healthy blood donors (n=7) had no effect on platelet aggregation. T2D large TGRL increased thromboxane B_2 (TxB_2) concentration in platelets stimulated with collagen (+34%, p<0.05) or thrombin (+37%, p<0.05) compared to platelets stimulated with one or the other agonists alone. Phosphorylation of p38 MAPK and cytosolic phospholipase A_2 ($cPLA_2$) was enhanced after incubation of platelets with T2D TGRL and thrombin (+87% and +32%, respectively, p<0.05) compared to platelets incubated with thrombin. **Conclusion.** Large TGRL from fasting T2D patients may play a role in the development of atherothrombosis by increasing platelet aggregation and activating platelet AA signaling pathway.

Keywords: *Triglyceride rich lipoproteins, platelets, type 2 diabetes, cardiovascular risk*

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

1. INTRODUCTION

Type 2 diabetes (T2D) and ischemic cardiovascular risk are highly associated and diabetic patients have a risk of ischemic coronary artery event increased by two to four fold [1]. The presence of T2D is associated with increased atherosclerotic plaque formation and eventually atherothrombosis when platelets that are already hyperactive are triggered following plaque rupture, leading to stroke or myocardial infarction [2]. It is well documented that risk factors for atherothrombosis in T2D patients include elevation of fasting plasma triglycerides, which are mostly carried by triglyceride rich lipoproteins (TGRL) including remnants from chylomicrons (CM) and very large density lipoproteins (VLDL) [3]. There is growing evidence that the increased production of large triglyceride-enriched VLDL1 and remnants particles in insulin resistant states and their prolonged presence in circulation may play a significant role in the atherothrombosis process [4]. While there are many studies about functional effects of modifications of LDL and HDL particles size, concentration and composition in diabetic patients [5-7], a direct involvement of the large triglyceride-rich lipoproteins subfraction in T2D-associated atherothrombotic events remains unclear. A direct role of TGRL has already been demonstrated in the inflammatory response of endothelial cells to cytokine stimulation and in the recruitment of monocytes on inflamed endothelial cells under shear flow [8]. However, there is currently very little data about the functional properties of TGRL on platelets compared to the numerous data regarding atherogenic functions of other particles such as LDL.

Hyperglycemia, glycemic variability and insulin resistance are also associated with altered blood platelet activation, implying a change in platelet composition and function in diabetic individuals. High plasma lipids or glucose concentrations often observed in T2D patients can cause modifications of the lipid composition of

Abbreviations: AA: arachidonic acid, BMI: body mass index, CM: chylomicrons, $cPLA_2$: cytosolic phospholipase A_2, HBD: healthy blood donors, HDL: high density lipoproteins, HTG: hypertriglyceridemia, LDL: low density lipoproteins, PRP: platelet-rich plasma, VLDL: very low density lipoproteins, TGRL: triglyceride rich lipoproteins, TG: triglycerides, T2D: type 2 diabetes, TxA_2: thromboxane A_2, TxB_2: thromboxane B_2.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

platelets, reduce their membrane fluidity and lead to protein glycation [9, 10]. Consequently, platelets from T2D patients exhibit an increased reactivity/activation [9, 11], and this even in the absence of previous vascular complications [12], as well as increased adhesion and aggregation [10].

Many studies focused on interactions between platelets and lipoproteins, especially LDL, HDL and their oxidized forms. Our group, as well as others, showed an inhibitory effect of HDL particles on platelet aggregation and a stimulating effect of oxidized LDL [13-16]. Binding of lipoproteins to the platelet receptors can have an impact on multiple agonist dependent signaling pathways essentials for platelet activation and aggregation. Among them, activation of p38 MAPK results in phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A_2 ($cPLA_2$) that catalyzes the release of arachidonic acid from membrane phospholipids. This leads to the formation of thromboxane A_2 (TxA_2) that is released and amplifies the activation of adjacent platelets promoting thrombus formation [16, 17]. To our knowledge, there are no studies on the potential effect of large TGRL from fasting T2D patients on platelet function and the mechanisms implied.

Thus, the aims of our study were to determine if large TGRL from fasting T2D patients have an effect on platelets and if so, to identify the platelet signaling pathway involved.

2. SUBJECTS AND METHODS

2.1. *T2D patients characteristics*

T2D patients were recruited at the Endocrinology, Metabolic Disease, Diabetes and Nutrition Department at the Louis Pradel Hospital (Hospices Civils de Lyon) in Bron, France and written informed consent was obtained for biobanking prior to their inclusion into the study. Blood was collected after an overnight 12 hours fast. Exclusion criteria were presence of any metabolic disease other than T2D and record of any type of cardiovascular complications.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Patients were treated with either one or a combination of oral anti-diabetic medication: 92% had metformin, 40% had sulfonylurea, 32% had gliptin, 24% had GLP-1 inhibitor and 28% had insulin therapy. A total of 72% of the patients had lipid lowering therapy: 64% had statin therapy and 8% had a combined therapy of statin and ezetimibe. Subjects in the control group were non-diabetic blood donors for which general good health status was determined by a confidential medical assessment at the Etablissement Français du Sang prior to blood donation. The study was conducted in accordance with the principles of the Helsinki declaration and medication was not discontinued for ethical reasons in the T2D patients group prior to venipuncture. **Table 1** shows study participants characteristics (n=32). The mean age was of 59.8 ± 2 years old for T2D patients and 27 ± 4 years old for controls. T2D patients mean BMI was in the obese category (31.9 ± 1.4) and lipid profiles and blood glucose variables were in the normal range since patients had an ongoing follow-up.

2.2. *Plasma biochemistry*

Measurements of ApoB-100 and ApoB-48 were performed by ELISA specific for each apolipoprotein (MABTECH, Nacka Strand, Sweden and SHIBAYAGI, Shibukawa, Gunma Prefecture, Japan, respectively). Total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) were enzymatically determined using commercial kits (ABBOTT Diagnostics) on an Architect C16000 autoanalyser (ABBOTT Diagnostics, Illinois, USA). HbA1c was determined by high-performance liquid chromatography using a Variant II Hemoglobin testing system (Bio-Rad).

2.3. *Isolation and characterization of TGRL fractions*

Blood was collected into EDTA tubes and plasma was immediately isolated by centrifugation (1500 × g, 10 min, at 4 °C). Plasma was stored in aliquots at −20 °C. Collection of the TGRL fraction was done by careful deposition of plasma under a layer of distilled water followed by ultracentrifugation at 9777 × g for 1 hour at 12°C using a Beckman Coulter Optima TLX ultracentrifuge. Top 100 µL of the floating layer corresponding to

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

TGRL with density <1.000 g/ml was collected and stored at 4°C for no longer than 2 days. Protein concentration of the fractions was measured using a modified Lowry method [18].

TGRL ApoB-48, ApoB-100, cholesterol and triglycerides concentrations were measured using the same methods as plasma samples. The hydrodynamic diameter of TGRL was measured by dynamic light scattering at 25°C with a ZetaSizer using 1.0658 as viscosity and 1.445 as refractive index and 1.330 as refractive index of the aqueous phase.

2.4. *Platelet isolation*

Venous blood was obtained from the local blood bank (Etablissement Français du Sang) on citrate-phosphate-dextrose anticoagulant (19.6 mmol/L citric acid, 89.4 mmol/L sodium citrate, 16.1 mmol/L NaH_2PO_4, 128.7 mmol/L dextrose; pH 5.6) from healthy volunteers who had not ingested any aspirin or anti-inflammatory drugs in the previous 10 days. Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation of the blood at 200 × g for 17 minutes at 20°C. PRP was collected, acidified to pH 6.4 with 0.15 M citric acid and centrifuged at 900 × g for 12 minutes at 20°C. Platelet-poor plasma (PPP) was removed and platelets were suspended in a Tyrode-HEPES buffer (pH 7.35).

2.5. *Platelet aggregation experiments*

Aggregation was measured in isolated platelets in a Chrono-log dual-channel aggregometer (Coulter, Margency, France) according to the method of Born [19]. A volume of 400 µL of platelet suspensions was preincubated for 5 minutes at 37°C in the presence or absence of different preparations of TGRL (25µg proteins/mL) and then stimulated with subthreshold concentrations of collagen (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France) or thrombin (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) with continuous stirring at 1000

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

rpm. The subthreshold concentrations of collagen or thrombin were defined as the concentrations of agonists that induced approximately less than a 20-30% increase in light transmission. The extent of platelet aggregation was expressed as percentage of change in light transmission 4 minutes after the addition of either agonist.

2.6. *Platelet thromboxane B_2 measurement*

Freshly isolated platelet suspensions were incubated at 37°C for 30 minutes in the absence or presence of TGRL (25µg proteins/mL) while being slowly agitated. Platelets were then incubated at 37°C for an hour with either collagen (0.5µg/mL) or thrombin (0.1 U/mL) while being slowly agitated before being immediately stored at -80°C until measurement. Following 3 cycles of thawing and freezing of samples for platelets lysis, TxB_2 concentrations were determined by enzyme immunoassays according to the manufacturer's recommendations (Enzo Life Sciences Inc., Villeurbanne, France).

2.7. *Western blotting analysis*

Following platelet incubation as described above and platelet lysis in the presence of anti-phosphatases and anti-proteases, proteins were denatured, electrophoresed in 12% bis-Tris or 3-8% Tris-Acetate (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% skimmed milk and incubated with either 1:2500 anti-phospho-p38 MAPK or 1:1000 anti-phospho-$cPLA_2$ polyclonal antibodies (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), washed, and incubated with 1:5000 or 1:2000 goat anti-rabbit horseradish peroxidase conjugate. Phospho-p38 MAPK (38 kDa) and phospho-$cPLA_2$ (85 kDa) were visualized by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare, Little Chalfont

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Buckinghmashire, UK), and bands were quantified by densitometry using Quantity One (Bio-Rad). Results were normalized for β-actin protein levels.

2.8. *Statistical analyses*

Data were expressed as means ± S.E.M. Normality of data distribution was assessed using d'Agostino-Pearson normality test. Paired Student's t-test was used to assess differences between platelets incubated with large TGRL and stimulated with an agonist compared to platelets stimulated with an agonist. Differences between platelets stimulated with an agonist compared to platelets alone were performed to ensure platelet functionality in response to agonists using Student's t-test as well. Differences were considered significant at $p<0.05$. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.0 (Graphpad Software, San Diego, CA).

3. RESULTS

3.1. *TGRL fractions characterization*

Lipoprotein particles recovered in the top aqueous fractions of ultracentrifuged plasma had a density lower than 1.000 g/ml. Both apoB-48 and apoB-100 were detected in the isolated fractions, indicative of the presence of CM and CM remnants containing apoB-48, as well as VLDL and their remnants containing apoB-100. Collected particles had a mean hydrodynamic diameter of 205 nm confirming that they were large. TG/total apoB and TG/total cholesterol ratios were 4-fold higher in TGRL than in plasma showing an enrichment of the particles in TG (**Table 2**).

3.2. *Effect of TGRL isolated from T2D patients on collagen-stimulated platelet aggregation and TxB_2 concentration*

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

As shown in **Figure 1A**, there was a significant increase of 68% (168 ± 22%) of collagen-stimulated platelet aggregation when platelets were preincubated with 25µg/mL T2D patients large TGRL compared with 100% for platelets incubated with subthreshold concentrations of collagen (n=25). We also determined the effect of large TGRL isolated from healthy blood donors (HBD) on platelets (n=7). There was no impact of the incubation of platelets with large TGRL from HBD prior to collagen stimulation: 102 ± 31% aggregation in platelets pre-incubated with 25µg/mL HBD TGRL and stimulated with 0.13 ± 0.02 µg/mL collagen vs 100% for platelets incubated with the same collagen concentration (**Figure 1A**). Addition of large TGRL from T2D patients or HBD without agonist stimulation did not trigger platelet aggregation on their own (not shown). To determine whether stimulating effects of large T2D TGRL on platelet aggregation were associated with an increased biosynthesis of TxA_2 produced from arachidonic acid by the cyclooxygenase pathway, concentrations of TxB_2, its stable catabolite, were measured in platelets pre-incubated with or without 25µg/mL T2D large TGRL and stimulated with 0.37 ± 0.04 µg/mL collagen (n=22). As expected, there was first a 55% increase in TxB_2 concentration when platelets where incubated with collagen ($p<0.05$), and the increase was even greater (+108% vs control platelets) when platelets were pre-incubated with T2D large TGRL and with the same collagen concentration ($p<0.05$) (**Figure 1B**).

3.3. *Effect of large TGRL isolated from T2D patients on thrombin-stimulated platelet aggregation and thromboxane B_2 concentration*

We also performed aggregation measurements on platelets pre-incubated with 25µg/mL large TGRL from T2D patients and subthreshold concentrations of thrombin compared with platelets incubated with thrombin alone. There was a 771% increase of aggregation when platelets were pre-incubated with T2D large TGRL compared to 100% for platelets stimulated with the same thrombin concentration as shown in **Figure 2A**.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Platelets pre-incubated with 25µg/mL T2D large TGRL and further stimulated with thrombin (0.1 U/ml) showed higher concentrations of TxB_2 than platelets only stimulated with thrombin ($p<0.05$) (**Figure 2B**).

3.4. *Effect of T2D large TGRL on platelet p38MAPK and cPLA$_2$*

Because TxA_2 biosynthesis requires p38 MAPK-dependent activation of $cPLA_2$, which hydrolyzes membrane phospholipids to release arachidonic acid, we measured the phosphorylation of p38 MAPK and $cPLA_2$, in platelets pre-incubated with or without 25µg/mL T2D large TGRL and thrombin (0.09 ± 0.01 U/ml). As shown in **Figure 2C** and **2D**, there was an increase of phosphorylated amounts of both enzymes with the addition of thrombin (phospho-p38MAPK: +48%, $p<0.05$, phospho-$cPLA_2$: +110%, $p<0.05$). An additional increase in phosphorylation of both enzymes was observed when platelets were pre-incubated with T2D large TGRL and thrombin compared to platelets stimulated with thrombin (phospho-p38MAPK: +87%, $p<0.05$, phospho-$cPLA_2$: +32%, $p<0.05$).

4. DISCUSSION

The presence of large TGRL in the fasting state is known as a major lipid abnormality in T2D patients; however, the potential implication of these specific particles in the development of atherothrombosis is unknown. The present study supports the presence of remaining large TGRL containing ApoB-48 and B-100 in the plasma of fasting T2D patients. Our data show for the first time that large TGRL from fasting T2D patients potentiate activation of isolated platelets when incubated with non-aggregating subthreshold concentrations of collagen or thrombin. This platelet activation is triggered through the activation of the AA signaling pathway.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Our lipoprotein fractions corresponded to ultracentrifuged fractions of the lightest density (d<1.000) and were a mixture of large lipoproteins and their remnants enriched in triglycerides. They had a mean diameter of 205 nm, which was higher than the reported values in healthy individuals of 30-80 nm for VLDL and CM remnants [20].We were able to detect and quantify ApoB-48 and ApoB-100 in plasma from fasting T2D patients, also indicative of the presence of large CM remnants and large light VLDL. These findings are in agreement with data showing that T2D patients present a higher production of large VLDL1 particles as well as a reduction of their hepatic catabolism [21, 22]. Since each triglyceride-rich particle contains only one apolipoprotein B, the ratio of TG/Total ApoB of 4.2 ± 0.5 shows the particles isolated from fasting T2D patients' plasma display an enrichment in TG, characteristic of large TGRL. Concentrations of ApoB-48 and ApoB-100 similar to ours have been reported in plasma, CM and large VLDL fractions of T2D patients [23]. The centrifugation method used for large TGRL isolation ensured that there was no contamination with smaller particles like IDL, and most probably caused a loss of the small VLDL2 subclass, allowing the collection of the largest particles. Altogether, our results regarding the presence of large TG-rich particles in fasting T2D patients are in accordance with the literature [24-27].

In this study, we chose to focus on large TGRL interactions with platelets in T2D patients since this population presents an increased risk of developing cardiovascular complications compared to non-diabetic. Indeed, in fasting healthy individuals, CM and their remnants are rapidly cleared from circulation and negligible concentrations of ApoB-48 are reported in their plasma [28-30]. These particles are unlikely to play a role in atherothrombotic events in healthy subjects [31] therefor, the relevance of studying the effect of fasting large TGRL from healthy subjects on platelets is weak. By contrast, previous studies have shown that large TGRL particles from T2D and/or HTG patients display increased residence time in the circulation, which may increase their atherogenicity and contribute to cardiovascular complications [32]. We tested also the effect of large TGRL from fasting T2D patients on platelets isolated from healthy donors and not on platelets from T2D

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

patients. Since it was already shown that platelets from T2D patients are prone to activation in a basal state, it would have been uncertain if the effects on activation and aggregation were really caused by large TGRL rather than by the dysfunction of the platelets itself.

