



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

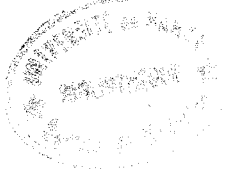
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

2387. 10 232-af.
7ab6

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ NANCY I



THESE

ALTERATIONS STRUCTURALES ET DYNAMIQUES DE LA MEMBRANE
DE L'HEMATIE HUMAINE AU COURS DE DESORDRES METABOLIQUES.

Présentée en vue d'obtenir le titre de:

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ NANCY I

Spécialité génie biologique et médical

par

Nezha ZEGHARI
présentée et soutenue publiquement
le 25 Avril 1995.

Rapporteurs: Pr L. VAN GAAL
Pr M. BOURDEAUX
Mme F. BEAUGE

Membres du jury: Pr P. DROUIN
Mme M. DONNER

**ALTERATIONS STRUCTURALES ET DYNAMIQUES
DE LA MEMBRANE DE L'HEMATIE HUMAINE
AU COURS DE DESORDRES METABOLIQUES.**

Liste des figures



Figure 1: <i>Protéines du cytosquelette.</i>	7
Figure 2: <i>Sites de coupure des phospholipases A₁ et A₂.</i>	
Figure 3. <i>Droite de régression linéaire du cholestérol en fonction de l'HbA_{1c}.</i>	13
Figure 4. <i>Régression linéaire du cholestérol en fonction de la fructosamine.</i>	51
Figure 5. <i>Régression linéaire du cholestérol en fonction de la glycémie.</i>	52
Figure 6. <i>Régression linéaire des phospholipides en fonction de l'HbA_{1c}.</i>	52
Figure 7. <i>Régression linéaire des phospholipides en fonction de la fructosamine.</i>	53
Figure 8. <i>Régression linéaire du rapport C/PL en fonction de l'HbA_{1c}.</i>	53
Figure 9. <i>Régression linéaire du rapport C/PL en fonction de la fructosamine.</i>	54
Figure 10 <i>Régression linéaire du rapport C/PL en fonction de la glycémie.</i>	54
Figure 11. <i>Régression linéaire du cholestérol membranaire en fonction du cholestérol HDL.</i>	55
Figure 12. <i>Régression linéaire de l'HDL cholesterol en fonction de l'HbA_{1c}.</i>	56
Figure 13. <i>Régression linéaire de la quantité de PE membranaire en fonction de l'HbA_{1c}.</i>	58
Figure14. <i>Régression linéaire de la quantité de PE membranaire en fonction de la fructosamine.</i>	59
Figure 15. <i>Régression linéaire de la quantité de PC membranaire en fonction de l'HbA_{1c}.</i>	59
Figure 16. <i>Régression linéaire de la quantité de PC membranaire en fonction de la fructosamine.</i>	56
Figure 17. <i>Régression linéaire de la quantité de SM membranaire en fonction de la fructosamine.</i>	60
Figure 18: <i>Régression linéaire de le SM en fonction de la PC.</i>	61
Figure 19. <i>Régression linéaire de la quantité totale de phospholipides membranaire en fonction de l'HbA_{1c}.</i>	61
Figure 20. <i>Régression linéaire de la quantité totale de phospholipides membranaire en fonction de la fructosamine.</i>	62
Figure 21: <i>Régression linéaire des phospholipides totaux déterminés par CLHP et de la glycémie.</i>	62
Figure 22. <i>Régression linéaire de la PC membranaire en fonction du cholestérol HDL.</i>	63
Figure 23. <i>Régression linéaire de la PC membranaire en fonction du cholestérol LDL.</i>	64
Figure 24. <i>Régression linéaire de la PC membranaire en fonction des triglycérides plasmatiques.</i>	64
Figure 25 <i>Régression linéaire du rapport PC/SM en fonction de la fructosamine.</i>	66
Figure 26. <i>Régression linéaire du rapport PE/PC en fonction de la glycémie.</i>	66
Figure 27. <i>Régression linéaire du rapport PE/PC en fonction de l'HbA_{1c}.</i>	67

Figure 28: Régression linéaire du cholestérol HDL en fonction du rapport PC/SM chez le diabétique.	68
Figure 29: Régression linéaire du cholestérol membranaire en fonction du rapport PC/SM chez le diabétique.	68
Figure 30: Régression linéaire du cholestérol membranaire en fonction du rapport PC /SM chez le témoin.	69
Figure 31: Régression linéaire de l'anisotropie $\langle r \rangle$ du 6-AS en fonction de l'HbA _{1c} .	70
Figure 32: Régression linéaire de l'anisotropie $\langle r \rangle$ émise par le 12-AS en fonction du cholestérol membranaire.	71
Figure 33: Régression linéaire de l'anisotropie $\langle r \rangle$ du 12-AS en fonction du rapport C/PL .	71
Figure 34: Perturbations métaboliques en cas d'acidocétose diabétique.	82
Figure 35: Réaction de méthylation de la PE en PC.	90
Figure 36: Couplage des PMTases avec le récepteur β -adrénergique et l'adénylate cyclase.	92
Figure 37: Dégradation par la PLA ₂ de la PC synthétisée par méthylation.	93
Figure 38: Intervention de la protéine G dans la transduction du signal.	94
Figure 39: Régression linéaire entre les variations des quantités de PE et les variations des quantités de PC après incubation avec le β -OH.	103
Figure 40: Régression linéaire de la perte de PC en fonction de la fructosamine.	114
Figure 41: Régression linéaire de la dégradation de PC en fonction de l'anisotropie $\langle r \rangle$ du 6-AS	115
Figure 42: Régression linéaire de la quantité totale de phospholipides membranaires en fonction de la concentration plasmatique de β -OH.	127
Figure 43: Régression linéaire de la quantité totale de phospholipides membranaires en fonction de la concentration plasmatique d'acétoacétate.	128
Figure 44: Régression linéaire de la quantité de PC membranaire en fonction de la concentration plasmatique de β -OH.	129
Figure 45: Régression linéaire de la quantité de SM en fonction de la quantité de PS.	130
Figure 46: Régression linéaire de la quantité de PS en fonction de la glycémie.	130
Figure 47: Récepteur de l'insuline..	141
Figure 48: Métabolisme des inositols	142
Figure 49: Hydrolyse du phosphatidyl inositol et transmission du signal.	145
Figure 50: structure de la sphingosine.	151
Figure 51: Molécule de sphingomyéline. Structure constituée d'un céramide et d'une tête phosphocholine	152
Figure 52 Structure générale des glycolipides	153



Liste des tableaux.

Tableau 1: <i>Composition en phospholipides des deux feuilletts de la membrane érythrocytaire.</i>	16
Tableau 2 : <i>Fluidité de la membrane érythrocytaire et diabète insulino-dépendant.</i>	
<i>Données de la littérature.</i>	37
Tableau 3: <i>Données de la littérature sur le cholestérol, les phospholipides et le rapport C/PL membranaires</i>	38
Tableau 4: <i>Phospholipides membranaires chez les DID.</i>	
<i>Données de la littérature.</i>	39
Tableau 5: <i>Caractéristiques plasmatiques des patients diabétiques.</i>	49
Tableau 6: <i>Lipides membranaires.</i>	50
Tableau 7: <i>Corrélations des lipides membranaires avec les paramètres de l'équilibre glycémique..</i>	51
Tableau 8: <i>Corrélation de l'HDL cholestérol avec l'équilibre glycémique et le cholestérol membranaire.</i>	55
Tableau 9: <i>Classes de phospholipides des patients et des témoins.</i>	57
Tableau 10: <i>Corrélations des classes de phospholipides membranaires avec les paramètres de l'équilibre glycémique.</i>	58
Tableau 11: <i>Corrélations de la PE et de la PC avec les lipides plasmatiques</i>	63
Tableau 12. <i>Rapports PE/PC et PC/SM dans les deux groupes et comparaison.</i>	65
Tableau 13. <i>Anisotropie de la fluorescence émise par les sondes 6 et 12-AS incorporées dans les hématies de sujets témoins et diabétiques.</i>	69
Tableau 14: <i>Corrélations des valeurs d'anisotropies différents paramètres membranaires ou plasmatiques</i>	70
Tableau 15: <i>Effet du β-OH sur l'activité de différentes enzymes des cellules neuroblastiques en culture: (Prasad K. N.,1976)</i>	86
Tableau 16: <i>Effet de l'interaction in vitro du β-OH sur les lipides des membranes érythrocytaires de sujets témoins.</i>	101
Tableau 17: <i>Effet de l'interaction in vitro du β-OH sur les classes de phospholipides membranaires des hématies de sujets témoins.</i>	102
Tableau 18 <i>Effet de l'interaction in vitro du β-OH sur les pourcentages de PE et de PC des hématies de sujets témoins.</i>	103

Tableau 19. Rapports PE/PC et PC/SM avec et sans β -OH.	104
Tableau 20. Valeurs de l'anisotropies de fluorescence émise par les sondes 6 et 12-AS avant et après incubation avec le β -OH.	104
Tableau 21. Quantités des différentes classes de phospholipides pour les différents groupes	109
Tableau 22. Effet in vitro du β -OH sur les quantités de cholestérol , de phospholipides et sur le rapport C/PL .	112
Tableau 23. Effet in vitro du β -OH sur les quantités des classes de phospholipides .	113
Tableau 24. Effet in vitro du β -OH sur les rapports PE/PC et PC/SM des hématies de patients diabétiques.	114
Tableau 25. Effet in vitro du β -OH sur l'anisotropie de fluorescence émise par les sondes 6 et 12-AS insorporées dans les hématies de patients diabétiques.	115
Tableau 26. Quantités des différentes classes de phospholipides pour les cinq groupes.	116
Tableau 27. Caractéristiques plasmatiques des ACD et DID.	123
Tableau 28. Cholestérol, phospholipides et rapport C/PL de la membrane érythrocytaire de sujets témoins, de patients diabétiques et de patients en acidocétose.	126
Tableau 29. Comparaison des ACD avec les différents goupes.	126
Tableau 30. Classes majeures de phospholipides pour les différents groupes.	128
Tableau 31. Comparaison des ACD avec les autres goupes (Mann-Whitney).	129
Tableau 32. Rapport PE/PC et PC/SM pour les différents groupes.	131
Tableau 33. Comparaison des ACD avec les autres goupes (Mann-withney).	131
Tableau 34. Anisotropies de fluorescence $\langle r \rangle$ pour les deux sondes.	132
Tableau 35. Comparaison des ACD avec les autres groupes (Mann-Withney).	132
Tableau 36. Caractéristiques cliniques et biochimiques des témoins et des patients obèses.	160
Tableau 37. Anisotropies de la fluorescence $\langle r \rangle$ émise par le DPH et le TMA-DPH incorporés dans les membranes de témoins et de patients obèses.	161
Tableau 38. Données de la littérature.	161
Tableau 39. Composition lipidique membranaire des hématies des sujets témoins et des patients obèses.	162
Tableau 40. Coefficients de corrélation entre Log(insulinémie) et les différents paramètres.	163
Tableau 41: Influence de l'insulinosensibilité sur les paramètres cliniques et plasmatiques des sujets obèses.	164
Tableau 42: Anisotropies de la fluorescence $\langle r \rangle$ émise par le DPH et le TMA-DPH pour les différents groupes.	165

Tableau 43: Paramètres lipidiques membranaires.	165
Tableau 44: Classes de phospholipides membranaires.	166



Liste des abréviations.



- $\langle r \rangle$: anisotropie de fluorescence.
- 12-AS : acide 12-(9-anthroyloxystéarique).
- 6-AS : acide 6-(9-anthroyloxystéarique).
- Acétyl-coA : Acétyl Coenzyme A
- AG : Acide gras
- AMPc : Adénosine triphosphate ou AMP cyclique.
- Apo A : Apoprotéine A.
- Apo B : Apoprotéine B.
- ATP : Adénosyltriphosphate.
- β -OH : β -hydroxybutyrate.
- BHT : 2,6-Di-butyl-p-cresol.
- BMI : Body Mass Index.
- C : Cholestérol.
- C20:4(n-6) : acide arachidonique.
- C22:6(n-3) : acide docosahexanoïque
- CAPP : Ceramide-Activated-Protein-Phosphatase.
- CC : corps cétoniques.
- CLHP : chromatographie liquide haute performance.
- DAG : 1,2-diacylglycérol
- DID : diabète insulino-dépendants.
- DNID : diabète non insulino-dépendant.
- DPH : 1,6 diphényl 1,3,5 hexatriène.
- EGFR : epidermal growth factor receptor.
- GLUT : transporteur du glucose.
- HbA1c : pourcentage d'hémoglobine glycosylée.
- HDL : High Density Lipoprotein.
- HGPO : hyperglycémie provoquée par voie orale.
- HSL : hormone sensitive lipase.
- IFN γ : l'interféron γ .

Ig E : immunoglobuline E.

IgG : immunoglobuline G.

IL1: interleukine.

Io : insulïnémie à jeun.

IP₃ : inositol 1',4',5'-triphosphate

LCAT : la Lécithine-Cholestérol-Acyl-Transférase

LDL : Low Density Lipoprotein.

LPC : Lysophosphatidylcholine ou LysoPC

OPT : ophthalaldéhyde.

P/S : AG polyinsaturés / AG saturés.

PA : acide phosphatidique

PAF : platelet activating factor.

PC : phosphatidylcholine.

PC_i et PC_β : quantité de PC avant et après incubation au β-OH, respectivement

PC_i - PC_β représentant la quantité de PC dégradée par la PLA₂

PE : Phosphatidyléthanolamine ou céphaline.

PE_i et PE_β : quantité de PE avant et après incubation au β-OH, respectivement

PI : Phosphatidylinositol.

PIP : phosphatidyl inositol-4'-phosphate (PIP)

PIP₂ : phosphatidylinositol-4',5'-biphosphate

PKC : protéine kinase C

PL : Phospholipides.

PLA₂ : Phospholipases A₂.

PLC : Phospholipase C

PS : Phosphatidylsérine.

Q : quinacrine.

RTH : rapport taille/hanche.

SAH : S-adénosylhomocystéine.

SAM : S-adénosylméthionine.

SM : Sphingomyéline.

SMase : sphingomyélinase.

TMA-DPH: 1(4 triméthylamino) phénylhéxa 1,3,5 triène

TNF α : *tumor necrosis factor α* .





SOMMAIRE

AVANT-PROPOS

1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE : LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE

I) LES PROTEINES

5

I.1) Distinction selon leur topologie

6

I.1.1) Les protéines intrinsèques

6

I.1.2) Les protéines extrinsèques

6

I.1.3) Les protéines du cytosquelette

6

I.2.1) La spectrine

7

I.2.2) L'actine :

7

I.2.3) La protéine 4.1:

7

I.2.4) L'ankyrine

8

I.2.5) La bande 3

8

I.2.6) Les glycophorines A et C

8

II) LES LIPIDES MEMBRANAIRES

9

II.1) Les glycérides

9

II.2) Le cholestérol

9

II.3) Les phospholipides

10

II.3.1) Les glycérophosphatides

10

II.3.2) Les sphingolipides

11

II.4) Les glycolipides

12

III) MECANISMES DE RENOUVELLEMENT DES PHOSPHOLIPIDES

MEMBRANAIRES

14

III.1) Acylation des lysophospholipides

14

III.2) Dismutation

15

III.3) Transacylation	15
III.4) Echange direct	15
IV) ASYMETRIE MEMBRANAIRE	16
IV.1) La topologie transmembranaire des phospholipides	16
IV.2) Origine de l'asymétrie membranaire	16
V) DYNAMIQUE MOLECULAIRE	17
V.1) Mouvement des protéines	17
V.2) Mouvements des lipides	18
V.2.1) Au niveau du même feuillet	18
V.2.2) Diffusion transversale d'un feuillet à l'autre	18
V.2.3) La fluidité membranaire	18
V.3) Principaux modulateurs intrinsèques de la fluidité membranaire	19
V.3.1) Le cholestérol	19
V.3.2) Les phospholipides	19
V.3.3) Le degré d'insaturation des acides gras	20
V.3.4) Les protéines membranaires	20
VI) ROLE DES PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES	20
VII) LES PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES EN TANT QUE PRECURSEURS	
DE MEDiateurs CHIMIQUES	21
VII.1) La phospholipase C	21
VII.2) Les phospholipases A ₂	22
HORMONES ET REGULATION DU METABOLISME	
A) REGULATION HORMONALE DU METABOLISME	25
D) SYSTEME HYPOGLYCEMIANT	25

I.1) L'insuline	25
I.1.1) Actions physiologiques de l'insuline	25
II) SYSTEME HYPERGLYCEMIANT	26
II.1) Le glucagon	26
II.1.1) Rôles du glucagon	27
II.1.2) Mode d'action	27
II.2) Le cortisol	27
II.3) Les catécholamines	28
II.3.1) Rôles des catécholamines	29
B) LE DIABETE	29
I) LE DIABETE INSULINO-DEPENDANTS (DID) OU DIABETE DU TYPE 1	30
I.1) Physiopathologie et anomalies métaboliques	31
I.2) Révélation de la maladie	32
II) LE DIABETE NON INSULINO-DEPENDANT OU DIABETE TYPE 2	32
1ère PARTIE: MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE ET DIABETE INSULINO-DEPENDANT	
I) INTRODUCTION	35
II) RAPPELS	36
II.1) Altération de la fluidité membranaire chez le DID. Facteurs mis en cause	36
II.1.1) Influence du cholestérol sur la fluidité membranaire des érythrocytes de sujets diabétiques.	37
II.1.2) Changements qualitatifs et quantitatifs des phospholipides membranaires	39
II.1.3) Diminution du degré d'insaturation des acides gras dans le DID	40
II.1.4.) Influence de la glycation des protéines sur la fluidité membranaire	40

II.1.5.) Effet de la peroxydation lipidique sur la fluidité membranaire	41
II.2) Influence de la fluidité et de la composition membranaires sur les fonctions membranaires	42
II.2.1) Effet de la fluidité et de la composition membranaires sur le fonctionnement d'enzymes et de transporteurs.	43
III) SUJETS & METHODES	46
III.1) Sujets	46
III.1.1) Patients	46
III.1.2) Témoins	46
III.4) Détermination de la composition biochimique et des propriétés dynamiques des membranes	47
III.5) Tests statistiques	47
IV) RESULTATS	49
IV.1) Paramètres plasmatiques	49
IV.2) Composition membranaire en cholestérol, en phospholipides et rapport C/PL	50
IV.2.1). Corrélations avec les paramètres de l'équilibre métabolique	50
IV.2.2) Corrélations avec les lipides plasmatiques.	55
IV.3) Classes de phospholipides	57
IV.3.1) Corrélations avec les paramètres de l'équilibre métabolique	57
IV.3.2) Corrélations avec les lipides plasmatiques	62
IV.4) Proportions relatives des phospholipides	65
IV.4.1) Corrélations avec les paramètres de l'équilibre métabolique	65
IV.4.2) Corrélations entre le rapport PC/SM et les paramètres lipidiques plasmatiques et membranaires	67
IV.5) Propriétés dynamiques membranaires	69
IV.5.1) Corrélations avec les paramètres de l'équilibre métabolique	70
IV.5.2) Corrélations avec les lipides membranaires	71
V) DISCUSSION	72

V.1) Cholestérol	72
V.2) Phospholipides	74
V.3) Dynamique membranaire	77
V.3.1) Effet du cholestérol	77
V.3.2) Autres facteurs	78

2^{ème} PARTIE: ACIDOCETOSE DIABETIQUE

INTRODUCTION.	81
RAPPELS	82
I) LES CORPS CETONIQUES	82
I.1) Rôle des corps cétoniques dans l'homéostasie énergétique	82
I.2) Rôles des corps cétoniques comme substrats ou comme signaux dans les tissus	84
I.3) Effets du β -OH sur les cellules en culture	84
I.4) Effets du β -OH sur l'induction hormonale de certaines protéines	85
I.5) Effets du β -OH sur l'activité spécifique des enzymes	86
I.6) Effets du β -OH sur les récepteurs	86
I.7) Effets du β -OH sur la lipolyse	87
II) METHYLATION DES PHOSPHOLIPIDES	89
II.1) Définition	89
II.2) Enzymes impliquées	89
II.2.1) Ségrégation topographique	90
II.2.2) Altération de la dynamique membranaire par méthylation des phospholipides	90
II.3) Interaction des méthyltransférases avec les différents composants de la membrane	91
II.3.1) Couplage des PMTases avec les récepteurs membranaires	91

II.3.2) Couplage des PMTases avec l'adénylate cyclase	91
II.3.3.) Couplage des PMTases avec la phospholipase A ₂	92
II.3.4) Intervention des protéines G dans l'activation du complexe récepteur, adénylate cyclase et PMTases	93
II.4.) Protéines G	95
II.5) L'adénylate cyclase	96
II.6) Les PMTases	97
II.7) La phospholipase A ₂ (PLA ₂)	98
ETUDE <i>IN VITRO</i>	99
I) INTRODUCTION	99
II) MATERIELS ET METHODES	99
II.1) Réactifs	99
II.2) Interaction des hématies avec le β -hydroxybutyrate	99
II.3) Détermination de la composition biochimique et des propriétés dynamiques des membranes	100
II.4) Tests statistiques	100
III) RESULTATS	101
III.1) Effet <i>in vitro</i> du β -OH sur les érythrocytes de sujets sains	101
III.1.1) Effets du β -OH sur le contenu membranaire en cholestérol et phospholipides	101
III.1.2) Effets du β -OH sur la composition membranaires en phospholipides	102
III.1.3) Effet du β -OH sur les quantités relatives des phospholipides	104
III.1.4) Effet du β -OH sur la fluidité membranaire des érythrocytes des témoins	104
III.1.5) Hypothèses	106
III.1.6) Inhibitions de la méthylation de la PE et de la dégradation de la PC	108

a) Traitement des échantillon sanguins.	108
b) Résultats.	109
III.1.7) Discussion	110
III.2) Effet in vitro du β -OH sur les érythrocytes de patients diabétiques	112
III.2.1) Effets du β -OH sur le contenu membranaire en cholestérol et phospholipides	112
III.2.2) Effets du β -OH sur les différentes classes de phospholipides	113
III.2.3) Effet du β -OH sur les rapports PE/PC et PC/SM	114
III.2.4) Effet du β -OH sur la fluidité membranaire	115
III.2.5) Inhibition de la méthylation de la PE et de la dégradation de la PC	116
III.2.6) Discussion	118
A) Dynamique membranaire	118
B) Lipides membranaires	118
Les PMTases	119
La phospholipase A ₂	120
ETUDE <i>IN VIVO</i>	123
I) INTRODUCTION	123
II) SUJETS ET METHODES	122
II.1) Patients	122
II.2) Mesure des paramètres dynamiques et structuraux	124
II.3) Tests statistiques	125
III) RESULTATS	126
III.1) Composition membranaire en cholestérol et phospholipides	126
III.2) Classes de phospholipides membranaires	128
III.3) Quantités relatives de phospholipides	131
III.4) Dynamique membranaire	131
IV) DISCUSSION	132

IV.1) Dynamique membranaire	132
IV.2) Composition membranaire	132

3^{ème} PARTIE: OBESITE ET INSULINORESISTANCE

I) INTRODUCTION.	138
II) RAPPELS	140
II.1) Mécanisme d'action de l'insuline	140
II.1.1) Le récepteur de l'insuline	140
II.1.2) Interaction insuline-récepteur	140
II.1.3) Effets de l'insuline sur le métabolisme des phospholipides	144
II.1.4) Importance des groupements polaires dérivant des phospholipides et du 1,2-diacylglycérol en tant que médiateurs de l'action de l'insuline	146
II.1.5) Importance potentielle de l'activation du système DAG-PKC par l'insuline	146
II.2) L'insulino-résistance	148
II.3) Métabolisme de la sphingomyéline. Rôle dans la transmission du signal	150
II.3.1) Généralités	150
II.3.2) Les composantes du cycle de la SM	151
II.3.3) Hydrolyse de la sphingomyéline et transmission du signal	153
II.3.4) Les inducteurs extracellulaires du cycle de la SM	155
II.3.5) Similitudes et différences entre le cycle de la SM et du PI	155
III) MATERIELS ET METHODES	157
III.1) Sujets	157
III.2) Méthodes	158
III.2.1) Explorations métaboliques	158
III.2.2) Composition membranaire	158
III.2.3) Fluidité membranaire	159
III.2.4) Tests statistiques	159

IV) RESULTATS.	160
IV.1) Paramètres cliniques et plasmatiques	160
IV.2) Fluidité membranaire	160
IV.3) Composition lipidique membranaire	162
IV.4) Effet de l'insulino-sensibilité	164
V) DISCUSSION	167
V.1) Dynamique	168
V.2) Composition lipidique membranaire	169

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

ANNEXES

I) PREPARATION DES MEMBRANES D'HEMATIES	179
I.1) Tampons	179
I.2) Lavages	179
I.3) Hémolyse	179
II) DOSAGES BIOCHIMIQUES	180
II.1) Protéines membranaires: méthode de Lowry	180
II.1.1) Principe	180
II.1.2) Réactifs	180
II.1.3) Protocole de dosage	181
II.2) Lipides membranaires. Méthode de Rose et Oklander	181
II.2.1) Principe	181
II.2.2) Réactifs	182
II.2.3) Protocole	182
II.3) Cholestérol. Méthode de Zak et Zlatkis	183
II.3.1) Principe	183
II.3.2) Réactifs	183
II.3.3) Protocole de dosage	183
II.3.4) Courbe d'étalonnage	184

II.4) Extraction des phospholipides. Méthode de Folch	184
II.5) Dosage des phospholipides. Méthode de Bartlett	185
II.5.1.) Principe	185
II.5.2) Réactifs	185
II.5.3) Protocole de dosage	186
III) POLARISATION DE FLUORESCENCE. DETERMINATION DE LA FLUIDITE	
MEMBRANAIRE	187
III.1) Intérêt	187
III.2) Principe	187
III.3) Choix des marqueurs fluorescents	188
III.3.1) Les propriétés spectroscopiques	188
III.3.2) Perturbations causées par la sonde	189
III.3.3) Localisation des sondes dans les membranes	189
III.3.4) Interférences avec les molécules exogènes	189
III.3.5) Sondes utilisées	189
III.4) Protocole	191
III.4.1) Appareillage	191
III.4.2) Réactifs	192
III.4.3) Marquage des hématies avec les sondes fluorescentes	192
IV) CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)	194
IV.1) Intérêt	194
IV.2) Composition du système chromatographique	194
IV.3) Difficultés de la séparation des phospholipides	195
IV.4) Choix de la colonne et du mode chromatographique	195
IV.5) Choix du solvant	196
IV.6) Choix du détecteur	197
IV.7) Appareillage utilisé	198



IV.8) Réactifs	199
IV.8.1) Standards	199
VI.8.2) Solvants	200
IV.9) Protocole	200
IV.9.1) Préparation des échantillons	200
IV.9.2) Séparation des phospholipides	200
V) TESTS STATISTIQUES	208

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AVANT-PROPOS

Il est connu que les membranes ont un rôle bien plus important que la simple délimitation du territoire cellulaire. Elles assurent les échanges entre la cellule et le milieu extérieur et sont également impliquées dans la transmission des signaux extracellulaires. En effet, les phospholipides membranaires constituent des structures de précurseurs de médiateurs qui sont impliqués dans le transfert de l'information apportée à la surface cellulaire.

Ces mécanismes mettent en jeu des enzymes, des récepteurs et des transporteurs dont l'activité est influencée par des propriétés biophysiques et biochimiques de la membrane. De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont démontré qu'il existait une relation entre la composition de la membrane cellulaire, les propriétés dynamiques ou fluidité et certaines fonctions biologiques. Ainsi des changements de la fluidité membranaire dans l'environnement immédiat des récepteurs, des enzymes ou des transporteurs peuvent influencer leur activité. De même, des modifications de la dynamique et de la composition membranaires peuvent altérer des fonctions telles que la perméabilité aux substrats, les flux ioniques, l'activité catalytique des enzymes et le fonctionnement ou l'affinité des récepteurs.

Ces altérations peuvent constituer l'un des mécanismes en cause dans de nombreux processus pathologiques et en particulier dans les maladies métaboliques.

De nombreuses maladies métaboliques sont en effet associées à un certain nombre d'altérations membranaires pouvant être impliquées dans leur physiopathologie et/ou dans leur complications.

Le but de ce travail a été d'examiner dans le cadre de diverses situations correspondant à un désordre métabolique, la composition et les propriétés dynamiques

membranaires du globule rouge humain et de déterminer d'éventuelles modifications apparaissant lors de ces troubles.



Ce mémoire se présente en quatre parties.

La première partie est consacrée à une étude bibliographique sur la membrane érythrocytaire et la régulation du métabolisme.

La deuxième partie rassemble les résultats de l'étude entreprise sur un groupe de patients présentant un diabète insulino-dépendant et représentant par conséquent une situation de carence en insuline. Dans le cadre de cette étude, une attention particulière a été portée aux relations éventuelles entre les altérations membranaires et les paramètres plasmatiques.

La troisième partie concerne une situation extrême d'insulinopénie, l'acidocétose diabétique. Une étude complémentaire *in vitro* de l'effet des corps cétoniques sur la membrane érythrocytaire, a permis de préciser les modifications des paramètres observés *in vivo* et de déterminer les mécanismes mis en jeu lors de l'action des corps cétoniques.

Enfin, la quatrième partie est centrée sur l'étude des propriétés dynamiques et de la composition de la membrane érythrocytaire d'un groupe d'obèses présentant des degrés variables d'insulino-sensibilité. Cette dernière partie de notre travail de recherche a permis d'appréhender les relations existant entre la membrane et l'insulinorésistance.

Le choix de la cellule s'est porté sur l'érythrocyte. L'érythrocyte étant caractérisé par l'absence d'une machinerie enzymatique intracellulaire, il permet une étude plus ciblée des phénomènes membranaires. La membrane érythrocytaire a par ailleurs des échanges permanents avec le milieu plasmatique et constitue de ce fait un bon reflet des éventuelles perturbations qui pourraient être associées aux troubles que nous nous proposons d'étudier. Le dernier avantage offert par le choix de l'érythrocyte consiste en son accessibilité et la facilité de l'isolement des membranes érythrocytaires.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

**LA MEMBRANE
ERYTHROCYTAIRE.**

Les membranes biologiques jouent un rôle crucial dans presque tous les phénomènes cellulaires. Aussi, une parfaite connaissance de la composition membranaire, de la structure et de l'organisation moléculaire est nécessaire à la compréhension des fonctions des systèmes biologiques.

Les membranes biologiques sont constituées d'une double couche avec un feuillet interne et un feuillet externe. Elles sont composées de cholestérol, de phospholipides, de protéines, de glycolipides et de glycoprotéines.

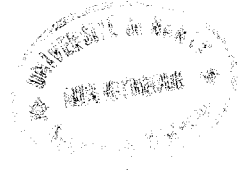
L'analyse de la thermodynamique des systèmes macromoléculaires a permis de conclure à une structure lipidique en mosaïque fluide, dans laquelle les protéines sont dispersées (Singer et Nicholson, 1972).

D) LES PROTEINES

Les protéines sont des composants essentiels des membranes. Assurant des fonctions diverses, elles représentent à peu près 50% des constituants membranaires. Selon leurs fonctions, ce sont :

- des antigènes de surface,
- des canaux ioniques et protéines de transport,
- des protéines du cytosquelette,
- des enzymes,
- des récepteurs.

I.1) Distinction selon leur topologie



I.1.1) Les protéines intrinsèques

Ce sont des protéines globulaires de structure amphipatique qui sont enfouies dans la matrice lipidique, la traversant de part en part, formant des liaisons hydrophobes entre leurs acides aminés et les chaînes aliphatiques des acides gras des phospholipides.

I.1.2) Les protéines extrinsèques

Elles sont ancrées à la périphérie de la membrane grâce à des liaisons électrostatiques. Celles situées à la face interne constituent essentiellement le cytosquelette membranaire.

I.1.3) Les protéines du cytosquelette

Elles constituent une infrastructure composée de molécules protéiques qui soutiennent la double couche lipidique de la membrane érythrocytaire. Ce squelette est pour une large partie impliqué dans la forme de l'hématie et lui confère également ses propriétés élastiques (Boivin, 1984 a).

I.2) Le cytosquelette

Ces protéines sont situées du côté cytoplasmique de la cellule et assurent le soutien de la membrane. Ce sont en particulier la spectrine, l'actine, la protéine 4.1, la bande 3, l'ankyrine et la glycophorine A et C (Figure 1).

I.2.1) La spectrine

C'est le constituant majeur du squelette membranaire. Elle représente 25% des protéines membranaires du globule rouge. La spectrine est un hétérodimère de 460 kD de poids moléculaire, formé de deux chaînes peptidiques différentes α et β de 240 et 220 kD respectivement; le tétramère final est formé par interaction de deux dimères (Cohen, 1984, Boivin, 1984 b). La spectrine interagit avec les autres constituants membranaires comme les autres protéines du cytosquelette et les phospholipides membranaires. Elle montre une grande affinité pour les phospholipides chargés négativement comme la phosphatidylsérine (PS) (Mommers et Verkileij, 1979). La spectrine comme la phosphatidylsérine est localisée au niveau de la face interne de la membrane, et présente une partie fortement hydrophobe capable de pénétrer la double couche lipidique (Boivin, 1984 b).

I.2.2) L'actine

Appelée aussi bande 5, les monomères ont une masse moléculaire de 42 kD, et forment une double chaîne hélicoïdale. Cette protéine présente une capacité importante à activer l'ATPase associée à la membrane (Cohen, 1984).

I.2.3) La protéine 4.1

C'est une protéine globulaire représentant environ 5% de la masse totale du cytosquelette du globule rouge. Elle a une structure polaire, avec une extrémité acide et une autre extrémité basique riche en cystéine. La protéine 4.1 est phosphorylée par des kinases membranaires. Cette phosphorylation peut conduire à une relaxation du réseau squelettique et à la formation d'une structure membranaire plus flexible qui est importante pour les fonctions du globule rouge (Eder et al, 1988).

I.2.4) L'ankyrine

C'est une protéine globulaire de 200 kD appelée également bande 2.1. Elle est responsable du maintien de l'association des protéines du cytosquelette membranaire avec la bicouche lipidique. Elle interagit également avec la bande 3.

I.2.5) La bande 3

C'est la principale protéine intrinsèque de la membrane. Elle existe sous forme de dimères et tétramères. Elle est repliée sur elle-même et traverse la membrane au moins deux fois. L'interaction de la bande 3 avec le cytosquelette limite sa mobilité latérale. La bande 3 interagit également avec un certain nombre d'enzymes comme l'aldolase, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (G₃PDH) et la phosphofructokinase.

I.2.6) Les glycophorines A et C

Ces protéines portent des groupements glucosidiques. La glycophorine A est la principale sialoglycoprotéine de la membrane érythrocytaire qui est liée à la bande 3 (Cohen, 1984). La liaison de la glycophorine C avec la protéine 4.1 constitue le second système d'ancrage du squelette membranaire au reste de la membrane.

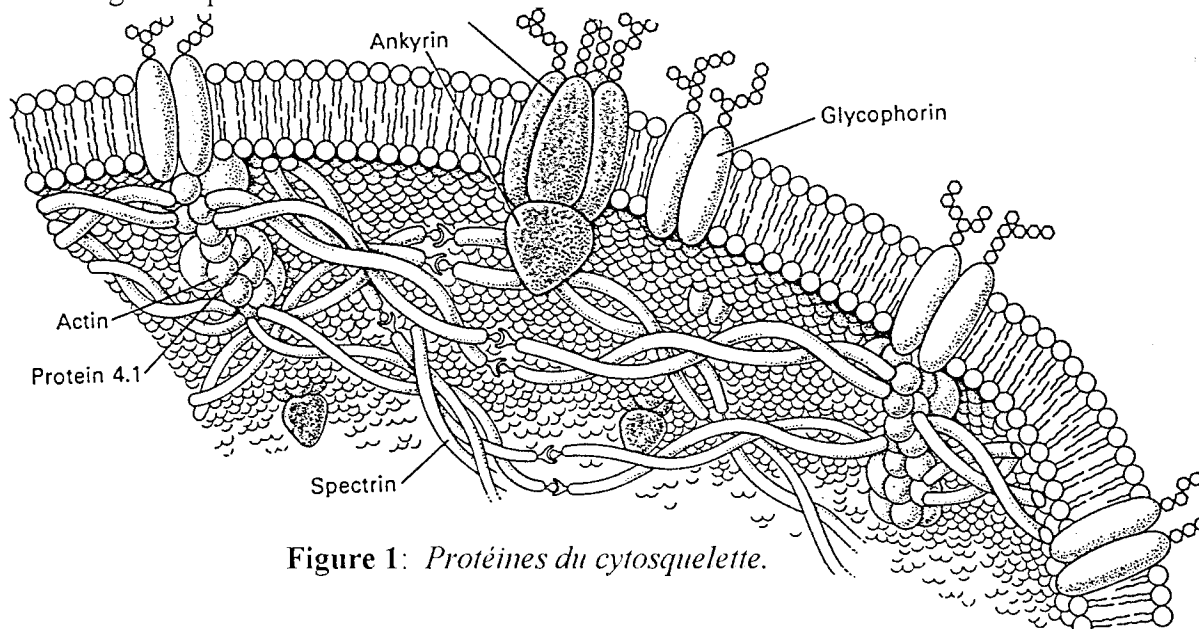


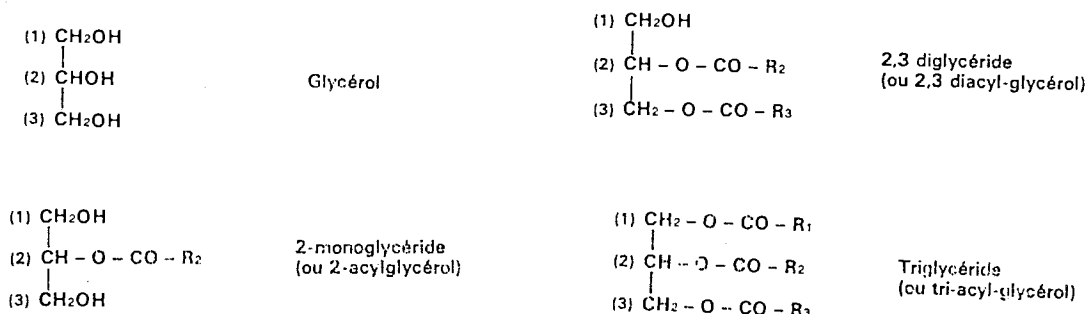
Figure 1: Protéines du cytosquelette.

II) LES LIPIDES MEMBRANAIRES

La diversité des lipides membranaires est très grande. Cependant, les lipides majeurs existant dans l'hématie humaine sont le cholestérol et les phospholipides. On y rencontre néanmoins, bien qu'en faible quantité, des triglycérides, des diglycérides, et des glycolipides.

II.1) Les glycérides

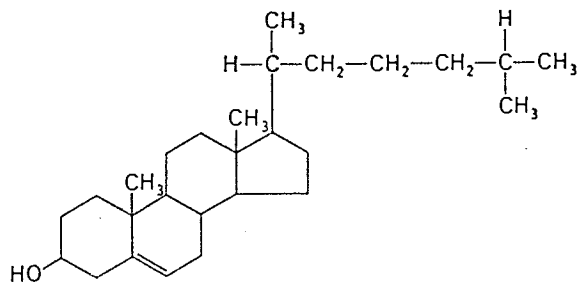
Les glycérides membranaires comportent des monoglycérides, des diglycérides et des triglycérides. Ils sont définis respectivement par l'estérification du glycérol par une, deux ou trois chaînes d'acides gras.



II.2) Le cholestérol

Il fait partie de la famille des stérols. Ce sont des composés possédant un noyau tétracyclique, appelé noyau de cyclopentanophénantrène. La fonction alcool peut être estérifiée par un acide gras provenant d'une lécithine grâce à l'action de la Lécithine-Cholestérol-Acyl-Transférase (LCAT). Le cholestérol (C) représente normalement plus de 90% des lipides neutres existant dans la membrane du globule rouge mature. Il est sous la forme libre non estérifiée.

Le globule rouge mature perd sa capacité à synthétiser le cholestérol. Il s'établit cependant un renouvellement permanent par un échange équilibré entre le cholestérol de la couche externe et le cholestérol plasmatique libre associé aux lipoprotéines. Etant donné qu'aucun récepteur membranaire aux lipoprotéines n'a été mis en évidence au niveau du globule rouge, les échanges semblent s'effectuer par diffusion dans le milieu aqueux et sans aucun contact entre la cellule et les lipoprotéines.



II.3) Les phospholipides

Les phospholipides (PL) représentent 70% en poids des lipides du globule rouge humain. Le rapport molaire C/PL relativement constant pour les hématies normales est de 0,7 - 0,8.

Les phospholipides sont des esters d'acides gras dans lesquels un groupement phosphate fait partie intégrante de la fonction alcool entrant dans la composition de la molécule. Ils comprennent principalement les glycérophosphatides qui contiennent un glycérol et les sphingolipides qui contiennent une sphingosine.

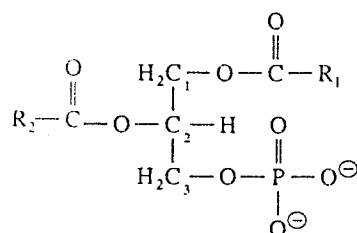
II.3.1) Les glycérophosphatides

La diversité des différentes espèces moléculaires des glycérophospholipides est d'abord assurée par la nature des têtes polaires, sérine, éthanolamine, monométhyl et diméthyl éthanolamine, choline, glycérol et glycérol phosphate, inositol et inositol mono et diphosphate. La nature des acides gras en position 1 et 2 du glycérol ajoute encore à la complexité. Les acides gras saturés (myristique, palmitique et stéarique) sont

principalement situés en position 1, alors que les acides gras insaturés (oléique, linoléique, arachidonique, eicosapentaénoïque et docosapentaénoïque) sont principalement situés en position 2.

II.3.1.1) ACIDE PHOSPHATIDIQUE

Sa synthèse se fait à partir des acide gras, du glycérol et de l'adénosine triphosphate. Il contient un groupement phosphate libre plutôt qu'un acide phosphorique.



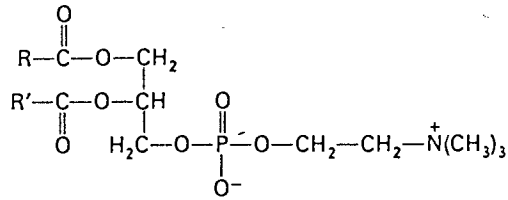
II.3.1.2) ESTERS PHOSPHATIDIQUES

Ce sont des esters mixtes de glycérol, constitués de deux longues chaînes d'acides gras estérifiant les groupements hydroxyls des C1 et C2 du glycérol et d'un acide phosphorique relié par des liaisons ester d'une part au groupement hydroxyl en position C3, et d'autre part à un groupement alcool. Ce dernier selon sa nature (choline, sérine, inositol ou éthanolamine) permet de distinguer les différentes sous classes de phospholipides.

a) Phosphatidylcholine (ou lécithine) (PC)

Elle représente 20 à 25% des phospholipides membranaires.

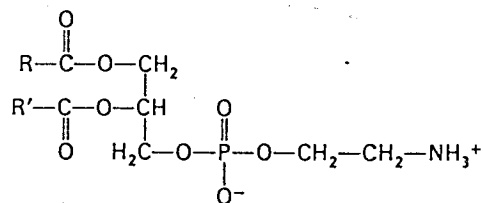
C'est une molécule présentant un pôle hydrophobe constitué des chaînes aliphatiques des acides gras et d'un pôle hydrophile, constitué de la tête polaire. La molécule possède ainsi un caractère amphotère: acide par l'acide phosphorique et basique par la fonction ammonium quaternaire de la choline.



b) Phosphatidyléthanolamine ou céphaline (PE)

Elle représente 22 à 30% des phospholipides membranaires.

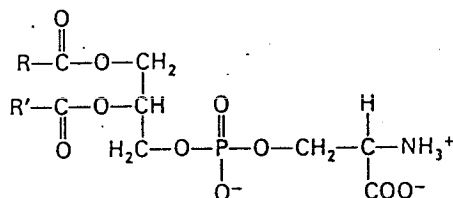
C'est également un phospholipide amphotère portant aussi une charge positive et une charge négative.



c) Phosphatidylsérine (PS)

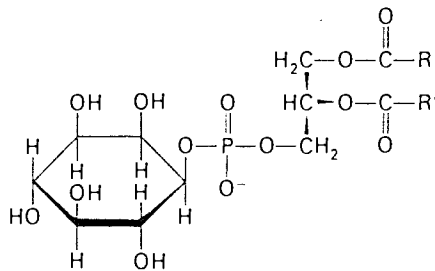
Elle représente 5 à 15% des phospholipides membranaires.

La phosphatidylsérine a un caractère acide car elle porte deux charges négatives et une charge positive.



d) Phosphatidylinositol (PI)

Il est assez peu représenté au niveau de la membrane du globule rouge (2 à 6% des phospholipides membranaires). Il porte une charge négative.



e) Les lysophosphatides:

Ce sont des glycérophosphatides partiellement hydrolysés. Il existe dans la membrane de l'érythrocyte des enzymes (phospholipases A) capables de transformer les phospholipides en lysophospholipides en coupant la liaison ester au niveau de l'un ou de l'autre des acides gras.

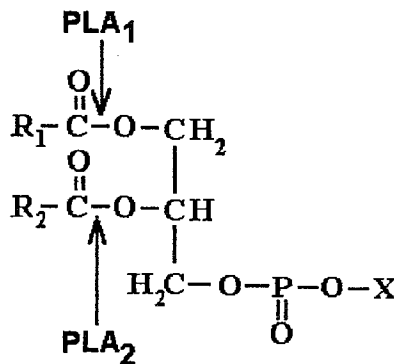


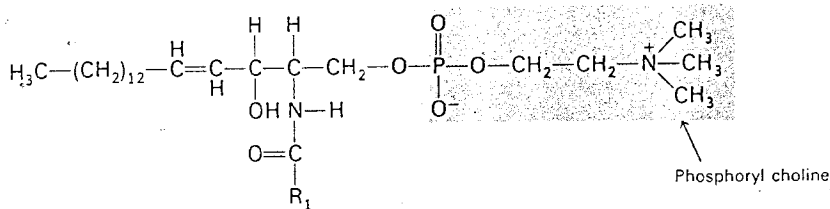
Figure 2: Sites de coupure des phospholipases A₁ et A₂.

II.3.2) Les sphingolipides

Dans le groupe des sphingolipides, le glycérol est remplacé par une sphingosine. Ils sont représentés essentiellement par la sphingomyéline (SM).

Sa structure est particulière. Elle comporte une tête polaire qui est une phosphocholine identique à celle de la phosphatidylcholine mais elle ne contient qu'une seule chaîne d'acide gras. La deuxième chaîne aliphatique est reliée par son groupement acyle à la fonction amine de la sphingosine par une liaison amide.

Les acides gras habituels de la SM sont les acides stéariques et lignocérique.



II.4) Les glycolipides

Ce sont des molécules complexes constituées d'une sphingosine reliée à une longue chaîne d'acide gras par une fonction amide et à un ou plusieurs résidus glucidiques par une fonction alcool primaire.

Les glycolipides des mammifères peuvent être divisés en deux classes selon le nombre d'hexoses liés: les glycolipides simples appelés cérebrosides (1 glucose ou 1 galactose), et les glycolipides complexes ou gangliosides.

III) MECANISMES DE RENOUVELLEMENT DES - PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES

III.1) Acylation des lysophospholipides

Les érythrocytes matures ne peuvent plus synthétiser des phospholipides de novo. Ils ne font qu'incorporer des acides gras à longues chaînes au niveau des phospholipides (Craig et al, 1980). L'acide gras est activé par une Acyl-coA-Ligase donnant un Acyl-coA,

la réaction nécessitant de l'ATP. Après cette étape d'activation, le métabolisme dans le globule rouge se limite à des réactions d'acylations et de déacylations catalysées par des phospholipases A et des Acyl-coA-Lysophosphoglycérides-Acyltransférases (Shohet, 1970).

Les lysophospholipides sont également rapidement échangés entre le plasma et le globule rouge. L'acylation des lysophospholipides assure ainsi un mécanisme de renouvellement des phospholipides qui ont été dégradés (Reed, 1968).

III.2) Dismutation

C'est le deuxième mécanisme de renouvellement des phospholipides. Il utilise également les lysophospholipides mais ne requière pas d'énergie. On obtient alors une dismutation de la lysoPC générant une PC et une glycérophosphocholine. Ce mécanisme concerne essentiellement les lécithines.

III.3) Transacylation

L'incorporation des acides gras (AG) dans la PE a également été démontrée, mais le renouvellement de la PE n'implique pas uniquement l'acylation de la lysoPE par les AG libres, mais également une transacylation où le donneur est la PC générant donc également une lysoPC.

III.4) Echange direct

Les phospholipides de la membrane du globule rouge peuvent également se renouveler par échange direct entre les phospholipides membranaires et leurs homologues plasmatiques (Cooper, 1977).

IV) ASYMETRIE MEMBRANAIRE

IV.1) La topologie transmembranaire des phospholipides

Le caractère amphipatique des phospholipides membranaires est important pour la formation de la bicouche. La ségrégation des lipides en phospholipides anioniques et en molécules zwitterioniques est essentielle pour la polarité des biomembranes. Ces dernières présentent un feuillet externe riche en phospholipides zwitterioniques et un feuillet interne riche en phospholipides anioniques.

Les phospholipides, tout comme les protéines, sont donc distribués de manière asymétrique dans la membrane et en particulier dans la membrane de l'hématie.

Les aminophospholipides PS et PE sont sur la face interne, tandis que les phospholipides à tête choline sont sur la face externe (Devaux et al, 1986).

Tableau 1: *Composition en phospholipides des deux feuillets de la membrane érythrocytaire.*

FEUILLET INTERNE	FEUILLET EXTERNE
20 à 25% de PC	75 à 80% de PC.
100% de PS	100% de SM.
80% de PE	20% de PE

IV.2) Origine de l'asymétrie membranaire

Elle pourrait remonter à la génèse des membranes puisque lorsqu'on crée une asymétrie par biosynthèse, les phénomènes de flip-flop sont plutôt rares, et l'asymétrie est assez stable. Il a également été suggéré que certaines interactions entre les protéines du

cytosquelette et les phospholipides y contribuent, sachant qu'il existe des interactions spécifiques entre la PS, la spectrine et la bande 4.1.

Il apparaît aujourd'hui que la principale cause de l'asymétrie serait en fait due à une protéine transmembranaire ATP-dépendante, appelée aminophospholipide translocase ou "flippase" qui est capable de pomper des aminophospholipides de la couche externe vers le feuillet interne, alors que les phospholipides à tête choline s'accumuleraient au niveau du feuillet externe par un mécanisme de contre diffusion (Devaux et al, 1986).

V) DYNAMIQUE MOLECULAIRE

Les membranes ne sont pas des entités statiques et les lipides autant que les protéines sont affectés de mouvements de différents types.

V.1) Mouvement des protéines

a) Diffusion latérale: elle dépend essentiellement des interactions que les protéines peuvent avoir entre elles ou avec les lipides membranaires ainsi que des différentes fonctions des protéines.

b) Mouvement de rotation: elle peut se faire soit selon un axe parallèle à la membrane comme c'est le cas dans les fonctions de transport, ou selon un axe perpendiculaire au plan de la membrane.

c) Migration: les protéines sont capable de migrer vers des pôles cellulaires lors d'interactions avec des molécules extracellulaires (phénomène de "capping").

V.2) Mouvements des lipides

V.2.1) Au niveau du même feuillet

a) Diffusion latérale des phospholipides membranaires à l'intérieur de la bicouche. Ce mouvement est relativement rapide, le coefficient de diffusion étant estimé à 10^{-8} cm^2/s , alors que pour les protéines il est voisin de 10^{-11} cm^2/s .

b) Rotation des phospholipides autour de leur axe.

c) Mouvement de balancier. Il est diffusé d'une chaîne aliphatique à l'autre et est dû à l'existence d'une flexibilité plus importante au niveau des extrémités au centre de la bicouche qu'au voisinage des têtes polaires.

V.2.2) Diffusion transversale d'un feuillet à l'autre

a) Diffusion transversale passive ou "flip-flop". Elle a tendance à équilibrer les lipides au niveau des deux couches de la membrane. Ce mouvement est très lent et dure de plusieurs dizaines de minutes à plusieurs heures. Il est limité par le passage de la tête polaire à travers un milieu hydrophobe. La nature de la chaîne aliphatique influence la vitesse de diffusion, les acides gras polyinsaturés facilitent plus la diffusion que les acides gras saturés.

b) Diffusion transversale facilitée par une protéine spécifique

V.2.3) La fluidité membranaire

Quand le modèle de mosaïque fluide de la membrane cellulaire a été formulé, il est devenu évident que les lipides pouvaient influencer les fonctions liées aux membranes biologiques (Shinitzki, 1984; Spector et Yorek, 1985). Dans ce modèle, les protéines sont considérées comme des unités dynamiques et fonctionnelles enfouies dans la matrice

lipidique. La fluidité lipidique constituerait alors l'élément qui faciliterait la diffusion des protéines.

Le terme fluidité se réfère à la résultante des propriétés dynamiques, chimiques et physiques qui sont le reflet de la mobilité latérale des phospholipides, et de leurs interactions moléculaires au sein de la bicouche.

V.3) Principaux modulateurs intrinsèques de la fluidité membranaire

Les composants membranaires sont connus pour influencer la fluidité soit dans le sens d'une augmentation ou au contraire dans le sens d'une diminution. Les modulateurs majeurs de la fluidité membranaire sont selon leur ordre d'importance.

V.3.1) Le cholestérol

Les informations sur la fluidité proviennent le plus souvent d'études avec des sondes hydrophobes émettant soit un signal de résonance paramagnétique électronique, soit un signal de fluorescence. Avec ces deux types de sondes, on a pu établir des corrélations entre la quantité de cholestérol dans la membrane et la fluidité des lipides membranaires. L'addition de cholestérol aux phospholipides diminue la mobilité des sondes incorporées à l'intérieur de la bicouche lipidique en augmentant la cohésion du microenvironnement des sondes.

Le cholestérol agit en effet, comme facteur rigidifiant de la bicouche lipidique. Il augmente l'efficacité du packing et le degré d'ordre des phospholipides. Le rapport molaire C/PL a également été considéré comme un paramètre quantitatif inversement corrélé à la fluidité (Shinitzki, 1984).

V.3.2) Les phospholipides

La sphingomyéline et la phosphatidyléthanolamine ont un effet rigidifiant sur la bicouche lipidique (Shinitzky, 1984). La phosphatidylsérine aurait également un effet

rigidifiant. En revanche, la phosphatidylcholine et le phosphatidylinositol exerceraient plutôt un effet fluidifiant sur la membrane.

V.3.3) Le degré d'insaturation des acides gras

L'effet des phospholipides sur la fluidité membranaire dépend de la nature de leurs acides gras. En effet, les acides gras à chaînes saturées confèrent un plus grand degré d'ordre aux membranes et donc une fluidité plus basse. Inversement, les chaînes d'acides gras polyinsaturées sont connues pour désorganiser la membrane en empêchant le packing des phospholipides. Elles augmentent ainsi la fluidité membranaire.

V.3.4) Les protéines membranaires

Etant donné leur faible compressibilité, les protéines membranaires peuvent être considérées comme des domaines rigides enfouies dans la matrice lipidique. Leur degré de glycation peut également être un des facteurs influençant la fluidité membranaire (Cooper, 1977).

VI) ROLE DES PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES

Il apparaît clairement que les phospholipides ont un rôle bien plus important que la simple délimitation du territoire cellulaire. Ils participent également à l'établissement des propriétés biophysiques des membranes cellulaires.

En effet, la nature des têtes polaires, la position et le nombre des doubles liaisons des acides gras des chaînes aliphatiques, ainsi que, probablement, la nature de la liaison entre les acides gras et le glycérol, sont des éléments importants dans l'établissement des propriétés viscodynamiques des membranes, dans la stabilité de la structure en bi-couche et dans l'apparition de ségrégation de phases.

On sait aussi que certains produits du métabolisme des phospholipides, qui apparaissent lors des activations cellulaires peuvent affecter localement les propriétés biophysiques en créant des micro-domaines. C'est le cas des lysolécithines, des diglycérides, des acides gras libres ou des acides gras peroxydés.

L'étude de l'influence réelle des modifications de la composition biochimique de la membrane sur ses propriétés biophysiques n'est pas aisée à appréhender et ceci d'autant plus que des variations locales extrêmement limitées peuvent parfaitement échapper aux moyens d'investigation classiques. Il n'en reste pas moins que des modifications de ce qu'on appelle fluidité membranaire affectent l'activité de certaines protéines membranaires. C'est le cas pour les ATPases (Farias et al, 1975), la phospholipase A₂ (Momchilova et Petkova, 1986) l'adénylate cyclase (Allam et al, 1987) et bien d'autres protéines.

VII) LES PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES EN TANT QUE PRECURSEURS DE MEDiateurs CHIMIQUES

Les phospholipides membranaires constituent également des structures de réserves de médiateurs qui sont impliqués dans le transfert de l'information apportée à la membrane cellulaire. Ces mécanismes sont étroitement intriqués les uns avec les autres, et mettent en jeu en particulier les phospholipases C et A₂.

VII.1) La phospholipase C

L'activation de la phospholipase C résulterait d'un couplage avec un récepteur ou un canal ionique par l'intermédiaire d'une protéine possédant une activité GTPasique: la protéine G (Wu et al, 1993). Elle libère à partir du phosphatidylinositol, un diglycéride et un inositol tri-phosphate (IP₃). Le diglycéride permet la translocation de la protéine kinase

C (PKC) dans la membrane et son activation. L'IP₃ qui constitue en fait la tête polaire du PI est également impliqué dans la transduction du signal.

VII.2) Les phospholipases A₂

Les phospholipases A₂ (PLA₂) catalysent la réaction d'hydrolyse de la liaison ester en position 2 des phospholipides.

Elles sont reconnues comme des enzymes qui contrôlent l'étape limitante de la production de médiateurs lipidiques. Des acides gras polyinsaturés principalement l'acide arachidonique sont libérés lors de l'action de la PLA₂ et peuvent eux mêmes être des seconds messagers.

La PLA₂ joue également un rôle dans des processus physiologiques impliquant une désorganisation membranaire localisée, comme c'est le cas lors de fusions membranaires accompagnant les processus sécrétoires.

Le mécanisme d'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) reste encore inconnu. Enzyme membranaire, elle doit être inhibée en permanence pour ne pas détruire la membrane dont les phospholipides constituent le substrat endogène. La levée de l'inhibition aurait lieu sous l'influence de protéines kinases. Il pourrait s'agir de sérines protéines kinases telles que la PKC ou plus rarement de tyrosines protéines kinases exprimées anormalement. L'enzyme est également susceptible d'être inhibée par des acides gras polyinsaturés.

Les produits des réactions phospholipasiqes A₂ possèdent des propriétés biologiques extrêmement importantes. Ce sont en particulier des agents déstabilisant les membranes. Le lysodérivé de l'alkyl PC par exemple n'est autre que le PAF acéther (platelet activating factor), médiateur puissant possédant un récepteur spécifique sur de nombreuses cellules lequel est très probablement couplé à la phospholipase C.

Les acides gras polyinsaturés libérés peuvent être transformés par différentes enzymes comme la cyclooxygénase, la peroxydase ou d'autres enzymes permettant la

synthèse de prostaglandines, de thromboxanes ou d'une série d'acides gras polyinsaturés peroxydés puis hydroxylés. Ces différents produits possèdent souvent au niveau de la membrane des récepteurs couplés à différentes enzymes comme l'adénylate cyclase et la phospholipase C.

**HORMONES ET
REGULATION DU METABOLISME**

A) REGULATION HORMONALE DU METABOLISME

Les hormones jouent un rôle clé dans le métabolisme. La régulation est assurée par deux systèmes, un système hypoglycémiant constitué de l'Insuline et un système hyperglycémiant comprenant le Glucagon, les Corticoïdes et les Catécholamines.

I) SYSTEME HYPOGLYCEMIANT

I.1) L'insuline

L'insuline est une hormone polypeptidique de 5 à 8 kD synthétisée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Sa sécrétion est stimulée par le système nerveux parasympathique et le glucose.

L'insuline se fixe sur des récepteurs spécifiques (glycoprotéines) au niveau de la membrane plasmique des cellules cibles. Selon les conditions métaboliques et selon le type cellulaire, le nombre de récepteurs spécifiques est variable.

I.1.1) Actions physiologiques de l'insuline

L'insuline a pour principal rôle de permettre à l'organisme d'utiliser les sucres et essentiellement le glucose. C'est l'hormone qui permet donc la pénétration cellulaire du glucose et son stockage éventuel au niveau du foie. L'insuline stimule également les réactions anaboliques lipidiques et protidiques.

I.1.1.1) ACTION SUR LE GLUCOSE

L'insuline favorise la pénétration cellulaire du glucose. L'hormone se fixe sur des sites récepteurs spécifiques sur la membrane cellulaire et active les transporteurs de glucose.

L'insuline favorise la glycogénèse hépatique en agissant sur le système de la synthèse du glycogène, et en bloquant la glycogénolyse. Un déficit en insuline s'accompagne donc d'une hyperglycémie par non consommation de glucose.

I.1.1.2) ACTION SUR LES GRAISSES

L'insuline agit de façon majeure sur la synthèse des graisses au niveau du foie et sur leur mise en réserve dans la cellule adipeuse (elle est réduite de 90% dans le diabète). La synthèse et le stockage des graisses à partir des glucides sont des phénomènes fondamentaux qui sont liés au fait que l'insuline favorise la voie glycolytique d'Embden-Meyerhof. Celle ci fournit l'énergie sous forme de NADH nécessaire à la synthèse lipidique.

L'insuline active la lipogénèse et diminue la lipolyse ainsi que la production des corps cétoniques (cétogénèse).

I.1.1.3) ACTION SUR LES PROTIDES

L'insuline est puissamment anabolisante au niveau de la plupart des tissus. Elle participe à la formation des glycoprotéines de structure en particulier au niveau des parois vasculaires. Elle accélère le transport des acides aminés et stimule la biosynthèse des protéines dans le foie, le tissu adipeux et le muscle. De plus, elle inhibe la dégradation intracellulaire des protéines.

II) SYSTEME HYPERGLYCEMIANT

II.1) Le glucagon

C'est une autre hormone peptidique pancréatique de 3 à 5 kD, sécrétée par les cellules α des îlots de Langerhans pancréatiques.

II.1.1) Rôles du glucagon

C'est une hormone glycogénolytique et hyperglycémiante, agissant essentiellement au niveau du foie et non du muscle.

Le glucagon intervient également dans le contrôle de la lipogénèse. Il a l'effet inverse de l'insuline. Il augmente la phosphorylation de l'acétyl.CoA-carboxylase, la rendant moins sensible à l'effet activateur positif du citrate. Il stimule en outre la lipolyse dans les tissus adipeux, en agissant au niveau de l'hydrolyse des liaisons glycérol-acides gras des triglycérides. Le glucagon a une action stimulatrice sur la cétogénèse.

II.1.2) Mode d'action

L'action du glucagon au niveau cellulaire s'exerce par l'intermédiaire de l'AMP cyclique, résultant de l'activation de l'adénylate cyclase et toutes les actions du glucagon sont médiées par des protéines kinases activées par l'AMP cyclique.

II.2) Le cortisol

C'est un hyperglycémiant à long terme. Il inhibe la capture périphérique du glucose, stimule la néoglycogénèse, et donc une inflation glucidique de l'organisme. Il exerce par ailleurs une action stimulatrice sur la lipolyse. De plus, le cortisol a une action anti-insuline propre.

II.3) Les catécholamines

L'activation du système nerveux sympathique ou la stimulation des sécrétions adrénomédullaires, produit un large effet sur le métabolisme via les catécholamines.

Les catécholamines agissent soit directement sur les tissus impliqués, soit par une action indirecte sur d'autres hormones.

Les catécholamines ont deux types d'actions selon la nature des récepteurs α et β stimulés. En effet, la stimulation des récepteurs α et β provoque un effet opposé sur les processus métaboliques.

II.3.1) Rôles des catécholamines

II.3.1.1) METABOLISME DES SUCRES

Les effets directs ou indirects des catécholamines entraînent une augmentation rapide et soutenue du glucose dans le plasma, due à une augmentation de la production et à la diminution de l'utilisation périphérique du glucose.

Les catécholamines agissent en se fixant sur les récepteurs β des membranes des hépatocytes, stimulent l'adénylate cyclase permettant la formation de l'AMP cyclique, et ainsi l'activation d'une protéine kinase permettant la phosphorylation de la phosphorylase kinase et de la glycogène synthétase. La phosphorylation active la première enzyme et inactive la deuxième.

II.3.1.2) METABOLISME DES PROTEINES

Les catécholamines stimulent le métabolisme des protéines, cette action est médiée par les récepteurs β -adrénergiques. L'adrénaline, en particulier, inhibe la protéolyse, et a ainsi une action similaire à celle de l'insuline.

II.3.1.3) METABOLISME DES GRAISSES

Le système sympatho-adréral est le plus important de la régulation de la lipolyse chez l'Homme. Les adipocytes humains contiennent à la fois des récepteurs β stimulateurs et des récepteurs α inhibiteurs, mais l'activité des premiers est généralement prédominante. Bien que ce ne soit pas toujours le cas, le tissu adipeux provenant de patients obèses révèle une activité antilipolytique supérieure des récepteurs α .

L'étape limitante de la lipolyse est l'hydrolyse initiale des triglycérides par "l'hormone sensitive lipase" (HSL). L'activation de cette hormone se fait via un

phénomène de cascade similaire à celui de la glycogénolyse. Les catécholamines agissent au niveau du récepteur β -adrénergique pour stimuler l'adénylate cyclase produisant l'AMPc. La HSL existe sous forme active phosphorylée et sous forme inactive déphosphorylée, la phosphorylation étant catalysée par une protéine kinase dont l'activité dépend du taux de AMPc.