Regarding the interaction of large TGRL with platelets, only a few studies have reported an effect of large TGRL on platelet function in various populations in the postprandial state [33-37]. It is difficult to compare these post-prandial results with ours from fasting T2D patients, since we cannot rule out that the large TGRL composition could be modified after a meal and therefore have a different impact on platelet aggregation. There are also many methodological differences between the studies that limit their comparison and the conclusions drawing. Indeed, isolation method of the large TGRL, measurement of platelet aggregation performed in whole blood, platelet-rich plasma (PRP) or washed platelets as well as the concentrations of large TGRL and agonists used to assess platelet aggregation can all have a major impact on the results. Our experiments were carried out in plasma-free platelet suspensions, which avoid the interference of plasma proteins present in PRP (such as albumin and other lipoproteins), and of other blood cells (such as erythrocytes) present in whole blood. Indeed, Yamazaki *et al*. showed that post-prandial remnant-like particles in non-diabetic individuals enhanced shear induced platelet aggregation and P-selectin expression in whole blood and suggested that ADP released from erythrocytes might have activated platelets [38]. In addition, our large TGRL fractions were isolated from fasting type 2 diabetic patients, which excludes the effect of other fatty compounds released in the post-prandial state that could potentially stimulate platelets. The T2D large TGRL fractions we tested were a mixture of apoB-48 and apoB-100 containing particles, thus it is not possible to conclude which class of lipoproteins in particular drives the stimulating effect observed on platelet activation. However, our fractions are representative of those of the large TGRL found *in-vivo* in plasma from

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

fasting T2D patients. Our results demonstrate for the first time that the aggregation response of platelets from healthy donors to physiological agonists is enhanced by large TGRL from fasting T2D patients.

This study also showed that the increased platelet activation caused by large TGRL from fasting T2D patients involved the activation of the platelet AA signaling pathway. Indeed, TxB_2 concentration as well as phosphorylated amounts of p38MAPK and $cPLA_2$ were higher following platelet incubation with the particles and stimulation by an agonist compared to agonist-stimulated platelets. Beitz *et al.* showed that VLDL from fasting patients with coronary heart disease increased platelet generation of TxA_2 in whole blood from healthy volunteers [39]. Later, Englyst *et al*. showed that incubation of PRP with high concentrations of VLDL from healthy volunteers in a post-prandial state increased collagen-stimulated platelet TxB_2 concentration when compared with platelets stimulated with collagen [35].

In conclusion, we showed that large TGRL from fasting T2D patients, containing both apoB-48 and apoB-100, have an enhancing effect on platelet aggregation *via* activation of the AA signaling pathway and might contribute to the increased atherothrombotic risk of T2D patients. Further studies about these fasting lipoproteins specific to T2D patients would be required to have a better understanding of their implication in the development of cardiovascular complications in this population. It would also be relevant to determine whether postprandial large TGRL from T2D patients or from healthy subjects activate platelets to the same extent as large TGRL from fasting T2D patients.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest related to this work to disclose.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by Inserm. We would like to thank Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation for granting a doctoral contract to Marie Michèle Boulet.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MMB, MCM, DC and CC designed the study. MMB, MDF and CB performed the experiments and collected the data. MMB and CC analyzed the data. MMB, DC, MCM, PM and CC interpreted the data. MMB and CC wrote the manuscript. DC, MCM and PM critically revised the manuscript. All co-authors read, commented and approved the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Harout Iliozier for carrying out plasma sampling and collecting biological data from recruited T2D patients' data bank at Louis Pradel Hospital. We also thank the nurse team of the department of Endocrinology, Metabolic Disease, Diabetes and Nutrition at Louis Pradel hospital for their essential collaboration with the patients' blood collection.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

REFERENCES

1. Vazzana N, Ranalli P, Cuccurullo C, and Davi G (2012) Diabetes mellitus and thrombosis. Thromb Res 129 : 371-377
2. Einarson TR, Acs A, Ludwig C, and Panton UH (2018) Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017. Cardiovasc Diabetol 17 : 83
3. Howard BV, Cowan LD, Go O, Welty TK, Robbins DC, and Lee ET (1998) Adverse effects of diabetes on multiple cardiovascular disease risk factors in women. The Strong Heart Study. Diabetes Care 21 : 1258-1265
4. Taskinen MR, and Boren J (2015) New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes. Atherosclerosis 239 : 483-495
5. Rivas-Urbina A, Benitez S, Perez A, and Sanchez-Quesada JL (2018) Modified low-density lipoproteins as biomarkers in diabetes and metabolic syndrome. Front Biosci (Landmark Ed) 23 : 1220-1240
6. Gomez Rosso L, Lhomme M, Merono T, Dellepiane A, Sorroche P, Hedjazi L, Zakiev E, Sukhorukov V, Orekhov A, Gasparri J, Chapman MJ, Brites F, and Kontush A (2017) Poor glycemic control in type 2 diabetes enhances functional and compositional alterations of small, dense HDL3c. Biochim Biophys Acta 1862 : 188-195
7. Morgantini C, Meriwether D, Baldi S, Venturi E, Pinnola S, Wagner AC, Fogelman AM, Ferrannini E, Natali A, and Reddy ST (2014) HDL lipid composition is profoundly altered in patients with type 2 diabetes and atherosclerotic vascular disease. Nutr Metab Cardiovasc Dis 24 : 594-599
8. Ting HJ, Stice JP, Schaff UY, Hui DY, Rutledge JC, Knowlton AA, Passerini AG, and Simon SI (2007) Triglyceride-rich lipoproteins prime aortic endothelium for an enhanced inflammatory response to tumor necrosis factor-alpha. Circulation research 100 : 381-390
9. Santilli F, Simeone P, Liani R, and Davi G (2015) Platelets and diabetes mellitus. Prostaglandins Other Lipid Mediat 120 : 28-39
10. Gaiz A, Mosawy S, Colson N, and Singh I (2017) Thrombotic and cardiovascular risks in type two diabetes; Role of platelet hyperactivity. Biomed Pharmacother 94 : 679-686
11. D'Angelo A, Micossi P, Mannucci PM, Garimberti B, Franchi F, and Pozza G (1984) Increased production of platelet thromboxane B2 in non-insulin-dependent diabetes. Relationship to vascular complications. Eur J Clin Invest 14 : 83-86
12. Vericel E, Januel C, Carreras M, Moulin P, and Lagarde M (2004) Diabetic patients without vascular complications display enhanced basal platelet activation and decreased antioxidant status. Diabetes 53 : 1046-1051
13. Le QH, El Alaoui M, Vericel E, Segrestin B, Soulere L, Guichardant M, Lagarde M, Moulin P, and Calzada C (2015) Glycoxidized HDL, HDL enriched with oxidized phospholipids and HDL from diabetic patients inhibit platelet function. J Clin Endocrinol Metab 100 : 2006-2014
14. Calzada C, Vericel E, Colas R, Guillot N, El Khoury G, Drai J, Sassolas A, Peretti N, Ponsin G, Lagarde M, and 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

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

15. Korporaal SJ, Relou IA, van Eck M, Strasser V, Bezemer M, Gorter G, van Berkel TJ, Nimpf J, Akkerman JW, and Lenting PJ (2004) Binding of low density lipoprotein to platelet apolipoprotein E receptor 2' results in phosphorylation of p38MAPK. J Biol Chem 279 : 52526-52534
16. Colas R, Sassolas A, Guichardant M, Cugnet-Anceau C, Moret M, Moulin P, Lagarde M, and Calzada C (2011) LDL from obese patients with the metabolic syndrome show increased lipid peroxidation and activate platelets. Diabetologia 54 : 2931-2940
17. Hackeng CM, Relou IA, Pladet MW, Gorter G, van Rijn HJ, and Akkerman JW (1999) Early platelet activation by low density lipoprotein via p38MAP kinase. Thromb Haemost 82 : 1749-1756
18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193 : 265-275
19. Born GV (1962) Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature 194 : 927-929
20. Feingold KR, and Grunfeld C (2000) Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, and Vinik A (eds) Endotext: South Dartmouth (MA)
21. Verges B (2015) Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? Diabetologia 58 : 886-899
22. Krauss RM (2004) Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care 27 : 1496-1504
23. Bozzetto L, Annuzzi G, Corte GD, Patti L, Cipriano P, Mangione A, Riccardi G, and Rivellese AA (2011) Ezetimibe beneficially influences fasting and postprandial triglyceride-rich lipoproteins in type 2 diabetes. Atherosclerosis 217 : 142-148
24. Garvey WT, Kwon S, Zheng D, Shaughnessy S, Wallace P, Hutto A, Pugh K, Jenkins AJ, Klein RL, and Liao Y (2003) Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. Diabetes 52 : 453-462
25. Carmena R (2008) High Risk of Lipoprotein Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. Revista Espanola de Cardiologia 8 : 18-24
26. Hirano T (2018) Pathophysiology of Diabetic Dyslipidemia. J Atheroscler Thromb 25 : 771-782
27. Adiels M, Boren J, Caslake MJ, Stewart P, Soro A, Westerbacka J, Wennberg B, Olofsson SO, Packard C, and Taskinen MR (2005) Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25 : 1697-1703
28. Otokozawa S, Ai M, Diffenderfer MR, Asztalos BF, Tanaka A, Lamon-Fava S, and Schaefer EJ (2009) Fasting and postprandial apolipoprotein B-48 levels in healthy, obese, and hyperlipidemic subjects. Metabolism 58 : 1536-1542
29. Sakai N, Uchida Y, Ohashi K, Hibuse T, Saika Y, Tomari Y, Kihara S, Hiraoka H, Nakamura T, Ito S, Yamashita S, and Matsuzawa Y (2003) Measurement of fasting serum apoB-48 levels in normolipidemic and hyperlipidemic subjects by ELISA. J Lipid Res 44 : 1256-1262
30. Bae JC, Han JM, Kwon S, Jee JH, Yu TY, Lee MK, and Kim JH (2016) LDL-C/apoB and HDL-C/apoA-1 ratios predict incident chronic kidney disease in a large apparently healthy cohort. Atherosclerosis 251 : 170-176

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

31. Karpe F, Olivecrona T, Hamsten A, and Hultin M (1997) Chylomicron/chylomicron remnant turnover in humans: evidence for margination of chylomicrons and poor conversion of larger to smaller chylomicron remnants. J Lipid Res 38 : 949-961
32. Tomkin GH, and Owens D (2012) The chylomicron: relationship to atherosclerosis. International journal of vascular medicine 2012 : 784536
33. Olufadi R, and Byrne CD (2006) Effects of VLDL and remnant particles on platelets. Pathophysiol Haemost Thromb 35 : 281-291
34. Orth M, Luley C, and Wieland H (1995) Effects of VLDL, chylomicrons, and chylomicron remnants on platelet aggregability. Thromb Res 79 : 297-305
35. Englyst NA, Taube JM, Aitman TJ, Baglin TP, and Byrne CD (2003) A novel role for CD36 in VLDL-enhanced platelet activation. Diabetes 52 : 1248-1255
36. Knofler R, Nakano T, Nakajima K, Takada Y, and Takada A (1995) Remnant-like lipoproteins stimulate whole blood platelet aggregation in vitro. Thromb Res 78 : 161-171
37. Pedreno J, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Badimon L, and Masana L (2000) Platelet function in patients with familial hypertriglyceridemia: evidence that platelet reactivity is modulated by apolipoprotein E content of very-low-density lipoprotein particles. Metabolism 49 : 942-949
38. Yamazaki M, Uchiyama S, Xiong Y, Nakano T, Nakamura T, and Iwata M (2005) Effect of remnant-like particle on shear-induced platelet activation and its inhibition by antiplatelet agents. Thromb Res 115 : 211-218
39. Beitz A, Nikitina NA, Giessler C, Beitz J, Masaev VP, Perova NA, and Mest HJ (1990) Modulation of TXA2 generation of platelets by human lipoproteins. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 40 : 57-61

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

TABLE 1. Clinical and biological parameters of the study participants

Characteristics	T2D	HBD
n	25	7
Age (years)	59.8 ± 2	27 ± 4[b]
BMI (kg/m^2)	31.9 ± 1.4	ND
TG (mmol/L)	1.63 ± 0.20	0.79 ± 0.14[b]
HDL-C (mmol/L)	1.06 ± 0.05	1.04 ± 0.07[b]
LDL-C (mmol/L)	2.22 ± 0.20	2.25 ± 0.27[b]
Glycemia (mmol/L)	9.0 ± 0.6	ND
HbA1c (%)	7.8 ± 0.3	ND
T2D duration (years)	**13.8 ± 2.0[a]**	**NA**

a: n=24, b: n=6
Data are presented as means ± SEM

TABLE 2. Characteristics of plasma and corresponding large TGRL fractions from T2D patients

Characteristics	Plasma	Large TGRL fractions
Hydrodynamic diameter (nm)	-	205 ± 15
ApoB-48 (mg/L)	15.2 ± 3.7[a]	0.94 ± 0.40[b]
ApoB-100 (mg/L)	1327.2 ± 126.8[a]	28.1 ± 5.2[b]
TG (mmol/L)	1.37 ± 0.16	0.16 ± 0.04
Total cholesterol (mmol/L)	3.89 ± 0.32	0.09 ± 0.01
Ratios (mg/L)		
ApoB-100/apoB-48	153.9 ± 42.0	42.4 ± 6.5
TG/total cholesterol	0.4 ± 0.04	4.0 ± 0.4
TG/total apoB	0.9 ± 0.1	4.2 ± 0.5

n=10, a: n=9, b: n=7
Data are presented as means ± SEM

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. **Collagen-stimulated platelet aggregation and thromboxane B_2 concentration are increased by large TGRL from type 2 diabetic patients.**

(A): (i) Platelets from healthy blood donors were incubated in the absence or presence of TGRL from healthy blood donors followed by stimulation with a concentration of collagen of 0.13 µg/ml ± 0.01 and agitated at 1000 rpm for 4 minutes at 37°C. Results are expressed as mean percentage of control determined by platelets stimulated with collagen and are means ± SEM of 7 healthy blood donors: NS. **(ii)** Platelets from healthy donors were incubated in the absence or presence of T2D patients large TGRL followed by stimulation with a concentration of collagen of 0.17 µg/ml ± 0.02 and agitated at 1000 rpm for 4 minutes at 37°C. Results are expressed as mean percentage of control determined by platelets stimulated with collagen and are means ± SEM of 25 patients: **p*<0.05.

(B): Platelets from healthy donors were incubated at 37°C for 30 minutes in the absence or presence of T2D large TGRL (25 µg prot/ml) and stimulated with collagen (0.37 ± 0.04 µg/ml) for 1 hour at 37°C while undergoing slow agitation. Results are expressed as mean TxB_2 concentrations in pmol/10^9 platelets ± SEM of 25 patients. Platelets + collagen *vs* platelet with vehicle: +36%, **p*<0.05. Platelets + T2D large TGRL + collagen *vs* platelets + collagen: +34%, **p*<0.05.

FIGURE 2. **Large TGRL from type 2 diabetic patients increase thrombin-stimulated platelet aggregation and thromboxane B_2 concentration via activation of the arachidonic acid signaling pathway.**

(A): Platelets from healthy donors were incubated in the absence or presence of T2D large TGRL (25 µg prot/ml) followed by stimulation with thrombin (0.013 U/ml ± 0.001) and agitated at 1000 rpm for 4 minutes Results are expressed as mean percentage of control determined by platelets stimulated with thrombin and are means ± SEM of 6 patients: **p*<0.05.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

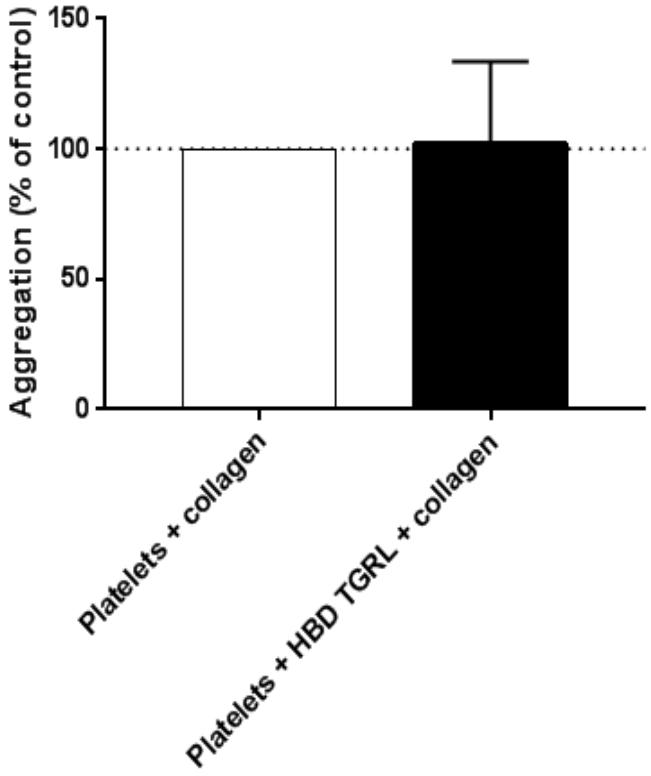
(B): Platelets from healthy donors were incubated at 37°C for 30 minutes in the absence or presence of T2D large TGRL (25 µg prot/ml) and stimulated with thrombin (0.1 U/ml) for 1 hour at 37°C while undergoing slow agitation (n=13). Results are expressed as mean TxB_2 concentrations in pmol/10^9 platelets ± SEM. Platelets + thrombin *vs* platelets alone: +1453%, **p*<0.05. Platelets + T2D large TGRL + thrombin *vs* platelets + thrombin: +37%, **p*<0.05.