III.3.1.4) EFFET DES CATECHOLAMINES SUR LA CETOGENESE:

La cétogénèse est essentiellement régulée par le glucagon (stimulation), et par l'insuline (inhibition). Néanmoins, une infusion de catécholamines augmente la concentration des corps cétoniques (CC) (Galster et al, 1981). Ceci semble dû à une augmentation de la production des corps cétoniques par le foie, et secondairement à une augmentation des acides gras libres comme substrat de synthèse des corps cétoniques (Bahnsen et al, 1984). Il existe un effet direct des catécholamines sur la stimulation de la cétogénèse hépatique puisque, lors d'une infusion plus ou moins longue des catécholamines, le taux de lipolyse finit par baisser alors que l'effet stimulateur de la cétogénèse persiste (Weiss et al, 1984). Il a ainsi été démontré que les catécholamines avaient une action cétogénique directe indépendante de son effet lipolytique (Schade et Eaton, 1978).

B) LE DIABETE

La concentration du glucose et d'autres substrats oxydables est régulée dans des limites étroites, appropriées au fonctionnement optimal des systèmes enzymatiques qui assurent le métabolisme de ces substrats. Le système de régulation est complexe. Il fait intervenir les substrats circulants comme le glucose, les acides aminés, les dérivés lipidiques et bien sûr l'insuline.

Cet ensemble est modulé par plusieurs systèmes: l'axe entéro-insulaire, l'axe cérébro-insulaire, la régulation panacrine intra-insulaire, et par l'autorégulation de la cellule insulinosécrétrice elle même.

L'axe entéro-insulaire est représenté par les hormones pariétodigestives libérées lors des repas, et qui ont un effet insulinosécrétoire propre.

L'axe cérébro-insulaire est constitué par les nerfs du pancréas, les nerfs pneumogastriques, la composante alpha-adrénergique du sympathique, et sans doute aussi des médiateurs peptidiques, qui stimulent la sécrétion d'insuline.

La régulation paracrine intra-insulaire est assurée par des concentrations élevées de somatostatine et de glucagon à l'intérieur de l'îlot de Langerhans. Il existe de plus une autorégulation intrinsèque de la cellule bêta. En effet, le glucose engendre une stimulation directe immédiate, mais aussi une potentialisation retardée de la réponse à un second stimulus glucosé, ainsi qu'une inhibition relative de la réponse insulinosécrétoire. Le dérèglement de ce système de régulation complexe et les anomalies des cellules bêta-langerhansienne sont à l'origine du diabète.

On distingue deux types de diabète avec des physiopathologies différentes, le diabète insulino-dépendant et le diabète non insulino-dépendant.

I) LE DIABETE INSULINO-DEPENDANTS (DID) OU DIABETE DU TYPE 1

La carence en insuline fait suite à une destruction auto-immune des cellules bêta ou une destruction globale de l'îlot de Langerhans. Le déficit en insuline peut également dériver de l'incapacité de l'enzyme à cliver la proinsuline. Ce processus dépend d'une protéolyse à des sites spécifiques. L'apparition de mutations du gène de l'insuline au niveau de ces sites de clivages, entraîne une impossibilité à convertir la proinsuline en insuline.

a) Eléments génétiques

C'est la susceptibilité à développer la maladie qui est génétiquement transmise. Cette susceptibilité est associée principalement à certains gènes du complexe majeur d'histocompatibilité.

b) Auto-immunité

Le rôle de l'auto-immunité est attesté par différents éléments: comme la présence d'auto-anticorps anti-cellules d'îlots et anti-insuline, la mise en évidence d'une insulite qui est une infiltration des îlots par des cellules mononuclées, macrophages et lymphocytes T activés ainsi que l'efficacité de certaines thérapeutiques immunosuppressives comme la cyclosporine dans des modèles expérimentaux

c) Facteurs déclenchants

Le ou les facteurs déclenchants la réaction auto-immune sont mal connus et peuvent être viraux, toxiques comme la nitrosamine ou nutritionnels.

La difficulté à identifier le facteur déclenchant tient à une longue évolution asymptomatique de la maladie, avec apparition d'anticorps anti-insuline d'îlots et diminution progressive de l'insulinosécrétion. Le diabète peut ainsi se démasquer tardivement.

I.1) Physiopathologie et anomalies métaboliques

La carence complète ou presque complète en insuline est responsable, avec l'augmentation des hormones hyperglycémiantes (glucagon, hormone de croissance, catecholamines, cortisol) des anomalies métaboliques suivantes:

a) hyperglycémie

Elle résulte d'une part d'une hyperproduction hépatique étant donné que la glycogénèse et la néoglucogénèse ne sont plus inhibées par l'insuline et d'autre part d'une réduction de l'utilisation périphérique du glucose

b) augmentation de la lipolyse et diminution de la lipogénèse.

Elles ont pour conséquence la mobilisation des acides gras libres se transformant en acétyl CoA et un apport de glycérol pour la néoglycogénèse hépatique.

c) augmentation de la cétogénèse hépatique

La production en excès de β -hydroxybutyrate, d'acétoacétate et d'acétone est secondaire à la carence complète d'insuline par levée de l'inhibition des enzymes de la cétogénèse, l'augmentation des acides gras disponibles et l'hyperglucogonémie. La production d'acides cétoniques est responsable d'une acidose et d'une perte rénale en cations (Na^+ K^+).

d) diminution de l'anabolisme et augmentation du catabolisme musculaires.

Elles sont responsables de l'amyotrophie et de l'asthénie.

I.2) Révélation de la maladie

Le DID se signale souvent de façon précoce par une hyperglycémie et une cétoacidose. L'hyperglycémie résulte d'une surproduction hépatique (néoglucogénèse) et d'une sous-utilisation tissulaire périphérique. La cétoacidose découle d'une mobilisation accrue d'acides gras du tissu adipeux et de leur oxydation accélérée dans le foie; l'administration d'insuline fait régresser ces dérèglements du DID.

II) LE DIABETE NON INSULINO-DEPENDANT OU DIABETE TYPE 2

La sécrétion d'insuline en réponse au glucose est retardée avec abolition du pic sécrétoire précoce et réduction de la capacité sécrétoire maximale. Plus rarement, l'insuline est rendue inactive par des anticorps anti-insuline circulants, spontanés ou consécutifs à une insulinothérapie.

L'insuline peut également être inefficace par une hormogénèse imparfaite. Dans ce cas, la molécule d'insuline est anormale et biologiquement peu active. Les sujets sont hyperglycémiques et hyperinsulinémiques, avec une sensibilité normale à l'insuline exogène et une résistance à l'insuline endogène.

Le message peut également être mal reçu lorsque les cellules cibles ou le récepteur sont la cible d'anticorps antirécepteur de l'insuline. Ces derniers peuvent également être trop rares ou présenter des anomalies de fonctionnement, notamment au niveau de leur autophosphorylation. Des anomalies membranaires post récepteurs peuvent également être impliquées.

**1ère PARTIE :
MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE
ET DIABETE
INSULINODEPENDANT.**

D) INTRODUCTION

Etant donné les nombreuses observations existant dans la littérature concernant l'influence de la fluidité et de la composition membranaires sur l'activité des enzymes, des transporteurs ou des récepteurs, l'intérêt de l'étude conjointe de ces deux paramètres est apparu évident.

La grande diversité des résultats rapportés dans la littérature concernant les propriétés dynamiques et la composition lipidique membranaire, chez les patients diabétiques insulino-dépendants (DID) peut être liée à la nature hétérogène des groupes étudiés. Des paramètres tels que la durée du diabète, l'association avec d'autres pathologies, l'existence ou non de complications et en particulier le degré de l'équilibre métabolique n'a pas toujours été pris en compte.

Nous nous sommes donc intéressés aux propriétés physico-chimiques de la membrane érythrocytaire, au niveau de sa composition lipidique et de ses paramètres dynamiques. Nous avons recherché si des perturbations de ces propriétés pouvaient être associées au diabète insulino-dépendant, ainsi que les relations éventuelles avec les modifications des lipides plasmatiques et l'équilibre métabolique.

Nous avons pris un soin particulier dans la sélection des patients, avec pour objectif un maximum d'homogénéité au sein de l'échantillon étudié.

II) RAPPELS

II.1) Altération de la fluidité membranaire chez le DID. Facteurs mis en cause

Le diabète est un exemple de désordre métabolique pouvant affecter les propriétés dynamiques et structurales des membranes cellulaires.

Le diabète est en effet associé à un large éventail d'anomalies métaboliques comme la modification des protéines, l'altération de la composition des lipides plasmatiques, du métabolisme des lipides et des glucides, et la peroxydation des lipides. Ces anomalies peuvent entraîner des variations de la fluidité des membranes érythrocytaires et avoir des conséquences sur les fonctions érythrocytaires.

Cependant, les études concernant les altérations des propriétés dynamiques des membranes de globules rouges au cours du diabète restent très divergentes. Ainsi, bien que la majorité des auteurs ont utilisé la même approche expérimentale, certains concluent à une diminution de la fluidité membranaire, d'autres à une augmentation, et d'autres encore à une absence de variations comme l'indique le tableau 2

Tableau 2 : Fluidité de la membrane érythrocytaire et diabète insulino-dépendant.
Données de la littérature.

Auteur/année	Technique	<r> Témoin	<r> DID	Fluidité
Juhan-Vague/1986	DPH ^a	0,255	0,210	Elevée
Testa/1988	DPH	0,256	0,244	Elevée
Muller/1987	DPH	0,242	0,240	Normale
Freyburger/1989	DPH	-	-	Normale
Caimi/1988	DPH	0,298	0,297	Normale
Kamada/1983	NS ^b	0.286 ^c	0.306	Basse
Watala/1992	DPH	0,173	0,186	Basse
Candiloros/1995	6-AS ^a	0,119	0,137	Basse

^a : Polarisation de fluorescence.

^b: Résonance paramagnétique électronique (RPE).

^c: paramètre d'ordre.

Les résultats contradictoires existant dans la littérature peuvent s'expliquer par la variabilité dans les critères de choix des patients. En effet, les conditions d'équilibre métabolique ainsi que la présence ou non de complications au cours du diabète, sont rarement précisées.

II.1.1) Influence du cholestérol sur la fluidité membranaire des érythrocytes de sujets diabétiques.

La quantité de cholestérol membranaire dans les érythrocytes est contrôlée par les échanges entre la membrane et les lipoprotéines plasmatiques. On distingue deux sortes d'échanges assurés par des lipoprotéines différentes:

- les "Low Density Lipoproteins" (LDL) qui ont pour rôle de véhiculer le cholestérol du foie vers les cellules,
- les "High Density Lipoproteins" (HDL) qui assurent le transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie.

Schématiquement, les LDL agissent comme donneurs de cholestérol et les HDL comme accepteurs. Ces processus se font sans apport d'énergie et impliquent uniquement des échanges par diffusion à travers le milieu aqueux séparant la membrane et les lipoprotéines.

Si les mécanismes homéostatiques du cholestérol membranaire sont insuffisants pour corriger ou tamponner les différentes influences perturbatrices, comme cela semble être le cas chez le diabétique, il en résulte une augmentation de la quantité de cholestérol membranaire et du rapport C/PL souvent observée au cours du diabète. Ceci entraîne des changements de fluidité membranaires qui peuvent être préjudiciables pour les fonctions cellulaires (Shinitzky, 1984; Cooper, 1970).

Les données de la littérature concernant le cholestérol, les phospholipides et le rapport C/PL dans la membrane érythrocytaire du patient diabétique par rapport au sujet témoin sont rassemblées dans le tableau 3.

Tableau 3: *Données de la littérature sur le cholestérol, les phospholipides et le rapport C/PL de la membrane érythrocytaire chez le DID.*

Auteur/année	C			PL		C/PL		
	Tém	DID	Unités	Tém	DID	Tém	DID	
Watala/1992	0,45	0,47	-	0.83	0.83	0.55	0,57	Elevé
Cignarelli/1983	3	3,31	nmol/10 ⁸ cells	4	4	0.75	0.81	Elevé
Juan-Vague/1984	1,25	1,4	mg/ml	3,15	2,85	0,82	1,01	Elevé
Bryszewska/1986	0,86	1,08	mmol/g prot	0,99	0,8	0,88	1,41	Elevé
Garnier/1989	3,34	2,86	μmol/10 ¹⁰ cells	-	-	0,78	0,79	Normal
Baldini/1989	0,65	0,49	μmol/10 ¹⁰ cells	0.69	0.63	0.94	0.80	Bas

II.1.2) Changements qualitatifs et quantitatifs des phospholipides membranaires

Il est également nécessaire de tenir compte des variations éventuelles de la composition en phospholipides. En effet un changement qualitatif au niveau des différentes classes de phospholipides peut également modifier la fluidité membranaire.

Les études portant sur la composition des phospholipides membranaires ont donné lieu également à des résultats très divergents. Ceci pourrait être du à l'hétérogénéité des diabétiques étudiés. En effet, le contrôle métabolique des patients étudiés n'a pas toujours été précisé.

Le tableau 4 montre que les études ont souvent porté sur des échantillons d'effectif réduit ou non précisé et peuvent difficilement être représentatives.

Tableau 4: *Variations des quantités de phospholipides membranaires chez les DID par rapport aux valeurs normales.*

Données de la littérature.

Auteur/année	PE	PS	PC	SM	HbA _{1c} *	n
Garnier/1990	Normale	Normale	Basse	Normale	-	-
Ruiz-gutierrez/1993	Normale	Normale	Normale	Normale	8,4 %	9
Freyburger/1989	Normale	Normale	Normale	Normale	13,1 %	10
Caimi/1988	Normale	-	Normale	-	-	-
Watala/1990	Elevée	Normale	Normale	Elevée	6,6 %	21
Baldini/1989	Normale	Normale	Elevée	Normale	-	-

HbA_{1c} : pourcentage d'hémoglobine glycosylée.

II.1.3) Diminution du degré d'insaturation des acides gras dans le DID

Il est connu que le diabète altère de façon marquée le métabolisme des lipides et plusieurs études ont été centrées sur les modifications éventuelles de la composition en acides gras. Le contenu en acides gras (AG) polyinsaturés totaux et en particulier les n-3 est diminué de façon significative au cours du diabète. Les quantités d'acides docosahexanoïque C22:6(n-3) et arachidonique C20:4(n-6) sont diminuées de façon marquée chez le diabétique et spécialement chez les sujets mal équilibrés (Jones et al, 1983). La quantité totale des AG polyinsaturés est corrélée négativement à l'HbA_{1c} et à la fructosamine (Kamada et al, 1990). Parallèlement, on note une augmentation des AG saturés, en particulier les AG saturés à longue chaîne C24:0 (Ruiz-Gutierrez et al, 1993)

La diminution du rapport AG polyinsaturés / AG saturés (P/S) lors du diabète est compatible avec la diminution de la fluidité membranaire rapportée dans d'autres études.

II.1.4.) Influence de la glycation des protéines sur la fluidité membranaire

La glycosylation non enzymatique des protéines ou glycation semble être un événement moléculaire majeur de l'état diabétique. En effet, plusieurs complications du diabète résultent de l'hyperglycémie (Winocour, 1989).

La baisse de la fluidité membranaire observée chez le diabétique a souvent été uniquement attribuée aux altérations de la composition des lipides membranaires et en particulier à une augmentation du cholestérol, et/ou des changements dans les proportions des différents phospholipides. Néanmoins, le phénomène de glycation affectant les protéines membranaires chez le diabétique influence également la dynamique membranaire.

Des études *in vitro* menées par différentes équipes ont démontré une corrélation entre la baisse de la fluidité membranaire et le taux de glycation des protéines (Brysewska et al, 1986, Watala , 1988,1992; Freisleben et al, 1992 ; Birlouez-Aragon et al, 1990).

La glycation des protéines n'est pas une réaction enzymatique. Elle constitue l'étape la plus précoce de la réaction de Maillard. Les produits de la réaction peuvent être toxiques pour la cellule. Les intermédiaires de la réaction, quant à eux, induisent une altération de la structure tridimensionnelle des protéines et il est possible que ces changements conformationnels des protéines puissent affecter la fluidité (Lyons et al, 1986; Watala, 1992).

Ces changements de conformation des protéines peuvent affecter aussi bien les groupements thiols bien exposés que les protéines intrinsèques. Les protéines modifiées présentent des fonctions altérées comme une baisse d'affinité de leurs récepteurs. C'est le cas notamment pour l'insuline et les LDL. La glycation des protéines peut également modifier l'activité des enzymes, comme l'aldose réductase ou la superoxyde dismutase (Urano et al, 1991).

II.1.5.) Effet de la peroxydation lipidique sur la fluidité membranaire

La peroxydation lipidique provoque des modifications au niveau des membranes. Ce phénomène est significativement plus élevé au niveau des globules rouges de diabétiques par rapport aux sujets sains (Sato et al, 1979; Jain et al, 1989). En effet, plusieurs études ont démontré *in vitro* une plus grande susceptibilité des globules rouges de patients diabétiques à la peroxydation lipidique (Matkovics et al, 1982; Uzel et al, 1987; Urano et al, 1991).

La formation d'aldéhydes réactifs est connue pour altérer les propriétés physiques et la flexibilité de la membrane. L'accumulation du malonyldialdéhyde peut ainsi altérer les propriétés de la membrane. En effet, la fluidité membranaire est inversement corrélée au taux de peroxydation lipidique (Tozzi-Ciancarelli et al, 1989).

D'autre part, la peroxydation lipidique est positivement corrélée au taux d'hémoglobine glycosylée (Jain et al, 1989) laissant supposer un rôle éventuel de l'équilibre métabolique. En effet, les dommages oxydatifs dont peut être responsable un milieu riche en glucose, peuvent participer à une plus grande exposition des protéines et à l'altération de leur conformation.

Il faut noter également que les phénomènes de glycation des protéines et la peroxydation lipidique semblent liés entre eux. En effet, on a observé une corrélation positive entre ces deux phénomènes, la glycosylation non enzymatique des protéines étant proposée comme un processus augmentant la formation de radicaux libres (Hunt et al, 1988).

Le mécanisme exact par lequel le glucose sanguin augmente la peroxydation lipidique n'est pas totalement élucidé. Des études (Wolff et Dean, 1987) *in vitro* ont démontré que le glucose peut s'énoliser en réduisant une molécule d'oxygène moléculaire et ceci dans des conditions physiologiques. Cette réaction produit des α -cétoaldéhydes, du peroxyde d'hydrogène et des radicaux libres favorisant la peroxydation lipidique.

De plus la glycation de la superoxyde dismutase induit son inactivation, cette enzyme étant responsable de l'élimination de l'oxygène superoxyde $O_2^{\bullet}$, (Halliwell et al, 1994).

II.2) Influence de la fluidité et de la composition membranaires sur les fonctions membranaires

De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont démontré qu'il existait une relation entre la composition de la membrane cellulaire, la fluidité et certaines fonctions biologiques. Ainsi, des modifications de la fluidité membranaire peuvent influencer le fonctionnement des récepteurs, des enzymes, ou des transporteurs en induisant des altérations dans l'exposition, l'accessibilité, l'orientation, ou l'activité de ces protéines (Shinitzki, 1984; Mc Murchie, 1988; Field et al, 1990). Des fonctions telles que la

perméabilité aux substrats, les flux ioniques, ou l'activité catalytique des enzymes sont également modifiées.

L'affinité et le nombre de récepteurs semblent également être influencés par la fluidité membranaire et la composition lipidique. En effet, ces paramètres peuvent induire des modifications de la liaison de l'insuline à son récepteur et/ou certaines actions de l'insuline (Ginsberg et al, 1981,82; Field et al, 1988).

Les altérations de la conformation des transporteurs, des enzymes et des récepteurs peuvent modifier l'accessibilité des ligands aux sites de liaisons (Ruiz-Gutierrez et al, 1993). Ceci peut être déterminant dans de nombreux processus pathologiques.

Ces observations ont conduit à penser que les anomalies membranaires se répercutant sur le fonctionnement d'enzymes, de transporteurs et de récepteurs, pourraient être l'un des mécanismes en cause dans certaines maladies métaboliques, telles que le diabète et l'obésité (Cooper, 1977; Mc Millan, 1983; Mazzanti et al, 1989).

Pour illustrer ceci, nous citerons à titre d'exemple l'effet des modifications de la fluidité et de la composition membranaire sur le fonctionnement d'une enzyme et d'un transporteur.

II.2.1) Effet de la fluidité et de la composition membranaires sur le fonctionnement d'enzymes et de transporteurs.

II.2.1.1) EXEMPLE D'UNE POMPE IONIQUE: LA Na^+K^+ ATPASE.

La $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPase joue un rôle fondamental. Elle permet d'établir un gradient ionique influençant le volume cellulaire et la pression osmotique. Son activité permet également le cotransport d'autres éléments comme les acides aminés, les monosacharides, ou les ions tels que H^+ , Ca^{++} , ou K^+ .

Des études ont démontré une activité ATPasique défectueuse lors du diabète et ceci au niveau de différentes cellules (Finotti et Palatini, 1986; Bing et al, 1986; Mazzanti et al, 1989; Rabini et al, 1994). Ceci augmenterait les risques cardio-vasculaires (Garay,

1980) et jouerait un rôle central dans certaines complications du diabète (Huot et Aronson, 1991).

La $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPase est sensible aux changements des propriétés physico-chimiques de la bicouche phospholipidique. Des études ont démontré l'existence d'une corrélation entre la diminution de l'activité de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPase et la diminution de la fluidité membranaire (Ruiz-Gutierrez, 1993).

La composition lipidique membranaire est également impliquée dans le fonctionnement de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPase. Bing et al (1986) ont suggéré qu'une altération de la composition des lipides pouvait être également un facteur important de l'hypertension. D'autres auteurs ont démontré que des changements modérés dans la composition en acides gras de la phosphatidylcholine pouvaient entraîner des changements importants dans le système de transport du sodium (Engelmann et al, 1990).

II.2.1.2) EXEMPLE D'UNE ENZYME: L'ADENYLATE CYCLASE

L'interaction des phospholipides avec les protéines est de première importance, les propriétés des phospholipides étant déterminées par leur chaînes d'acides gras. La modification dans la composition lipidique peut agir sur un certain nombre de fonctions cellulaires (Spector et Yorek, 1985)

L'activité catalytique de l'adénylate cyclase est sensible à son environnement lipidique. Certains travaux sur des membranes modèles, ont suggéré l'importance des phospholipides anioniques et neutres dans la stimulation hormonale de l'adénylate cyclase. L'activité basale de l'adénylate cyclase est également stimulée par addition de PC. La PS en revanche, est inhibitrice, tandis que la PE a une action biphasique (Ross, 1982).

L'effet des phospholipides semble s'exercer sur la protéine catalytique de l'adénylate cyclase et son interaction avec la protéine G régulatrice. La PC semble agir en promouvant la stimulation de l'adénylate cyclase par la protéine G activée et elle intervient probablement en augmentant leur liaison. La spécificité de ce système pour la PC est

importante. Par conséquent, les phospholipides semblent avoir une action bien plus importante que la simple fonction d'empêcher l'aggrégation des deux protéines.

L'état dynamique de la membrane semble également très important pour la régulation hormonale de l'adénylate cyclase (Allam et al, 1987). Celle ci doit en effet s'effectuer dans une membrane relativement non perturbée. Levitzki et al (1988) ont suggéré que le degré de packing, le mouvement ou la fluidité des régions hydrocarbonées de la membrane seraient importants pour un contrôle hormonal optimal. Des perturbations importantes dans la structure de la bicouche empêchent la stimulation hormonale de l'enzyme dans la membrane plasmique (Ross, 1982).

Une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase chez les sujets diabétiques (Kissebah et Fraser, 1972) et spécialement chez les sujets présentant un mauvais contrôle métabolique a été rapportée. Les diabétiques se distinguent également par une plus grande réponse à la stimulation β -adrénergique de l'adénylate cyclase. Cette augmentation pourrait être due à des altérations au niveau de l'environnement lipidique de l'enzyme ou au niveau de la fluidité membranaire.

III) SUJETS & METHODES

III.1) Sujets

III.1.1) Patients

Les patients présentaient un diabète insulino-dépendant (type I). Ils ont été recrutés dans le service de Médecine G de l'Hôpital Jeanne d'Arc à Toul.

Il s'agissait de patients d'une moyenne d'âge de $29,8 \pm 8,1$ ans, comprenant 17 hommes et 15 femmes. Aucun patient n'avait d'excès pondéral, le BMI (Body Mass Index) moyen étant de $23,1 \pm 2,5$. Parmi les patients, 27 présentaient un déséquilibre glycémique chronique jugé sur l'HbA_{1c} ($> 7\%$) et 5 étaient bien contrôlés avec une HbA_{1c} $< 7\%$. Ils ne recevaient aucun traitement oral excepté une contraception orale par pilule oestroprogestative minidosée, pour un tiers des femmes. L'insulinothérapie était assurée principalement par 3 injections par jour pour 27 patients sur 32 et par une pompe à insuline externe en sous cutané pour les 5 autres.

III.1.2) Témoins

Les témoins au nombre de 22 ont été recrutés au Centre de Médecine Préventive. Ils ne présentaient ni excès pondéral, ni dyslipidémie. La proportion de femmes et d'hommes était de moitié, leur moyenne d'âge était comparable à celle des DID ($32,5 \pm 9,6$ ans).

III.2) Dosages biochimiques

L'évaluation du contrôle du diabète et des paramètres lipidiques plasmatiques a comporté les déterminations suivantes:

1. Glycémie par un dosage par la glucose-oxydase (BECTON glucose oxydase analyser, BGA II Beckmann-Instruments, Fullerton, Ca, USA).
2. Pourcentage d'hémoglobine glycosylée (HbA_{1c}), déterminé par chromatographie liquide haute performance (CLHP) (Biorex column, Biorad Richmond, Ca, USA). Le pourcentage d'HbA_{1c} reflète l'équilibre glucidique à long terme (2 mois).
3. Taux de fructosamine, déterminé par une méthode colorimétrique adaptée à l'analyseur 400 E (Ciba Corning, Le Vesinet, France). Il reflète l'équilibre sur 15 jours
4. Triglycéridémie, HDL et LDL cholestérol plasmatique, déterminés par une méthode enzymatique (Technicon Autoanalyser).
5. Apoprotéines A et B déterminées par immunonéphélométrie avec des anticorps polyclonaux spécifiques (Behring, Rueil-Malmaison, France)

III.3) Prélèvements sanguins

Le sang est prélevé à jeun sous anticoagulant (EDTA), à raison de 1,5 volumes d'anticoagulant pour 8,5 volumes de sang.

III.4) Détermination de la composition biochimique et des propriétés dynamiques des membranes

Les quantifications des protéines et des lipides membranaires, ainsi que la détermination de la dynamique membranaire ont été effectués selon le protocole décrit en annexe.

III.5) Tests statistiques

La normalité de la distribution des valeurs au sein des populations a été vérifiée par un test d'aplatissement et d'asymétrie.

Les 2 groupes diabétiques et témoins ont été comparés entre eux par un test t.

Les tests de régression linéaire ont permis d'établir des corrélations entre les différents paramètres.

Un test de régression multiple a permis de déterminer l'importance de différents facteurs dans la variation d'un paramètre donné.

IV) RESULTATS

IV.1) Paramètres plasmatiques

Les résultats des paramètres plasmatiques du groupe des diabétiques figurent dans le tableau 5. Il s'agit de patients qui présentent pour la plupart un déséquilibre glycémique chronique ($HbA_{1c} > 7\%$). En revanche, les paramètres lipidiques plasmatiques sont normaux.

Tableau 5: *Caractéristiques plasmatiques des patients diabétiques.*

	Patients diabétiques	Valeurs normales
Glycémie à jeun (g/l)	$2,09 \pm 1,23$ ^a	1
HbA _{1c} (%)	$8,31 \pm 1,77$	< 6
Fructosamine(mg/mg protéines)	$4,91 \pm 0,78$	< 4,4
Triglycérides (g/l)	$0,84 \pm 0,54$	< 1,7
Cholestérol total (g/l)	$1,84 \pm 0,33$	< 2
Cholestérol HDL (g/l)	$0,52 \pm 0,14$	> 0,45
Cholestérol LDL (g/l)	$1,17 \pm 0,31$	< 1,5
Apoprotéine A (g/l)	$1,5 \pm 0,26$	> 1,5
Apoprotéine B (g/l)	$1,04 \pm 0,26$	< 1,5

a: Valeurs moyennes $\pm$ Ecart type.

IV.2) Composition membranaire en cholestérol, en phospholipides et rapport C/PL

Les résultats concernant la composition en cholestérol et en phospholipides de la membrane, ainsi que le rapport C/PL sont regroupés dans le tableau 6.

Tableau 6: Lipides membranaires.

	Diabétiques	Témoins	(p)
Cholestérol	185,2 ± 8,4 ^a	150,0 ± 7,5	p < 0,01
Phospholipides	394,3 ± 15,78	362,5 ± 14,2	p < 0,05
Rapport C/PL	0,47 ± 0,01	0,41 ± 0,02	NS

^a: Valeurs moyennes en µg par mg de protéines ± ES.

Le cholestérol membranaire des hématies de patients diabétiques est significativement plus élevé que celui des témoins. La quantité totale de phospholipides déterminée par la méthode de Bartlett est également plus élevée, le rapport C/PL montrant également une tendance à l'augmentation mais qui reste non significative.

IV.2.1). Corrélations avec les paramètres de l'équilibre métabolique

L'augmentation du cholestérol, des phospholipides membranaires et du rapport C/PL chez les diabétiques semble être liée au déséquilibre glycémique. Un certain nombre de relations linéaires ont en effet, pu être mises en évidence entre ces composants et les paramètres de l'équilibre métabolique (Tableau 7).

Tableau 7: *Corrélations des lipides membranaires avec les paramètres de l'équilibre glycémique..*

	HbA ₁ C (p, r)	Fructosamine (p, r)	Glycémie (p, r)
Cholestérol	(0,005; 0,45)	(0,01; 0,54)	(0,05; 0,48)
Phospholipides	(0,005; 0,48)	(0,05; 0,45)	-
Rapport C/PL	(0,005; 0,6)	(0,005; 0,64)	(0,05; 0,57)

Les Figures 3 à 10 donnent les droites de régressions linéaires obtenues entre les différents paramètres lipidiques membranaires (cholestérol, phospholipides et le rapport cholestérol/phospholipides), et les paramètres de l'équilibre glycémique, (HbA₁C, fructosamine et glycémie).

A. Cholestérol membranaire.

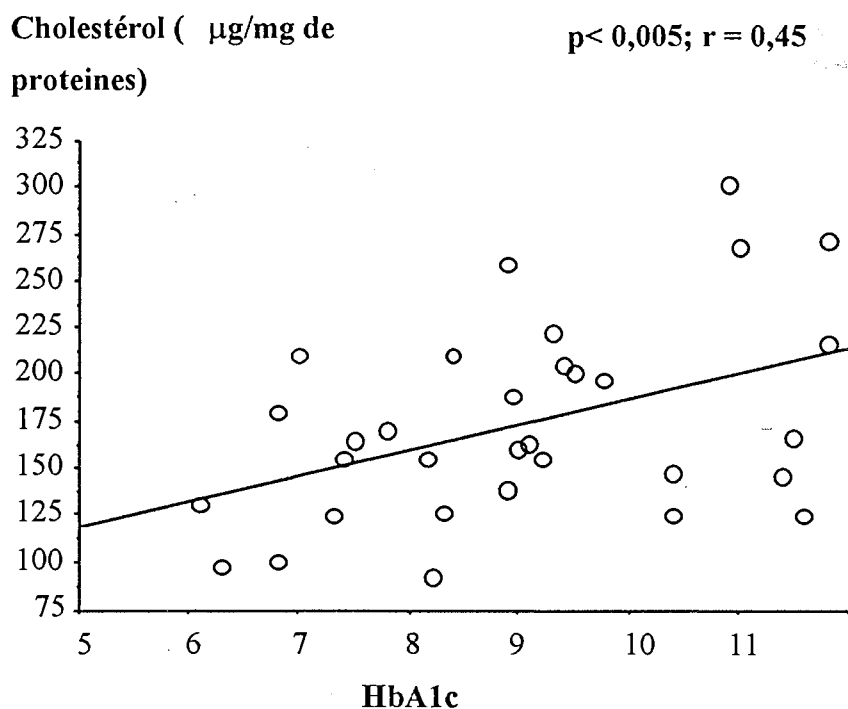


Figure 3. *Régression linéaire du cholestérol en fonction de l'HbA₁c.*

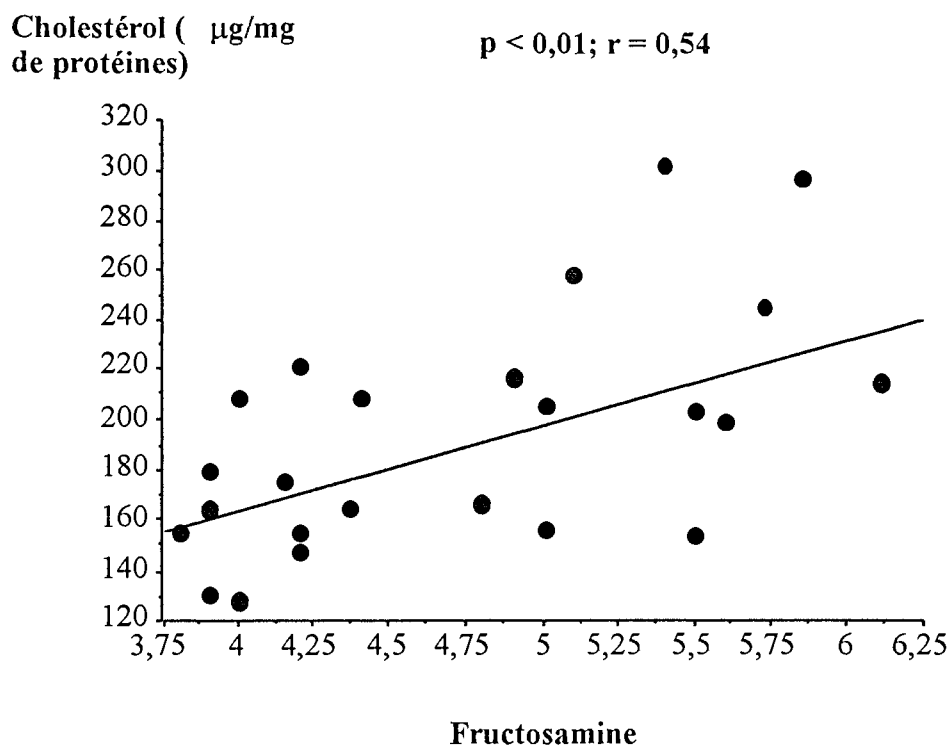


Figure 4. Régression linéaire du cholestérol en fonction de la fructosamine.

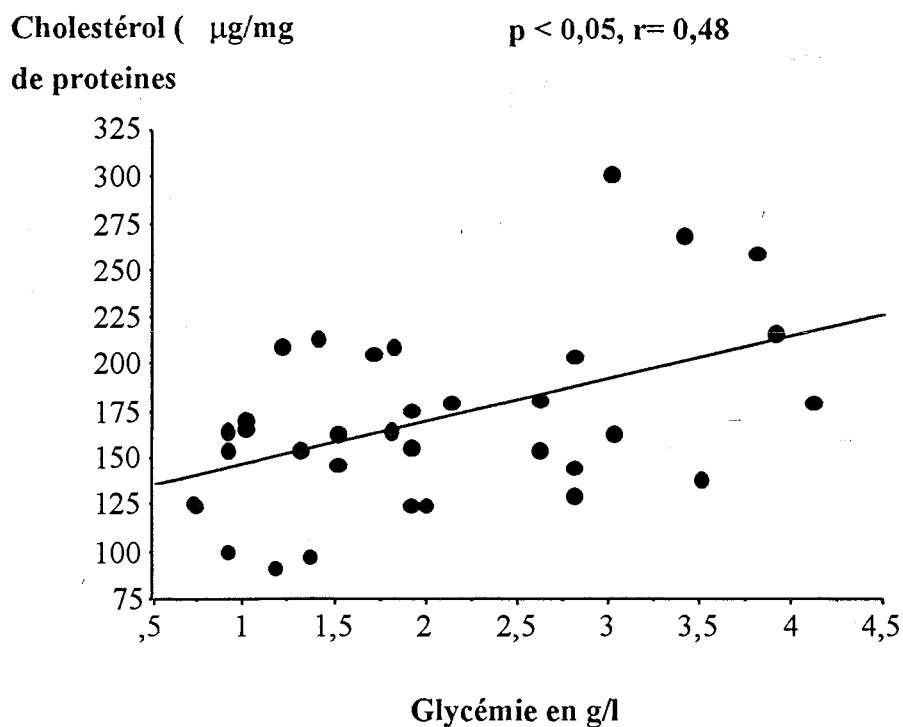


Figure 5. Régression linéaire du cholestérol en fonction de la glycémie.

B. Phospholipides membranaires

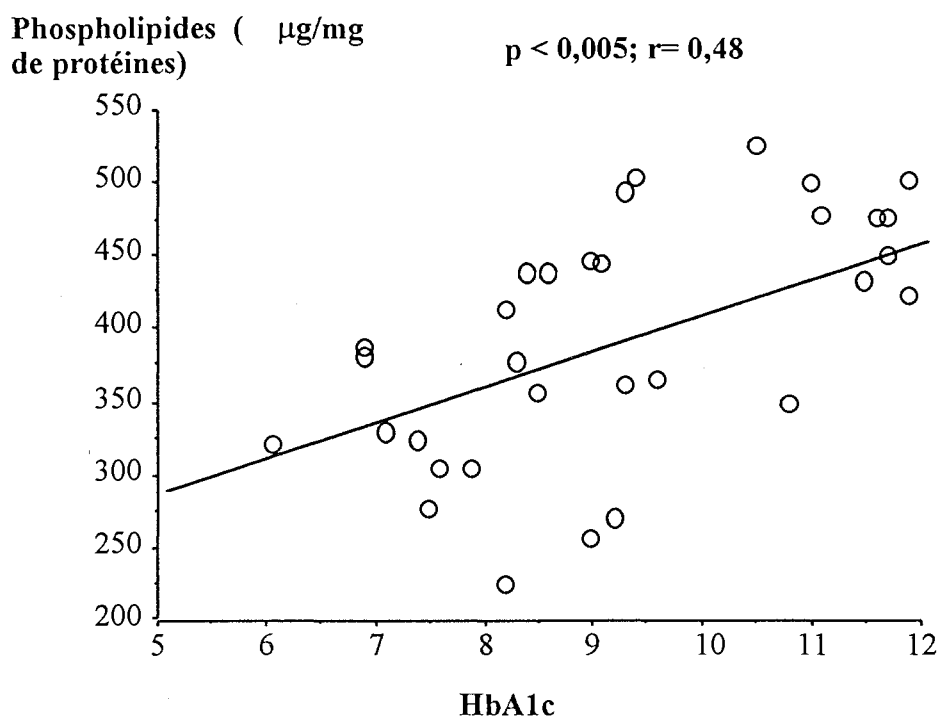


Figure 6. Régression linéaire des phospholipides en fonction de l'HbA_{1c}.

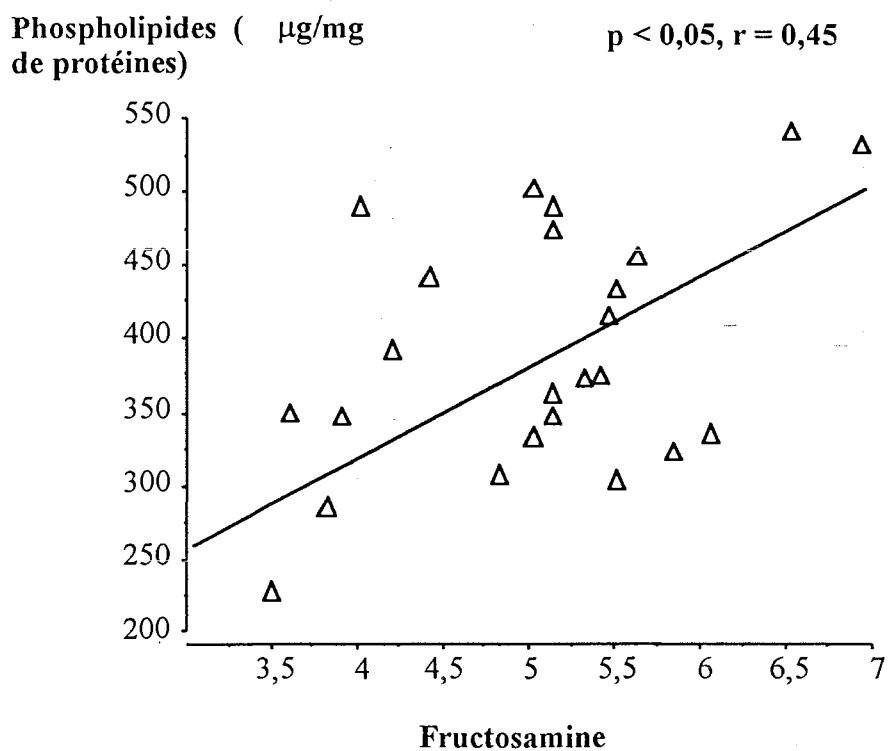


Figure 7. Régression linéaire des phospholipides en fonction de la fructosamine.

C. Rapport C/PL

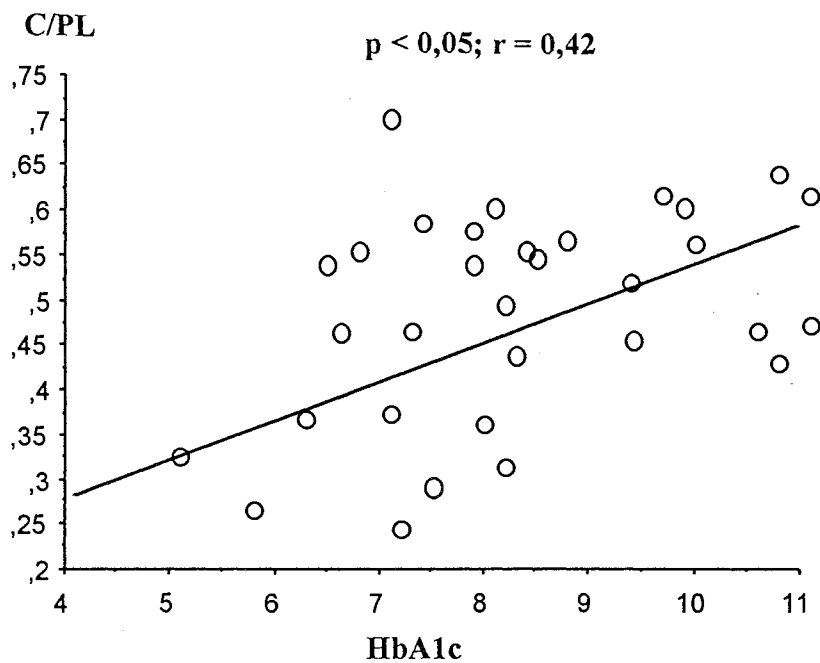


Figure 8. Régression linéaire du rapport C/PL en fonction de l'HbA1c.

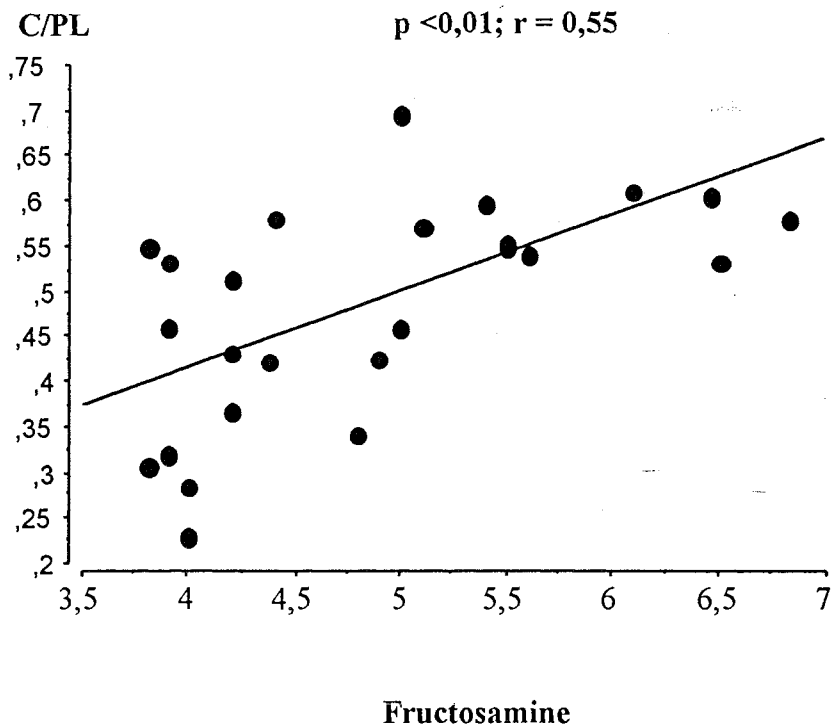


Figure 9. Régression linéaire du rapport C/PL en fonction de la fructosamine.

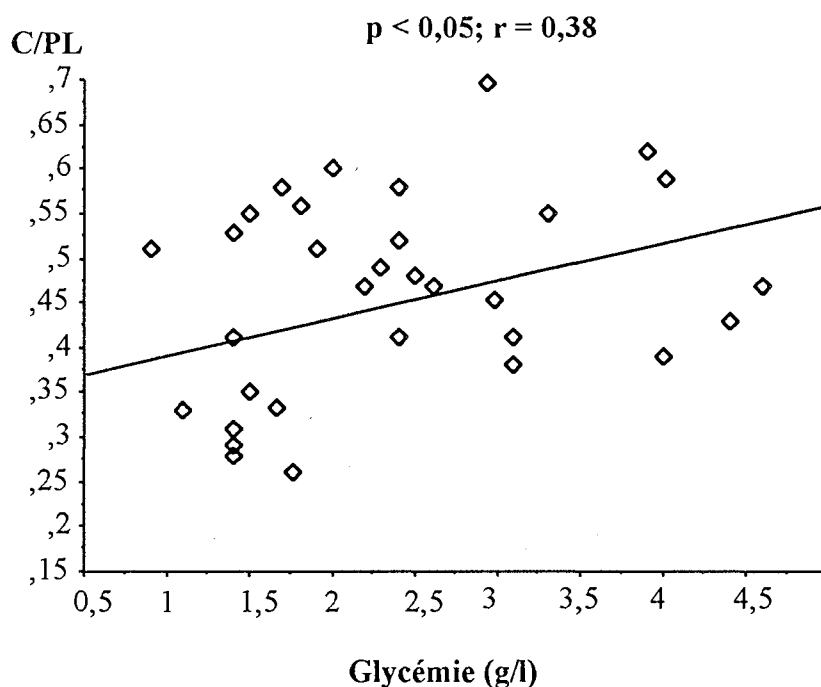


Figure 10 Régression linéaire du rapport C/PL en fonction de la glycémie.

IV.2.2) Corrélations avec les lipides plasmatiques.

Par ailleurs, des relations linéaires négatives ont été établies entre le cholestérol HDL d'une part, le cholestérol membranaire et l'HbA_{1c} d'autre part, reflétant une diminution du cholestérol HDL chez les patients les plus déséquilibrés et présentant les quantités de cholestérol membranaire les plus élevées (tableau 8 et figures 11, 12).

Tableau 8: *Corrélations du cholestérol HDL avec l'équilibre glycémique et le cholestérol membranaire.*

Cholestérol HDL vs	(p)	(r)
Cholestérol membranaire.	0,005	- 0,45
HbA _{1c}	0,005	- 0,44

La régression multiple a montré que le taux d'HbA1c expliquait 31,6% de la variation du cholestérol membranaire et que l'HbA1c avec le cholestérol HDL expliquaient 43,2% de cette variation.

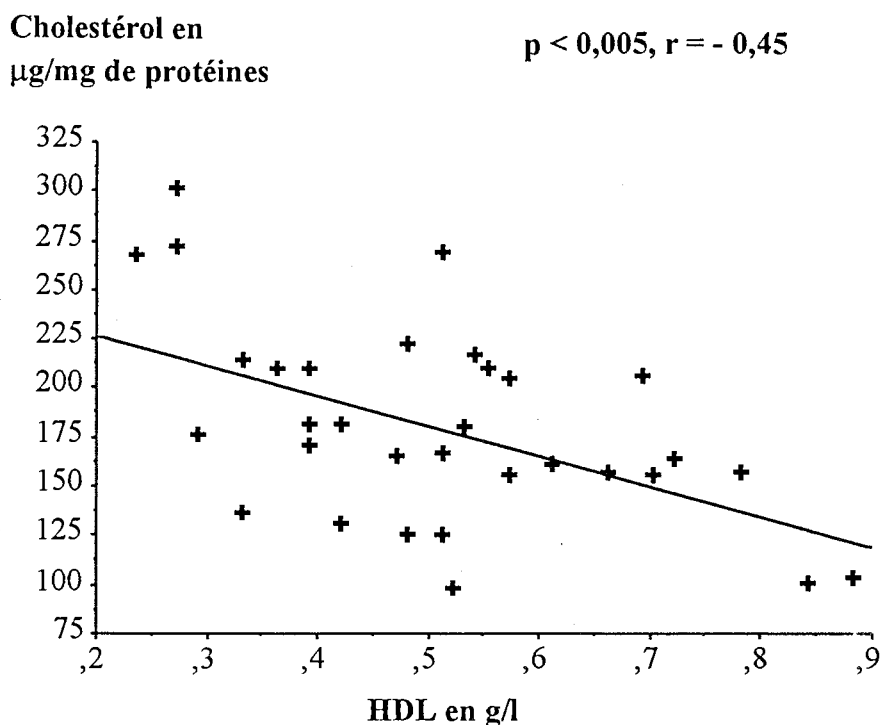


Figure 11. *Régression linéaire du cholestérol membranaire en fonction du cholestérol HDL.*

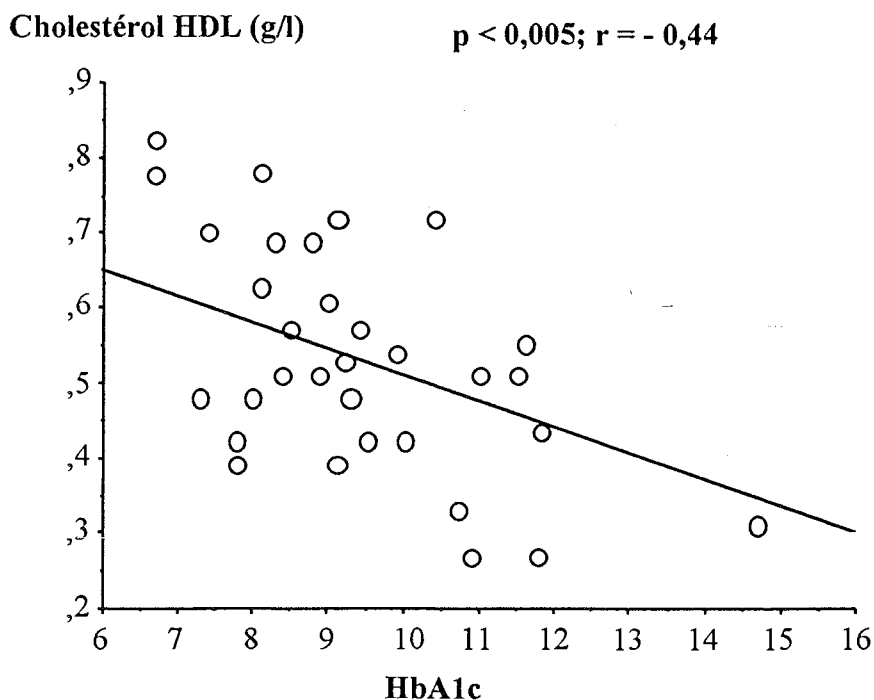


Figure 12. *Régression linéaire du cholestérol HDL en fonction de l'HbA1c.*

IV.3) Classes de phospholipides

La composition membranaire au niveau des différentes classes de phospholipides déterminés par CLHP est exprimée en valeurs absolues et regroupée dans le tableau 9.

Tableau 9: *Classes de phospholipides des patients et des témoins.*

	Diabétiques	Témoins	(p)
PE	181,1 ± 7,5 ^a	143,7 ± 7,6	p < 0,005
PS	43,5 ± 3,3	41,9 ± 5,2	NS
PC	145,1 ± 7,3	118,8 ± 4,8	p < 0,01
SM	62,9 ± 3,3	72,6 ± 4,4	p < 0,05
TOTAL	431,4 ± 14,0	376,1 ± 11,9	p < 0,005

^a: Valeurs moyennes exprimées en µg/mg de protéine ± ES.

La comparaison des différentes classes de phospholipides des deux groupes, montre des quantités de PE et PC significativement plus élevées et une quantité de SM significativement plus basse chez le patient diabétique. La quantité totale de phospholipides est également significativement plus élevée chez le patient diabétique.

IV.3.1) Corrélations avec les paramètres de l'équilibre métabolique

Les tests de régression linéaire effectués ont établi l'existence de relations linéaires positives entre la fructosamine et l'HbA_{1c} d'une part et les quantités de PE, de PC, et la quantité totale des phospholipides d'autre part. La quantité de SM présente en revanche une relation linéaire négative avec la fructosamine et la quantité de PC membranaire (tableau 10 et figures 13 à 21).

Tableau 10: *Corrélations des classes de phospholipides membranaires avec les paramètres de l'équilibre glycémique.*

	HbA _{1c} (p; r)	Fructosamine (p; r)	Glycémie (p; r)
PE	(0,01; 0,46)	(0,05; 0,46)	-
PC	(0,005; 0,48)	(0,005; 0,55)	-
SM		(0,05; - 0,42)	-
PLCLHP	(0,001; 0,66)	(0,01; 0,56)	(0,05; 0,41)

A) Phosphatidyléthanolamine (PE).

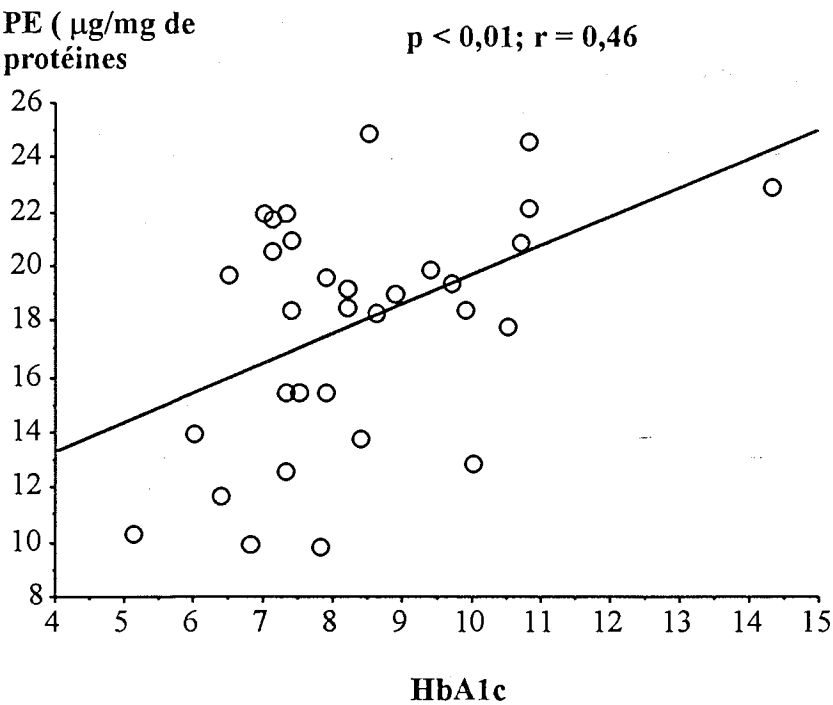


Figure 13. *Régression linéaire de la quantité de PE membranaire en fonction de l'HbA_{1c}.*

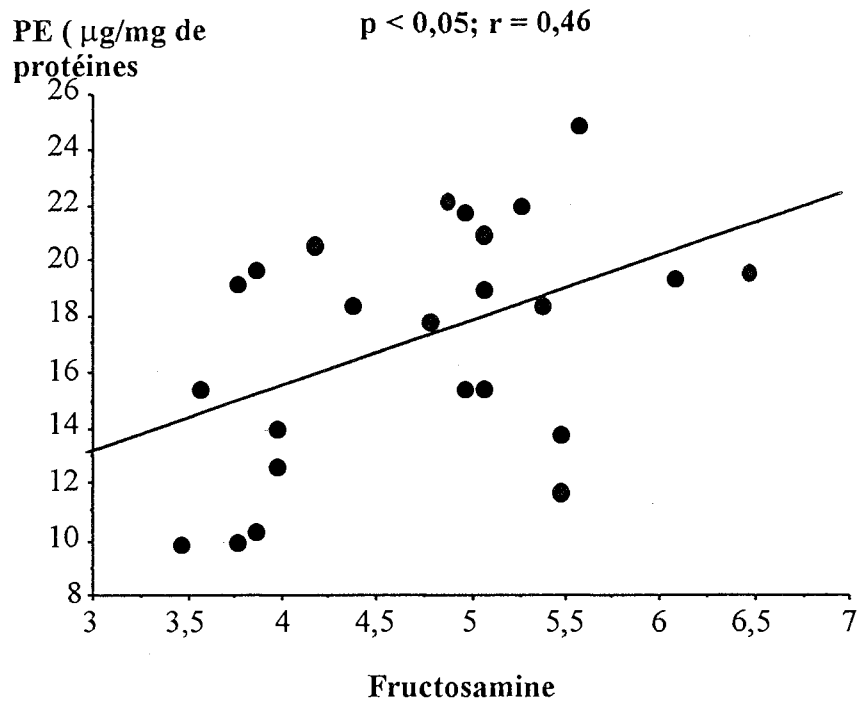


Figure 14. Régression linéaire de la quantité de PE membranaire en fonction de la fructosamine.

B) Phosphatidylcholine (PC)

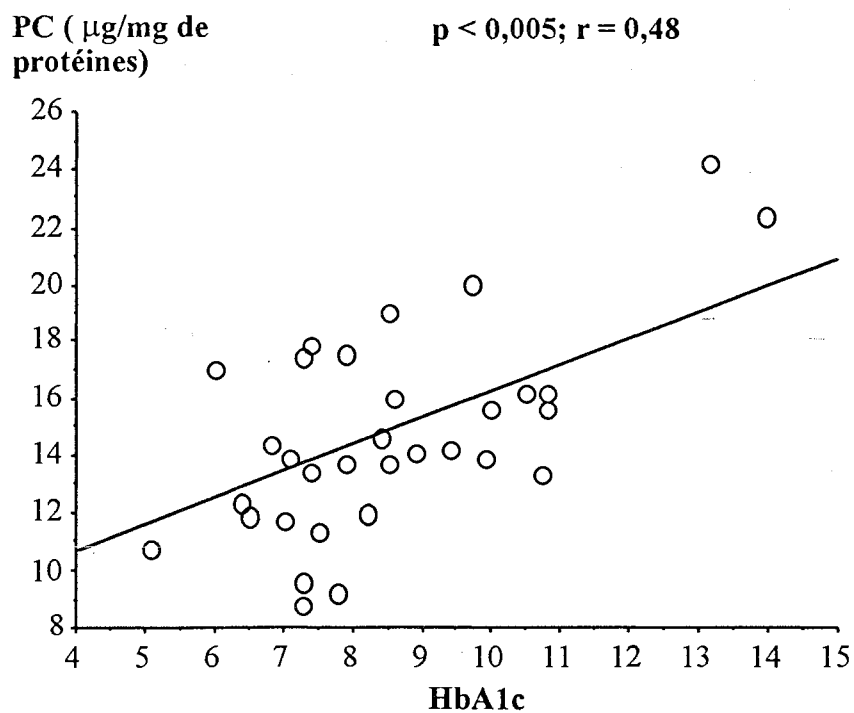


Figure 15. Régression linéaire de la quantité de PC membranaire en fonction de l'HbA1c.

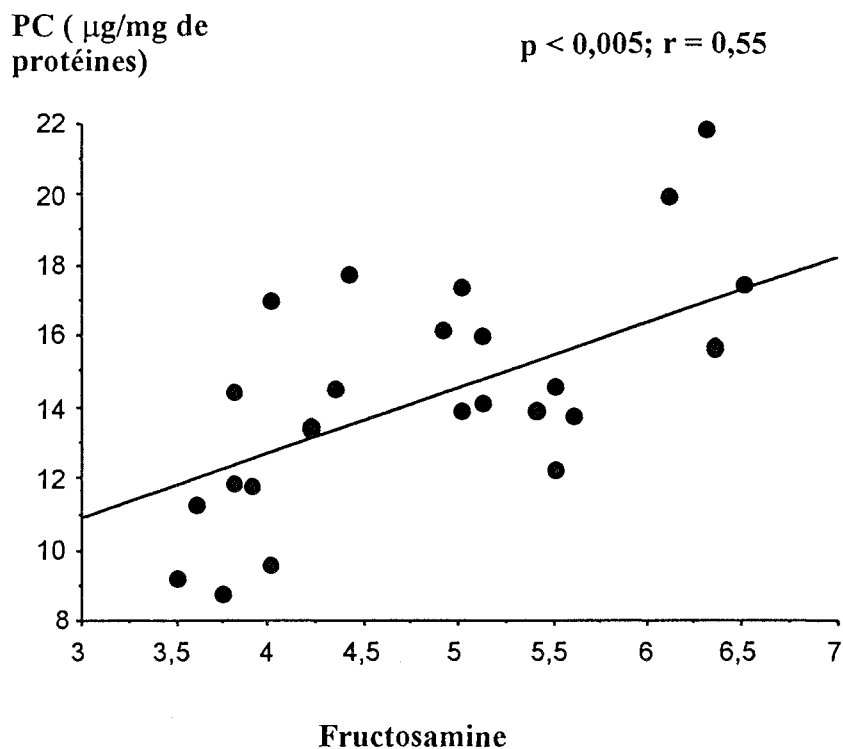


Figure 16. *Régression linéaire de la quantité de PC membranaire en fonction de la fructosamine.*

C) Sphingomyéline

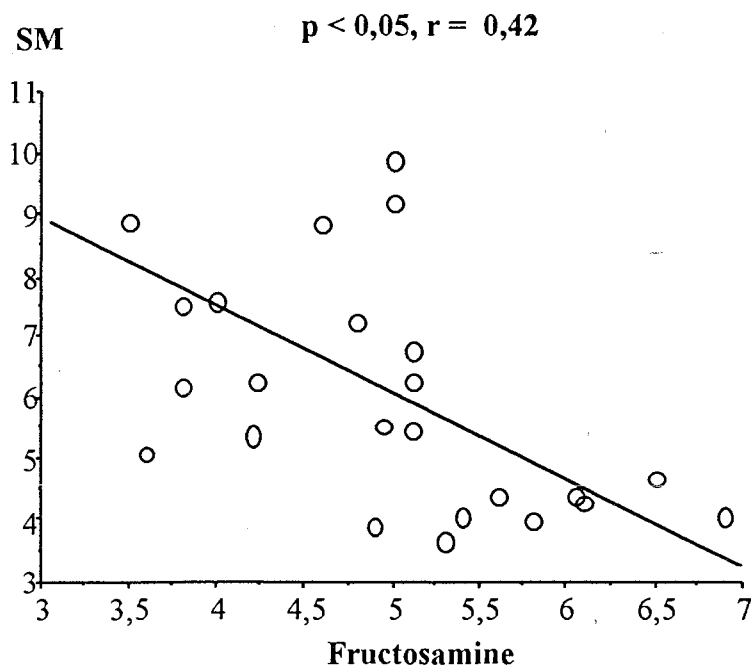


Figure 17. *Régression linéaire de la quantité de SM membranaire en fonction de la fructosamine.*

La SM présente par ailleurs une relation inverse avec la PC membranaire.

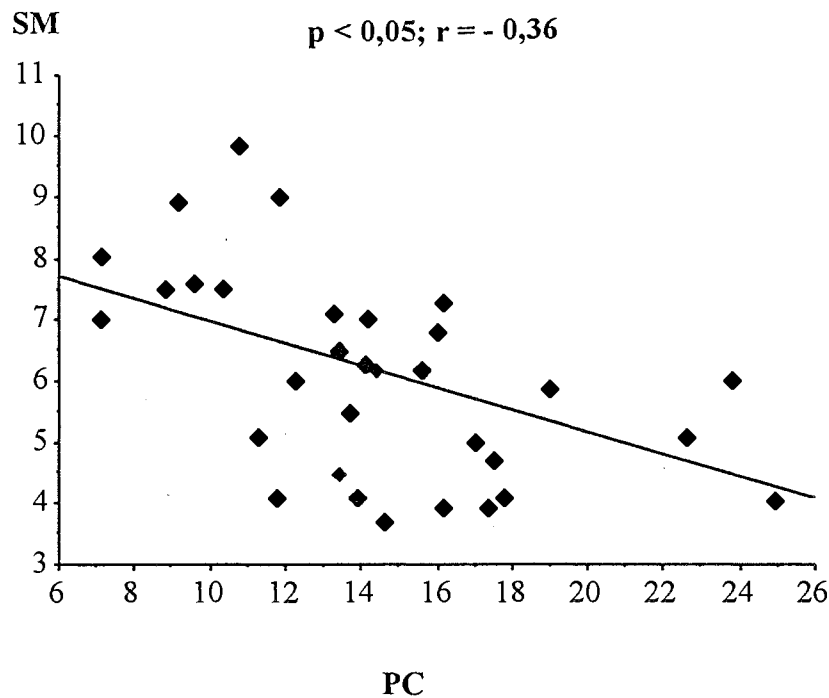


Figure 18: Régression linéaire de la SM en fonction de la PC.

D) Phospholipides totaux déterminés par CLHP

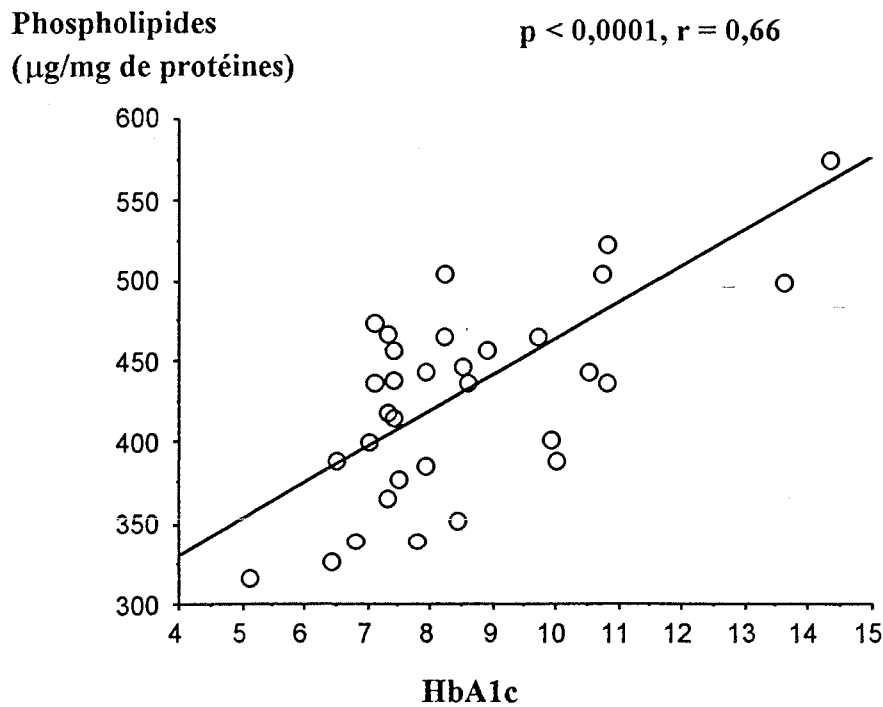


Figure 19. Régression linéaire de la quantité totale de phospholipides membranaire en fonction de l'HbA1c.