(C and **D):** Platelets from healthy donors were incubated at 37°C with or without thrombin (0.09 ± 0.01 U/ml) while undergoing slow agitation for controls. Platelets were incubated with 25 µg prot/ml T2D large TGRL and thrombin under the same conditions for testing. Phosphorylation of p38MAPK and $cPLA_2$ was measured after SDS-PAGE separation and immunoblotting with anti-phospho p38 MAPK or anti-phospho $cPLA_2$ antibodies (n=6 and n=3, respectively). Results are expressed as mean percentage of control determined by platelets stimulated with thrombin **(C) phospho-p38MAPK**: Platelets + thrombin *vs* platelets alone: **p*<0.05. Platelets + T2D large TGRL + thrombin *vs* platelets + thrombin: **p*<0.05 and the representative immunoblot. **(D) phospho-$cPLA_2$**: Platelets + thrombin *vs* platelets alone: **p*<0.05. Platelets + T2D large TGRL + thrombin *vs* platelets + thrombin: **p*<0.05 and the representative immunoblot.

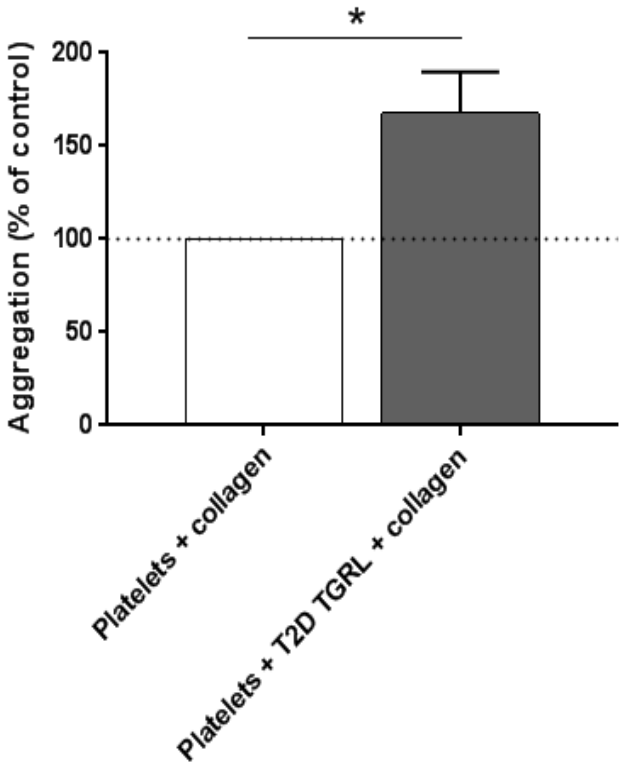
Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Figure 1A.

(i)



(ii)



Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Figure 1B.

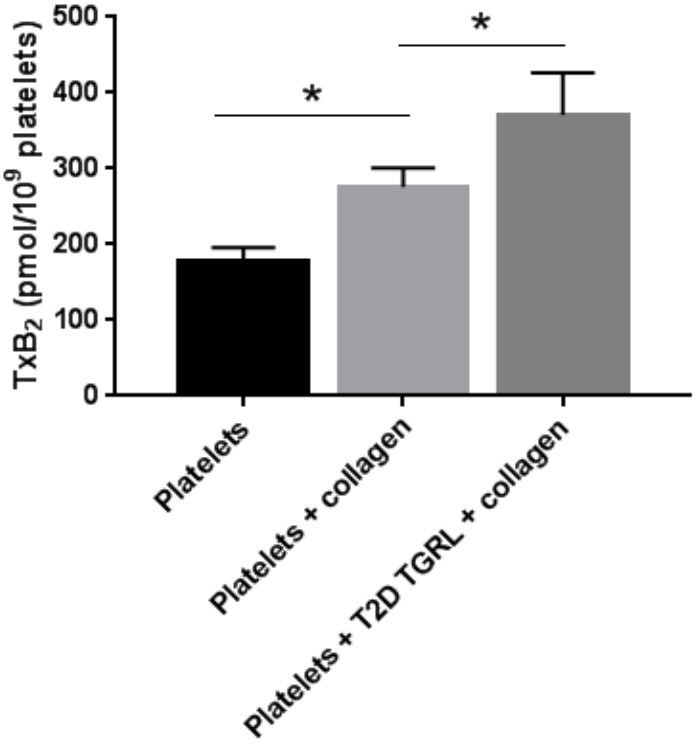
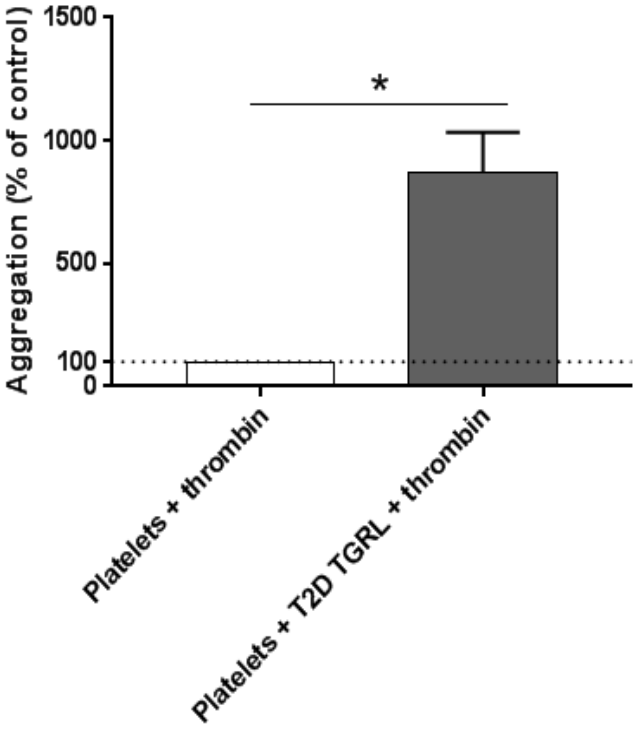
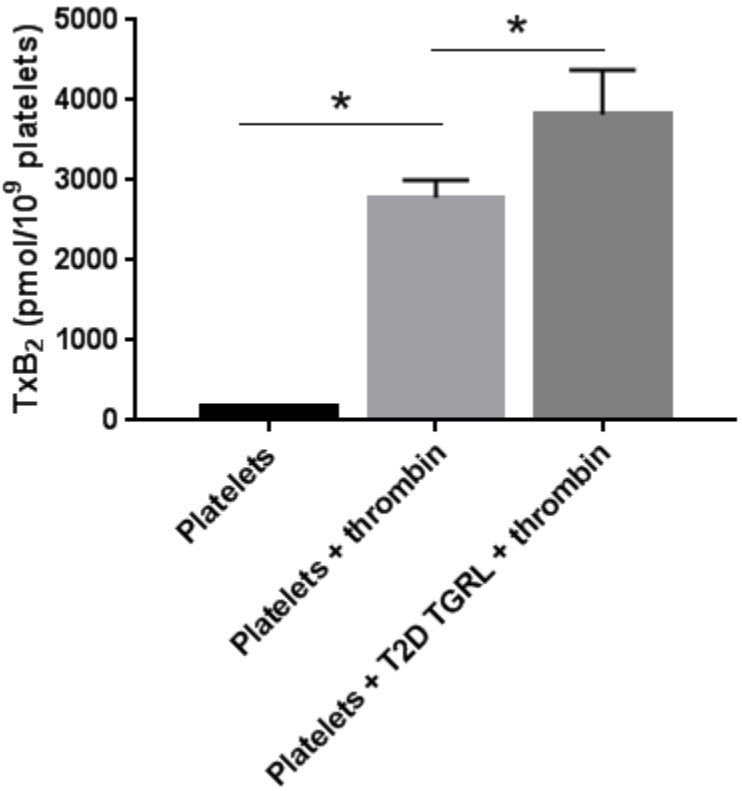


Figure 2A.



Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Figure 2B.



Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Figure 2C.

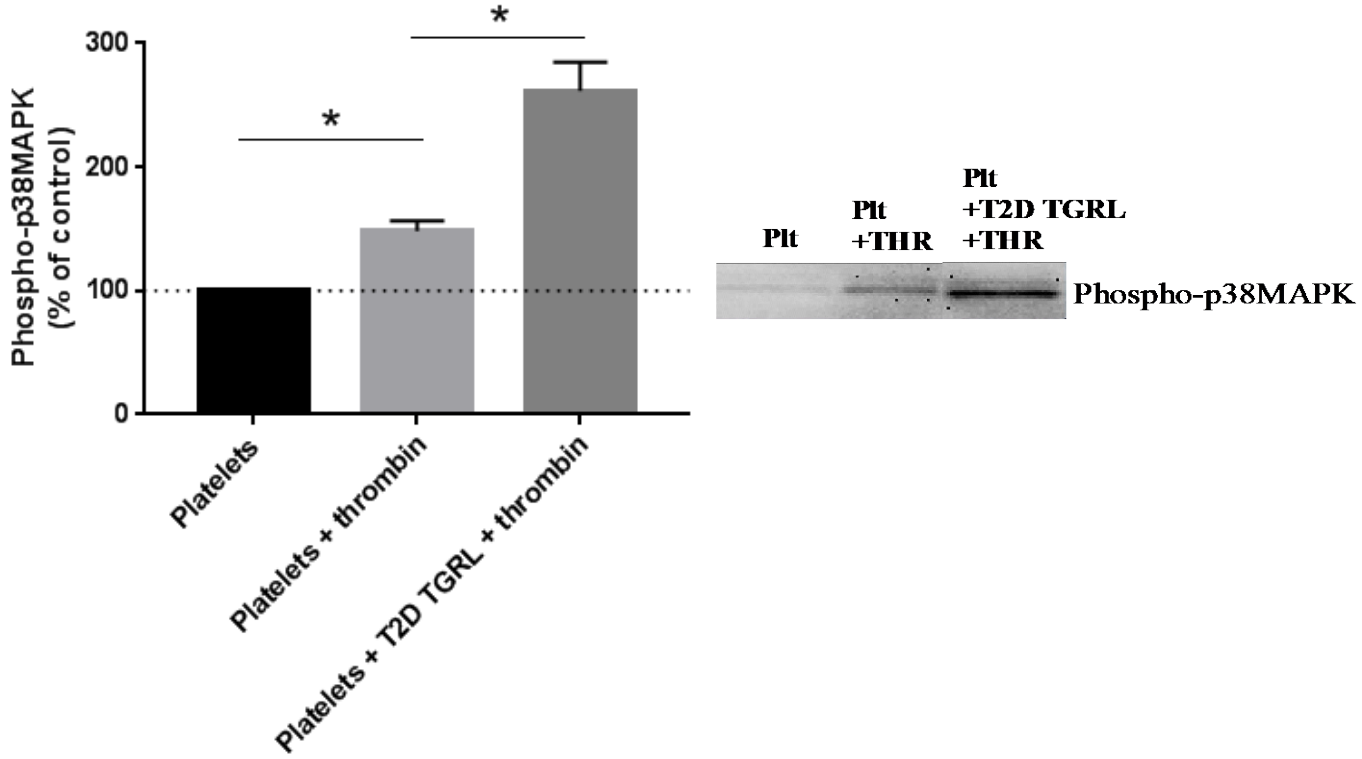
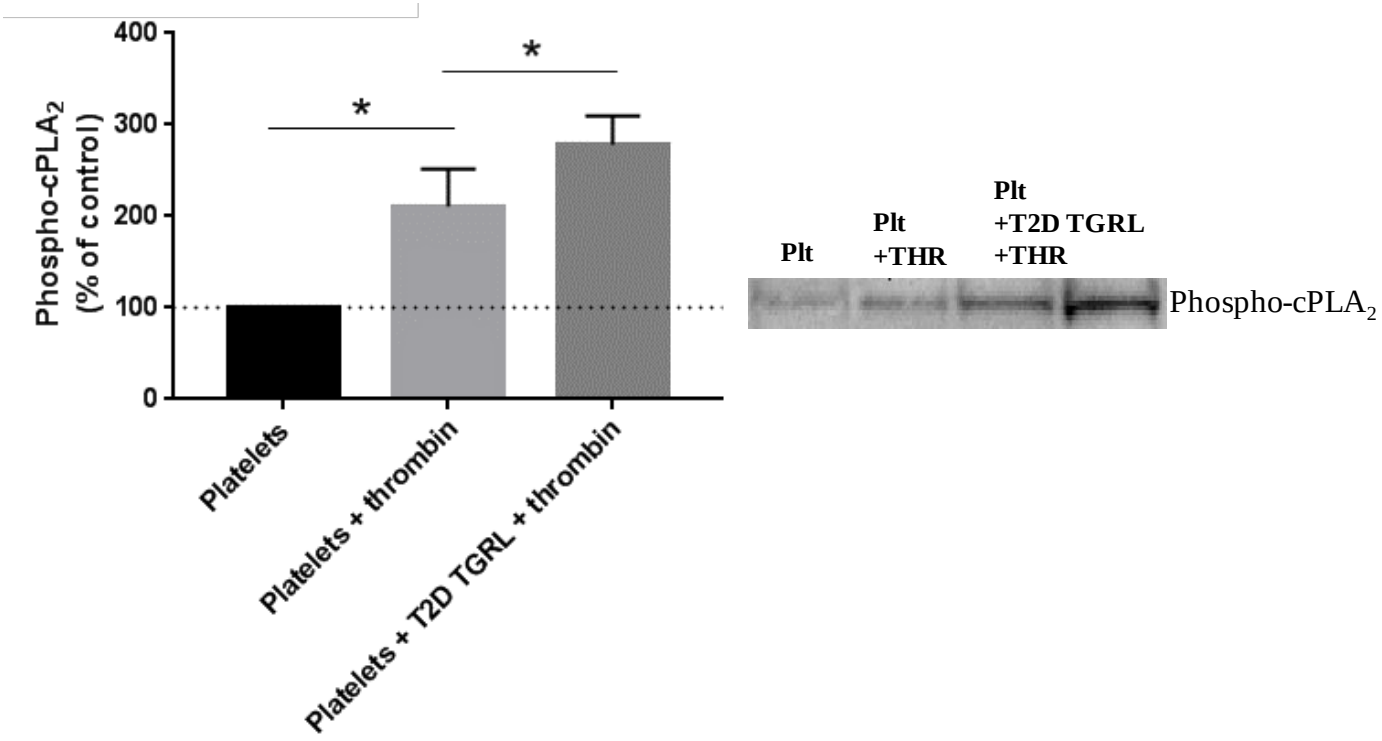


Figure 2D.



Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Publié dans Biochimie 2020

Alterations of endogenous sphingolipid metabolism in cardiometabolic diseases: towards novel therapeutic approaches

Mélanie Le Barz[a,*], Marie-Michèle Boulet[a,*], Catherine Calzada[a], David Cheillan[a,b], Marie-Caroline Michalski[a,#].

[a]Lyon University, CarMeN Laboratory, Inserm U1060, INRA U1397, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, (Lyon-Sud Medical School), Pierre-Bénite Fr-69310, France.

[b]Service Biochimie et Biologie Moléculaire Grand Est - Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, 69677 Bron, France.

*As co-first authors

[#] Corresponding author: Marie-Caroline Michalski, Laboratoire CarMeN, INRA U1397, INSERM U1060, Bâtiment CENS-ELI 2D, Hôpital Lyon Sud, 165 Chemin du Grand Revoyet 69310 Pierre-Bénite, France, Tel: (+33) 4 26 23 61 71.

E-mail addresses: melanie.le-barz@univ-lyon1.fr, marie-michele.boulet@insa-lyon.fr, catherine.calzada@insa-lyon.fr, david.cheillan@chu-lyon.fr, marie-caroline.michalski@inra.fr

doi: 10.1016/j.biochi.2019.10.003

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Highlights

- Serum and tissue SL levels are altered in obesity and metabolic diseases.
- Lipoprotein SL composition and functionality are modified in metabolic diseases.
- There are novel data about accumulation of SL in cell lipid droplets.
- Modulation of SL metabolism could be beneficial for metabolic diseases prevention.
- Dietary SL can partly reach the colon and thereby interact with the gut microbiota.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

ABSTRACT

The increasing prevalence of obesity and metabolic diseases is a worldwide public health concern, and the advent of new analytical technologies has made it possible to highlight the involvement of some molecules, such as sphingolipids (SL), in their pathophysiology. SL are constituents of cell membranes, lipoproteins and lipid droplets (LD), and are now considered as bioactive molecules. Indeed, growing evidence suggests that SL, characterized by diverse families and species, could represent one of the main regulators of lipid metabolism. There is an increasing amount of data reporting that plasma SL profile is altered in metabolic diseases. However, less is known about SL metabolism dysfunction in cells and tissues and how it may impact the lipoprotein metabolism, its functionality and composition. In cardiometabolic pathologies, the link between serum SL concentrations and alterations of their metabolism in various organs and LD is still unclear. Pharmacological approaches have been developed in order to activate or inhibit specific key enzymes of the SL metabolism, and to positively modulate SL profile or related metabolic pathways. Nevertheless, little is known about the long-term impact of such approaches in humans and the current literature still focuses on the decomposition of the different parts of this complex system rather than performing an integrated analysis of the whole SL metabolism. In addition, since SL can be provided from exogenous sources, it is also of interest to evaluate their impact on the homeostasis of endogenous SL metabolism, which could be beneficial in prevention or treatment of obesity and related metabolic disorders.

Keywords: *Obesity, metabolic diseases, sphingolipids, lipoproteins, lipid droplets*

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

1. Introduction

Worldwide incidence of obesity has increased exponentially in the last few years as well as the prevalence of low-grade inflammation associated disorders [1] such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [2], type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular diseases (CVD) [3]. Aside from traditional biomarkers of metabolic risks, progress in analytical technologies in the last decades have facilitated the study of other molecules, especially bioactive lipids such as phospholipids and sphingolipids (SL). SL are known as ubiquitous molecules that are important components of cell membranes and lipoproteins [4]. They are involved in many biological processes starting with cell growth, senescence and death as well as cell adhesion and migration, but also inflammation, immune responses and nutrient uptake, among others [5]. It is also starting to emerge that SL could be involved in the pathophysiology of obesity and cardiometabolic risk factors. Indeed, changes in plasma or serum SL concentrations are associated with metabolic disorders as well as accumulation of some SL species in insulin-sensitive tissues, such as the liver [6]. SL could also be involved in the accumulation of an emerging cell organelle that is the lipid droplets (LD), especially in non-adipose tissue [7]. In addition to the endogenous SL metabolism, exogenous SL present in the diet also need to be considered, especially regarding their potential effect on the intestine and the gut microbiota - other important actors of metabolic homeostasis [8]. Another non-negligible aspect is that the liver and the gut are organs that are largely involved in and impacted by metabolic abnormalities. Considering that they are the producers of lipoproteins that carry a great amount of both endogenous and exogenous SL, it is also highly relevant to study the possible effect of an altered SL metabolism on these particles. Indeed, lipoproteins are already known to be highly involved in various metabolic diseases from T2D to atherosclerosis and coronary heart disease but the impact of their SL composition remains largely unknown.

In this review, we will describe the involvement of SL in different pathophysiological mechanisms related to lipid metabolism that could be reflected on systemic SL concentrations and associated with the development of metabolic diseases.

2. Overview of sphingolipids metabolism

SL represent a class of bioactive lipids that was first identified in the 19th century [9]. Interest for these particular lipids has markedly increased with the study of genetic SL disorders and the identification of complex SL such as cerebrosides or gangliosides. Many elegant reviews have already detailed SL metabolism to which the interested reader can refer [10–13], therefore this section will provide a summary of the major pathways.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

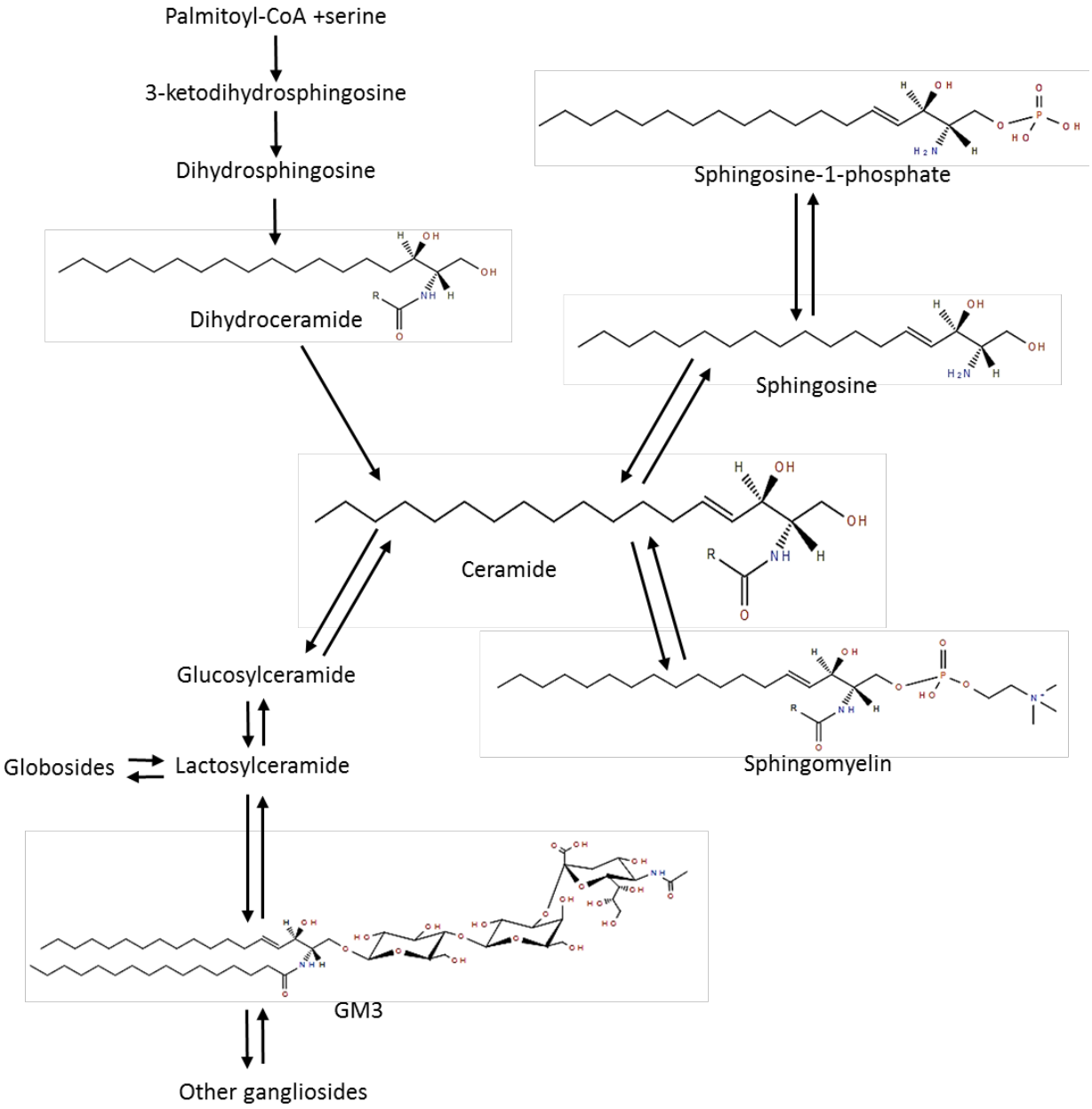


Figure 1. Summarized partial pathway of sphingolipid biosynthesis

In this partial metabolic pathway of SL synthesis, general structures of the classes discussed in this review are represented, taking into account that each SL class contains numerous molecular species according to the length of their acyl chain. This Figure contains molecular structures created using the Lipid Structure Drawing Tools from LIPID MAPS online tools for lipid research. Fahy E, Sud M, Cotter D and Subramaniam S. Nucleic Acids Research 35, W606-12 (2007).

Briefly, the biosynthesis of SL starts in the endoplasmic reticulum from the condensation of serine and palmitoyl-CoA, and leads to the production of ceramides (Cer) by the introduction of a double bond into its precursor dihydroceramide [14]. Cer represent the basic structure of SL with the presence of a sphingosine

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

base and an acyl chain that can be of various lengths. Each SL class present numerous molecular species according to the number of carbon of this acyl chain (C16, C18, C20, etc.). Sphingomyelin (SM) can be synthetized from Cer by condensation of phosphocholine to a Cer. Of note, SM is also classified as a phospholipid. Finally, more complex molecules comprised in the glycosphingolipid family, such as GM3 ganglioside for example, are constituted of a Cer backbone and various type and number of sugar molecules (**Figure 1**).

In addition to *de novo* synthesis, the generation of Cer from hydrolysis of SM or breakdown of glycosphingolipids can also lead to its conversion into other SL classes or bioactive derivatives), which makes Cer a central molecule of the SL biosynthesis pathway. Cer can be converted back to sphingosine for this base to be recycled into SL synthesis again or phosphorylated to produce sphingosine-1-phosphate (S1P) [15]. SL metabolism is a highly regulated process that can lead to thousands of molecules for which the functions will vary according to their molecular composition and structure (see further details in [16,17,15,18].

3. Plasma alterations of SL metabolism in metabolic diseases

In the bloodstream, SL are present in the outer cell membranes, in lipoproteins and bound to albumin as well. In healthy individuals, plasma SL are mostly represented by SM (87% of total SL) [4], whereas glycosphingolipids contribute to 9-10% and Cer to 3% of total plasma SL. With few exceptions, detected SL mainly belong to C16, C18 and C24 species in human plasma and tissues [19]. SM is co-localized with cholesterol in cell membranes and all classes of lipoproteins [20] while Cer are equally distributed between ApoB-containing lipoproteins and HDL [19] (Table 1). Glycosphingolipids, mostly glucosylceramides and lactosylceramides, are also present on VLDL, LDL and HDL. Another SL found in plasma and carried in part by lipoproteins is S1P, which is the most abundant SL in HDL [4].

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Table 1. General classification of lipoproteins and distribution of major circulating lipid species.

	VLDL	**LDL**	**HDL**	Total	*Ref.*
Density (g/ml)	0.93-1.006	1.019-1.063	1.063-1.210		[21]
Distribution of major lipid content (% of total content carried by circulating lipoproteins)					
TG	66	26	7	100	[22]
Cholesterol esters	20	57	23	100	[22]
Unesterified cholesterol	7	69	24	100	[22]
Phospholipids	7	31	62	100	[23]
Distribution of minor lipid content (% of total content carried by circulating lipoproteins)					
Phosphatidylcholine	5-8	30-39	56-62	100	[22,23]
Sphingomyelin	3-7	33-50	43-64	100	[19,23]
Ceramides	9-16	40-60	24-51	100	[19,23]
S1P*	1-2	4-6	90-95	100	[19,24]
Glycosphingolipids	6-9	42-50	42-52	100	[24]
Protein composition					
Apolipoproteins	Apo B-100, Apo E, Apo C	Apo B-100	Apo A-I, A-II, Apo C, Apo E		[21]

***An important part of total plasma S1P is carried by albumin (30-40%)**

3. 1. Ceramides and their precursors

In obesity and cardiometabolic diseases, many organs are affected and thus involved in the development of IR and low-grade inflammation, and this can be reflected in systemic circulation [25]. Among SL classes that could be potential biomarkers for metabolic diseases, Cer are the most studied. It is now well established that Cer metabolism is altered in the context of T2D. Many studies have shown an elevation of circulating Cer [26,27] and a positive association with insulin resistance [28] as well as a role of Cer in β-cell apoptosis [29]. Higher plasma concentrations of Cer, as compared to healthy individuals, have even been reported in obese female children and adolescents with T2D and it was correlated with a deleterious metabolic profile [30]. Cer increased plasma levels have also been described in other metabolic diseases or cardiovascular risk factors, such as NAFLD [31], visceral obesity [32,33], atherosclerosis [34], and are a predictor of cardiovascular mortality [35]. In addition, Peterson *et al*. [36] recently demonstrated that a decreased Cer C24:0/C16:0 ratio could be a more potent predictive marker of coronary heart disease incidence and all-cause mortality, than alterations in specific Cer species.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

There is also an increasing interest for other SL classes in the context of metabolic diseases, especially Cer precursors such as dihydroceramides. Indeed, very recent studies suggest that dihydroceramides are not inert molecules as it was first thought, but are also involved in metabolic disturbances [14]. Plasma level of dihydroceramides could even be considered as a potential predictive biomarkers for the development of T2D [37]. For instance, two different clinical studies corroborated results obtained in mouse models by showing a specific increase in plasma long-chain fatty acids (FA)-containing dihydroceramides in individuals who develop metabolic disorders related to obesity and T2D [37,38]. *In vitro* experiments also demonstrated that the accumulation of dihydroceramides inhibits autophagy-related pathways, which in turn could lead to fibrosis and thus plays a role in the progression of NAFLD [39]. It was also revealed that levels of sphingosine and sphinganine are elevated in plasma of patients suffering from T2D, compared to healthy individuals [40]. Regarding S1P, its involvement in cardiometabolic diseases is quite controversial; starting with the fact that a large part (50-70 %) of S1P in circulation is comprised in HDL, which are particles known to have anti-atherogenic effect. However, low S1P concentrations in HDL from T2D or coronary artery disease patients are associated with HDL dysfunctions [41,42]. In the development of atherosclerosis, it is not really defined yet if S1P has beneficial or deleterious effects [43]. Indeed, a recent review from Kurano and Yatomi highlighted that S1P bound to HDL via apolipoprotein M displays atheroprotective properties, while when bound to albumin it exerts both beneficial and harmful effects [44]. Same as for the involvement of S1P in T2D and obesity since it has been reported that S1P plasma levels are increased in these two populations compared to healthy individuals [45,46] are associated with visceral fat accumulation in T2D patients [47]. On the other hand, S1P is thought to have favorable effects in models of lipotoxicity and hyperlipemia as well as for β-cell survival, among others [48].

Interestingly, several studies also reported that serine–palmitoyl–CoA transferase (SPT), a rate-limiting enzyme involved in *de novo* SL synthesis which basically conjugates L-serine and palmitoyl-CoA, is also able to conjugates other amino acid substrates such as L-alanine producing 1-deoxysphingolipids [49–51]. Recent papers demonstrated that this specific SL class could be used as potential predictor of metabolic disorders, such as T2D, since 1-deoxysphingolipids accumulate in systemic circulation and cells, exerting toxic and pathological effects [51–53].

3. 2. Complex sphingolipids

In addition to Cer precursors, complex SL have been of interest when studying cardiometabolic diseases physiopathology. Altered SM plasma levels have also been observed in T2D as well as coronary artery disease and obesity [34,54–56]. Indeed, SM level is considered as an independent risk factor for coronary heart disease [34,57]. Regarding the development of insulin resistance, growing evidence suggests that

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

GM3 is also involved. In fact, the first data about GM3 and insulin response were reported in the early 1990 and a negative correlation was established between GM3 concentrations and insulin responsiveness in leukemic cell lines [58]. Almost two decades later, Sato *et al*. analyzed GM3 concentrations in individuals with hyperlipemia, T2D patients with or without hyperlipemia and controls. They observed that serum GM3 levels were elevated in all groups compared to controls [59]. Lastly, a recent study confirmed a higher concentrations of some GM3 molecular species in subjects with visceral fat accumulation and metabolic disease and showed that hydroxylated GM3 species concentrations in human serum were also increased and correlated with risk factors of cardiometabolic diseases [60].

When examining the relation between SL plasma levels and metabolic diseases, it is hard to draw a clear line in the associations between all the different SL classes and each metabolic disorder. Moreover, it is now necessary to have a better understanding of how SL metabolism is altered in tissues of interest and at the cellular level, notably in LD.

4. Modulation of cholesterol and lipid metabolism by sphingolipids in the gut-liver axis

Growing evidence supports that the gut-liver axis plays an essential role in nutrient absorption and NAFLD development [61,62]. Indeed, the development of metabolic disorders has been widely associated with impaired gut homeostasis, gut microbiota dysbiosis and increased intestinal permeability [63]. Recent reviews described how SL modulate metabolic and inflammatory pathways in the gastrointestinal tract [64,65]. However, once ingested, metabolites produced after digestion by enzymes from host and microbial cells present in the gut, reach the liver through the portal vein and could also exert some physiological or pathological effects.

4. 1. Interplay between intestinal absorption of cholesterol and sphingomyelin

In metabolic diseases, lipid metabolism is altered at several levels from intestinal absorption to endogenous biosynthesis and lipid species distribution, and could participate to the worsening of cardiometabolic disorders. In obese patients with T2D, intestinal absorption of cholesterol is lower than in healthy subjects [66], whereas in normal metabolic conditions, there is already an inter-individual variation of 30 to 80% [67]. Moreover, in metabolic diseases, an altered bile acid profile was associated with hypercholesterolemia and defects in pathways related to lipid metabolism [68]. SL are complex molecules that cannot passively diffuse into enterocytes. Consequently, they need to be hydrolyzed by bile acids and enzymes at the surface of epithelial cells and in the lumen [69]. Once absorbed, SL influence the enterocyte lipid flux: SM is hydrolyzed to sphingosine which is incorporated into triglycerides (TG) after

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

conversion and acetylation, and then reach the lymphatic circulation in chylomicrons [70]. Agren *et al*. demonstrated that postprandial lipid profiles and lipoprotein composition depend on the efficiency of cholesterol absorption, which was determined according to a higher baseline serum cholestenol/cholesterol ratio [71]. In fact, compared to low cholesterol absorbers, high cholesterol absorption efficiency results in a higher concentration of triglycerides, cholesterol and SM in VLDL during the postprandial phase, and a higher free cholesterol/PC ratio in chylomicrons [71]. In rats, dietary supplementation of a mixture of SM and cholesterol demonstrated a mutual inhibitory effect on their absorption, inducing an increased presence of Cer in the colon [72]. In Caco-2 cells, the incorporation of SM in apical bile salt-cholesterol micelles inhibits cholesterol absorption, which could be explained by the decrease of ABC-A1 and -G1 gene expression [73].