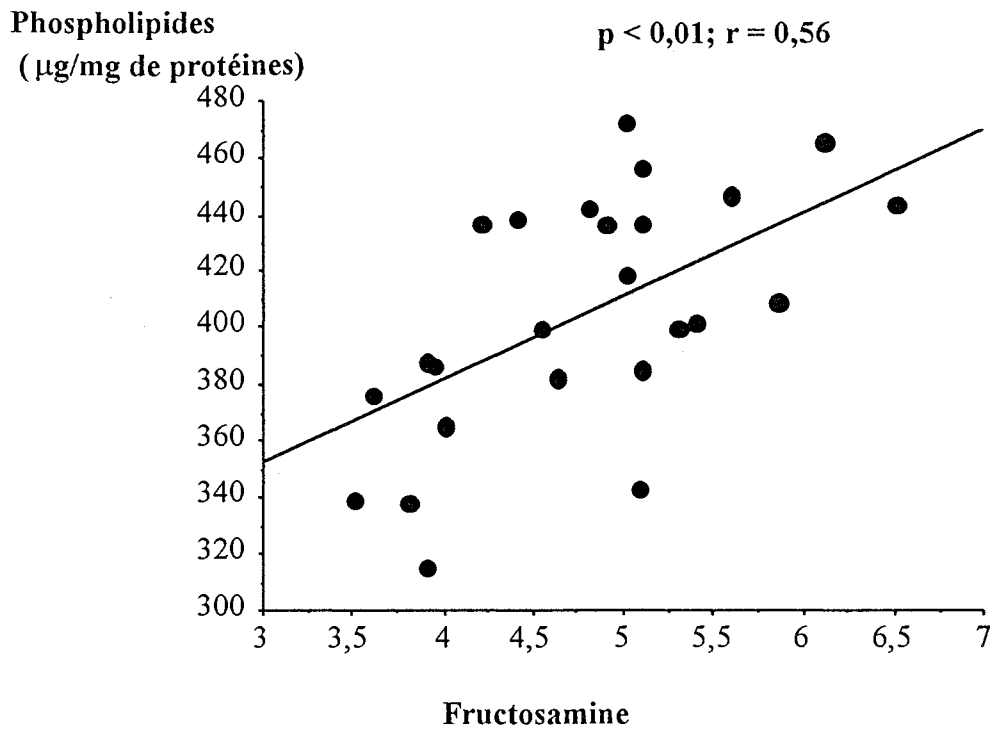


Figure 20. Régression linéaire de la quantité totale de phospholipides membranaire en fonction de la fructosamine.

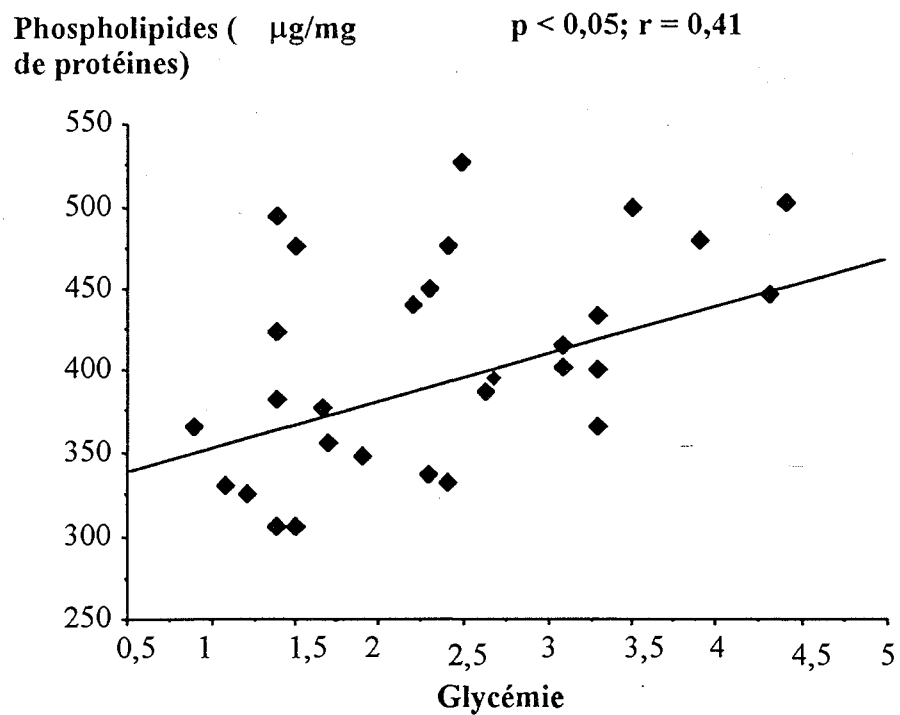


Figure 21: Régression linéaire des phospholipides totaux déterminés par CLHP et de la glycémie.

IV.3.2) Corrélations avec les lipides plasmatiques

Le tableau 11 représente les corrélations de la PC membranaire avec certains lipides plasmatiques. Il faut noter que la PC est corrélée négativement avec le cholestérol HDL et positivement avec le cholestérol LDL.

Tableau 11: *Corrélations de la PE et de la PC avec les lipides plasmatiques.*

	PC (p; r)
Triglycéridémie	(0,01; 0,52)
Cholestérol HDL	(0,01; - 0,46)
Cholestérol LDL	(0,05; 0,59)

Les figures 22 à 24 illustrant les régressions linéaires sont représentées ci-dessous.

A) Phosphatidylcholine

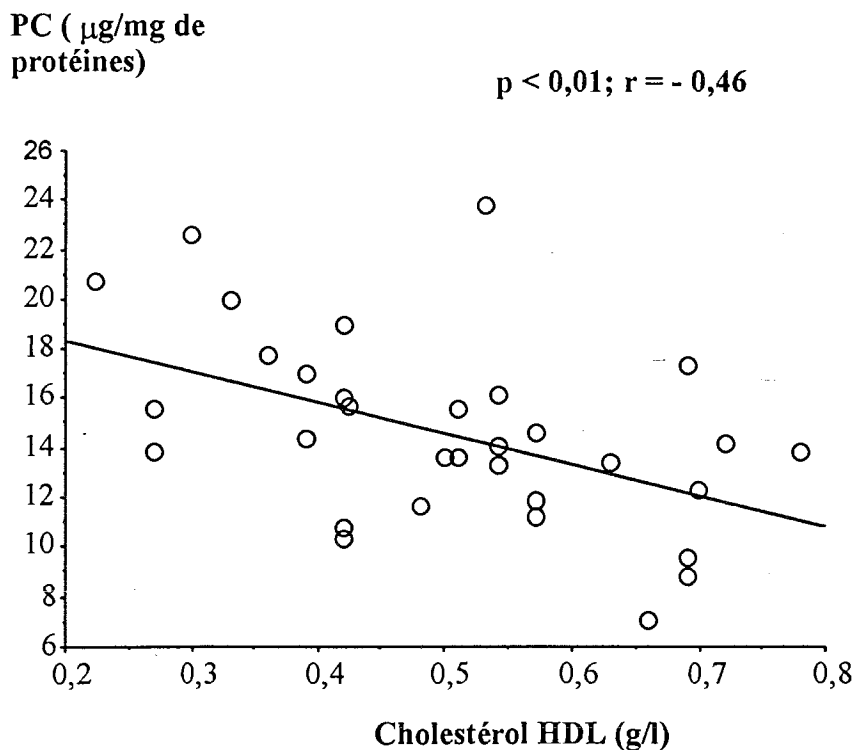


Figure 22. *Régression linéaire de la PC membranaire en fonction du cholestérol HDL.*

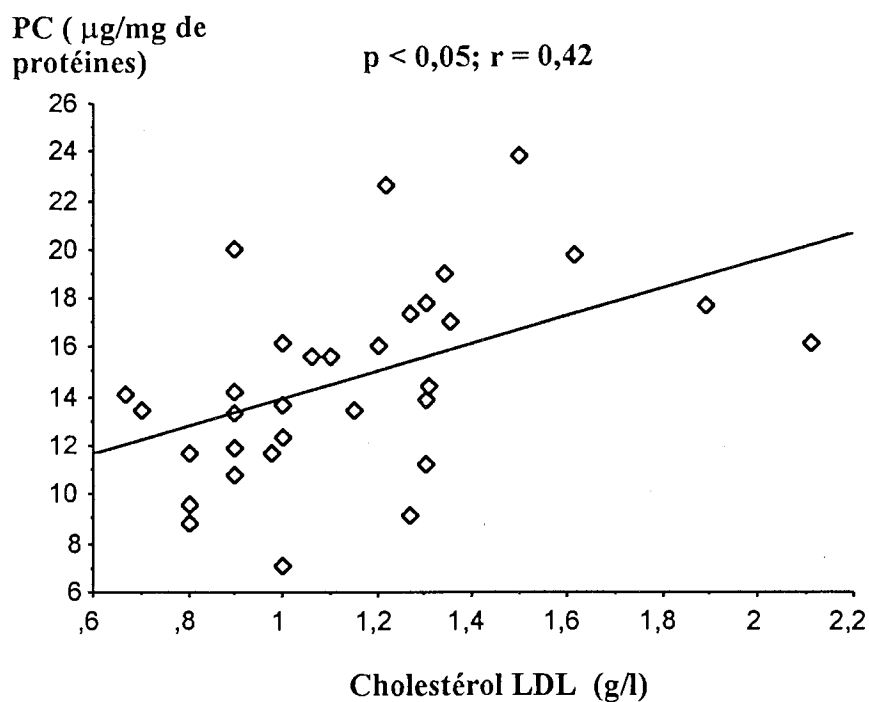


Figure 23. Régression linéaire de la PC membranaire en fonction du cholestérol LDL.

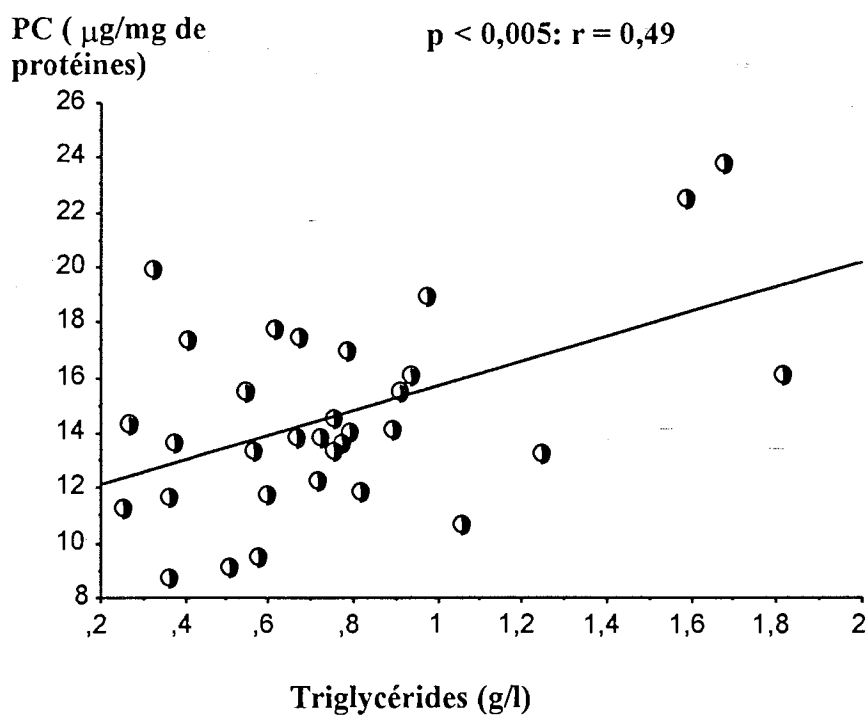


Figure 24. Régression linéaire de la PC membranaire en fonction des triglycérides plasmatiques.

Par ailleurs, la régression multiple révèle que les taux de fructosamine et de cholestérol LDL expliquent à eux deux 66,5% de la variation de la PC membranaire.

IV.4) Proportions relatives des phospholipides

Tableau 12. *Rapports PE/PC et PC/SM dans les deux groupes. et comparaison.*

	Diabétiques	Témoins	(p)
PE/PC	1,25 ± 0,1 ^a	1,21 ± 0,1	NS
PC/SM	2,32 ± 0,15	1,64 ± 0,13	p < 0,01

^a: Moyenne ± ES.

Dans le tableau 12, nous pouvons observer une augmentation significative du rapport PC/SM chez le diabétique. Le rapport PE/PC tend également à augmenter, mais la différence n'est pas significative.

IV.4.1) Corrélations avec les paramètres de l'équilibre métabolique

Les rapports PE/PC et PC/SM présentent un certains nombre de relations avec les paramètres de l'équilibre glycémique.

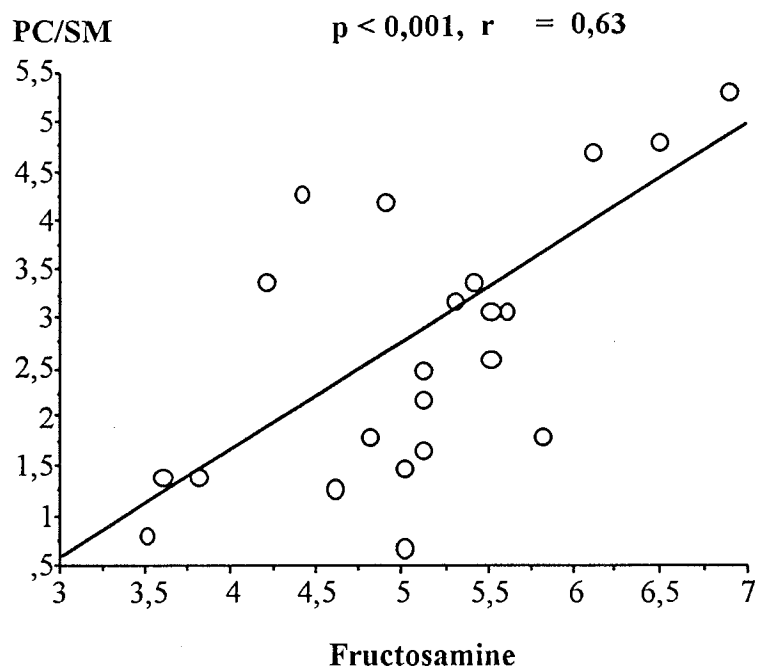


Figure 25 Régression linéaire du rapport PC/SM en fonction de la fructosamine.

Le rapport PC/SM présente une relation positive avec la fructosamine. En revanche, le rapport PE/PC présente une relation négative avec la glycémie et l'HbA_{1c}.

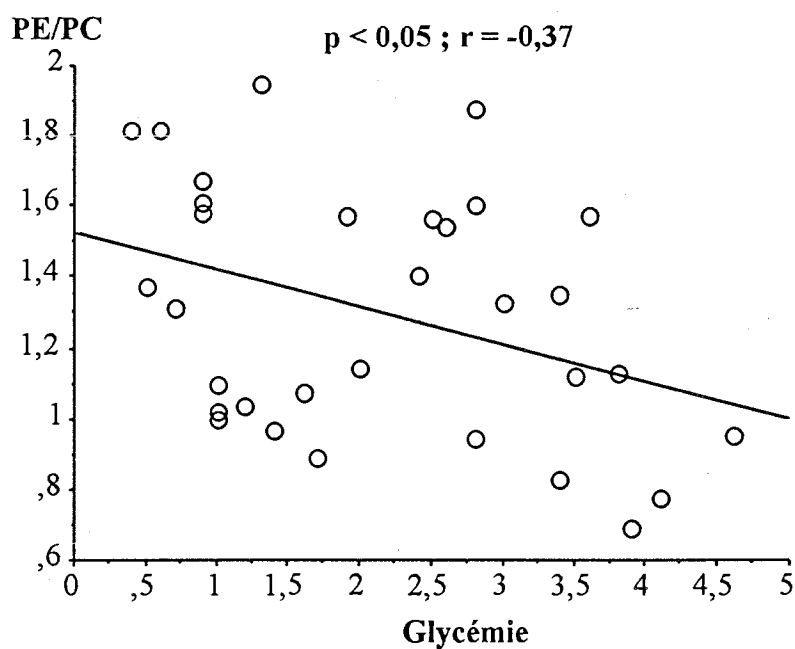


Figure 26. Régression linéaire du rapport PE/PC en fonction de la glycémie.

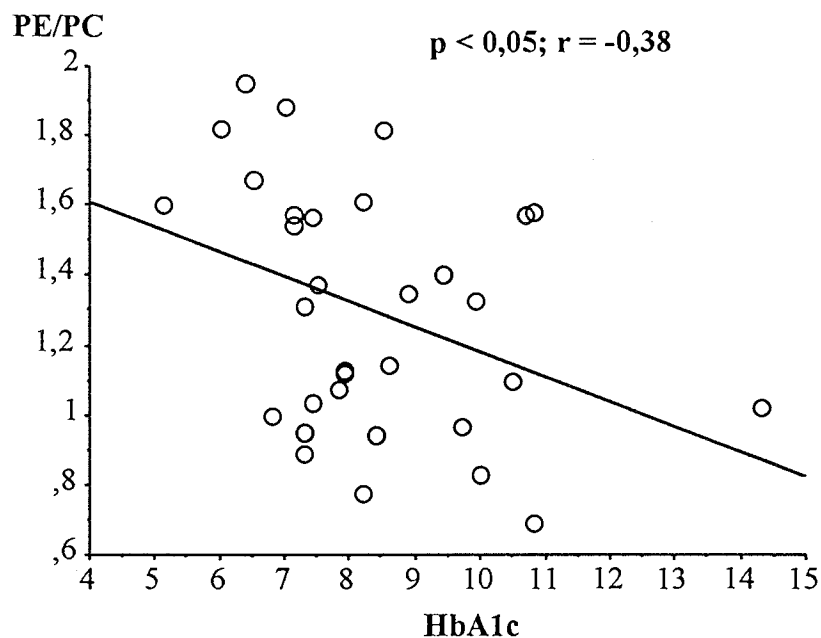


Figure 27. Régression linéaire du rapport PE/PC en fonction de l'HbA1c.

Ces résultats montrent qu'en dépit de l'augmentation globale des deux phospholipides PE et PC dans l'érythrocyte diabétique, la proportion de PE par rapport à celle de la PC semble plus basse chez les sujets les plus déséquilibrés.

IV.4.2) Corrélations entre le rapport PC/SM et les paramètres lipidiques plasmatiques et membranaires

Nous avons pu déterminer des régressions linéaires entre d'une part le rapport PC/SM et d'autre part, le cholestérol HDL et le cholestérol membranaire.

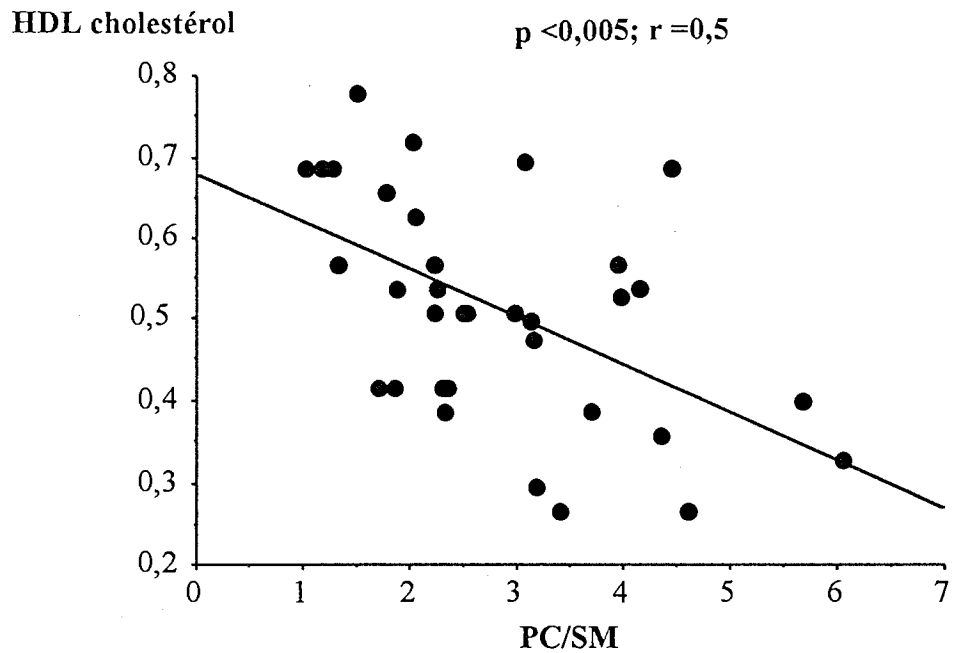


Figure 28: Régression linéaire du cholestérol HDL en fonction du rapport PC/SM chez le diabétique.

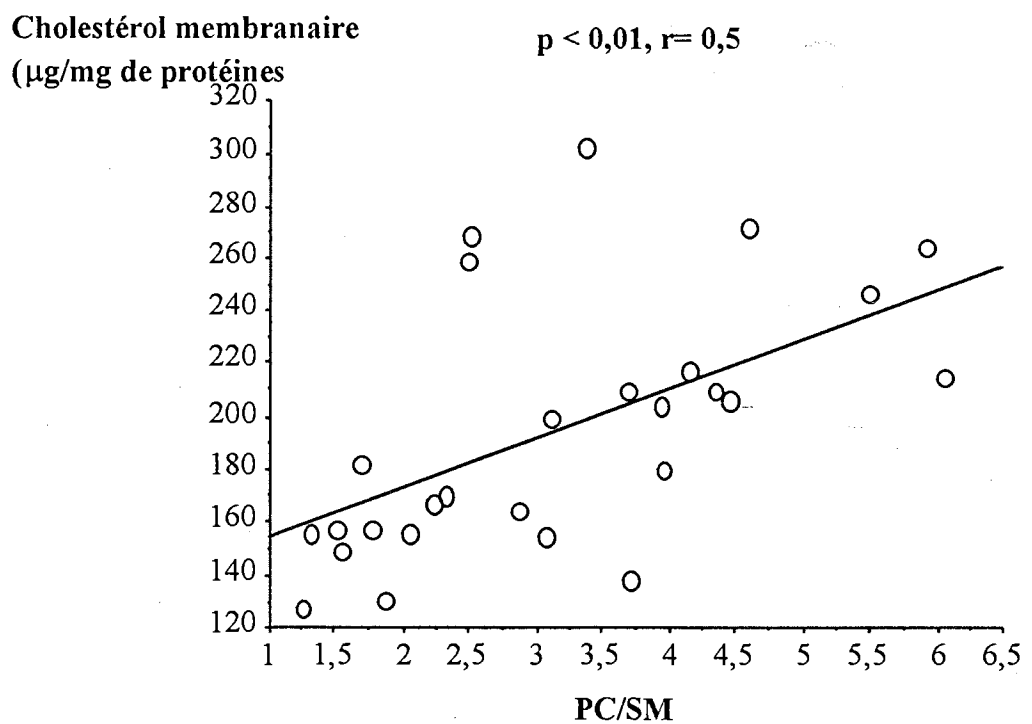


Figure 29: Régression linéaire du cholestérol membranaire en fonction du rapport PC/SM chez le diabétique.

A l'inverse du diabétique, chez le témoin on trouve une relation négative entre la quantité de cholestérol et le rapport PC/SM

Cholestérol membranaire
(μg par mg de protéines)

$p < 0,05$; $r = - 0,4$

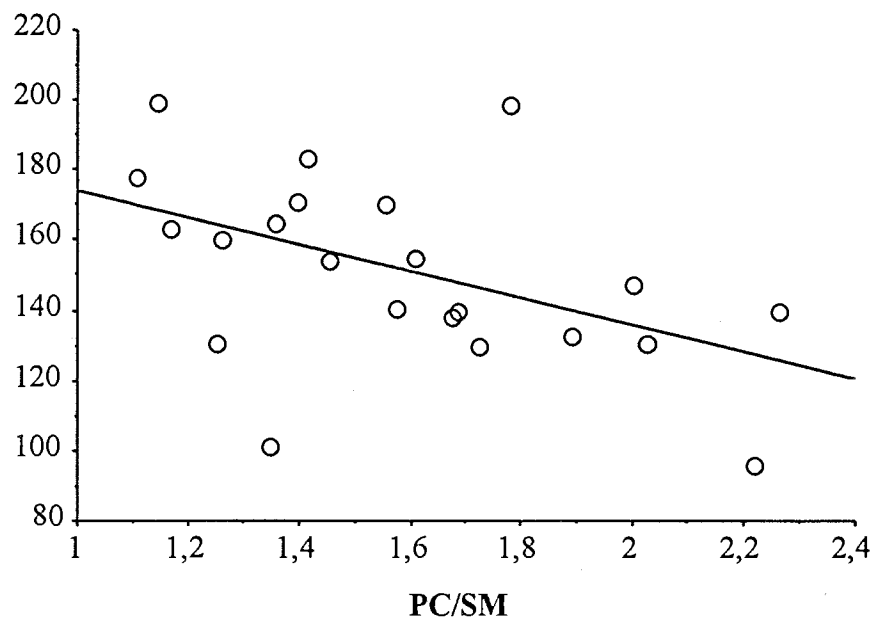


Figure 30. Régression linéaire du cholestérol membranaire en fonction du rapport PC /SM chez le témoin.

IV.5) Propriétés dynamiques membranaires

Les valeurs moyennes des anisotropies de fluorescence émises par les sondes 6-AS et 12-AS sont regroupées dans le tableau 13.

Tableau 13. Anisotropie de la fluorescence émise par les sondes 6 et 12-AS incorporées dans les hématies de sujets témoins et diabétiques.

$\langle r \rangle$	Diabétiques	Témoins	(p)
6-AS	$0,111 \pm 0,002$ ^a	$0,101 \pm 0,005$	$p < 0,005$
12-AS	$0,091 \pm 0,003$	$0,083 \pm 0,002$	$p < 0,05$

^a: Moyenne $\pm$ ES.

Les valeurs d'anisotropie déterminées par les sondes 6-AS et 12-AS sont significativement plus élevées chez le sujet diabétique par rapport au témoin.

L'élévation de valeurs d'anisotropie dans le groupe diabétique est statistiquement plus marquée au niveau des couches superficielles caractérisées par la sonde 6-AS.

Les tests de régression linéaires nous ont permis par ailleurs de mettre en évidence un certain nombre de relations entre les valeurs de $\langle r \rangle$ et divers paramètres plasmatiques et membranaires.

Tableau 14: *Corrélations des valeurs d'anisotropies avec les paramètres membranaires ou plasmatiques*

	6-AS (p ; r)	12-AS (p ; r)
HbA _{1c}	(0,005; 0,7)	-
Cholestérol	-	(0,0001; 0,89)
C/PL	-	(0,005; 0,84)

IV.5.1) Corrélations avec les paramètres de l'équilibre métabolique

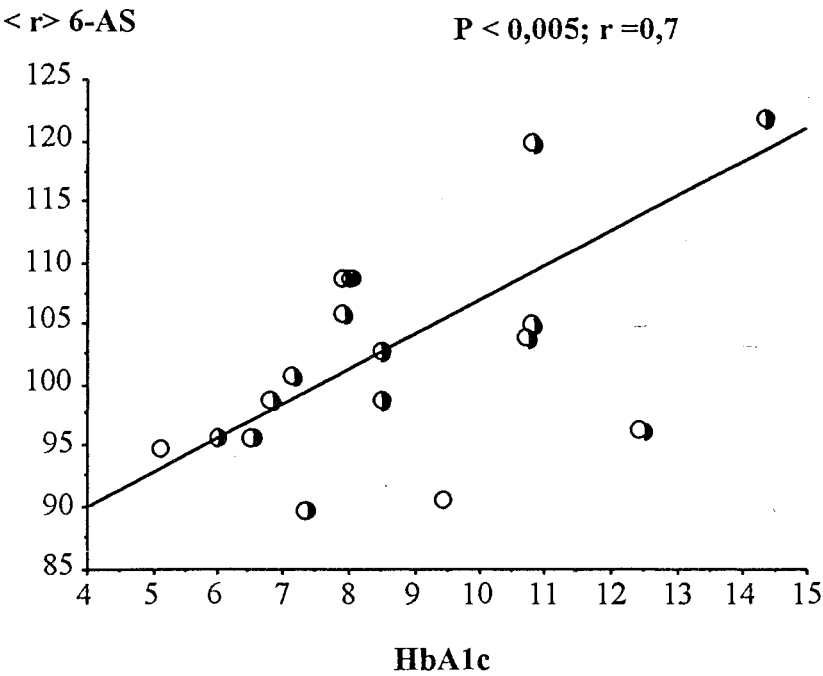


Figure 31. *Régression linéaire de l'anisotropie $\langle r \rangle$ du 6-AS en fonction de l'HbA_{1c}.*

IV.5.2) Corrélations avec les lipides membranaires

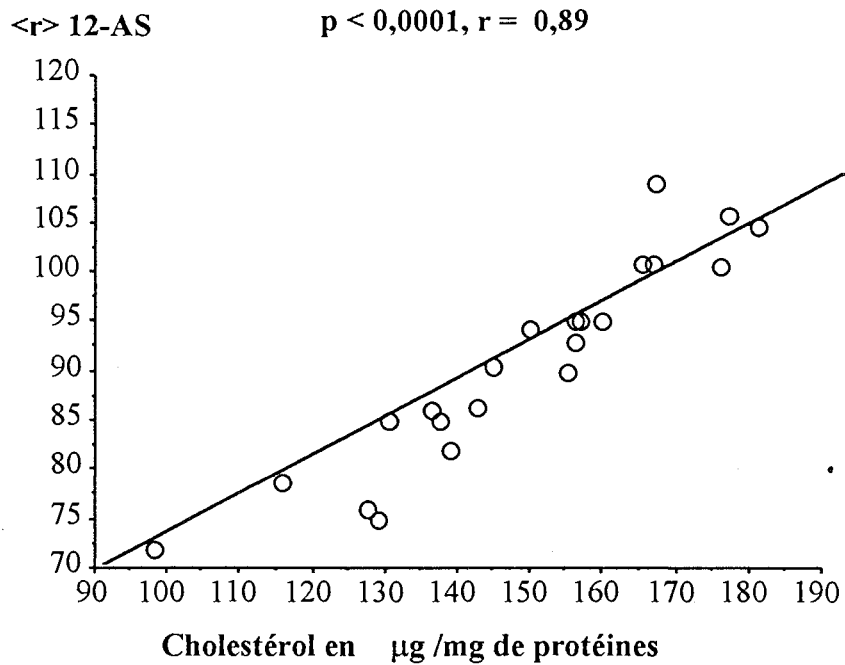


Figure 32. Régression linéaire de l'anisotropie $\langle r \rangle$ du 12-AS en fonction du cholestérol membranaire.

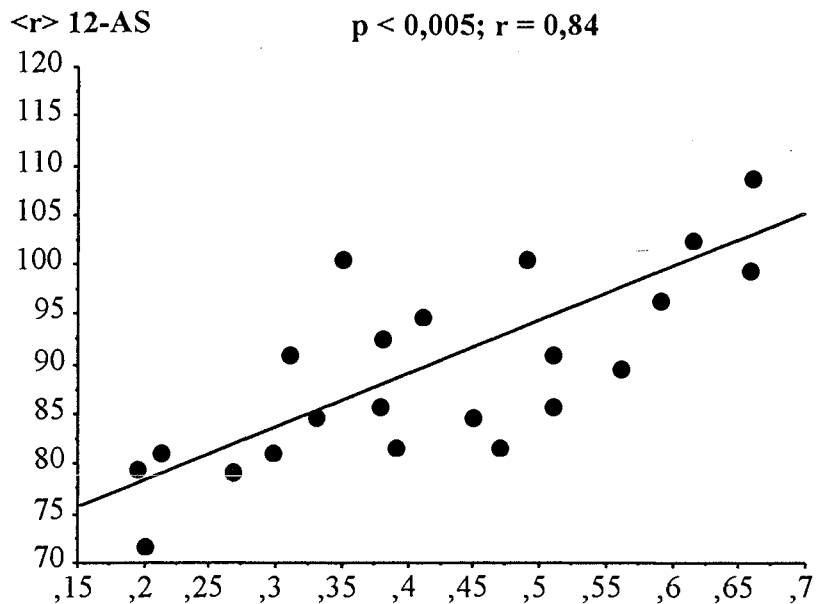


Figure 33. Régression linéaire de l'anisotropie $\langle r \rangle$ émise par 12-AS en fonction du rapport C/PL.

V) DISCUSSION

Nos résultats permettent de développer un certain nombre de commentaires et de formuler des hypothèses sur les perturbations de la membrane érythrocytaire au cours du diabète insulino-dépendant.