4. 2. Ceramide metabolism in liver and its relation with metabolic diseases

In metabolic diseases, excess of lipids (*e.g*. saturated FA) is reflected in the systemic circulation but also in tissues such as liver, which in turn leads to *de novo* Cer synthesis [26]. Liver plays a critical role in the organism homeostasis since it directly participates to detoxification as well as metabolism, biosynthesis and storage. In addition, this important organ has the capacity to repair itself and regenerate. A recent review by Nojima *et al*. focused on the role of SL in both liver injury and regeneration [74]. Moreover, several *in vivo* and clinical studies reported that the impact of SL on the liver could be linked to their acyl-chain length and composition [75–77]. Indeed, Montgomery *et al*. compared the hepatic profile of Cer and SM in 5 different strains of mice submitted to a high-fat diet. In the 4 mice strains that developed glucose intolerance, the results revealed a marked decrease of very long chain Cer and SM species (C>22) and a significant increase of C16-C22 Cer and SM species in the liver [77]. Interestingly, it was correlated with the specific decrease of Cer synthase 2 (CerS2) expression and activity. Park *et al.* demonstrated that in CerS2 null mice, unable to synthetize Cer C22-C24, the activity of key proteins involved in FA uptake was dysregulated in favor of an increase of CD36 [76]. In clinical studies, a similar pattern was reported with a significant decrease of serum Cer C24 in patients suffering from cirrhosis [75]. In addition, Grammatikos *et al*. also reported an upregulation of serum acid sphingomyelinase in NAFLD patients, which was also associated with an increase of circulating sphingosine and dihydroceramides species, correlated to elevated cholesterol levels [78]. Another possible pathway involves bile acids which plays an important role in the enterohepatic pathway of cholesterol and thus in lipid metabolism. It has been demonstrated that some toxic bile acids (*e.g*. chenodeoxycholic acid, deoxycholic acid, lithocholic acid) are endogenous activators of farnesoid X receptors (FXR) involved in glucose intolerance and insulin resistance through hepatic *de novo* Cer production [79,80]. Besides, elevated plasma concentration of GM3 has been

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

associated with metabolic diseases [59,60], however Choi *et al.* reported that plasma membrane associated GM3 inhibits the secretion of TG-enriched ApoB containing lipoproteins (*i.e*. VLDL and LDL) and could contribute to lower the development of atherosclerosis [81].

As mentioned above, when evaluating the role of the gut-liver axis, it is also important to consider the gut microbiota as an additional metabolically active "organ", whose composition and functions are altered in metabolic diseases [82–84]. Thus, the composition of the human gut microbiota may also have an impact on circulating SL, since it has been shown that it contains SL-producing bacteria. Same as for mammalian SL, bacterial SL may be detected and used by intestinal endothelial cells and then potentially modulate lipid metabolism [69].

5. Involvement of sphingolipids in lipoprotein metabolism and cell lipid droplets

Another major aspect to consider when addressing the question of SL systemic alterations in metabolic diseases is their important role in lipid and lipoprotein synthesis and regulation. Among many others, Meikle and Summers recently published a state of the art about the involvement of dyslipidemia, particularly related to SL metabolism disruptions, in metabolic disorders associated with obesity [85]. Indeed, SL can modulate genes involved in lipid biosynthesis in mice [86] and their involvement in cholesterol transport has also been demonstrated [87]. In addition, there is a growing interest for the lipoprotein composition in SL that can be modified in metabolic diseases. The development of mass spectrometry-based lipidomics also allowed to identify and quantify many lipid molecular species in lipoproteins [24,88–91]. These particles have an important role in the transport of endogenous and dietary lipids including SL. They are a complex of lipids and proteins all assembled following the same pattern with a central hydrophobic core of TG and cholesterol esters that is surrounded by apolipoproteins phospholipids, SL and unesterified cholesterol forming a membrane and contributing to maintaining the shape of the particles [21,92] (**Table 1**).

5. 1. Sphingolipids in lipoprotein composition and function

Modifications in the lipidome of some lipoprotein classes were observed in cardiovascular diseases and T2D [93,94]. This modified lipid composition could affect lipoprotein clearance from plasma and certain enzymes related to lipoprotein metabolism. A study by Redgrave *et al*. where rats were injected with chylomicron-like TG emulsions showed that when the emulsion was stabilized with 100% SM or 50% SM combined with egg yolk phosphatidylcholine, the clearance of CM emulsions from plasma was negligible and very slow, respectively [95]. In comparison, when the emulsion was stabilized with egg yolk

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

phosphatidylcholine alone, clearance was much more important. This study also showed that the liver uptake of triolein and cholesteryl oleate was significantly reduced when the emulsion contained 50% and 100% SM compared to dioleoyl phosphatidylcholine-enriched emulsions [95]. These results were supported by Arimoto *et al*. who also showed delayed clearance of triolein-SM (2:1 molar ratio) lipid emulsion injected in rats. In addition, the incorporation of SM to the emulsion reduced the binding of ApoE, ApoC-II and ApoC-III to the surface lipids of the emulsion [96], which can have functional consequences that would deserve to be investigated.

Modifications in the lipid composition of lipoproteins are of interest since they could potentially affect the functionality of the particles, especially in the context of metabolic diseases. Most studies have focused on LDL and HDL particles, since it is well established that the first have atherogenic properties and the second are cardioprotective. Ståhlman *et al*. found that major classes of surface lipids including SM and Cer were diminished in HDL from dyslipidemic insulin resistant and T2D women [97]. Interestingly, Denimal *et al*. observed reductions in SM and d18:1 S1P, but not Cer concentrations in HDL2 and HDL3 of patients with metabolic syndrome without insulin resistance [93]. This suggest that HDL composition is already altered in the presence of metabolic syndrome, but insulin resistance and T2D could alter other specific classes of SL in these particles. Boon *et al*. observed an elevation in Cer content of LDL from T2D individuals compared to lean non-diabetic subjects that was reversed with weight loss [98]. The lipid composition of LDL particles can also affect their aggregability, which is an important aspect in the development of atherosclerosis and cardiovascular complications. A recent study showed that there is a strong association between the surface lipid LDL composition and their susceptibility to aggregate. LDL prone to aggregation are enriched in SM and Cer and contained less lysoPC and PC [99]. On a general point of view, changes of SL composition in lipoproteins are mostly observed in the representation of each SL class rather than in the variation of particular molecular species and this particular question has to be explored.

5. 2. Sphingolipids in cell lipid droplets

In addition to lipoproteins, it is now important to consider the role of LD in cells which are recognized as dynamic organelles also involved in lipid metabolism as well as many cellular mechanisms [100]. LD are present in almost all type of cells and tissues and their excessive accumulation in various non-adipose tissues has been associated with many metabolic alterations and diseases. Interestingly, Deevska *et al*. have recently described the importance of SL in LD biogenesis and metabolism in a very elegant review [7]. In addition to cell membranes, SL also are found in very low concentrations in LD with cholesterol and TG. In fact, it is now well-admitted that under obesogenic conditions, ectopic fat accumulation in metabolic tissues such as liver or skeletal muscle causes lipotoxicity and is associated with the development of insulin

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

resistance [26,101], meaning that SL in LD could also play a role in lipid metabolism at the tissue level. Recently, Senkal *et al*. elegantly demonstrated the generation of acylceramide from ceramide in LD of HCT116 cell lines and showed that in the liver of mice fed an oleate-enriched high fat diet, acylceramides were generated from Cer and specifically accumulated in LD and this was accompanied by steatosis development [102]. Nevertheless, in the current literature, there is very few data about SL and LD, since SL profiles and related metabolic pathways are mostly studied at the whole tissue level and not specifically in LD or cell membranes.

6. Towards the prevention of metabolic diseases by the modulation of sphingolipid metabolism

Despite the reported deleterious role of some SL, particularly Cer, it is important to keep in mind that it is not the presence of SL itself that could be harmful for metabolism, but rather the modulation of the quantity and length of the acyl chain of the represented species [103]. In this context, several approaches have been developed in order to positively modify the SL metabolism, with the aim of reducing metabolic disorders.

6. 1. Modulation of enzymes of the sphingolipid metabolic pathway

Many studies reported that modulating the activity of key enzymes involved in SL metabolism – such as ceramidase or CerS activity – via pharmacological or dietary approaches, could have beneficial impacts on SL metabolism and thus improve metabolic disorders induced in a context of obesity or T2D [104,105]. For instance, the specific knock-down of CerS6 in an obese insulin resistant mice model induced an efficient reduction of Cer C16:0 concentration in plasma and hepatic tissue which was associated with an improvement of glucose tolerance and insulin sensitivity [33]. Xia *et al*. developed a transgenic model of mice able to inducibly overexpress acid ceramidase in the liver and demonstrated that activating this pathway prevented hepatic steatosis and insulin sensitivity, associated with a lower hepatic Cer concentration [106]. In ApoE-KO mice, it has been demonstrated that the oral administration of myriocin, a specific inhibitor of SPT, induced a significant decrease of plasma total cholesterol, SM concentrations and atherosclerotic lesions, combined with an increase in plasma HDL cholesterol [107,108]. Another possible pathway involves adiponectin which acts as a regulator of insulin sensitivity and induces ceramidase activity through its receptors AdipoR1/R2, both depending on AMPK, an important kinase involved in energy metabolism and activated by the increase of S1P [109]. The authors demonstrated that the decrease of Cer via the activation of AdipoR1/R2 in hepatocytes or adipocytes (especially Cer C16:0 but also the other Cer species according to the activated receptor isoform) was associated with the improvement of hepatic steatosis, glucose tolerance and insulin sensitivity in mice fed with a high-fat diet

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

[109]. Another potential mechanism concerns the suppression of the intestinal FXR signaling, which in turn induced a decrease of plasma Cer by reducing the expression of genes of Cer synthesis, thus leading to a decrease of hepatic gluconeogenesis [80].

However, in the literature, both *in vivo* and clinical studies do not reflect the complexity of the SL metabolism since the authors selected and analyzed specific classes of SL or pathways without considering the impact of their intervention on the overall metabolism. In fact, since SL classes and species are differentially distributed among cells, tissues and systemic circulation, it is quite reductive to only describe the modulation of few SL species in one or two compartments of the individual without keeping in mind that the intervention could have an effect in SL profile in other metabolic tissues, specific classes of lipoproteins or in LD at the cellular level. Indeed, further *in vitro* studies are needed to demonstrate potential mechanisms or to suggest an integrative model.

6. 2. Beneficial effects of dietary sphingolipid supplementation in metabolic diseases

SL are ubiquitous in many plant and animal organisms, explaining that they are found in non-negligible amounts in our diet. Therefore, the consumption of dietary SL may modulate plasma and tissue levels of SL and thus could impact the endogenous SL metabolism. Indeed, Norris and Blesso recently published a state of the art concerning the potential beneficial effects of dietary SL in (*i*) the regulation of inflammatory signaling pathways, (*ii*) the decrease of dyslipidemia focusing on hepatic lipid accumulation and also (*iii*) the positive modulation of the gut microbiota associated to a decrease of metabolic endotoxemia in mice [110,111].

The major dietary sources of SL studied are chicken eggs, meat and dairy products [112]. The particularity of milk and dairy products is that the milk fat presents a specific profile of bioactive lipids, rich in SM and Cer, and organized in milk fat globule membrane (MFGM) [113–115]. In addition, the consumption of dairy products has been associated with a decrease of metabolic syndrome prevalence or improvements of metabolic disorders related to obesity and CVD [116–118]. Buttermilk is a dairy product particularly rich in milk polar lipids and our group recently revealed its SL composition [119]. In fact, previous *in vivo* studies demonstrated that the consumption of milk polar lipid-rich extract (derived from buttermilk) prevented hepatic TG and cholesterol accumulation normally induced by a high-fat diet [120], and addition of SM in the diet decreased cholesterol absorption in mice [121]. More recently, our group confirmed that milk polar lipids significantly enhance *in vitro* digestive lipolysis and improve postprandial lipid metabolism in mice, compared to soy polar lipids [122]. In a crossover study, Conway *et al*. demonstrated that buttermilk drink consumption during 8 weeks improved fasting lipid metabolism with a decrease of plasma total- and LDL-cholesterol, as well as TG [123]. A recent clinical study performed in our laboratory by Vors *et al*. [124]

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

corroborated these results by revealing that the 4-week consumption of milk polar lipids concentrated from buttermilk, which are rich in SM, decreased hypercholesterolemia and hyperlipemia both at fasting state and during the postprandial phase, in overweight postmenopausal women at cardiovascular risk. In addition, in overweight individuals, Demmer *et al.* reported that the supplementation of MFGM to a palm oil-rich meal induced a lower plasma cholesterol and LDL concentrations during the 6-hours postprandial phase, compared to the palm oil-rich meal alone [125]. Another promising dietary SL, β-glucosylCer, a natural glycosphingolipid, has been studied in humans. Lalazar *et al*. demonstrated that the daily uptake of β-glucosylceramide during 40 weeks decreased steatosis and improve glucose tolerance in NASH patients, as compared with placebo-receiving individuals [126].

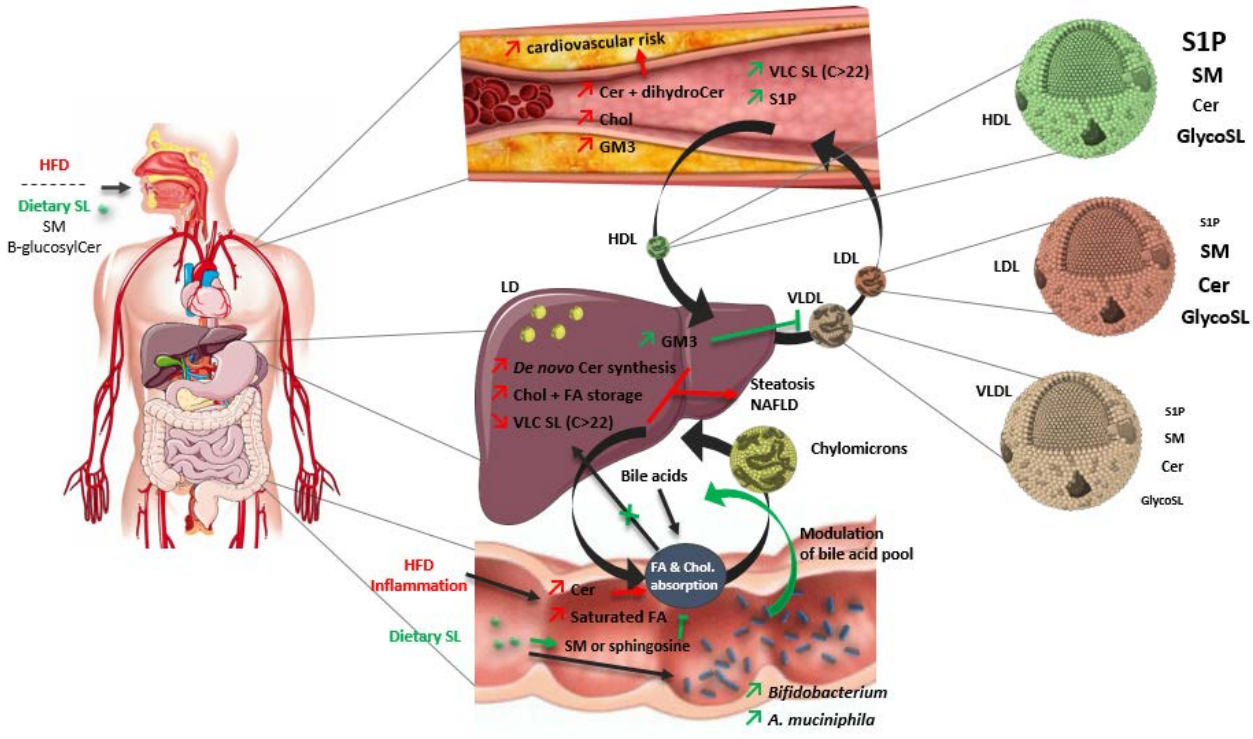


Figure 2. **Schematic representation of potential sphingolipid metabolism alterations in cardiometabolic diseases**. *In obesity and cardiometabolic diseases, many tissues are affected and undergo profound metabolic dysfunction. Among them, the metabolism of major lipids like triglycerides can be altered, but the involvement of minor bioactive lipids like SL in these processes is starting to emerge. SL are involved in lipid metabolism regulation in organs such as the liver and the gut, but is also an important constituent of cell lipid droplets and lipoproteins. Plasma SL concentrations could be a reflection of all the SL metabolism alterations in the gut-liver axis as well as changes in lipoprotein composition in obesity and metabolic diseases. Cer: ceramides, Chol: cholesterol, FA: fatty acids, glycoSL: glycosphingolipids, HFD: high fat diet, LD: lipid droplets, NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease, SL: sphingolipids, SM: sphingomyelin, S1P:*

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

sphingosine-1-phosphate, VLC: very long chain. This Figure contains pieces of artwork that are derivatives of artworks kindly provided by the Servier Medical Art database licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

6. 3. Modulations of the gut microbiota composition and cholesterol absorption by sphingolipids

In addition, since the gut microbiota is involved in the development of low-grade inflammation and metabolic disorders [127,128], the use of pharmacological or dietary molecules in order to positively modulate its composition or function has gained more attention. For example, in a rat model of fructose-induced metabolic disorders, Crescenzo *et al*. [129] demonstrated that an antibiotic treatment reversed gut microbiota dysbiosis in fructose-fed rats by positively modulating its composition, and decreases hepatic Cer content and insulin resistance in both liver and visceral adipose tissues. Norris *et al*. reported that milk SL supplementation induced an increase of *Bifidobacterium* in the colon of high fat-fed mice and lowered serum total cholesterol and lipopolysaccharide [130]. In a recent *in vivo* study performed in our laboratory, Milard *et al.* demonstrated that dietary supplementation with milk polar lipids (1.1-1.6% of diet corresponding to 0.25-0.36% of SM) prevented the development of obesity without impacting caloric intake, but was associated with changes in gut microbiota populations [131]. Under a more mechanistical approach realized both *in vitro* and *in vivo*, our results demonstrated that SM could induce beneficial effects at the intestinal barrier level through the increase of plasma IL-8, an interleukin involved in immunity, leading to an improvement of gut integrity [132]. These results from Milard *et al.* also suggested that some effects could be mediated by sphingosine, which is liberated during the digestion of SM from both egg and milk [132]. In fact, since SM co-localize with cholesterol, it could explain that dietary SM is associated with a decrease in cholesterol absorption in animal models [121]. However, *in vitro* experiments realized by Garmy *et al.* also demonstrated that sphingosine forms lipid complexes with cholesterol and this specific interaction inhibits the intestinal transport of micellar cholesterol [133].