Notre étude a fait apparaître au niveau de la membrane érythrocytaire du groupe des diabétiques insulino-dépendants étudiés des modifications significatives, dans les quantités de cholestérol et de phospholipides, ainsi que des altérations des propriétés dynamiques membranaires.

V.1) Cholestérol

Le contenu en cholestérol et en phospholipides totaux de la membrane érythrocytaire est plus élevé chez le patient diabétique que chez le sujet sain, le rapport C/PL résultant tendant également à augmenter. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature, plusieurs auteurs ayant rapporté une élévation du cholestérol et du rapport C/PL de la membrane érythrocytaire au cours du diabète (cf Rappels).

Certains auteurs (Cignarelli et al, 1983) ont déjà rapporté l'existence d'une relation négative entre la quantité de cholestérol dans les HDL et le taux d'HbA_{1c}. Cette relation est confirmée dans nos résultats. De plus, nous rapportons une baisse du cholestérol HDL parallèlement à une augmentation du cholestérol membranaire. Le déséquilibre métabolique semble être impliqué dans ces altérations. En effet, la baisse de cholestérol HDL et l'augmentation du cholestérol membranaire sont fonction de l'équilibre du diabète. L'HbA_{1c} et le taux de cholestérol HDL expliquent à eux deux 43,6% de la variation du cholestérol membranaire.

Ces éléments laissent supposer que l'augmentation du cholestérol membranaire chez le diabétique serait, tout au moins en partie, due à une altération des processus

d'échanges entre les particules HDL et la membrane sous l'effet du déséquilibre métabolique.

Par ailleurs, il est bien établi que la quantité de cholestérol membranaire est en relation avec la composition membranaire en phospholipides. Le cholestérol interagit avec les phospholipides, son cycle rigide recouvrant l'acide gras du 9^{ème} au 12^{ème} carbone.

La PC est constituée essentiellement d'AG insaturés, alors que la SM contient des AG saturés capables d'augmenter le packing des lipides et d'interagir fortement avec le cholestérol. La molécule de SM adopte une structure condensée et les interactions de type Van der Waals qui s'établissent entre le cholestérol et la SM sont plus fortes que les interactions cholestérol-PC. Ainsi, la cinétique d'échange du cholestérol entre l'hématie et l'HDL est influencée par le rapport PC/SM membranaire (Gold et Phillips, 1990). Une membrane présentant un rapport PC/SM plus faible incorpore plus facilement le cholestérol et présente inversement un taux de désorption plus faible (Kan et al, 1991).

Nos résultats chez les témoins confirment ces données de la littérature, puisque nous obtenons une relation linéaire inverse entre le rapport PC/SM et le cholestérol membranaire. Paradoxalement, chez le groupe diabétique où le cholestérol membranaire est justement plus élevé, nous obtenons une relation positive.

Notre résultat paradoxal pourrait être expliqué par une modification des AG de la PC et/ou de la SM chez le diabétique. Une diminution des AG polyinsaturés, a été rapportée chez les diabétiques et plus particulièrement chez les patients les plus déséquilibrés (Kamada et al, 1990). Cette diminution est par ailleurs compensée par l'augmentation des acides gras saturés (Ruiz Gutierrez et al, 1993). Les AG de la PC pourraient être plus spécialement concernés. En effet, une diminution spécifique de l'acylation de la PC a été observée chez le rat diabétique (Le Petit Thévenin et al, 1988). Une diminution de l'acide arachidonique dans la PC de sujets diabétiques a également été observée (Baldini et al, 1989). Ainsi, la diminution du degré d'insaturation des AG de la PC lors du diabète pourrait induire une plus forte interaction de cette dernière avec le cholestérol qui se traduirait par une plus forte incorporation du cholestérol dans les

membranes et parallèlement à une plus faible désorption par les HDL. La relation négative de la PC membranaire avec le cholestérol HDL et positive avec le cholestérol LDL tendrait à appuyer cette hypothèse.

V.2) Phospholipides

En ce qui concerne la répartition des classes majeures des phospholipides, la membrane érythrocytaire du sujet diabétique comparée à celle des témoins, présente une augmentation significative de la PE et de la PC ainsi qu'une baisse significative de la quantité de SM. L'ensemble de ces variations a pu être relié au contrôle métabolique.

Les résultats portant sur la composition des phospholipides érythrocytaires chez le diabétique sont très contradictoires (cf Rappels).

Toutefois, certains travaux sont en accord avec nos résultats. Jain et al (1990) ont étudié la composition des érythrocytes de rats diabétiques, présentant une hyperglycémie. Le profil des phospholipides est comparable au nôtre, à savoir une augmentation importante de la quantité de PE, une augmentation de la PC et une nette diminution de la SM. Il faut noter que l'augmentation de la PE ainsi que la baisse de la SM, ont été corrigées ‡ la suite du contrôle de la glycémie après administration d'insuline.

Ces observations sont en accord avec nos résultats puisque toutes les modifications des phospholipides que nous avons observées chez les patients diabétiques autant au niveau des différentes classes qu'au niveau de la quantité totale, ont pu être corrélées au déséquilibre métabolique.

On peut formuler plusieurs hypothèses pour expliquer ces variations des phospholipides de la membrane érythrocytaire .

En premier lieu, le déséquilibre métabolique du diabétique pourrait induire une stimulation de la synthèse des phospholipides dans les réticulocytes. En effet, le glucose sert de substrat pour la synthèse des acides gras saturés, le catabolisme glucidique conduisant par l'intermédiaire de la glycolyse extramitochondriale au pyruvate dont la

décarboxylation oxydative intramitochondriale donne naissance à l'acétyl-coenzyme A. Celui-ci par la voie du citrate ou celle de la carnitine rejoint le milieu extramitochondrial et alimente la biosynthèse des acides gras (Vaulont et Kahn, 1994). De plus, le glucose est connu pour activer la transcription de la plupart des gènes codant pour les enzymes de la lipogénèse tels que l'ATP citrate lyase, l'acide gras synthétase et l'acétyl CoA carboxylase (Girard et al., 1994).

La stimulation de la synthèse des acides gras qui sont des constituants des phospholipides se traduirait également par une augmentation de la synthèse de ces derniers et notamment des classes majeures PE et PC, alors que la diminution concomitante de la quantité de SM dans le globule rouge pourrait, quand à elle, résulter de contraintes de packing induites au niveau de la couche externe de la membrane par l'augmentation de la quantité de PC (Engelmann et al, 1992). En effet, on a pu noter dans les membranes de plusieurs types cellulaires, une corrélation négative entre les quantités de PC et celles de SM. Il semblerait qu'elles soient régulées de façon à maintenir constante la quantité totale de phospholipides à tête choline (Barenholz et Gatt, 1982).

La seconde hypothèse concerne le globule rouge mature qui n'a plus d'activité de synthèse et dont la composition en lipides résulte uniquement d'échanges avec les lipoprotéines plasmatiques. Les modifications des lipides membranaires pourraient dériver d'altérations des lipides plasmatiques et de modifications dans les processus d'échanges entre le plasma et la membrane. L'équilibre métabolique pourrait être à ce niveau déterminant. En effet, plusieurs observations indiquent une augmentation significative des particules LDL et VLDL lors du diabète (Lopes-Virella et al; 1988, Ziegler et al, 1990; Guerci et al, 1994), ces désordres étant corrélés au contrôle métabolique.

Les lipoprotéines sécrétées contiennent à la fois du cholestérol, des triglycérides et des phospholipides. La PC est le phospholipide majeur présent dans toutes les lipoprotéines circulantes, les autres phospholipides étant par contre faiblement représentés (Vance, 1989). L'augmentation de la PC dans la membrane érythrocytaire de patients

diabétiques pourrait être due à un enrichissement de la membrane par des lipoparticules riches en PC, une élévation de la PC ayant déjà été observée dans les LDL de patients diabétiques (Bagdade, 1987). Les corrélations linéaires obtenues entre la quantité de PC et les lipides plasmatiques tels que le cholestérol LDL et les triglycérides, tendraient à supporter cette hypothèse. Le taux d'HbA1c et le cholestérol LDL expliquent par ailleurs 66,5% de la variation du contenu membranaire en PC.

Enfin, une dernière hypothèse expliquant les modifications des phospholipides membranaires, s'appuie sur les travaux de plusieurs auteurs portant sur les relations entre la peroxydation lipidique et la composition membranaire en phospholipides. En effet, l'augmentation de la PC et de la PE membranaire et la diminution de la SM qui ont été observées par Jain et al (1989) chez les rats hyperglycémiques étaient également associées à une augmentation de la peroxydation lipidique dans la membrane.

D'autres auteurs (Engelmann et al, 1990), ont également démontré une diminution de la quantité de SM et une élévation de la quantité de PC chez des patients hyperlipidémiques. Ces derniers présentaient par ailleurs une diminution de leurs plasmalogènes PE et par conséquent, une plus grande susceptibilité à la peroxydation lipidique.

D'autres travaux ont également mis en évidence une augmentation des quantités de PE et de PC et une diminution de la SM, dans des situations de chocs oxydatifs telles que le vieillissement ou le diabète (Jain, 1988), et spécialement le diabète déséquilibré (Jain et al, 1989).

On pourrait alors penser que les modifications observées au niveau des lipides membranaires des patients diabétiques sont dues à une plus grande susceptibilité des diabétiques à la peroxydation lipidique. Les patients les plus déséquilibrés sont alors les plus exposés puisque l'influence du déséquilibre métabolique ainsi que l'effet activateur d'un milieu riche en glucose sur la peroxydation des lipides sont bien établis (cf Rappels).

Par ailleurs, le rapport membranaire PE/PC présente une relation inverse avec l'équilibre métabolique. En effet, en dépit de l'augmentation globale de la quantité de PE, on observe une baisse relative de la PE lors de l'augmentation de la quantité de PC membranaire. Ce résultat pourrait être lié à la modulation des groupements polaires des phospholipides par les acides gras (McGee, 1990). En effet, plusieurs auteurs ont montré une augmentation du rapport PE/PC membranaire lors de l'enrichissement de la membrane en acides gras insaturés. La relation inverse que nous avons obtenue entre le rapport PE/PC et les paramètres de l'équilibre métabolique pourrait rendre compte d'une modification des acides gras membranaires sous l'influence d'un milieu riche en glucose agissant comme inhibiteur des désaturases (Brenner, 1981) qui conduirait à une augmentation de la proportion d'AG saturés et donc à une diminution du rapport PE/PC.

V.3) Dynamique membranaire

L'étude de la dynamique membranaire a permis de mettre en évidence une baisse de la fluidité membranaire de l'hématie des patients diabétiques. Dans la littérature, les résultats concernant la fluidité membranaire du diabétique sont contradictoires. Ceci peut être dû à une grande hétérogénéité des groupes étudiés et notamment au niveau de leur équilibre glycémique.

Dans le groupe de diabétiques que nous avons étudié, la fluidité semble en relation avec un certain nombre de facteurs membranaires et plasmatiques.

V.3.1) Effet du cholestérol

L'augmentation du cholestérol membranaire chez le diabétique semble influencer spécifiquement la fluidité des régions plus profondes caractérisées par la sonde 12-AS. Nous pouvons en effet constater l'absence de corrélation entre les valeurs d'anisotropie de la fluorescence émises par la sonde 6-AS et le cholestérol membranaire. L'effet rigidifiant du cholestérol sur la fluidité semble s'exercer uniquement à proximité de ses sites

d'incorporation. Le cholestérol a en effet, une distribution non uniforme verticalement et latéralement dans les membranes. Il s'incorpore préférentiellement dans les couches plus profondes de la membrane caractérisées par le 12-AS (Chabanel et al, 1983).

V.3.2) Autres facteurs

La baisse de la fluidité membranaire apparaît de façon plus significative dans les régions explorées par la sonde 6-AS que dans les régions explorées par la sonde 12-AS. Il est difficile d'expliquer cette diminution de fluidité par l'augmentation du cholestérol membranaire chez le diabétique puisqu'il n'existe aucune corrélation entre les deux paramètres. De plus, nous notons une augmentation significative du rapport PC/SM chez le patient diabétique par rapport aux témoins. Or l'augmentation de ce rapport est connue pour traduire une fluidification des couches superficielles de la membrane. Un éventuel effet fluidifiant de l'augmentation du rapport PC/SM observée chez le diabétique, ne se reflète pourtant pas dans nos résultats, puisque la baisse de la fluidité membranaire est encore plus importante au niveau des régions caractérisées par le 6-AS.

Ces éléments suggèrent que la baisse de la fluidité membranaire dans les régions explorées par la sonde 6-AS serait due à un ou des facteur(s) autre(s) que ceux que nous avons étudié.

Les corrélations qui ont pu être établies entre les valeurs d'anisotropie émises par le 6-AS et l'HbA_{1c} laissent supposer l'intervention du déséquilibre glycémique. L'effet de ce dernier sur la fluidité pourrait être lié à l'augmentation de la glycation des protéines membranaires. En effet, la glycation des protéines est un phénomène qui se produit en milieu riche en glucose et il a déjà été cité comme un des facteurs majeurs impliqués dans la baisse de la fluidité membranaire chez le diabétique (Watala, 1992).

D'autres facteurs doivent également être pris en compte. La baisse de la fluidité dans les couches superficielles pourrait également être associée à des altérations du profil des AG membranaires. Ces altérations se traduisent par une diminution du rapport AG polyinsaturés /saturés (Faas et Carter 1980, Vidal et al, 1983) la PC étant par ailleurs

hautement concernée. Ceci pourrait expliquer que l'augmentation du rapport PC/SM n'est pas associée à une augmentation de la fluidité membranaire.

Plusieurs auteurs ont constaté une diminution du degré d'insaturation des AG en fonction du déséquilibre du diabète (Ruiz-Gutierrez et al, 1993). Les corrélations positives que nous avons observé entre la fluidité et les paramètres mesurant l'équilibre glycémique semblent appuyer cette hypothèse. Par ailleurs, il a été rapporté un effet inhibiteur d'un milieu riche en glucose sur l'activité des désaturases (Brenner, 1981) ainsi qu'un effet stimulateur du glucose sur la peroxydation lipidique (Hunt et al, 1988). La déficience en insuline pourrait également être impliquée, les désaturases semblant en effet être insulino-dépendantes au niveau de leur activité (Borkman et al, 1993).

Par conséquent, il est probable que les perturbations de la membrane érythrocytaire au cours du diabète insulino-dépendant aient une origine multifactorielle, pouvant concerner aussi bien le degré d'insaturation des acides gras, les classes de phospholipides ou des modifications des protéines membranaires. Ceci pourrait expliquer en partie la variabilité des observations rapportées dans la littérature.

2ème PARTIE
ACIDOCETOSE DIABETIQUE.

INTRODUCTION.

L'acidocétose diabétique (ACD) est une complication métabolique aiguë du diabète sucré. Elle est caractérisée par une carence aiguë en insuline associée à une insulino-résistance. Elle met par ailleurs en jeu des hormones de contre-régulation (glucagon, catécholamines, cortisol, hormone de croissance). Elle est définie comme une élévation importante de la production de corps cétoniques, acétoacétate et β -hydroxybutyrate (β -OH) essentiellement en raison d'une hyperglycémie très importante.

Or, il est bien établi que les corps cétoniques peuvent traverser la membrane plasmique. Ceci peut s'effectuer par simple diffusion ou par transport actif. Des transporteurs de monocarboxylates capables de prendre en charge les corps cétoniques ont été mis en évidence dans les érythrocytes. Nous nous sommes demandé alors quel pouvait être leur effet sur la membrane érythrocytaire. Nous avons récemment observé des différences marquées au niveau de la fluidité membranaire des patients diabétiques en acidocétose par rapport aux sujets diabétiques bien équilibrés (Candiloros et al, 1995). Ainsi, nous avons consacré la deuxième partie de ce travail à la détermination de l'influence des corps cétoniques sur les lipides de la membrane érythrocytaire.

Notre travail a comporté une étude simultanée des hématies de patients en ACD et une simulation *in vitro* par incubation des globules rouges de patients diabétiques déséquilibrés avec des concentrations de β -OH rencontrées habituellement en ACD. L'effet du β -OH a également été évalué sur les érythrocytes de sujets sains. Pour faciliter les présentations des résultats et de la discussion, nous avons d'une part fait figurer l'étude *in vitro* avant l'étude *in vivo* et d'autre part rassemblé dans un chapitre de rappels des généralités sur les corps cétoniques et la méthylation des phospholipides.

RAPPELS

I) LES CORPS CETONIQUES

Les corps cétoniques ont des fonctions multiples: substrats pour la biosynthèse, régulation du métabolisme du glucose et des acides gras, rôle sur les fonctions cellulaires.

I.1) Rôle des corps cétoniques dans l'homéostasie énergétique

En cas de carence alimentaire en glucides (jeûne, régime hypoglucidique), ou de sous utilisation tissulaire du glucose (diabète), les acides gras se mobilisent à partir des adipocytes et sont disponibles pour l'utilisation tissulaire sous deux formes: acides gras libres (AGL), ou corps cétoniques (CC) après transformation hépatique. Les CC sont représentés principalement par l'acide acétoacétique et l'acide β -hydroxybutyrique.

Deux conditions sont requises pour que la cétogénèse hépatique soit stimulée. Il faut que:

- a) Le taux des AGL (précurseurs des CC) soit élevé.
- b) Le foie se trouve en état cétogène, l'insuline et le glucagon jouant à cet égard un rôle majeur.

Dans toutes les formes de cétose, la concentration d'insuline est abaissée et celle du glucagon élevée. Ces conditions favorisent la stimulation de la lipolyse adipocytaire et la conversion d'une fraction élevée des AGL captés par le foie en acide acétoacétique. La formation de β -OH se fait dans le foie par réduction de l'acide acétoacétique.

Les AGL et les CC sont utilisés et oxydés par différents tissus (muscle squelettique, myocarde, intestins, reins...) où ils peuvent remplacer le glucose comme substrat énergétique.

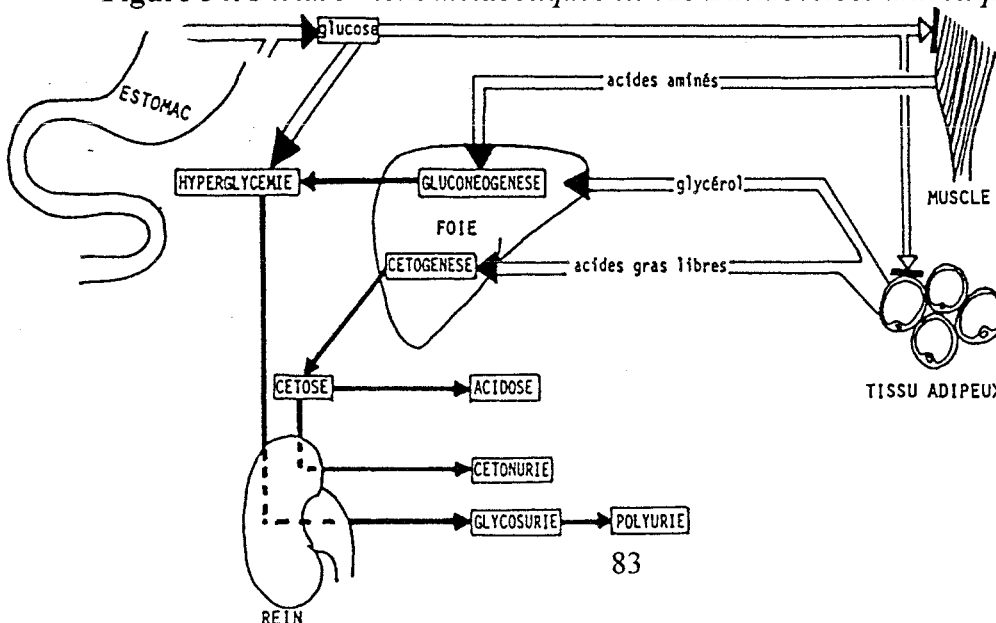
La différence importante entre les AGL et les CC est liée à la possibilité pour ces derniers de traverser la barrière hématoencéphalique et de servir ainsi de substrat métabolique pour le cerveau.

L'acétone est le produit de décarboxylation non enzymatique de l'acide acétoacétique qui a lieu dans le sang et dans les urines. L'acétone est peu métabolisée et est principalement excrétée par voie respiratoire et urinaire.

Dans les états de cétose physiologique (jeûne, régime hypoglucidique, exercice prolongé, états de post exercice...), la concentration des CC totaux est toujours inférieure à 10 mM, taux maximal compatible avec le maintien du pH sanguin dans les limites physiologiques.

En revanche, dans les cétooses pathologiques telles qu'on peut les observer dans le diabète décompensé ou dans les cétooses alcooliques, la concentration des CC peut dépasser 20 mM et être responsable d'une acidose sévère. Ce phénomène s'explique par le fait que les CC tendent en principe à inhiber leur propre production en raison de leur effet insulinosecrétoire et de leur action antilipolytique. Au cours de la cétose diabétique, en raison de l'absence de sécrétion insulinique, la cétogénèse n'est plus correctement inhibée par ce phénomène de rétrocontrôle négatif.

Figure 34: Perturbations métaboliques en cas d'acidocétose diabétique.



I.2) Rôles des corps cétoniques comme substrats ou comme signaux dans les tissus

En plus de leur utilisation comme substrats pour la biosynthèse, les CC peuvent réguler l'approvisionnement et le métabolisme d'autres substrats. Leur concentration répond de façon rapide à un changement physiologique et ceci affecte le métabolisme d'autres substrats, en particulier celui du glucose et des acides gras. Leur action régulatrice sur le glucose est importante en particulier en cas de jeûne ou d'alimentation faible en glucides. Les CC contrôlent à la fois l'utilisation du glucose par les tissus périphériques et sa production par le foie, en altérant l'approvisionnement en précurseur du glucose.

Les corps cétoniques sont également capables de contrôler l'approvisionnement du foie en acides gras non estérifiés. Ils ont une action antilipolytique, et leur administration diminue la concentration plasmatique des acides gras non estérifiés. Cette action antilipolytique est souvent accompagnée par une augmentation de la concentration en insuline.

Le β -OH est capable d'inhiber la lipolyse stimulée par le jeûne ou par addition *in vivo* d'agents lipolytiques comme l'ACTH, la norépinephrine, ou la théophylline. Le mécanisme par lequel le β -OH inhibe la lipolyse n'est pas très clair. Plusieurs auteurs ont toutefois suggéré que l'effet du β -OH s'exercerait sur l'action et la formation de l'adénosine 3', 5'- monophosphate cyclique (AMPc) (Prasad et Sinha, 1976).

I.3) Effets du β -OH sur les cellules en culture

Le β -OH produit des changements réversibles sur la morphologie, la différenciation cellulaire, le taux de croissance et l'activité enzymatique de plusieurs cellules de mammifères. Certains de ces changements sont soit similaires, soit antagonistes à ceux produits par des agents augmentant le taux intracellulaire d'AMPc, comme les agonistes

des récepteurs β -adrénergiques tel que l'isoprotérénol, ou les analogues de l'AMPc comme le dibutyryl AMPc, mais d'autres effets semblent uniques à ce composé (Prasad et Sinha, 1976).

I.4) Effets du β -OH sur l'induction hormonale de certaines protéines

Les hormones sont capables d'induire la synthèse des protéines et des enzymes et le β -OH peut avoir une action sur ce type d'induction (Kruh, 1982).

- L'hydrocortisone augmente de 2 à 3,6 fois l'activité de la glycérol phosphate deshydrogénase au niveau de cellules gliales C₆. Le β -OH abolit totalement cette action. De même, le β -OH bloque l'induction de la synthèse de l'ovalbumine et la transferrine par l'oestradiol.

- Les glucocorticoïdes induisent au niveau des myoblastes la synthèse de tyrosine aminotransférase. Le β -OH interfère avec cette action en altérant d'une part l'effet spécifique de l'hormone sur la chromatine et d'autre part en inhibant une des protéines régulatrices de cette synthèse.

- La dexaméthasone active la phosphatase alcaline au niveau des cellules HeLa. Le β -OH semble avoir un effet synergique à celui de l'hormone puisqu'il augmente l'activité de l'enzyme de 7 à 10 fois.

- Le β -OH inhibe l'action de la « thyrotropin releasing hormone » (TRH) en empêchant l'hydrolyse du phosphatidylinositol par la phospholipase C (Imai et Gershengorn, 1985).

I.5) Effets du β -OH sur l'activité spécifique des enzymes

Le β -OH est également capable d'agir sur l'activité enzymatique de plusieurs protéines:

Tableau 15: *Effet du β -OH sur l'activité de différentes enzymes des cellules neuroblastiques en culture: (Prasad K. N. et Sinha, P. K., 1976)*

	Activité basale	Activité avec β -OH
Tyrosine hydroxylase (pmol/30 min/10 ⁶ cellules)	15,1 $\pm$ 1,9	300 $\pm$ 12
Acétylcholine transférase (pmol/30 min/10 ⁶ cellules)	260 $\pm$ 35	760 $\pm$ 100
Acétylcholine estérase (pmol/ min/10 ⁶ cellules)	460 $\pm$ 63	3900 $\pm$ 100
Catéchol-O-méthyltransférase (pmol/hr/10 ⁶ cellules)	11900 $\pm$ 2500	32900 $\pm$ 3100
Adénylate cyclase (pmol/ min/mg de prot cellulaire)	15 $\pm$ 1,4	35 $\pm$ 1,4
AMPC phosphodiesterase (pmol/ min/mg de prot cellulaire)	36 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2,5

I.6) Effets du β -OH sur les récepteurs

Le β -OH est connu pour exercer un effet stimulateur, sur la sensibilité au GTP des récepteurs aux opioïdes (Coscia et al, 1990).

Le β -OH diminue la liaison de l'hormone TRH à son récepteur (Imai et Gershengorn, 1985)

Le traitement des lignées de cellules humaines carcinomateuses HeLa et A 431 par l'acide butyrique augmente jusqu'à 12 fois le nombre des récepteurs β -adrénergiques (Kassis et al, 1988).

De la même manière, le traitement des cellules du muscle lisse au β -OH augmente le nombre des récepteurs β -adrénergiques ainsi que la stimulation de l'adénylate cyclase. Ces effets sont relativement spécifiques au β -OH. D'autres acides gras ayant un plus grand nombre de carbones comme le succinate, le propionate ou le valérate sont inactifs (Nambi et al, 1986).

I.7) Effets du β -OH sur la lipolyse

Les travaux de Nakano et Ishiin (1970) portant sur le tissu adipeux de rat, ont démontré que le β -OH inhibe de façon marquante la lipolyse induite par la norépinéphrine, l'ACTH et la théophylline, et réduit significativement la lipolyse induite par le dibutyryl AMPc. Le mode d'inhibition du β -OH est compétitif pour la norépinephrine.

Ceci suggère que le β -OH inhibe l'activation de la lipase hormono-sensible (HSL), mais le site précis de l'action du β -OH reste incertain. Plusieurs hormones comme les catécholamines, l'ACTH ou le glucagon exercent leur activité en stimulant l'activité de l'adénylate cyclase et en augmentant la concentration d'AMPc cellulaire, cette augmentation permettant la conversion de l'HSL vers sa forme phosphorylée active et par conséquent l'hydrolyse des triglycérides en glycérol. L'action du β -OH semble interférer soit avec l'action de l'AMPc, soit à un niveau quelconque du système activateur de l'HSL.

Il a également été rapporté que le β -OH inhibait la lipolyse stimulée par l'isoprotérénol et le glucagon au niveau des cellules cardiaques du rat. En effet, les corps cétoniques sont connus pour être de puissants inhibiteurs de la lipolyse stimulée.

Toutefois l'effet antilipolytique du β -OH dépend du type cellulaire ainsi que du statut (normal ou pathologique) des cellules considérées. Larsen et Severson (1990) ont démontré sur des myocytes un effet stimulateur du β -OH sur la lipolyse. L'étude a porté

sur des myocytes provenant d'animaux sains ou diabétiques, les auteurs ayant étudié le rôle du β -OH sur la lipolyse basale et la lipolyse stimulée par l'isoprotérénol qui est un agoniste β -adrénergique.

Dans les myocytes normaux, le β -OH stimule à la fois la lipolyse basale et la lipolyse stimulée par l'isoprotérénol. En revanche, dans les myocytes de rats diabétiques, les corps cétoniques provoquent une stimulation de la lipolyse basale, mais n'ont aucun effet sur la lipolyse stimulée par l'isoprotérénol. Il faut noter que les myocytes provenant d'animaux diabétiques présentaient le taux de lipolyse basale le plus élevé.

II) METHYLATION DES PHOSPHOLIPIDES

II.1) Définition

La méthylation des phospholipides est la réaction permettant de convertir les phospholipides à éthanolamine en phospholipides à choline. Les phospholipides substrats peuvent être des acyl-, alkyl-, et alkényl-glycérophosphoryléthanolamine. Cette activité existe dans un grand nombre de cellules, et requiert la présence d'un donneur de méthyl, la S-Adénosyl-Méthionine (SAM).

II.2) Enzymes impliquées

La réaction de méthylation de la PE en PC se passe en trois étapes successives impliquant deux enzymes (figure 35):

La phosphométhyltransférase I (PMTase I) catalyse la méthylation du groupement éthanolamine de la PE en monométhyléthanolamine.

La phosphométhyltransférase II (PMTase II) ajoute deux groupements additionnels à la monométhyléthanolamine, formant en premier lieu, la diméthylphosphatidyléthanolamine et ensuite la phosphatidylcholine (figure 35).

Figure 35: *Réaction de méthylation de la PE en PC.*

II.2.1) Ségrégation topographique

La PMTase I est située dans la membrane érythrocytaire du côté cytoplasmique, tandis que la PMTase II est localisée à la surface cellulaire. La ségrégation spatiale des deux PMTases permet la translocation de la PE de la face cytoplasmique en même temps que sa conversion en PC. Bien que le phénomène de "flip-flop" spontané des phospholipides soit très lent, le "flip-flop" catalysé par les enzymes peut se dérouler très rapidement. Ainsi, des composés tels que la PE formée par décarboxylation de la PS, le diacylglycérol généré lors de l'action de la PLC, la lysoPC lors de l'action de la PLA₂, ou les intermédiaires de la réaction de méthylation sont capables de se transloquer très rapidement à travers la membrane.

II.2.2) Altération de la dynamique membranaire par méthylation des phospholipides

Généralement la PE quand elle est incorporée au sein de liposomes augmente le degré d'ordre, tandis que la PC est connue pour avoir un effet fluidifiant (Shinitzky, 1984).

Par conséquent, l'influence sur la dynamique membranaire des modifications structurales membranaires sous l'action de la méthylation a été étudiée.

L'anisotropie de fluorescence émise par des sondes telles que le DPH incorporées dans les membranes de globules rouges au cours de la méthylation, rend compte d'une augmentation bien marquée de la fluidité membranaire lors de ce phénomène (Hirata et al, 1979a). L'augmentation de la fluidité membranaire est proportionnelle à la quantité d'intermédiaires réactionnels accumulés durant la réaction. Le monométhyl et diméthyl-PE semblent avoir une action fluidifiante. Néanmoins, cette augmentation de la fluidité membranaire n'est que transitoire et dès que la méthylation est accomplie, la fluidité membranaire retourne à son niveau initial (Hirata, 1985).

II.3) Interaction des méthyltransférases avec les différents composants de la membrane

II.3.1) Couplage des PMTases avec les récepteurs membranaires

La stimulation de certains récepteurs membranaires comme les récepteurs des IgE, des neurotransmetteurs, ou β -adrénergiques, est connue pour augmenter la méthylation des phospholipides (Hirata et al, 1979a) et ceci même sur des membranes isolées.

Les PMTases forment des "cluster" ou groupements avec certains types de récepteurs, comme les récepteurs β -adrénergiques. En effet, les récepteurs β -adrénergiques purifiés à partir d'hématies, peuvent interagir spontanément avec les PMTases d'hématies d'origine humaine (Hirata et Axelrod, 1980). L'interaction du récepteur β -adrénergique avec les PMTases, provoque la suppression de l'activité de ces dernières, et la liaison d'un ligand tel que l'isoproterénol au récepteur β -adrénergique lève cette suppression. Ce système est couplé à l'adénylate cyclase (Hirata et al, 1979b).

II.3.2) Couplage des PMTases avec l'adénylate cyclase

Les PMTases sont des enzymes membranaires qui interagissent avec le cytosquelette. L'adénylate cyclase est également associée au cytosquelette. La stimulation

de cette dernière peut être bloquée par des inhibiteurs de la méthylation tels que la S- adénosyl homocystéine. Par contre, son activité est stimulée par la PC ou le diméthyl- et mono-méthyl-PE dérivant de l'action des PMTases et pas par d'autres phospholipides. L'ensemble de ces observations indiquent que les PMTases se situent à proximité des sites de liaisons de l'adénylate cyclase (figure 36).