6. 4. Sphingolipid metabolism in specific bacterial species

In the previous section, we demonstrated that SL and the gut microbiota could be interconnected since specific dietary SL may modulate the gut microbiota composition. However, it has also been reported that specific bacterial species are able to produce or metabolize SL. In fact, it was previously established that SL

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

were exclusively found in eukaryote cells until their discovery in prokaryotes [134]. For example, whereas most bacterial membranes only contain glycerol-based PL, few of them possess both PL and SL [135]. Among the SL-containing bacteria, the genus *Bacteroides* has been mainly studied because of its specific PL membrane, which is composed of 40-70% of SL [136]. An *et al*. demonstrated that SL-rich membrane of *Bacteroides* plays an important role in the survival of this genus in the gastro-intestinal tract [135]. Wieland Brown *et al*. also reported that α-galactosylceramides produced by *Bacteroides* species can modulate natural killer T cell activity and thus influence the host immune response [136]. In addition, the genus *Bacteroides* is mainly deprived from key SL metabolism-related enzymes as sphingomyelinases whereas they are found in some pathogens such as *Staphylococcus aureus* [137]. More recently, promising studies demonstrated that, among all the known mechanisms, the anti-inflammatory effects of certain probiotics could be the result of the SL metabolism modulations. Angulo *et al*. reported that *Lactobacillus brevis* and *Streptococcus thermophilus* species could influence the mucosal immune cells by inducing cell apoptosis through the activation of a neutral SMase and the production of Cer [138]. In addition, Soo *et al*. demonstrated that the supplementation with the probiotic cocktail VSL#3 induced a significant increase of alkaline SMase levels in the intestinal sections of both IL-10 deficient mice and humans with colitis, resulting in a decrease of intestinal inflammation [139].

7. Conclusion

In this review, we realized a focused state of the art about the possible alterations of the SL metabolism in the context of obesity and associated metabolic diseases. In fact, all the data discussed suggest that SL metabolism is highly involved in the regulation of lipid homeostasis. In addition, changes in both the quantity and profile of represented SL species and classes at the molecular, cellular and tissue levels could also be reflected in circulation (**Figure 2**). As described above, the most studied pathway mainly concerns the metabolism of Cer whereas few papers now also included the analysis of SM, dihydroceramide, ganglioside and other glucosylceramide species. In clinical studies, the difficult access to biopsies may also be a limitation in the study of the SL metabolism in obese and T2D patients for example, partly explaining why lipidomic analysis are most of the time only realized in systemic circulation. In this review, we discussed about how plasma SL alterations can reflect the accumulation of perturbations in tissue, lipoprotein and LD metabolism. In addition, the last part of this review demonstrated that more and more studies now describe the beneficial impact of metabolic disorder treatments on SL profile and metabolism. These preventive or curative treatments concern pharmacological drugs but also dietary bioactive molecules or extracts. In addition, such as highlighted by Bellini *et al*. [140], it is unthinkable to non-specifically inhibit key enzymes involved in the production of specific Cer species to improve T2D-related

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

metabolic disorders because all SL are part of a plethora of physiological pathways. There is also growing evidence *in vivo* that the dietary supplementation with specific SL could exert beneficial effects on both metabolic disorders and SL metabolism. Therefore, it confers an advantage to prevent or attenuate metabolic disorders development, and to improve overall SL metabolism homeostasis.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Author contributions: MLB, MMB: performed literature review and wrote the original draft. CC, DC, MCM: revised the manuscript for important intellectual content. All: read and approve the final manuscript.

Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. MM Boulet received a doctoral contract from the Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche and M Le Barz acknowledged a postdoctoral grant from Société Francophone du Diabète.

Conflict-of-interest/financial disclosure statement: MCM received other research fundings on other topics from Sodiaal-Candia R&D, the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL, French Dairy Interbranch Organization) and Nutricia Research and has consultancy activities for food & dairy companies. These activities had no link with the present study. MCM is coordinator of a research project funded by the National Research Agency on the valuing and health properties of buttermilk and milk polar lipids (VALOBAB, ANR-2011-0007), in which DC and MLB participate; the present review is not part of this project. Other authors have no conflict of interest to declare.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

References

[1] S. O'Neill, L. O'Driscoll, Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies, Obes Rev. 16 (2015) 1–12. doi:10.1111/obr.12229.

[2] R. Loomba, A.J. Sanyal, The global NAFLD epidemic, Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 10 (2013) 686–690.

[3] J.-P. Després, Body Fat Distribution and Risk of Cardiovascular Disease, Circulation. 126 (2012) 1301. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067264.

[4] J. Iqbal, M.T. Walsh, S.M. Hammad, M.M. Hussain, Sphingolipids and Lipoproteins in Health and Metabolic Disorders., Trends Endocrinol Metab. 28 (2017) 506–518. doi:10.1016/j.tem.2017.03.005.

[5] Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease., Nat Rev Mol Cell Biol. 19 (2018) 175–191. doi:10.1038/nrm.2017.107.

[6] S. Choi, A.J. Snider, Sphingolipids in High Fat Diet and Obesity-Related Diseases., Mediators Inflamm. 2015 (2015) 520618. doi:10.1155/2015/520618.

[7] G.M. Deevska, M.N. Nikolova-Karakashian, The expanding role of sphingolipids in lipid droplet biogenesis., Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 1862 (2017) 1155–1165. doi:10.1016/j.bbalip.2017.07.008.

[8] F. Fava, L. Rizzetto, K.M. Tuohy, Gut microbiota and health: connecting actors across the metabolic system., Proc Nutr Soc. (2018) 1–12. doi:10.1017/S0029665118002719.

[9] J. Thudichum, A treatise on the chemical constitution of the brain, London, Bailliere, Tindall and Cox, 1884.

[10] J. Iqbal, M.T. Walsh, S.M. Hammad, M.M. Hussain, Sphingolipids and Lipoproteins in Health and Metabolic Disorders., Trends Endocrinol Metab. 28 (2017) 506–518. doi:10.1016/j.tem.2017.03.005.

[11] C.R. Gault, L.M. Obeid, Y.A. Hannun, An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown., Adv Exp Med Biol. 688 (2010) 1–23.

[12] A.H.J. Merrill, De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway., J Biol Chem. 277 (2002) 25843–25846. doi:10.1074/jbc.R200009200.

[13] R. Pralhada Rao, N. Vaidyanathan, M. Rengasamy, A. Mammen Oommen, N. Somaiya, M.R. Jagannath, Sphingolipid metabolic pathway: an overview of major roles played in human diseases., J Lipids. 2013 (2013) 178910. doi:10.1155/2013/178910.

[14] M.M. Siddique, Y. Li, B. Chaurasia, V.A. Kaddai, S.A. Summers, Dihydroceramides: From Bit Players to Lead Actors., J Biol Chem. 290 (2015) 15371–15379. doi:10.1074/jbc.R115.653204.

[15] N. Bartke, Y.A. Hannun, Bioactive sphingolipids: metabolism and function., J Lipid Res. 50 Suppl (2009) S91-96. doi:10.1194/jlr.R800080-JLR200.

[16] A.H. Futerman, Y.A. Hannun, The complex life of simple sphingolipids., EMBO Rep. 5 (2004) 777–782. doi:10.1038/sj.embor.7400208.

[17] Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids., Nat Rev Mol Cell Biol. 9 (2008) 139–150. doi:10.1038/nrm2329.

[18] T. Kolter, A view on sphingolipids and disease., Chem Phys Lipids. 164 (2011) 590–606. doi:10.1016/j.chemphyslip.2011.04.013.

[19] S.M. Hammad, J.S. Pierce, F. Soodavar, K.J. Smith, M.M. Al Gadban, B. Rembiesa, R.L. Klein, Y.A. Hannun, J. Bielawski, A. Bielawska, Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology., J Lipid Res. 51 (2010) 3074–3087. doi:10.1194/jlr.D008532.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

[20] J.P. Slotte, B. Ramstedt, The functional role of sphingomyelin in cell membranes, European Journal of Lipid Science and Technology. 109 (2007) 977–981. doi:10.1002/ejlt.200700024.

[21] M. Ana Jonas, Lipoprotein struture, in: Biochemistry of Lipods, Lipoproteins and Membranes, Fifth edition, Elsevier, 2008.

[22] J. Serna, D. Garcia-Seisdedos, A. Alcazar, M.A. Lasuncion, R. Busto, O. Pastor, Quantitative lipidomic analysis of plasma and plasma lipoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry., Chem Phys Lipids. 189 (2015) 7–18. doi:10.1016/j.chemphyslip.2015.05.005.

[23] P. Wiesner, K. Leidl, A. Boettcher, G. Schmitz, G. Liebisch, Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry., J Lipid Res. 50 (2009) 574–585. doi:10.1194/jlr.D800028-JLR200.

[24] M. Scherer, A. Bottcher, G. Schmitz, G. Liebisch, Sphingolipid profiling of human plasma and FPLC-separated lipoprotein fractions by hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry., Biochim Biophys Acta. 1811 (2011) 68–75. doi:10.1016/j.bbalip.2010.11.003.

[25] S.A. Summers, D.H. Nelson, A role for sphingolipids in producing the common features of type 2 diabetes, metabolic syndrome X, and Cushing's syndrome., Diabetes. 54 (2005) 591–602.

[26] B. Chaurasia, S.A. Summers, Ceramides - Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders., Trends Endocrinol Metab. 26 (2015) 538–550. doi:10.1016/j.tem.2015.07.006.

[27] J.M. Haus, S.R. Kashyap, T. Kasumov, R. Zhang, K.R. Kelly, R.A. Defronzo, J.P. Kirwan, Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance., Diabetes. 58 (2009) 337–343. doi:10.2337/db08-1228.

[28] D.I. Kuzmenko, T.K. Klimentyeva, Role of Ceramide in Apoptosis and Development of Insulin Resistance., Biochemistry (Mosc). 81 (2016) 913–927. doi:10.1134/S0006297916090017.

[29] S. Galadari, A. Rahman, S. Pallichankandy, A. Galadari, F. Thayyullathil, Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms., Lipids Health Dis. 12 (2013) 98. doi:10.1186/1476-511X-12-98.

[30] X. Lopez, A.B. Goldfine, W.L. Holland, R. Gordillo, P.E. Scherer, Plasma ceramides are elevated in female children and adolescents with type 2 diabetes., J Pediatr Endocrinol Metab. 26 (2013) 995–998. doi:10.1515/jpem-2012-0407.

[31] T. Kasumov, L. Li, M. Li, K. Gulshan, J.P. Kirwan, X. Liu, S. Previs, B. Willard, J.D. Smith, A. McCullough, Ceramide as a mediator of non-alcoholic Fatty liver disease and associated atherosclerosis., PLoS One. 10 (2015) e0126910. doi:10.1371/journal.pone.0126910.

[32] B. Choromanska, P. Mysliwiec, H. Razak Hady, J. Dadan, H. Mysliwiec, A. Chabowski, A. Miklosz, Metabolic Syndrome is Associated with Ceramide Accumulation in Visceral Adipose Tissue of Women with Morbid Obesity., Obesity (Silver Spring). (2019). doi:10.1002/oby.22405.

[33] S. Raichur, B. Brunner, M. Bielohuby, G. Hansen, A. Pfenninger, B. Wang, J.C. Bruning, P.J. Larsen, N. Tennagels, The role of C16:0 ceramide in the development of obesity and type 2 diabetes: CerS6 inhibition as a novel therapeutic approach, Molecular Metabolism. (2019). doi:10.1016/j.molmet.2018.12.008.

[34] X.C. Jiang, F. Paultre, T.A. Pearson, R.G. Reed, C.K. Francis, M. Lin, L. Berglund, A.R. Tall, Plasma sphingomyelin level as a risk factor for coronary artery disease., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20 (2000) 2614–2618.

[35] J.W. Meeusen, L.J. Donato, S.C. Bryant, L.M. Baudhuin, P.B. Berger, A.S. Jaffe, Plasma Ceramides., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 38 (2018) 1933–1939. doi:10.1161/ATVBAHA.118.311199.

[36] L.R. Peterson, V. Xanthakis, M.S. Duncan, S. Gross, N. Friedrich, H. Volzke, S.B. Felix, H. Jiang, R. Sidhu, M.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Nauck, X. Jiang, D.S. Ory, M. Dorr, R.S. Vasan, J.E. Schaffer, Ceramide Remodeling and Risk of Cardiovascular Events and Mortality., J Am Heart Assoc. 7 (2018). doi:10.1161/JAHA.117.007931.

[37] L. Wigger, C. Cruciani-Guglielmacci, A. Nicolas, J. Denom, N. Fernandez, F. Fumeron, P. Marques-Vidal, A. Ktorza, W. Kramer, A. Schulte, H. Le Stunff, R. Liechti, I. Xenarios, P. Vollenweider, G. Waeber, I. Uphues, R. Roussel, C. Magnan, M. Ibberson, B. Thorens, Plasma Dihydroceramides Are Diabetes Susceptibility Biomarker Candidates in Mice and Humans., Cell Rep. 18 (2017) 2269–2279. doi:10.1016/j.celrep.2017.02.019.

[38] A. Mousa, N. Naderpoor, N. Mellett, K. Wilson, M. Plebanski, P.J. Meikle, B. de Courten, Lipidomic profiling reveals early-stage metabolic dysfunction in overweight or obese humans., Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 1864 (2019) 335–343. doi:10.1016/j.bbalip.2018.12.014.

[39] A.Y. Lee, J.W. Lee, J.-E. Kim, H.J. Mock, S. Park, S. Kim, S.-H. Hong, J.-Y. Kim, E.-J. Park, K.-S. Kang, K.P. Kim, M.-H. Cho, Dihydroceramide is a key metabolite that regulates autophagy and promotes fibrosis in hepatic steatosis model., Biochem Biophys Res Commun. 494 (2017) 460–469. doi:10.1016/j.bbrc.2017.10.110.

[40] M. Gorska, A. Dobrzyn, M. Baranowski, Concentrations of sphingosine and sphinganine in plasma of patients with type 2 diabetes., Med Sci Monit. 11 (2005) CR35-38.

[41] K. Sattler, M. Gräler, P. Keul, S. Weske, C.-M. Reimann, H. Jindrová, P. Kleinbongard, R. Sabbadini, M. Bröcker-Preuss, R. Erbel, G. Heusch, B. Levkau, Defects of High-Density Lipoproteins in Coronary Artery Disease Caused by Low Sphingosine-1-Phosphate Content, Journal of the American College of Cardiology. 66 (2015) 1470. doi:10.1016/j.jacc.2015.07.057.

[42] T. Vaisar, E. Couzens, A. Hwang, M. Russell, C.E. Barlow, L.F. DeFina, A.N. Hoofnagle, F. Kim, Type 2 diabetes is associated with loss of HDL endothelium protective functions., PLoS One. 13 (2018) e0192616. doi:10.1371/journal.pone.0192616.

[43] M. Maceyka, K.B. Harikumar, S. Milstien, S. Spiegel, Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease., Trends Cell Biol. 22 (2012) 50–60. doi:10.1016/j.tcb.2011.09.003.

[44] M. Kurano, Y. Yatomi, Sphingosine 1-Phosphate and Atherosclerosis., J Atheroscler Thromb. 25 (2018) 16–26. doi:10.5551/jat.RV17010.

[45] S. Ito, S. Iwaki, K. Koike, Y. Yuda, A. Nagasaki, R. Ohkawa, Y. Yatomi, T. Furumoto, H. Tsutsui, B.E. Sobel, S. Fujii, Increased plasma sphingosine-1-phosphate in obese individuals and its capacity to increase the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in adipocytes., Coron Artery Dis. 24 (2013) 642–650. doi:10.1097/MCA.0000000000000033.

[46] V. Randriamboavonjy, K. Badenhoop, H. Schmidt, G. Geisslinger, B. Fisslthaler, I. Fleming, The S1P(2) receptor expressed in human platelets is linked to the RhoA-Rho kinase pathway and is down regulated in type 2 diabetes., Basic Res Cardiol. 104 (2009) 333–340. doi:10.1007/s00395-008-0769-1.

[47] S. Tanaka, I. Kanazawa, T. Sugimoto, Visceral fat accumulation is associated with increased plasma sphingosine-1-phosphate levels in type 2 diabetes mellitus., Diabetes Res Clin Pract. 143 (2018) 146–150. doi:10.1016/j.diabres.2018.07.003.

[48] W. Chen, H. Lu, J. Yang, H. Xiang, H. Peng, Sphingosine 1-phosphate in metabolic syndrome (Review)., Int J Mol Med. 38 (2016) 1030–1038. doi:10.3892/ijmm.2016.2731.

[49] B. Weiss, W. Stoffel, Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase--cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis., Eur J Biochem. 249 (1997) 239–247. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00239.x.

[50] N.C. Zitomer, T. Mitchell, K.A. Voss, G.S. Bondy, S.T. Pruett, E.C. Garnier-Amblard, L.S. Liebeskind, H. Park, E. Wang, M.C. Sullards, A.H.J. Merrill, R.T. Riley, Ceramide synthase inhibition by fumonisin B1 causes accumulation of,

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

J Biol Chem. 284 (2009) 4786–4795. doi:10.1074/jbc.M808798200.