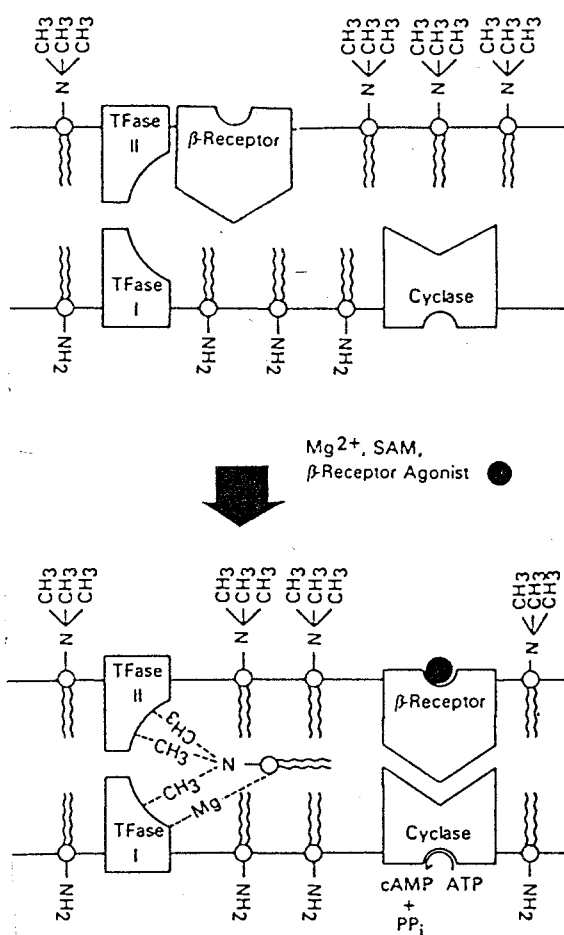


Figure 36: *Couplage des PMTases avec le récepteur β -adrénergique et l'adénylate cyclase.*

II.3.3.) Couplage des PMTases avec la phospholipase A_2

Plusieurs observations laissent à penser que la PC nouvellement synthétisée par méthylation est dégradée par la PLA_2 .

En effet, la PC est synthétisée par deux voies essentielles, la voie des cytidine diphosphate choline (CDP-choline) et par méthylation. L'activité des PMTases est bien inférieure à celle des CDP-choline transférase. Elle n'est impliquée que pour 1/10 du total de la PC synthétisée. Cependant, 80 à 90% de la PC dérivant de la méthylation contient en position 2 du glycérol un acide arachidonique. Or c'est celui ci qui est dégradé par la PLA₂ (Hirata et Axelrod, 1980).

L'activation de la PLA₂ a été observée après la stimulation de nombreux récepteurs impliqués dans la méthylation des phospholipides. Cette activation est suivie de la libération d'acide arachidonique et de lysoPC dérivant de la dégradation de la PC (Figure 37). De plus, les PMTases et la PLA₂ ont des spécificités de substrats très proches, et sont souvent copurifiées au niveau des membranes plasmiques, même lors de préparations hautement purifiées.

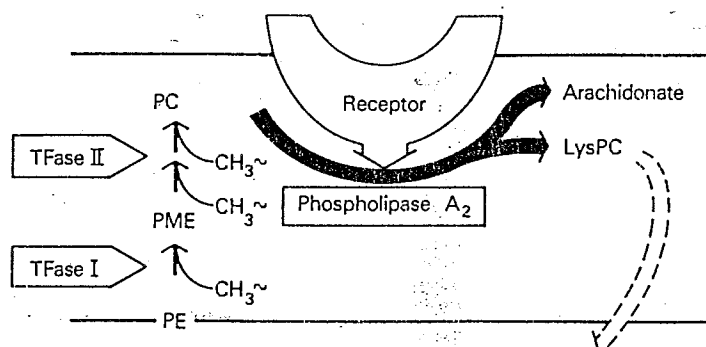


Figure 37: Dégradation par la PLA₂ de la PC synthétisée par méthylation.

II.3.4) Intervention des protéines G dans l'activation du complexe récepteur, adénylate cyclase et PMTases

Les PMTases sont couplées aux récepteurs β -adrénergiques, ce couplage permettant la suppression de leur activité. La stimulation du récepteur par un effecteur va

provoquer la liaison du récepteur à l'adénylate cyclase et lever la suppression des PMTases. Le couplage de l'adénylate cyclase au récepteur fait intervenir une protéine G (Figure 38).

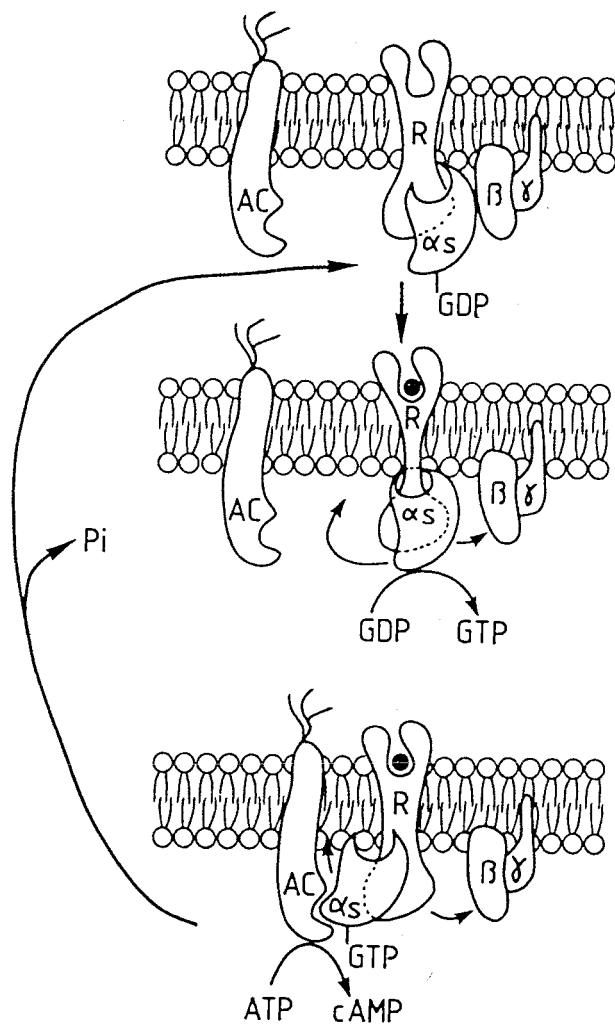


Figure 38: *Intervention de la protéine G dans la transduction du signal.*

Dans le contexte de la méthylation des phospholipides, il est important d'approcher ces quatre protéines à savoir, les protéines G, l'adénylate cyclase, les PMTases, et la PLA2 et de mieux connaître :

- * leurs mécanismes d'action et d'activation.
- * leurs interactions les unes avec les autres.
- * leur interaction avec les récepteurs β -adrénergiques
- * et enfin, l'effet éventuel du β -OH sur ces différents mécanismes.

II.4.) Protéines G

La protéine hétéromérique G est médiatrice de plusieurs changements intracellulaires générés par la liaison de ligands à différentes familles de récepteurs cellulaires de surface.

Les protéines G sont constituées de 3 sous unités α , β et γ . Chacune de ces sous unités est le produit d'un gène différent générant une large variété d'hétérotrimères différents.

Ces différentes formes combinées sont importantes pour le réseau intracellulaire de transduction de l'information lors de la liaison de ligands à des récepteurs spécifiques. Elles jouent un rôle essentiel dans l'activation d'effecteurs intracellulaires. Les effecteurs peuvent être des canaux ioniques comme les canaux potassiques cardiaques (Logothetis et al, 1987) ou des enzymes pouvant générer des seconds messagers comme la PLA2 ou la PLC (Burch et al, 1986) ou d'autres enzymes associées à l'activité de récepteurs comme l'adénylate cyclase.

Par ailleurs, les protéines G interviennent directement sur le système d'activation d'un certain nombre de récepteurs tels que les récepteurs à insuline et les récepteurs β -adrénergiques. En effet, les protéines G sont capables de moduler l'activité kinasique intrinsèque des récepteurs à insuline en agissant sur l'activité tyrosine kinase du récepteur,

(O'Brian et al, 1987; Rothenberg et et Kahn, 1988). L'activation de la protéine G associée au récepteur de l'insuline produit de plus un effet insulin-like (Obermaier-Kusser, 1988);

La protéine G peut agir également sur les récepteurs β -adrénergiques en activant la tyrosine kinase du récepteur. Par ailleurs, elle est capable de mimer une fois activée, l'effet des catécholamines (Cerione, 1991)

Mode d'action

La protéine G activée par un récepteur approprié, fixe le GTP et se dissocie en une sous unité α et un complexe de 2 sous unités $\beta\gamma$ ancré à la membrane.

La sous unité α est liée au récepteur et permet sa liaison avec l'adénylate cyclase et donc l'activation de cette dernière.

Le rôle du complexe libre $\beta\gamma$ est moins connu mais les deux sous unités ont été impliquées dans un grand nombre d'activités comme la modulation de l'activation de l'adénylate cyclase par la sous unité α . Elles permettent l'activation de la phospholipase A_2 (Burch et al, 1986, Jelsema et Axelrod, 1987) et l'activation de la kinase du récepteur β -adrénergique (Pitcher et al, 1992, Lohse, 1993).

II.5) L'adénylate cyclase

L'adénylate cyclase est l'enzyme permettant l'hydrolyse de l'ATP en AMP puis sa transformation en AMPc. C'est une enzyme qui est stimulée hormonalement, et son activité implique au moins trois protéines distinctes:

- Le récepteur hormonal.
- La protéine catalytique de l'adénylate cyclase.
- La protéine régulatrice de l'adénylate cyclase liant un nucléotide guanine.

L'activation du système implique des interactions entre ces différentes protéines.

Régulation

Les interactions sont régulées par deux ligands régulateurs:

- L'hormone se fixant sur le récepteur
- Le nucléotide guanine se fixant sur la protéine G.

Ceci se fait selon une séquence complexe impliquant l'hydrolyse du GTP et plusieurs réactions de liaisons protéines/protéines, notamment avec les protéines G, impliquées dans les systèmes de transduction du signal. En effet, une activité GTPasique est associée à la fois à l'adénylate cyclase et aux récepteurs associés à l'adénylate cyclase.

Mode d'activation

Lorsque le GDP est lié à la sous unité Gs- α , le complexe entre les trois sous unités α , β , γ est très stable.

La substitution du GDP par du GTP produit une dissociation entre Gs- α GTP, d'une part et G- $\beta\gamma$, d'autre part.

- La sous unité Gs- α libérée peut stimuler l'activité de l'unité catalytique (adénylcyclase) purifiée.

Il est probable que toutes les protéines G utilisent ce modèle de fonctionnement.

II.6) Les PMTases

Les PMTases sont des enzymes liées à la membrane qui peuvent être activées par deux mécanismes différents soit un mécanisme cAMP dépendant, soit par un mécanisme cAMP indépendant.

a) La stimulation des PMTases est reliée à celle de l'adénylate cyclase et d'une protéine kinase cAMP dépendante permettant leur phosphorylation et donc leur activation. L'augmentation de la quantité d'AMPc favorise donc l'activation des PMTases.

b) Les PMTases peuvent également être phosphorylées par une protéine kinase C à des sites différents de ceux AMPc dépendants.

Tous ces mécanismes font intervenir des protéines G.

De plus, il faut signaler que l'activation des PMTases s'accompagne d'une activité de lipolyse. En effet, on note une relation linéaire entre l'activité des PMTases et la lipolyse, lors de la réponse à la norépinephrine (Kelly et al, 1987).

II.7) La phospholipase A₂ (PLA₂)

Les PLA₂ catalysent la réactions d'hydrolyse de la liaison ester en position 2 des phospholipides. Le substrat classique de la PLA₂ est la PC qui est dégradée en lysoPC et en acide arachidonique.

L'intervention des protéines G dans la libération de l'acide arachidonique est maintenant bien établie. Ces résultats ont été reproduits sur de très nombreux types cellulaires par l'inhibition de la PLA₂ en présence d'inhibiteur des protéines G. Une autre preuve indirecte est apportée par la stimulation de la libération de l'acide arachidonique induite par les analogues stables du GTP dans des cellules perméabilisées. Enfin de nombreux agonistes ne peuvent libérer l'acide arachidonique dans les cellules perméabilisées qu'en présence de GTP.

Les protéines G peuvent également être couplées à d'autres systèmes de transductions comme l'adénylate cyclase, la phospholipase C ou les canaux calciques, qui pourraient eux même être responsables de l'activation de la PLA₂.

Elles sont également couplées à certains récepteurs, parmi lesquels le récepteur adrénergique dont la stimulation par la noradrénaline permet l'activation de la PLA₂.

ETUDE *IN VITRO*

I) INTRODUCTION

L'étude de l'effet *in vitro* des corps cétoniques sur la composition et la dynamique de la membrane érythrocytaire a été effectuée sur les mêmes sujets, témoins et diabétiques, qui ont figuré dans la première partie de ce travail.

II) MATERIELS ET METHODES

II.1) Réactifs

β -hydroxybutyrate de sodium (Sigma, Saint Louis, MO. USA), mis en solution extemporanément, à une concentration de 50 mM dans une solution de NaCl à 0,9 %.

II.2) Interaction des hématies avec le β -hydroxybutyrate

L'échantillon de sang est partagé en 2 volumes égaux :

Dans le premier sont ajoutés 200 μ l d'une solution isotonique de β -OH par ml de sang. La concentration finale est de 10 mM / ml et correspond à des taux plasmatiques de β -OH en cas d'acidocétose.

Dans le deuxième tube, ne sont ajoutés que 200 μ l d'une solution de NaCl à 0,9 % par ml de sang total.

Les tubes sont ensuite maintenus sous agitation douce, sur un plateau vibrant, à 37°C, pendant 1 heure.

II.3) Détermination de la composition biochimique et des propriétés dynamiques des membranes

Les quantifications des protéines et des lipides membranaires, ainsi que la détermination de la dynamique membranaire ont été effectués selon le protocole décrit en annexe.

II.4) Tests statistiques

La normalité de la distribution des valeurs au seins des groupes a été vérifiée par un test d'aplatissement et d'asymétrie.

Le test de Student a été utilisé pour la comparaison des groupes appariés avant et après traitement au β -OH.

III) RESULTATS

III.1) Effet *in vitro* du β -OH sur les érythrocytes de sujets sains

III.1.1) Effets du β -OH sur le contenu membranaire en cholestérol et phospholipides

Les quantités des lipides membranaires de l'érythrocyte chez les témoins avant et après traitement au β -OH sont représentées dans le tableau 16.

Tableau 16: *Effet de l'interaction in vitro du β -OH sur les lipides des membranes érythrocytaires de sujets témoins.*

	Hématies de témoins - β -OH	Hématies de témoins + β -OH	Test de Student (p)
Cholestérol	150,0 $\pm$ 7,5 ^a	145,74 $\pm$ 8,2	NS
Phospholipides	362,5 $\pm$ 14,2	338,93 $\pm$ 12,1	< 0,05
Rapport C/PL	0,41 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,02	< 0,05

^a Valeurs moyennes exprimées en μ g par mg de protéines $\pm$ ES.

Aucun changement significatif n'est observé dans la composition en cholestérol des érythrocytes du témoin après traitement au β -OH. Par contre on note une baisse des phospholipides totaux et une augmentation du rapport C/PL après incubation avec le β -OH.

III.1.2) Effets du β -OH sur la composition membranaires en phospholipides

Les quantités des différentes classes de phospholipides avant et après incubation au β -OH sont représentées dans le tableau 17.

Tableau 17: *Effet de l'interaction in vitro du β -OH sur les classes de phospholipides membranaires des hématies de sujets témoins.*

	Hématies de témoins - β -OH	Hématies de témoins + β -OH	test de Student (p)
PE	143,7 $\pm$ 7,6 ^a	116,4 $\pm$ 6,7	< 0,01
PS	41,9 $\pm$ 5,2	38,9 $\pm$ 5,1	NS
PC	118,8 $\pm$ 4,8	123,2 $\pm$ 7,7	NS
SM	72,6 $\pm$ 4,4	62,9 $\pm$ 3,3	NS
TOTAL	376,1 $\pm$ 11,9	340,5 $\pm$ 14,1	< 0,05

^a : Valeurs moyennes exprimées en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines $\pm$ ES.

La comparaison des quantités des différentes classes de phospholipides entre les deux groupes révèle une baisse significative de la quantité de PE après traitement au β -OH. Les quantités de PS et de SM tendent également à baisser alors que la quantité de PC montre une légère augmentation mais ces différences restent non significatives.

Ces variations se traduisent par une baisse significative de la quantité globale de phospholipides membranaires.

Exprimées en pourcentages, il apparaît que ce sont la PE et la PC qui présentent des différences significatives, la PE diminuant et la PC augmentant après action du β -OH (tableau 18).

Tableau 18 Effet de l'interaction in vitro du β -OH sur les pourcentages de PE et de PC des hématies de sujets témoins.

	Hématies de témoins - β -OH	Hématies de témoins + β -OH	Student (p)
(%) PE	$37,8 \pm 1,78^a$	$34,2 \pm 1,8$	$p < 0,05$
(%) PC	$30,8 \pm 1,2$	$34,8 \pm 1,8$	$p < 0,01$

^a Moyenne + ES.

Les tests de régression linéaire effectués révèlent par ailleurs une relation linéaire positive entre les variations des quantités de PE et PC après incubation avec le β -OH.

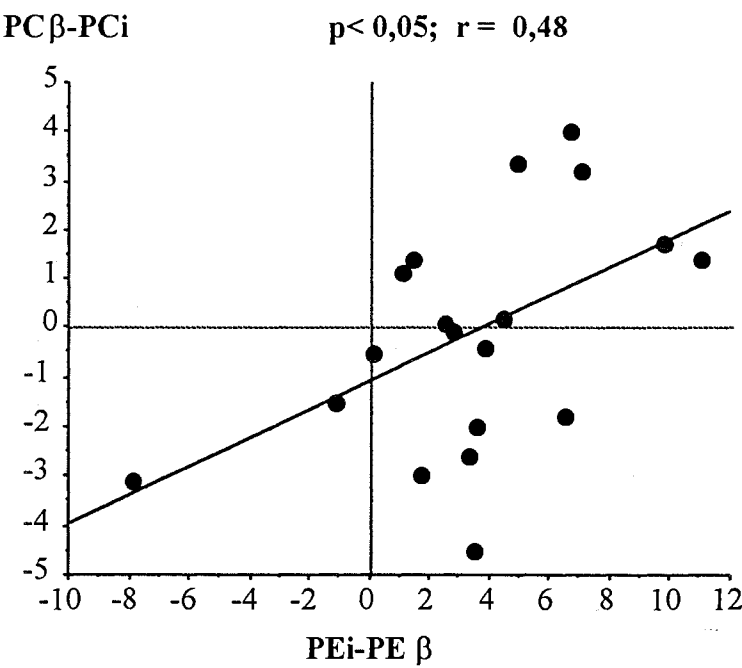


Figure 39. Régression linéaire entre les variations des quantités de PE et les variations des quantités de PC après incubation avec le β -OH.

(PE i -PE β) représentant la baisse de la quantité de PE après traitement avec le β -OH.

(PC β -PC i) représentant l'augmentation de la quantité de PC après traitement avec le β -OH.

III.1.3) Effet du β -OH sur les quantités relatives des phospholipides

Les rapports PE/PC et PC/SM avant et après incubation ainsi que leur comparaison figurent dans le tableau 19.

Tableau 19. *Rapports PE/PC et PC/SM avec et sans β -OH.*

	Hématies de témoins - β -OH	Hématies de témoins + β -OH	test de Student (p)
PE/PC	$1,21 \pm 0,1^a$	$1,06 \pm 0,098$	NS
PC/SM	$1,64 \pm 0,13$	$1,95 \pm 0,19$	NS

^a *Moyenne $\pm$ ES.*

Après traitement au β -OH, les variations des quantités de PE et de PC entraînent une légère baisse du rapport PE/PC et une tendance à l'augmentation du rapport PC/SM, mais les différences sont non significatives.

III.1.4) Effet du β -OH sur la fluidité membranaire des érythrocytes des témoins

Les valeurs de $\langle r \rangle$ émises par les deux sondes 6-AS et 12-AS avant et après incubation au β -OH, sont regroupées dans le tableau 20.

Tableau 20. *Valeurs de l'anisotropie de fluorescence émise par les sondes 6 et 12-AS avant et après incubation avec le β -OH.*

	Hématies de témoins - β -OH	Hématies de témoins + β -OH	test de Student (p)
6-AS	$0,101 \pm 0,003^a$	$0,107 \pm 0,002$	NS
12-AS	$0,083 \pm 0,002$	$0,080 \pm 0,002$	$< 0,05$

^a *Moyenne $\pm$ ES*

Les valeurs d'anisotropie pour la sonde 6-AS augmentent légèrement mais de façon non significative. Cette légère diminution de la fluidité semble être liée à la perte des phospholipides après traitement au β -OH, le test de corrélation ayant mis en évidence l'existence d'une relation qualitative négative entre les valeurs $\langle r \rangle$ de la sonde 6-AS et la quantité totale de phospholipides après incubation ($p < 0,05$).

Dans les mêmes conditions, on observe une faible diminution des valeurs de l'anisotropie de la fluorescence émise par la sonde 12-AS. La différence atteint toutefois le seuil de la significativité.

III.1.5) Hypothèses

Le traitement *in vitro* des hématies de sujets sains par le β -OH à des concentrations comparables à celles rencontrées dans les cas de cétoacidose, ne semble avoir aucun effet sur la quantité de cholestérol membranaire.

Nous obtenons par contre une nette diminution des phospholipides membranaires totaux qui semble résulter essentiellement d'une baisse de la quantité de PE. Par conséquent après interaction avec le β -OH, le rapport PE/PC tend à baisser. La PC ayant un effet fluidifiant et la PE un effet rigidifiant, ceci est compatible avec l'augmentation de la fluidité membranaire qui a été observée avec le 12-AS après traitement au β -OH.

Les valeurs d'anisotropie émises par le 6-AS-indiquent par contre une légère baisse de la fluidité membranaire. Celle-ci semble être en relation avec la baisse de la quantité totale de phospholipides.

La comparaison des pourcentages de PE et de PC obtenus avant et après traitement au β -OH indique une diminution et une augmentation du pourcentage de PE et de PC, respectivement. Les tests de régressions établissent l'existence d'une relation linéaire positive entre la baisse de la quantité de PE et l'augmentation de la quantité de PC après incubation avec le β -OH. Par conséquent, la diminution du pourcentage de PE semble donc se faire en faveur de la PC qui voit ainsi son pourcentage augmenter.

Cette augmentation de la PC au détriment de la PE peut résulter du fait que la PC dérive de la PE par simple méthylation du groupement amine de l'éthanolamine. Les enzymes phosphométhyltransférases catalysant cette réaction existent dans la membrane érythrocytaire et sont capables de transférer trois groupement méthyls convertissant la PE en PC. L'activation des phosphométhyltransférases est couplée à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques à la surface de l'érythrocyte. Or, le β -OH est capable d'interférer avec plusieurs actions des catécholamines ou de leurs agonistes.

Le fait qu'aucune différence n'apparaisse au niveau des quantités absolues de PC avant et après traitement au β -OH peut sembler donc contradictoire. Néanmoins, la PC

méthylée est caractérisée par un turnover très rapide (Hirata et al, 1979a, Hirata et Axelrod, 1980) et le phénomène de méthylation de la PE en PC est couplé à la stimulation de la PLA2 qui permet la dégradation des produits méthylés.

Par conséquent, nous avons formulé l'hypothèse que le **β -OH** serait capable d'activer les enzymes **phosphométhyltransférases** permettant la méthylation de la PE en PC en agissant sur le système d'activation du **récepteur β -adrénergique**. Ce phénomène s'accompagnerait de l'activation de la **phospholipase A₂** dégradant la PC méthylée.

Nous rapportons la vérification de la validité de cette hypothèse dans la section suivante de ce chapitre.

III.1.6) Inhibitions de la méthylation de la PE et de la dégradation de la PC

Afin de vérifier l'hypothèse de l'effet du β -OH sur la méthylation de la PE, des expériences d'inhibition des phosphométhyltransférases ont été effectuées en rajoutant un inhibiteur : la S-Adénosyl homocystéine (SAH) dans le milieu d'incubation, cette dernière empêchant l'incorporation des groupements méthyl sur la PE.

Deux inhibiteurs des phospholipases A₂, la quinacrine et l'EDTA, ont été utilisés afin de vérifier notre hypothèse sur la dégradation de la PC méthylée.

Il faut indiquer que ces expériences ont été longues et lourdes à mener. Elles n'ont donc été effectuées que sur un nombre restreint de sujets (n = 8).

a) Traitement des échantillon sanguins.

Les échantillon de sang prélevés sous ACD sont séparés en 5 tubes de volumes équivalents.

Le premier groupe constitue le groupe contrôle, il ne subit aucun traitement pendant l'incubation durant une heure à 37°C.

Dans les groupes II, III, IV et V, les échantillon de sang sont incubés avec du β -OH dans les mêmes condition que celles décrites dans le chapitre II, à savoir une concentration finale de 10 mM dans du NaCl à 0,9 % .

Dans trois de ces groupes, sont ajoutés au milieu d'incubation en même temps que le β -OH et pendant toute la durée d'incubation:

Groupe III : la S-Adénosyl Homocystéine (Sigma), la concentration finale étant de 200 μ M.

Groupe IV: deux inhibiteurs de la PLA₂, la quinacrine et l'EDTA (Sigma), à des concentration de 100 μ M et de 1 mM respectivement.

Groupe V: la S-Adénosyl Homocystéine (SAH), la quinacrine.(Q) et l’EDTA.

Après incubation, les échantillons de sang sont lavés. Les membranes sont isolées, et les lipides membranaires extraits. L'identification des classes majeures de phospholipides membranaires est effectuée selon le protocole décrit dans l'annexe.

b) Résultats.

Les quantités de la PE et de la PC membranaires des 5 groupes sont rassemblées dans le tableau 21.

Tableau 21. *Quantités des différentes classes de phospholipides pour les différents groupes.*

	Groupe I	Groupe II β-OH	Groupe III β-OH+ SAH	Groupe IV β- OH+(Q+EDTA)	Groupe V β-OH+(SAH+Q+EDTA)
PE	137,1 ± 11,2	120,8 ± 19,9	139,6 ± 12,5	123,5 ± 20,6	132,0 ± 13,2 ^a
PC	126,4 ± 8,2	119,5 ± 18,3	127,9 ± 11,4	131,1 ± 12,4	124,8 ± 16,2

^aValeurs moyennes exprimées en µg/mg de protéine ± ES.

Un certain nombre de remarques peuvent être dégagées du tableau 21.

La comparaison du groupe I et II montre, comme nous l'avions souligné auparavant, la baisse des quantités de PE après traitement au β-OH.

Le groupe III ayant subi une incubation conjointe avec le β-OH et l'inhibiteur de méthylation (S-Adénosyl-Homocystéine), présente des valeurs comparables au groupe I, aussi bien au niveau de la PE que de la PC. Ce résultat montre bien que la première étape dans la séquence des réactions induites par le β-OH est la méthylation de la PE, et que la dégradation de la PC est ultérieure.

Le groupe IV est incubé avec le β -OH et un inhibiteur de la PLA₂. La réaction de méthylation de la PE peut s'effectuer, la diminution des quantités de PE l'indiquant d'ailleurs clairement. Par contre, le maintien des valeurs de PC indique que la dégradation de la PC est bien inhibée par la quinacrine, les valeurs de PC étant même légèrement plus élevées que celles du groupe I. Cette différence pourrait représenter la proportion de PE méthylée en PC.

Le fait que le groupe V qui a été incubé avec les deux inhibiteurs ne présente aucune différence avec le groupe I apporte une preuve supplémentaire quant à l'implication des systèmes de méthylation et de dégradation des phospholipides dans l'action du β -OH sur les membranes d'érythrocytes.

III.1.7) Discussion

Les résultats rapportés ci-dessus confirment notre hypothèse que le β -OH pourrait avoir une action sur la méthylation de la PE et la dégradation de la PC. Un certain nombre d'arguments expérimentaux dans la littérature permettent de préciser le mécanisme d'action du β -OH.

En effet, des effets du β -OH sont similaires à ceux produits par les agonistes des récepteurs β adrénergiques tels que l'isoprotérénol, ou les analogues de l'AMPc comme le dibutyryl AMPc (Prasad et Sinha, 1976). L'effet de l'acide butyrique sur la stimulation de l'activité de l'adénylate cyclase est bien connu (Kruh, 1982, Flemming et al, 1988). Cet effet semble résulter de son action sur les protéines G.

Orly et Schramm (1975) ont démontré sur des réticulocytes une action spécifique de certains acides gras tels que le cis-vaccénique, oléique, laurique et butyrique sur le système d'activation de l'adénylate cyclase. Les acides gras semblent faciliter le couplage de l'enzyme au récepteur β -adrénergique. Ils agissent apparemment au niveau du site nucléotide-guanyl qui fonctionne comme régulateur du système adénylate cyclase en accélérant la fixation du GTP au niveau de la sous unité alpha stimulatrice de l'adénylate cyclase. Cet effet s'exerce même en absence de l'hormone.

D'autre part, il a été démontré au niveau des cellules HeLa 60 (Kassis, 1985), que la présence du β -OH augmentait l'efficacité de couplage du récepteur β -adrénergique à la sous unité Gs- α couplée à l'adénylate cyclase. La concentration de GTP requise pour l'obtention de 50% de la stimulation maximale de l'adénylate cyclase est également diminuée.

Tous ces éléments indiquent que le β -OH est capable d'agir à la fois directement sur les récepteurs adrénergiques et sur la protéine G.

L'effet du β -OH sur la méthylation pourrait alors être du soit à une action directe sur les récepteurs β -adrénergiques, dont la stimulation est connue pour être impliqués dans l'activation des PMTases, soit à un effet sur le couplage de l'adénylate cyclase au récepteur via les protéines G. Cette liaison est importante pour lever l'inhibition exercée sur les PMTases qui par ailleurs sont elles mêmes phosphorylées et activées par un mécanisme AMPc dépendant .

Par ailleurs, la méthylation des phospholipides est connue pour être associée à leur dégradation par la PLA₂. L'activité de cette dernière étant régulée également par une protéine G, le β -OH pourrait donc exercer directement un effet potentialisateur sur la dégradation de la PC.

III.2) Effet in vitro du β -OH sur les érythrocytes de patients diabétiques

III.2.1) Effets du β -OH sur le contenu membranaire en cholestérol et phospholipides

Les quantités totales de cholestérol et de phospholipides membranaires avant et après incubation des érythrocytes des diabétiques au β -OH sont rassemblés dans le tableau 22.

Tableau 22. *Effet in vitro du β -OH sur les quantités de cholestérol, de phospholipides et sur le rapport C/PL.*

	Hématies de patients diabétiques - β -OH	Hématies de patients diabétiques + β -OH	test de Student (p)
Cholestérol	185,2 $\pm$ 8,4 ^a	178,2 $\pm$ 7,93	NS
Phospholipides	394,3 $\pm$ 15,8	347,8 $\pm$ 14,6	< 0,005
Rapport C/P	0,47 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,02	< 0,05

^aValeurs moyennes exprimées en μ g par mg de protéines $\pm$ ES.

L'incubation des hématies avec le β -OH n'affecte pas les quantités de cholestérol membranaire. Ce résultat est comparable à celui obtenu chez les témoins. En revanche, le β -OH abaisse de façon significative les phospholipides membranaires du globule rouge des patients diabétiques. On note également une augmentation significative du rapport C/PL.

III.2.2) Effets du β -OH sur les différentes classes de phospholipides

Les quantités des différentes classes de phospholipides dans les érythrocytes des diabétiques avant et après traitement, sont représentées dans le tableau 23.

Tableau 23. *Effet in vitro du β -OH sur les quantités des classes de phospholipides .*

	Hématies de patients diabétiques - β -OH	Hématies de patients diabétiques + β -OH	test de Student (p)
PE	181,1 $\pm$ 7,5 ^a	145,7 $\pm$ 6,1	< 0,001
PS	43,5 $\pm$ 3,34	39,1 $\pm$ 4,0	NS
PC	145,1 $\pm$ 7,30	111,9 $\pm$ 5,3	< 0,001
SM	62,9 $\pm$ 3,3	58,3 $\pm$ 3,3	NS
TOTAL	431,4 $\pm$ 14,0	355,1 $\pm$ 12,7	< 0,001

^aValeurs moyennes exprimées en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines $\pm$ ES.

Le traitement des érythrocytes de sujets diabétiques au β -OH induit de la même manière que chez les témoins, une diminution significative de la quantité de PE et de la quantité totale de phospholipides. Néanmoins on peut noter que son effet est largement plus marqué chez le diabétique que chez le témoin ($p < 0,001$ pour les diabétiques versus $p < 0,01$ chez les témoins).

D'autre part, contrairement au témoin chez lequel la PC était peu affectée, chez le diabétique, la quantité de PC diminue de façon significative après traitement au β -OH.

Il faut noter que la perte de PC, représentée par la différence entre la quantité de PC avant et après traitement au β -OH présente une relation linéaire positive avec la fructosamine.

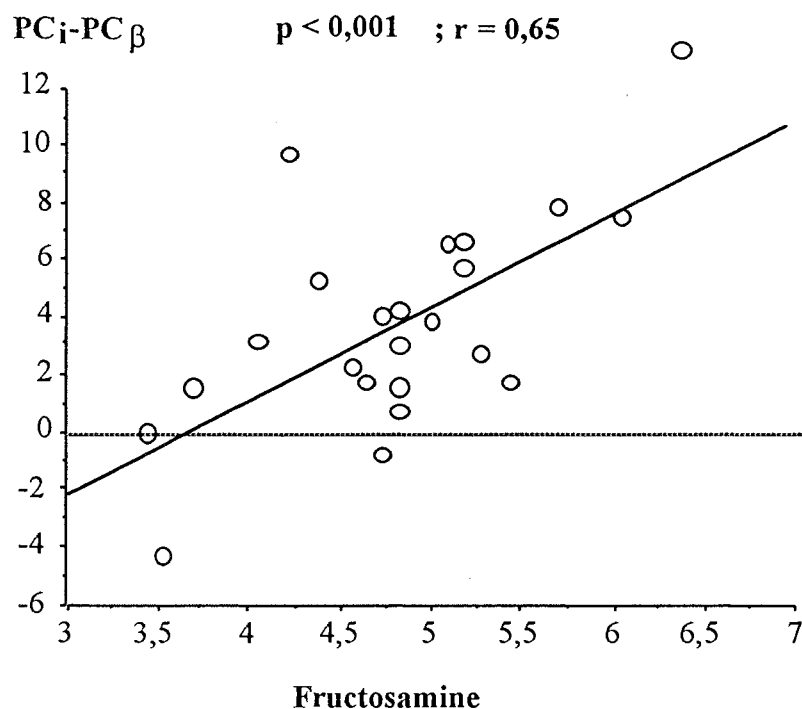


Figure 40. Régression linéaire de la perte de PC en fonction de la fructosamine.
PC_i et PC_β = quantités de PC avant et après incubation au β-OH, respectivement.

III.2.3) Effet du β-OH sur les rapports PE/PC et PC/SM

Les rapports PE/PC et PC/SM des patients diabétiques avant et après traitement au β-OH figurent dans le tableau 24.

Tableau 24. Effet *in vitro* du β-OH sur les rapports PE/PC et PC/SM des hématies de patients diabétiques.

	Hématies de patients diabétiques - β-OH	Hématies de patients diabétiques + β-OH	Test de Student (p)
PE/PC	1,25 ± 0,10 ^a	1,31 ± 0,11	NS
PC/SM	2,32 ± 0,15	1,97 ± 0,15	NS

^a Moyenne ± ES

Etant donné que la perte de phospholipides après traitement au β -OH concerne aussi bien la PC que la PE le rapport entre les deux ne change pas. En revanche, le rapport PC/SM tend à diminuer mais la différence reste non significative.

III.2.4) Effet du β -OH sur la fluidité membranaire

Les valeurs d'anisotropies de fluorescence émises par les sondes 6-AS et 12-AS des deux groupes avec et sans β -OH sont rassemblées dans le tableau 25.

Tableau 25. *Effet in vitro du β -OH sur l'anisotropie de la fluorescence émise par les sondes 6 et 12-AS insérées dans les hématies de patients diabétiques.*

	Hématies de patients diabétiques - β -OH	Hématies de patients diabétiques + β -OH	test de Student (p)
6-AS	0,111 $\pm$ 0,0023 ^a	0,117 $\pm$ 0,003	< 0,05
12-AS	0,091 $\pm$ 0,003	0,099 $\pm$ 0,003	< 0,05

^a *Moyenne $\pm$ ES*

Après traitement au β -OH, contrairement à ce que nous avons observé chez les témoins où les anisotropies émises par le 12-AS diminuaient et les anisotropies du 6-AS bien qu'elles augmentaient ne présentaient pas de différence significative, nous pouvons noter dans le groupe des diabétiques une augmentation significative des valeurs d'anisotropie émise par les deux sondes.

Par ailleurs, la quantité de PC dégradée semble être liée à l'état de fluidité basale de la membrane avant traitement au β -OH (figure 41).

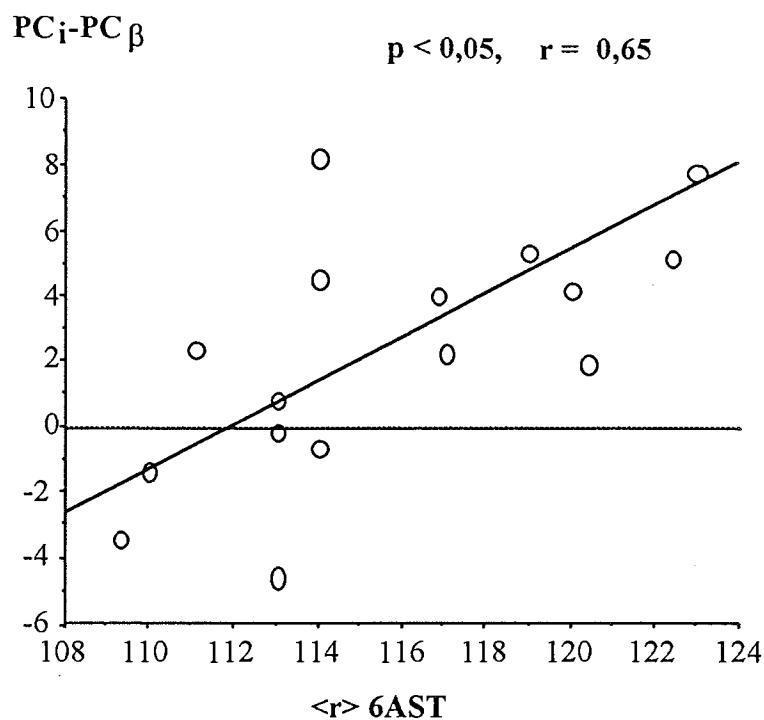


Figure 41. Régression linéaire de la dégradation de PC en fonction de l'anisotropie de fluorescence $\langle r \rangle$ du 6-AS.

(PC_i et PC_β = quantité de PC avant et après incubation au β -OH, respectivement).

$PC_i - PC_\beta$ représentant la quantité de PC dégradée par la PLA_2

III.2.5) Inhibition de la méthylation de la PE et de la dégradation de la PC

Le même type d'expérimentation que sur les hématies provenant des témoins, a été effectué sur les hématies des diabétiques. Les résultats figurent dans le tableau 26.

De la même manière que pour les témoins les expériences d'inhibitions ont été effectuées sur un effectif assez restreint.

Tableau 26. *Quantités des différentes classes de phospholipides pour les cinq groupes.*

(n=9)	Groupe I	Groupe II β-OH	Groupe III β-OH+ SAH	Groupe IV β- OH+(Q+EDTA)	Groupe V β-OH+(SAH+Q+EDTA)
PE	179,3 ± 12,0	147,2 ± 10,4	173,8 ± 13,6	165,8 ± 14,9	170,8 ± 17,5 ^a
PC	146,4 ± 19,7	135,2 ± 13,4	147,8 ± 10,4	149,0 ± 13,9	146,4 ± 14,3

^a *Valeurs moyennes exprimées en µg/mg de protéines ± ES.*

Les résultats sur les hématies de patients diabétiques confirment bien ceux obtenus avec les témoins.

En effet, l'inhibition des PMTases bloque l'effet du β-OH sur la diminution de PE et de PC. On retrouve ainsi des quantités de ces deux phospholipides comparables à celle du groupe I.

III.2.6) Discussion

A) Dynamique membranaire

Les valeurs d'anisotropie obtenues avec les 6-AS et 12-AS montrent une rigidification de la membrane après traitement au β -OH. Cet effet pourrait dériver de la diminution des quantités totales de phospholipides, et donc de l'augmentation du rapport C/PL lors du traitement au β -OH.

Par ailleurs la rigidification des régions superficielles pourrait plus spécifiquement être expliquée par la dégradation de la PC, et donc par l'augmentation des proportions de SM rigidifiante par rapport à la PC.

B) Lipides membranaires

Le β -hydroxybutyrate exerce un effet plus marqué sur les érythrocytes de patients diabétiques que sur ceux des témoins, autant au niveau de la dynamique qu'au niveau de la composition membranaires. Si de la même manière que pour les témoins, le β -OH ne semble pas affecter les quantités de cholestérol membranaire, son effet sur les phospholipides est plus important.

Au vu des variations de PE et de PC, on peut avancer que la quantité de PE méthylée est plus importante chez le diabétique que chez le témoin, la dégradation de la PC étant également plus importante dans le groupe diabétique. En effet chez le témoin, la dégradation ne paraît affecter que la PC issue de la méthylation, puisque les quantités de PC avant et après traitement au β -OH sont quasiment identiques. Chez le diabétique, la dégradation de la PC semble concerner aussi bien la PC dérivant de la méthylation que la PC préexistante dans la membrane.

Cette action différentielle du β -OH sur les érythrocytes de patients diabétiques peut être la résultante de plusieurs facteurs. Il a été rapporté que l'activité des transporteurs du β -OH dans la membrane de l'érythrocyte était augmentée lors du diabète,

(Halestrap et al 1990). L'augmentation de la concentration de l'agent stimulant (β -OH) pourrait représenter une première explication. Par ailleurs, il est possible que l'activité des PMTases et de la PLA2 soit plus élevée chez le diabétique. Un certain nombre d'arguments expérimentaux concernant les systèmes de régulation de ces deux enzymes sont en faveur de cette hypothèse et sont développés ci-dessous.

Les PMTases

Une activité plus élevée des PMTases a déjà été rapportée dans le diabète. Chiappe de Cingolani (1992), a trouvé dans les adipocytes de rats diabétiques une activité basale plus élevée que chez des animaux sains. La réponse à des stimulateurs comme l'isoprotérénol est également plus élevée, et l'effet maximal est obtenu à de plus faibles concentrations de stimulants.

Plusieurs éléments peuvent expliquer l'activité plus élevée des PMTases chez les diabétiques.

Un des mécanismes d'activation des PMTases dépend de leur phosphorylation par une kinase AMPc dépendante. La stimulation des PMTases par des hormones telles que les catécholamines, l'ACTH et le glucagon est médiée par l'AMPc (Kelly et Wong, 1987). Or le taux intracellulaire d'AMPc est plus élevé chez les diabétiques.

Une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase chez les sujets diabétiques (Kissebah et Fraser, 1972) et spécialement chez les mal équilibrés a par ailleurs été rapportée. Les diabétiques se distinguent également par une plus grande réponse à la stimulation β -adrénergique de l'adénylate cyclase et de la protéine kinase AMPc dépendante.

L'activité différente de l'adénylate cyclase dans les érythrocytes de patients diabétiques et de sujets témoins, pourrait être due à des différences dans les environnements lipidiques de l'enzyme. Selon nos observations, les érythrocytes des patients diabétiques présentent un contenu en phospholipides plus élevé notamment au

niveau de la PE. Or, celle-ci favorise le couplage de l'adénylate cyclase au récepteur β -adrénergique. Le contenu en PC est également plus élevé et cette dernière semble augmenter la stimulation de l'adénylate cyclase en améliorant l'interaction de l'unité catalytique de l'adénylate cyclase avec la protéine G (Ross, 1982).

L'augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase est associée à une diminution de fluidité induisant apparemment une modification allostérique de l'enzyme (Allam, 1986). La membrane du patient diabétique étant caractérisée par une fluidité plus basse, ce paramètre pourrait également influencer positivement l'activité de l'adénylate cyclase et expliquer au moins en partie la réponse plus marquée du groupe des diabétiques au traitement par le β -OH.

Une autre hypothèse pourrait être liée à l'augmentation de l'activité de l'AdoMet-Synthétase et donc de la concentration de l'Adénosyl-Methionine qui ont été mises en évidence chez les rats diabétiques (Cabrero et al, 1986). En effet, l'activité des PMTases présente une relation dose réponse avec la concentration du donneur de méthyl (l'Adénosyl-Methionine).

Enfin, le diabète est souvent associé à une hyperglycémie. Or, il a déjà été proposé que l'activité des PMTases pouvait être stimulée par le glucose. Dans les cellules pancréatiques, l'exposition de ces cellules à des concentrations de glucose stimulant la sécrétion d'insuline augmente de façon rapide et marquée l'incorporation des groupements méthyl dans les phospholipides (Kowluru et al, 1984).

La phospholipase A₂

Les données de la littérature sur l'activité des PLA₂ au cours du diabète sont d'une part assez peu fournies et d'autre part contradictoires. Néanmoins, une augmentation de l'activité des PLA₂ dans les plaquettes de patients diabétiques a déjà été rapportée (Takeda et al, 1981).

Les taux des dérivés plasmatiques de PGE₂, PGI₂, et thromboxane A₂ (Mc Rae et al 1985) sont également élevés chez les rats diabétiques. Ce résultat est confirmé chez les sujets diabétiques et en particulier chez les diabétiques avec acidocétose (Axelrod et Levine, 1982) signalant une activité plus élevée des PLA₂.

Bien que les paramètres cinétiques des phospholipases aient été bien définis, leur régulation reste à ce jour peu connue. Néanmoins, Momchilova et al (1985) ont montré un rôle important de l'état physique de la membrane sur l'activité des PLA₂ membranaires des hépatocytes.

L'activité de plusieurs enzymes membranaires est connue pour dépendre de la fluidité des régions dans lesquelles elles sont localisées. Le plus souvent, ces enzymes requièrent un environnement plus fluide pour une activité optimale. Néanmoins, la PLA₂ affiche une activité maximale dans une membrane plus rigide. La rigidification de la membrane par incorporation de DPPC ou par une alimentation riche en acides gras saturés augmente de façon marquée l'activité de la PLA₂ et une relation linéaire a été établie entre celle-ci et la fluidité membranaire. Il apparaît que l'activité de la PLA₂ est contrôlée par la fluidité membranaire plutôt que par des phospholipides définis (Burack et Biltonen, 1994). En effet, une incorporation de DOPC fluidifiant dans des membranes délipidées, entraîne une baisse de l'activité de la PLA₂, démontrant que la tête polaire des phospholipides a peu d'influence et que le facteur déterminant est la rigidification de la bicouche membranaire.

Dans notre étude, nous avons déterminé chez le diabétique une fluidité membranaire plus basse qui pourrait donc être la cause d'une dégradation accrue des phospholipides après méthylation. La relation linéaire positive entre la quantité de PC dégradée et les valeurs d'anisotropie de la sonde 6-AS est en accord avec cette hypothèse et suggère que l'activité de la PLA₂ peut effectivement dépendre de l'état de fluidité de la membrane.

L'activité de la PLA₂ semble par ailleurs être stimulée par la peroxydation lipidique (Yu, 1992). Des études récentes sur la PLA₂ ont établi une relation étroite entre

l'activation de la PLA₂ par les lipoperoxydes et leur hydrolyse préférentielle. Cette action semble être liée également à l'effet rigidifiant de la peroxydation lipidique sur les membranes (Einchenberger et al, 1982). Or, plusieurs auteurs ont rapporté chez les diabétiques une augmentation de la peroxydation lipidique, qui a par ailleurs été largement impliquée dans la baisse de la fluidité membranaire chez les diabétiques .

En conclusion, dans cette partie de notre étude, nous avons donc démontré une action du β -OH sur les phospholipides des membranes d'érythrocytes. Cette action semble manifestement mettre en jeu des systèmes de méthylation et de dégradation des phospholipides. Nous avons également démontré que l'action du β -OH est plus marquée chez les patients diabétiques. Cette différence semble résulter d'une plus grande activité des enzymes entrant en jeu qui est due probablement aux altérations des propriétés biophysiques et biochimiques caractérisant les membranes érythrocytaires des patients diabétiques.

ETUDE *IN VIVO*

I) INTRODUCTION

La dernière partie de l'étude de l'action du β -OH sur les membranes érythrocytaires concerne la détermination des paramètres dynamiques et biochimiques des érythrocytes de patients diabétiques en acidocétose. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux des hématies des témoins et des DID sans acidocétose traitées ou non au β -OH lors de l'étude *in vitro*.

II) SUJETS ET METHODES

II.1) Patients

Les échantillons sanguins de 14 patients diabétiques en acidocétose provenaient du service de Médecine G de l'Hôpital Jeanne d'Arc à Toul.

La moyenne d'âge des patients était de $30,7 \pm 9,2$ ans, avec un BMI de $19,3 \pm 2,4$ Kg/m².

Les paramètres plasmatiques des patients diabétiques en acidocétose sont comparés à ceux des DID sans acidocétose et représentés dans le tableau 27.

Tableau 27. *Caractéristiques plasmatiques des ACD et DID.*

	ACD	DID	(p) Mann-Withney
Glycémie (g/l)	3,49 ± 1,25	2,09 ± 1,23	< 0,001
HbA _{1c} %	10,48 ± 1,58	8,31 ± 1,77	< 0,01
Fructosamine (mg/mg protéines)	8,33 ± 1,4	4,91 ± 0,78	< 0,001
Triglycérides (g/l)	1,34 ± 0,23	0,84 ± 0,54	< 0,05
Cholestérol total (g/l)	1,72 ± 0,51	1,84 ± 0,33	-
Cholestérol HDL(g/l)	0,49 ± 0,15	0,52 ± 0,14	-
Cholestérol LDL (g/l)	1,1 ± 0,61	1,17 ± 0,31	-
Apoprotéine A (g/l)	1,24 ± 0,36	1,5 ± 0,26	-
Apoprotéine B(g/l)	0,98 ± 0,36	1,04 ± 0,26	-
β-hydroxybutyrate (μM)	5093 ± 2079	-	-
Acétoacétate (μM)	2091,8 ± 608	-	-
pH	7,26 ± 0,13	-	-

II.2) Mesure des paramètres dynamiques et structuraux

Les mesures de polarisation de fluorescence ont été effectuées sur les hématies intactes. La préparations des membranes, l'extraction des lipides membranaires, leurs dosages et l'identification des classes majeures de phospholipides ont été ensuite effectués selon les protocoles décrits en annexe.

II.3) Tests statistiques

Une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée en utilisant le test de Kruskal-Wallis. Les comparaisons du groupe des ACD avec les différents groupes ont ensuite été effectuées par un test non paramétrique de Mann-Whitney,.

III) RESULTATS

III.1) Composition membranaire en cholestérol et phospholipides

La composition membranaire en cholestérol et en phospholipides des hématies de patients en ACD est rapportée dans le tableau 28. Nous y avons joint afin de les comparer les groupes des DID sans acidocétose avant et après incubation au  -OH, ainsi que le groupe des témoins.

Tableau 28. Cholestérol, phospholipides et rapport C/PL de la membrane érythrocytaire de sujets témoins, de patients diabétiques et de patients en acidocétose.

	Témoins	DID	DID + �-OH	ACD	(p) Kruskal-Wallis
Cholestérol	150,0 � 7,5 ^a	185,2 � 8,4 ^a	178,2 � 7,9	197,3 � 10,4	< 0,01
Phospholipides	362,5 � 14,2	394,3 � 15,7	347,8 � 14,6	364,6 � 17,2	< 0,01
Rapport C/PL	0,41 � 0,02	0,47 � 0,01	0,52 � 0,02	0,56 � 0,03	< 0,05

^aValeurs moyennes exprimées en  g/mg de protéines à ES.

L'analyse statistique par le test de Mann-Whitney est donnée dans le tableau 29.

Tableau 29. Comparaison des ACD avec les différents groupes.

ACD / vs	Témoins	DID	DID +�-OH
Cholestérol	< 0,005	NS	NS
Phospholipides	NS	NS	NS
Rapport C/PL	< 0,01	NS	NS

Le groupe des ACD présente des quantités de cholestérol membranaire et un rapport C/PL significativement plus élevés par rapport au groupe des témoins. Il ne présente en revanche pas de différence au niveau de la quantité totale de phospholipides.

On ne relève pas de différence significative entre le groupe des patients en ACD et les groupes des DID sans acidocétose que ce soit avant ou après traitement au β -OH. Néanmoins, les ACD présentent un cholestérol membranaire et un rapport C/PL sensiblement plus élevés que tous les autres groupes.

Des tests de régression linéaire effectués entre les paramètres plasmatiques et membranaires ont révélé l'existence d'une relation linéaire inverse entre la quantité totale de phospholipides présents dans la membrane érythrocytaire des ACD et les taux de β -OH et d'acétoacétate présents dans le sang.

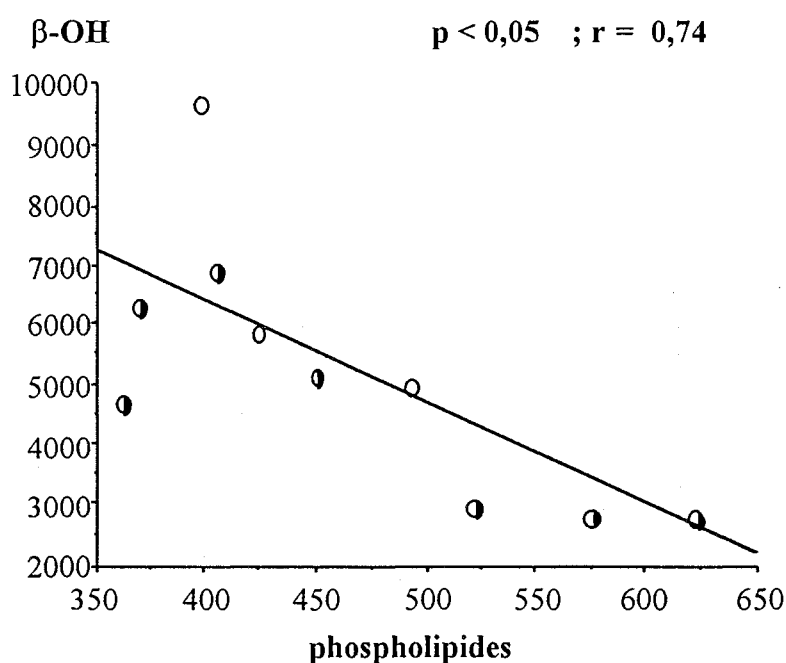


Figure 42. Régression linéaire de la quantité totale de phospholipides membranaires en fonction de la concentration plasmatique de β -OH.

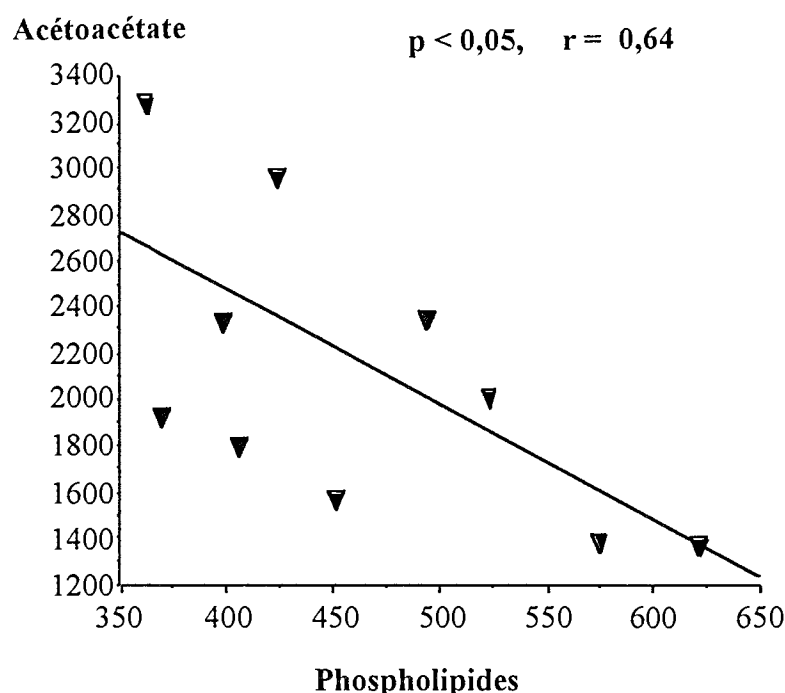


Figure 43. Régression linéaire de la quantité totale de phospholipides membranaires en fonction de la concentration plasmatique d'acétoacétate.

III.2) Classes de phospholipides membranaires

Les quantités des classes majeures de phospholipides de la membrane érythrocytaire des témoins, des DID traitée ou non *in vitro* avec le β -OH, ainsi que des ACD figurent dans le tableau 30. Les comparaisons effectuées entre les ACD et les autres groupes sont rassemblées sur le tableau 31.

Tableau 30. Classes majeures de phospholipides pour les différents groupes.

	Témoins	DID	DID + β -OH	ACD	(p) Kruskal-Wallis
PE	143,6 $\pm$ 7,6 ^a	181,1 $\pm$ 7,5	145,7 $\pm$ 6,1	138,8 $\pm$ 8,4	< 0,0005
PS	41,2 $\pm$ 5,2	43,4 $\pm$ 3,3	39,1 $\pm$ 3,99	65,0 $\pm$ 6,8	< 0,005
PC	118,8 $\pm$ 4,8	145,1 $\pm$ 7,3	111,9 $\pm$ 5,3	115,9 $\pm$ 9,0	NS
SM	72,6 $\pm$ 4,4	62,9 $\pm$ 3,3	58,3 $\pm$ 3,3	83,4 $\pm$ 8,4	NS
TOTAL	376,1 $\pm$ 11,9	431,4 $\pm$ 14,0	355,1 $\pm$ 12,7	401,6 $\pm$ 21,0	< 0,005

^aValeurs moyennes exprimées en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines $\pm$ ES.

Tableau 31. Comparaison des ACD avec les autres groupes (Mann-Whitney).

ACD vs	Témoins	DID	DID + β -OH
PE	NS	< 0,0001	NS
PS	< 0,005	< 0,005	< 0,0005
PC	NS	< 0,05	NS
SM	NS	< 0,01	< 0,01
TOTAL	NS	NS	NS

L'analyse des phospholipides de la membrane érythrocytaire de patients en acidocétose révèle des contenus en PS et SM plus élevés par rapport aux témoins et aux DID sans acidocétose traités ou non *in vitro* avec le β -OH. En revanche, les contenus en PC et PE sont comparables à ceux des témoins et des DID traités au β -OH, mais plus faibles que chez le DID sans acidocétose et non traités *in vitro* au β -OH.

Les tests de corrélation ont par ailleurs révélé que la PC était positivement corrélée à la concentration plasmatique en β -OH et la PS corrélée d'une part avec les quantités de SM et d'autre part avec la glycémie.

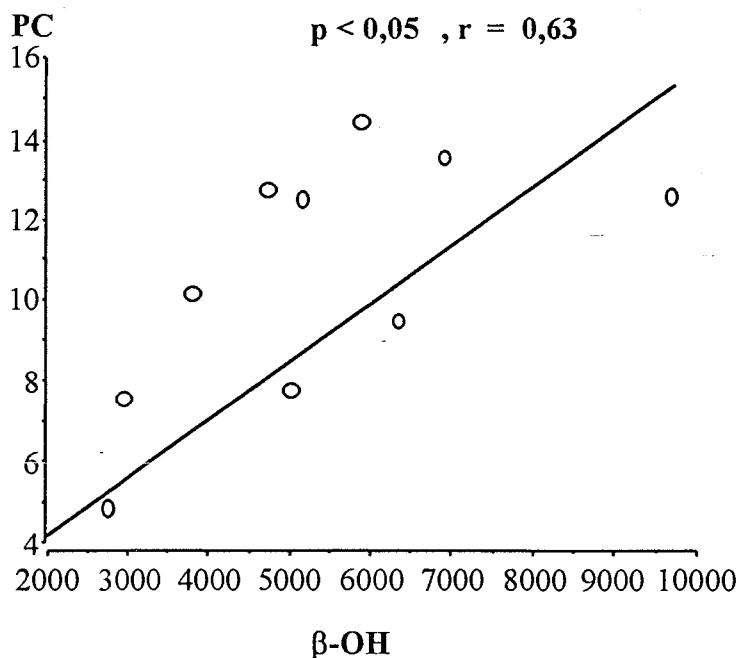


Figure 44. Régression linéaire de la quantité de PC membranaire en fonction de la concentration plasmatique de β -OH.

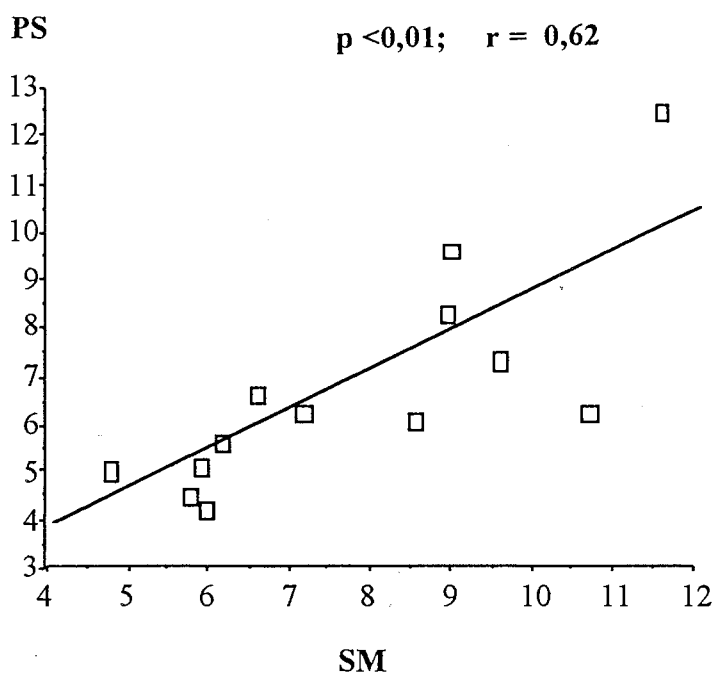


Figure 45. Régression linéaire de la quantité de SM en fonction de celle de PS.

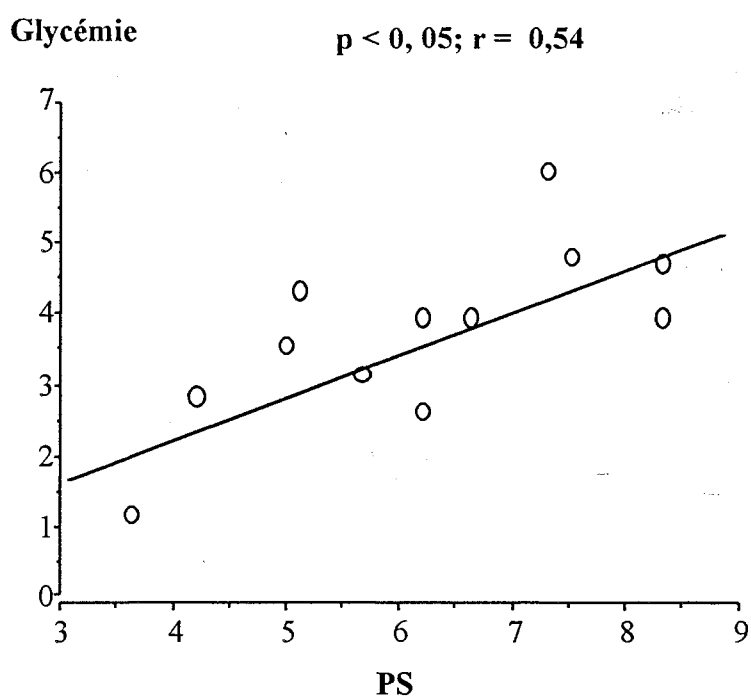


Figure 46. Régression linéaire de la quantité de PS en fonction de la glycémie.

III.3) Quantités relatives de phospholipides

Le tableau 32 regroupe les rapports PE/PC et PC/SM des 4 groupes. Le tableau 33 rassemble les comparaisons entre les différents groupes.

Tableau 32. *Rapport PE/PC et PC/SM pour les différents groupes.*

	Témoins	DID	DID + β -OH	ACD	(p) Kruskal-Wallis
PE/PC	1,21 + 0,1 ^a	1,25 $\pm$ 0,10	1,31 $\pm$ 0,11	1,19 $\pm$ 0,07	NS
PC/SM	1,64 + 0,13	2,32 $\pm$ 0,15	1,97 $\pm$ 0,15	1,38 $\pm$ 0,09	< 0,005

^a Moyenne $\pm$ ES.

Tableau 33. *Comparaison des ACD avec les autres groupes (Mann-Whitney).*

ACD vs	Témoins	DID	DID + β -OH
PE/PC	NS	NS	< 0,05
PC/SM	<0,05	<0,005	< 0,005

La comparaison entre les ACD et les différents groupes révèle un rapport PE/PC tendant à baisser par rapport aux DID sans acidocétose et un rapport PC/SM significativement plus bas que celui des autres groupes.

III.4) Dynamique membranaire

Les valeurs $\langle r \rangle$ d'anisotropies des 4 groupes figurent dans le tableau 32 et les comparaisons dans le tableau 34.

Tableau 34. Valeurs de l'anisotropies de fluorescence $\langle r \rangle$ pour les sondes 6 et 12-AS.

	Témoins	DID	DID + β -OH	ACD	(p) Kruskal-Wallis
6-AS	0,101 $\pm$ 0,003 ^a	0,111 $\pm$ 0,002	0,117 $\pm$ 0,003	0,116 $\pm$ 0,001	< 0,0005
12-AS	0,083 $\pm$ 0,002	0,091 $\pm$ 0,003	0,099 $\pm$ 0,003	0,085 $\pm$ 0,002	< 0,001

^aValeurs moyenne $\pm$ ES.

Tableau 35. Comparaison des ACD avec les autres groupes (Mann-Whitney).

ACD vs	Témoins	DID	DID + β -OH
6-AS	p < 0,0001	NS	NS
12-AS	NS	NS	p < 0,01

La comparaison des valeurs d'anisotropie émises par la sonde 6-AS indique que la fluidité membranaire des ACD est plus faible que celles des témoins et des DID. Toutefois, les différences observées entre le groupe des DID sans acidocétose et le groupe des ACD ne sont pas significatives. Il est important de noter que les valeurs correspondant aux ACD sont comparables à celles obtenues avec le groupe des DID après incubation avec le β -OH.

Au niveau des valeurs d'anisotropie émises par le 12-AS, nous ne notons aucune différence entre les ACD et les témoins