[51] M.A. Lone, T. Santos, I. Alecu, L.C. Silva, T. Hornemann, 1-Deoxysphingolipids, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 1864 (2019) 512–521. doi:10.1016/j.bbalip.2018.12.013.

[52] A. Othman, M.F. Rütti, D. Ernst, C.H. Saely, P. Rein, H. Drexel, C. Porretta-Serapiglia, G. Lauria, R. Bianchi, A. von Eckardstein, T. Hornemann, Plasma deoxysphingolipids: a novel class of biomarkers for the metabolic syndrome?, Diabetologia. 55 (2012) 421–431. doi:10.1007/s00125-011-2384-1.

[53] J. Duan, A.H. Merrill Jr, 1-Deoxysphingolipids Encountered Exogenously and Made de Novo: Dangerous Mysteries inside an Enigma, J Biol Chem. 290 (2015) 15380–15389. doi:10.1074/jbc.R115.658823.

[54] S. Mitsutake, K. Zama, H. Yokota, T. Yoshida, M. Tanaka, M. Mitsui, M. Ikawa, M. Okabe, Y. Tanaka, T. Yamashita, H. Takemoto, T. Okazaki, K. Watanabe, Y. Igarashi, Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes., J Biol Chem. 286 (2011) 28544–28555. doi:10.1074/jbc.M111.255646.

[55] A. Schlitt, S. Blankenberg, D. Yan, H. von Gizycki, M. Buerke, K. Werdan, C. Bickel, K.J. Lackner, J. Meyer, H.J. Rupprecht, X.-C. Jiang, Further evaluation of plasma sphingomyelin levels as a risk factor for coronary artery disease., Nutr Metab (Lond). 3 (2006) 5. doi:10.1186/1743-7075-3-5.

[56] F. Xu, S. Tavintharan, C.F. Sum, K. Woon, S.C. Lim, C.N. Ong, Metabolic signature shift in type 2 diabetes mellitus revealed by mass spectrometry-based metabolomics., J Clin Endocrinol Metab. 98 (2013) E1060-1065. doi:10.1210/jc.2012-4132.

[57] X. Chen, A. Sun, Y. Zou, J. Ge, J.M. Lazar, X.-C. Jiang, Impact of sphingomyelin levels on coronary heart disease and left ventricular systolic function in humans., Nutr Metab (Lond). 8 (2011) 25. doi:10.1186/1743-7075-8-25.

[58] H. Nojiri, M. Stroud, S. Hakomori, A specific type of ganglioside as a modulator of insulin-dependent cell growth and insulin receptor tyrosine kinase activity. Possible association of ganglioside-induced inhibition of insulin receptor function and monocytic differentiation induction in HL-60 cells., J Biol Chem. 266 (1991) 4531–4537.

[59] T. Sato, Y. Nihei, M. Nagafuku, S. Tagami, R. Chin, M. Kawamura, S. Miyazaki, M. Suzuki, S.-I. Sugahara, Y. Takahashi, A. Saito, Y. Igarashi, J.-I. Inokuchi, Circulating levels of ganglioside GM3 in metabolic syndrome: A pilot study., Obes Res Clin Pract. 2 (2008) I–II. doi:10.1016/j.orcp.2008.06.001.

[60] L. Veillon, S. Go, W. Matsuyama, A. Suzuki, M. Nagasaki, Y. Yatomi, J.-I. Inokuchi, Identification of Ganglioside GM3 Molecular Species in Human Serum Associated with Risk Factors of Metabolic Syndrome., PLoS One. 10 (2015) e0129645. doi:10.1371/journal.pone.0129645.

[61] C. Leung, L. Rivera, J.B. Furness, P.W. Angus, The role of the gut microbiota in NAFLD, Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 13 (2016) 412–425.

[62] M.V. Machado, H. Cortez-Pinto, Diet, Microbiota, Obesity, and NAFLD: A Dangerous Quartet., Int J Mol Sci. 17 (2016). doi:10.3390/ijms17040481.

[63] L. Miele, G. Marrone, C. Lauritano, C. Cefalo, A. Gasbarrini, C. Day, A. Grieco, Gut-liver axis and microbiota in NAFLD: insight pathophysiology for novel therapeutic target., Curr Pharm Des. 19 (2013) 5314–5324.

[64] K. Kurek, B. Lukaszuk, D.M. Piotrowska, P. Wiesiolek, A.M. Chabowska, M. Zendzian-Piotrowska, Metabolism, physiological role, and clinical implications of sphingolipids in gastrointestinal tract., Biomed Res Int. 2013 (2013) 908907. doi:10.1155/2013/908907.

[65] B. Phillips-Farfan, K. Carvajal, E.A. Medina-Torres, S.E. Espinosa-Padilla, G. Fabrias, L. Camacho, Sphingolipids as Mediators in the Crosstalk between Microbiota and Intestinal Cells: Implications for Inflammatory Bowel Disease,

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Mediators of Inflammation. 2016 (2016) 11.

[66] P. Simonen, H. Gylling, A.N. Howard, T.A. Miettinen, Introducing a new component of the metabolic syndrome: low cholesterol absorption., Am J Clin Nutr. 72 (2000) 82–88. doi:10.1093/ajcn/72.1.82.

[67] M.S. Bosner, L.G. Lange, W.F. Stenson, R.E.J. Ostlund, Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry., J Lipid Res. 40 (1999) 302–308.

[68] P.M. Ryan, C. Stanton, N.M. Caplice, Bile acids at the cross-roads of gut microbiome-host cardiometabolic interactions, Diabetology & Metabolic Syndrome. 9 (2017) 102–102. doi:10.1186/s13098-017-0299-9.

[69] S.L. Heaver, E.L. Johnson, R.E. Ley, Sphingolipids in host-microbial interactions., Curr Opin Microbiol. 43 (2018) 92–99. doi:10.1016/j.mib.2017.12.011.

[70] A. Nilsson, R.-D. Duan, Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin., J Lipid Res. 47 (2006) 154–171. doi:10.1194/jlr.M500357-JLR200.

[71] J.J. Agren, M. Hallikainen, H. Vidgren, T.A. Miettinen, H. Gylling, Postprandial lipemic response and lipoprotein composition in subjects with low or high cholesterol absorption efficiency., Clin Chim Acta. 366 (2006) 309–315. doi:10.1016/j.cca.2005.11.006.

[72] L. Nyberg, R.D. Duan, A. Nilsson, A mutual inhibitory effect on absorption of sphingomyelin and cholesterol., J Nutr Biochem. 11 (2000) 244–249.

[73] van Erpecum Karel J., Petruzzelli Michele, Groen Albert K., Moschetta Antonio, Relevance of interactions between sphingomyelin and cholesterol in biliary and intestinal tract, European Journal of Lipid Science and Technology. 109 (2007) 982–986. doi:10.1002/ejlt.200700046.

[74] H. Nojima, C.M. Freeman, E. Gulbins, A.B. Lentsch, Sphingolipids in liver injury, repair and regeneration., Biol Chem. 396 (2015) 633–643. doi:10.1515/hsz-2014-0296.

[75] G. Grammatikos, N. Ferreiros, O. Waidmann, D. Bon, S. Schroeter, A. Koch, E. Herrmann, S. Zeuzem, B. Kronenberger, J. Pfeilschifter, Serum Sphingolipid Variations Associate with Hepatic Decompensation and Survival in Patients with Cirrhosis., PLoS One. 10 (2015) e0138130. doi:10.1371/journal.pone.0138130.

[76] W.-J. Park, J.-W. Park, A.H. Merrill, J. Storch, Y. Pewzner-Jung, A.H. Futerman, Hepatic fatty acid uptake is regulated by the sphingolipid acyl chain length., Biochim Biophys Acta. 1841 (2014) 1754–1766. doi:10.1016/j.bbalip.2014.09.009.

[77] M.K. Montgomery, S.H.J. Brown, X.Y. Lim, C.E. Fiveash, B. Osborne, N.L. Bentley, J.P. Braude, T.W. Mitchell, A.C.F. Coster, A.S. Don, G.J. Cooney, C. Schmitz-Peiffer, N. Turner, Regulation of glucose homeostasis and insulin action by ceramide acyl-chain length: A beneficial role for very long-chain sphingolipid species., Biochim Biophys Acta. 1861 (2016) 1828–1839. doi:10.1016/j.bbalip.2016.08.016.

[78] G. Grammatikos, C. Muhle, N. Ferreiros, S. Schroeter, D. Bogdanou, S. Schwalm, G. Hintereder, J. Kornhuber, S. Zeuzem, C. Sarrazin, J. Pfeilschifter, Serum acid sphingomyelinase is upregulated in chronic hepatitis C infection and non alcoholic fatty liver disease., Biochim Biophys Acta. 1841 (2014) 1012–1020. doi:10.1016/j.bbalip.2014.04.007.

[79] T.Q. de Aguiar Vallim, E.J. Tarling, P.A. Edwards, Pleiotropic roles of bile acids in metabolism., Cell Metab. 17 (2013) 657–669. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.013.

[80] C. Xie, C. Jiang, J. Shi, X. Gao, D. Sun, L. Sun, T. Wang, S. Takahashi, M. Anitha, K.W. Krausz, A.D. Patterson, F.J. Gonzalez, An Intestinal Farnesoid X Receptor-Ceramide Signaling Axis Modulates Hepatic Gluconeogenesis in Mice., Diabetes. 66 (2017) 613–626. doi:10.2337/db16-0663.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

[81] H. Choi, U.-H. Jin, S.-K. Kang, F. Abekura, J.-Y. Park, K.-M. Kwon, S.-J. Suh, S.-H. Cho, K.-T. Ha, Y.-C. Lee, T.-W. Chung, C.-H. Kim, Monosialyl Ganglioside GM3 Decreases Apolipoprotein B-100 Secretion in Liver Cells., J Cell Biochem. 118 (2017) 2168–2181. doi:10.1002/jcb.25860.

[82] F. Backhed, H. Ding, T. Wang, L.V. Hooper, G.Y. Koh, A. Nagy, C.F. Semenkovich, J.I. Gordon, The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage., Proc Natl Acad Sci U S A. 101 (2004) 15718–15723. doi:10.1073/pnas.0407076101.

[83] D. Compare, P. Coccoli, A. Rocco, O.M. Nardone, S. De Maria, M. Cartenì, G. Nardone, Gut–liver axis: The impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease, Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. 22 (2012) 471–476. doi:10.1016/j.numecd.2012.02.007.

[84] T.H. Frazier, J.K. DiBaise, C.J. McClain, Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury., JPEN J Parenter Enteral Nutr. 35 (2011) 14S-20S. doi:10.1177/0148607111413772.

[85] P.J. Meikle, S.A. Summers, Sphingolipids and phospholipids in insulin resistance and related metabolic disorders., Nat Rev Endocrinol. 13 (2017) 79–91. doi:10.1038/nrendo.2016.169.

[86] T.-S. Park, R.L. Panek, M.D. Rekhter, S.B. Mueller, W.S. Rosebury, A. Robertson, J.C. Hanselman, E. Kindt, R. Homan, S.K. Karathanasis, Modulation of lipoprotein metabolism by inhibition of sphingomyelin synthesis in ApoE knockout mice., Atherosclerosis. 189 (2006) 264–272. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.12.029.

[87] T.S. Worgall, R.A. Juliano, T. Seo, R.J. Deckelbaum, Ceramide synthesis correlates with the posttranscriptional regulation of the sterol-regulatory element-binding protein., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24 (2004) 943–948. doi:10.1161/01.atv.0000125703.20434.4d.

[88] M. Dashti, W. Kulik, F. Hoek, E.C. Veerman, M.P. Peppelenbosch, F. Rezaee, A phospholipidomic analysis of all defined human plasma lipoproteins., Sci Rep. 1 (2011) 139. doi:10.1038/srep00139.

[89] G. Stubiger, E. Aldover-Macasaet, W. Bicker, G. Sobal, A. Willfort-Ehringer, K. Pock, V. Bochkov, K. Widhalm, O. Belgacem, Targeted profiling of atherogenic phospholipids in human plasma and lipoproteins of hyperlipidemic patients using MALDI-QIT-TOF-MS/MS., Atherosclerosis. 224 (2012) 177–186. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.06.010.

[90] H.C. Murphy, S.P. Burns, J.J. White, J.D. Bell, R.A. Iles, Investigation of human low-density lipoprotein by (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy: mobility of phosphatidylcholine and sphingomyelin headgroups characterizes the surface layer., Biochemistry. 39 (2000) 9763–9770.

[91] C.E. Kostara, V. Tsimihodimos, M.S. Elisaf, E.T. Bairaktari, NMR-Based Lipid Profiling of High Density Lipoprotein Particles in Healthy Subjects with Low, Normal, and Elevated HDL-Cholesterol., J Proteome Res. 16 (2017) 1605–1616. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00975.

[92] K. Feingold, C. Grunfeld, Introduction to lipids and lipoproteins, in: n.d.

[93] D. Denimal, A. Nguyen, J.-P. Pais de Barros, B. Bouillet, J.-M. Petit, B. Verges, L. Duvillard, Major changes in the sphingophospholipidome of HDL in non-diabetic patients with metabolic syndrome., Atherosclerosis. 246 (2016) 106–114. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.12.042.

[94] A. Kontush, M. Lhomme, M.J. Chapman, Unraveling the complexities of the HDL lipidome., J Lipid Res. 54 (2013) 2950–2963. doi:10.1194/jlr.R036095.

[95] T.G. Redgrave, V. Rakic, B.C. Mortimer, J.C. Mamo, Effects of sphingomyelin and phosphatidylcholine acyl chains on the clearance of triacylglycerol-rich lipoproteins from plasma. Studies with lipid emulsions in rats., Biochim Biophys Acta. 1126 (1992) 65–72.

[96] I. Arimoto, C. Matsumoto, M. Tanaka, K. Okuhira, H. Saito, T. Handa, Surface composition regulates clearance

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

from plasma and triolein lipolysis of lipid emulsions., Lipids. 33 (1998) 773–779.

[97] M. Stahlman, B. Fagerberg, M. Adiels, K. Ekroos, J.M. Chapman, A. Kontush, J. Boren, Dyslipidemia, but not hyperglycemia and insulin resistance, is associated with marked alterations in the HDL lipidome in type 2 diabetic subjects in the DIWA cohort: impact on small HDL particles., Biochim Biophys Acta. 1831 (2013) 1609–1617. doi:10.1016/j.bbalip.2013.07.009.

[98] J. Boon, A.J. Hoy, R. Stark, R.D. Brown, R.C. Meex, D.C. Henstridge, S. Schenk, P.J. Meikle, J.F. Horowitz, B.A. Kingwell, C.R. Bruce, M.J. Watt, Ceramides contained in LDL are elevated in type 2 diabetes and promote inflammation and skeletal muscle insulin resistance., Diabetes. 62 (2013) 401–410. doi:10.2337/db12-0686.

[99] M. Ruuth, S.D. Nguyen, T. Vihervaara, M. Hilvo, T.D. Laajala, P.K. Kondadi, A. Gistera, H. Lahteenmaki, T. Kittila, J. Huusko, M. Uusitupa, U. Schwab, M.J. Savolainen, J. Sinisalo, M.-L. Lokki, M.S. Nieminen, A. Jula, M. Perola, S. Yla-Herttula, L. Rudel, A. Oorni, M. Baumann, A. Baruch, R. Laaksonen, D.F.J. Ketelhuth, T. Aittokallio, M. Jauhiainen, R. Kakela, J. Boren, K.J. Williams, P.T. Kovanen, K. Oorni, Susceptibility of low-density lipoprotein particles to aggregate depends on particle lipidome, is modifiable, and associates with future cardiovascular deaths., Eur Heart J. 39 (2018) 2562–2573. doi:10.1093/eurheartj/ehy319.

[100] T.C. Walther, R.V.J. Farese, Lipid droplets and cellular lipid metabolism., Annu Rev Biochem. 81 (2012) 687–714. doi:10.1146/annurev-biochem-061009-102430.

[101] J. Boren, M.-R. Taskinen, S.-O. Olofsson, M. Levin, Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship., J Intern Med. 274 (2013) 25–40. doi:10.1111/joim.12071.

[102] C.E. Senkal, M.F. Salama, A.J. Snider, J.J. Allopenna, N.A. Rana, A. Koller, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Ceramide Is Metabolized to Acylceramide and Stored in Lipid Droplets., Cell Metab. 25 (2017) 686–697. doi:10.1016/j.cmet.2017.02.010.

[103] S. Rodriguez-Cuenca, N. Barbarroja, A. Vidal-Puig, Dihydroceramide desaturase 1, the gatekeeper of ceramide induced lipotoxicity., Biochim Biophys Acta. 1851 (2015) 40–50. doi:10.1016/j.bbalip.2014.09.021.

[104] J.-W. Park, W.-J. Park, A.H. Futerman, Ceramide synthases as potential targets for therapeutic intervention in human diseases., Biochim Biophys Acta. 1841 (2014) 671–681. doi:10.1016/j.bbalip.2013.08.019.

[105] S.-Y. Lee, H.-Y. Lee, J.-H. Song, G.-T. Kim, S. Jeon, Y.-J. Song, J.S. Lee, J.-H. Hur, H.H. Oh, S.-Y. Park, S.-M. Shim, H.J. Yoo, B.C. Lee, X.-C. Jiang, C.S. Choi, T.-S. Park, Adipocyte-Specific Deficiency of De Novo Sphingolipid Biosynthesis Leads to Lipodystrophy and Insulin Resistance., Diabetes. 66 (2017) 2596–2609. doi:10.2337/db16-1232.

[106] J.Y. Xia, W.L. Holland, C.M. Kusminski, K. Sun, A.X. Sharma, M.J. Pearson, A.J. Sifuentes, J.G. McDonald, R. Gordillo, P.E. Scherer, Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis., Cell Metab. 22 (2015) 266–278. doi:10.1016/j.cmet.2015.06.007.

[107] T.-S. Park, R.L. Panek, S.B. Mueller, J.C. Hanselman, W.S. Rosebury, A.W. Robertson, E.K. Kindt, R. Homan, S.K. Karathanasis, M.D. Rekhter, Inhibition of sphingomyelin synthesis reduces atherogenesis in apolipoprotein, Circulation. 110 (2004) 3465–3471. doi:10.1161/01.CIR.0000148370.60535.22.

[108] T.-S. Park, W. Rosebury, E.K. Kindt, M.C. Kowala, R.L. Panek, Serine palmitoyltransferase inhibitor myriocin induces the regression of atherosclerotic plaques in hyperlipidemic ApoE-deficient mice., Pharmacol Res. 58 (2008) 45–51. doi:10.1016/j.phrs.2008.06.005.

[109] W.L. Holland, J.Y. Xia, J.A. Johnson, K. Sun, M.J. Pearson, A.X. Sharma, E. Quittner-Strom, T.S. Tippetts, R. Gordillo, P.E. Scherer, Inducible overexpression of adiponectin receptors highlight the roles of adiponectin-induced ceramidase signaling in lipid and glucose homeostasis., Mol Metab. 6 (2017) 267–275. doi:10.1016/j.molmet.2017.01.002.

[110] G.H. Norris, C.N. Blesso, Dietary sphingolipids: potential for management of dyslipidemia and nonalcoholic

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

fatty liver disease., Nutr Rev. 75 (2017) 274–285. doi:10.1093/nutrit/nux004.

[111] G.H. Norris, C.M. Porter, C. Jiang, C.L. Millar, C.N. Blesso, Dietary sphingomyelin attenuates hepatic steatosis and adipose tissue inflammation in high-fat-diet-induced obese mice., J Nutr Biochem. 40 (2017) 36–43. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.09.017.

[112] H. Vesper, E.M. Schmelz, M.N. Nikolova-Karakashian, D.L. Dillehay, D.V. Lynch, A.H.J. Merrill, Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition., J Nutr. 129 (1999) 1239–1250. doi:10.1093/jn/129.7.1239.

[113] C. Bourlieu, M.-C. Michalski, Structure–function relationship of the milk fat globule, Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care. 18 (2015). https://journals.lww.com/co-clinicalnutrition/Fulltext/2015/03000/Structure_function_relationship_of_the_milk_fat.4.aspx.

[114] M.-C. Michalski, Specific molecular and colloidal structures of milk fat affecting lipolysis, absorption and postprandial lipemia, European Journal of Lipid Science and Technology. 111 (2009) 413–431. doi:10.1002/ejlt.200800254.

[115] C. Bourlieu-Lacanal, D. Cheillan, M. Blot, P. Daira, M. Trauchessec, S. Ruet, J.-Y. Gassi, E. Beaucher, B. Robert, N. Leconte, S. Bouhallab, F. Gaucheron, G. Gesan-Guiziou, M.-C. Michalski, Polar lipid composition of bioactive dairy co-products buttermilk and butterserums: emphasis on sphingolipid and ceramide isoforms, Food Chemistry. 240 (2018) 67–74.

[116] M. Chen, Q. Sun, E. Giovannucci, D. Mozaffarian, J.E. Manson, W.C. Willett, F.B. Hu, Dairy consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis., BMC Med. 12 (2014) 215. doi:10.1186/s12916-014-0215-1.

[117] F. Fumeron, A. Lamri, N. Emery, N. Bellili, R. Jaziri, I. Porchay-Balderelli, O. Lantieri, B. Balkau, M. Marre, Dairy products and the metabolic syndrome in a prospective study, DESIR., J Am Coll Nutr. 30 (2011) 454S–63S.

[118] T.K. Thorning, H.C. Bertram, J.-P. Bonjour, L. de Groot, D. Dupont, E. Feeney, R. Ipsen, J.M. Lecerf, A. Mackie, M.C. McKinley, M.-C. Michalski, D. Rémond, U. Risérus, S.S. Soedamah-Muthu, T. Tholstrup, C. Weaver, A. Astrup, I. Givens, Whole dairy matrix or single nutrients in assessment of health effects: current evidence and knowledge gaps, The American Journal of Clinical Nutrition. (2017). doi:10.3945/ajcn.116.151548.

[119] C. Bourlieu, D. Cheillan, M. Blot, P. Daira, M. Trauchessec, S. Ruet, J.-Y. Gassi, E. Beaucher, B. Robert, N. Leconte, S. Bouhallab, F. Gaucheron, G. Gésan-Guiziou, M.-C. Michalski, Polar lipid composition of bioactive dairy co-products buttermilk and butterserum: Emphasis on sphingolipid and ceramide isoforms, Food Chemistry. 240 (2018) 67–74. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.091.

[120] E. Wat, S. Tandy, E. Kapera, A. Kamili, R.W.S. Chung, A. Brown, M. Rowney, J.S. Cohn, Dietary phospholipid-rich dairy milk extract reduces hepatomegaly, hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice fed a high-fat diet., Atherosclerosis. 205 (2009) 144–150. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.12.004.

[121] E.R.M. Eckhardt, D.Q. –H. Wang, J.M. Donovan, M.C. Carey, Dietary sphingomyelin suppresses intestinal cholesterol absorption by decreasing thermodynamic activity of cholesterol monomers, Gastroenterology. 122 (2002) 948–956. doi:10.1053/gast.2002.32539.

[122] M. Lecomte, C. Bourlieu, E. Meugnier, A. Penhoat, D. Cheillan, G. Pineau, E. Loizon, M. Trauchessec, M. Claude, O. Menard, A. Geloen, F. Laugerette, M.-C. Michalski, Milk Polar Lipids Affect In Vitro Digestive Lipolysis and Postprandial Lipid Metabolism in Mice., J Nutr. 145 (2015) 1770–1777. doi:10.3945/jn.115.212068.

[123] V. Conway, P. Couture, C. Richard, S.F. Gauthier, Y. Pouliot, B. Lamarche, Impact of buttermilk consumption on plasma lipids and surrogate markers of cholesterol homeostasis in men and women, Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. 23 (2013) 1255–1262. doi:10.1016/j.numecd.2013.03.003.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

[124] C. Vors, L. Joumard-Cubizolles, M. Lecomte, E. Combe, L. Ouchchane, J. Drai, K. Raynal, F. Joffre, L. Meiller, M. Le Barz, P. Gaborit, A. Caille, M. Sothier, C. Domingues-Faria, A. Blot, A. Wauquier, E. Blond, V. Sauvinet, G. Gésan-Guiziou, J.-P. Bodin, P. Moulin, D. Cheillan, H. Vidal, B. Morio, E. Cotte, F. Morel-Laporte, M. Laville, A. Bernalier-Donadille, S. Lambert-Porcheron, C. Malpuech-Brugère, M.-C. Michalski, Milk polar lipids reduce lipid cardiovascular risk factors in overweight postmenopausal women: towards a gut sphingomyelin-cholesterol interplay, Gut. (2019) gutjnl-2018-318155. doi:10.1136/gutjnl-2018-318155.

[125] E. Demmer, M.D. Van Loan, N. Rivera, T.S. Rogers, E.R. Gertz, J.B. German, J.T. Smilowitz, A.M. Zivkovic, Addition of a dairy fraction rich in milk fat globule membrane to a high-saturated fat meal reduces the postprandial insulinaemic and inflammatory response in overweight and obese adults, Journal of Nutritional Science. 5 (2016) e14–e14. doi:10.1017/jns.2015.42.

[126] G. Lalazar, E. Zigmond, S. Weksler-Zangen, A.B. Ya'acov, M.S. Levy, N. Hemed, I. Raz, Y. Ilan, Oral Administration of beta-Glucosylceramide for the Treatment of Insulin Resistance and Nonalcoholic Steatohepatitis: Results of a Double-Blind, Placebo-Controlled Trial., J Med Food. 20 (2017) 458–464. doi:10.1089/jmf.2016.3753.

[127] P.D. Cani, M. Osto, L. Geurts, A. Everard, Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity., Gut Microbes. 3 (2012) 279–288. doi:10.4161/gmic.19625.

[128] F. Sommer, F. Backhed, The gut microbiota - masters of host development and physiology, Nat Rev Micro. 11 (2013) 227–238. doi:10.1038/nrmicro2974.

[129] R. Crescenzo, A. Mazzoli, B. Di Luccia, F. Bianco, R. Cancelliere, L. Cigliano, G. Liverini, L. Baccigalupi, S. Iossa, Dietary fructose causes defective insulin signalling and ceramide accumulation in the liver that can be reversed by gut microbiota modulation., Food Nutr Res. 61 (2017) 1331657. doi:10.1080/16546628.2017.1331657.

[130] G.H. Norris, C. Jiang, J. Ryan, C.M. Porter, C.N. Blesso, Milk sphingomyelin improves lipid metabolism and alters gut microbiota in high fat diet-fed mice., J Nutr Biochem. 30 (2016) 93–101. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.12.003.

[131] M. Milard, F. Laugerette, A. Durand, C. Buisson, E. Meugnier, E. Loizon, C. Louche-Pelissier, V. Sauvinet, L. Garnier, S. Viel, K. Bertrand, F. Joffre, D. Cheillan, L. Humbert, D. Rainteau, P. Plaisancie, L.B. Bindels, A.M. Neyrinck, N.M. Delzenne, M.-C. Michalski, Milk Polar Lipids in a High-Fat Diet Can Prevent Body Weight Gain: Modulated Abundance of Gut Bacteria in Relation with Fecal Loss of Specific Fatty Acids., Mol Nutr Food Res. (2019) e1801078. doi:10.1002/mnfr.201801078.

[132] M. Milard, A. Penhoat, A. Durand, C. Buisson, E. Loizon, E. Meugnier, K. Bertrand, F. Joffre, D. Cheillan, L. Garnier, S. Viel, F. Laugerette, M.-C. Michalski, Acute effects of milk polar lipids on intestinal tight junction expression: towards an impact of sphingomyelin through the regulation of IL-8 secretion?, J Nutr Biochem. 65 (2018) 128–138. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.12.007.

[133] N. Garmy, N. Taieb, N. Yahi, J. Fantini, Interaction of cholesterol with sphingosine: physicochemical characterization and impact on intestinal absorption., J Lipid Res. 46 (2005) 36–45. doi:10.1194/jlr.M400199-JLR200.

[134] I. Olsen, E. Jantzen, Sphingolipids in Bacteria and Fungi, Anaerobe. 7 (2001) 103–112. doi:10.1006/anae.2001.0376.

[135] D. An, C. Na, J. Bielawski, Y.A. Hannun, D.L. Kasper, Membrane sphingolipids as essential molecular signals for Bacteroides survival in the intestine., Proc Natl Acad Sci U S A. 108 Suppl 1 (2011) 4666–4671. doi:10.1073/pnas.1001501107.

[136] L.C. Wieland Brown, C. Penaranda, P.C. Kashyap, B.B. Williams, J. Clardy, M. Kronenberg, J.L. Sonnenburg, L.E. Comstock, J.A. Bluestone, M.A. Fischbach, Production of alpha-galactosylceramide by a prominent member of the human gut microbiota., PLoS Biol. 11 (2013) e1001610. doi:10.1371/journal.pbio.1001610.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

[137] I. Walev, U. Weller, S. Strauch, T. Foster, S. Bhakdi, Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of Staphylococcus aureus, Infect Immun. 64 (1996) 2974–2979.

[138] S. Angulo, A. Morales, S. Danese, L. Llacuna, M.C. Masamunt, N. Pultz, M.G. Cifone, C. De Simone, S. Delgado, J. Vila, J. Panes, C. Donskey, J.C. Fernandez-Checa, C. Fiocchi, M. Sans, Probiotic sonicates selectively induce mucosal immune cells apoptosis through ceramide generation via neutral sphingomyelinase., PLoS One. 6 (2011) e16953. doi:10.1371/journal.pone.0016953.

[139] I. Soo, K.L. Madsen, Q. Tejpar, B.C. Sydora, R. Sherbaniuk, B. Cinque, L. Di Marzio, M.G. Cifone, C. Desimone, R.N. Fedorak, VSL#3 probiotic upregulates intestinal mucosal alkaline sphingomyelinase and reduces inflammation., Can J Gastroenterol. 22 (2008) 237–242. doi:10.1155/2008/520383.

[140] L. Bellini, M. Campana, R. Mahfouz, A. Carlier, J. Veret, C. Magnan, E. Hajduch, H. Le Stunff, Targeting sphingolipid metabolism in the treatment of obesity/type 2 diabetes., Expert Opin Ther Targets. 19 (2015) 1037–1050. doi:10.1517/14728222.2015.1028359.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

FOLIO ADMINISTRATIF

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON OPEREE AU SEIN DE L'INSA LYON

NOM : Boulet **DATE de SOUTENANCE** : 12 mai 2020

(avec précision du nom de jeune fille, le cas échéant)

Prénoms : Marie Michèle

TITRE : Lipoprotéines riches en triglycérides chez le patient diabétique de type 2: effets sur l'activation plaquettaire et profil sphingolipidomique

NATURE : Doctorat **Numéro d'ordre** : 2020LYSEI034

Ecole doctorale : EDISS 205

Spécialité : Physiologie

RESUME: Le diabète de type 2 (DT2) est associé à plusieurs altérations du métabolisme lipidique ainsi qu'à l'incidence de complications cardiovasculaires. L'hypertriglycéridémie (HTG), caractérisée par une augmentation de la concentration des lipoprotéines riches en triglycérides (LRT), à jeun et en postprandial, ainsi que l'hyperactivité plaquettaire sont des facteurs de risque d'athérothrombose chez les patients DT2. La composition lipidomique des lipoprotéines peut également être modifiée dans un contexte de DT2, ce qui peut, par conséquent, affecter leur fonctionnalité. Notre objectif était de déterminer l'effet des LRT de patientes DT2 à jeun et suite à un repas contenant une matière grasse de source différente (végétale vs laitière) sur l'agrégation de plaquettes saines, ainsi que de déterminer la composition lipidomique, plus particulièrement en sphingolipides (SL), des LRT. D'abord, nous avons montré que les LRT de patients DT2 à jeun activent la voie de signalisation de l'acide arachidonique dans les plaquettes et augmentent leur concentration de thromboxane B2 (TxB2) et leur agrégation. Nous avons ensuite mis en place un protocole clinique en parallèle randomisé visant à étudier les effets des LRT de 30 patientes DT2 à jeun et 4h après l'ingestion d'un petit déjeuner contenant 20g de lipides de source laitière (beurre) ou végétale (pâte à tartiner cacao-noisette) sur les plaquettes et la composition en SL de ces lipoprotéines. Nous avons démontré que l'ingestion de 20g de lipides cause une augmentation des triglycérides et de l'ApoB-48 plasmatiques à 4h et modifie la composition en acides gras (AG) des LRT. De plus, les LRT isolés à jeun et en postprandial augmentent de manière similaire l'agrégation et la concentration de TxB2 plaquettaire. Concernant la composition en SL, la consommation d'une pâte à tartiner à base d'huile de palme a augmenté les concentrations en céramides (Cer) totales des LRT, plus précisément au niveau des espèces Cer 16:0, 22:0, 24:1 et 24:0, comparativement aux concentrations à jeun. La composition en SL des LRT de DT2 à jeun est également différente de celle de volontaires saines (augmentation des sphingomyélines, gangliosides GM3, de la sphingosine-1-phosphate et de la lyso sphingomyéline). Ces travaux mettent en évidence l'implication possible des LRT post-prandiales dans le développement de l'athérothrombose chez les patients DT2, ainsi que l'intérêt de l'étude du lipidome des lipoprotéines dans une optique de prévention des complications cardiovasculaires associées au DT2. Les mécanismes sous-tendant les effets de la composition en SL des LRT sur leur interaction avec les plaquettes restent à élucider.

MOTS-CLÉS : diabète de type 2, athérothrombose, risque cardiovasculaire, lipoprotéines riches en triglycérides, plaquettes, sphingolipides, lipidomique

Laboratoire (s) de recherche : CarMeN-Cardiovasculaire, métabolisme, diabétologie, nutrition

Directeur de thèse: Dr. Catherine Calzada

Co-directeur de thèse : Dr. David Cheillan

Président de jury :

Composition du jury :

Dr. Xavier Collet-Rapporteur

Pr. Bruno Vergès-Rapporteur

Dr. Constance Boyer-Examinatrice

Pr. Corinne Malpuech-Brugère-Examinatrice

Dr. Marie-Caroline Michalski-Examinatrice

Pr. Philippe Moulin-Examinateur

Dr. Catherine Calzada-Directrice de thèse

Dr. David Cheillan-Co-directeur de thèse

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI034/these.pdf
© [M.M. Boulet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés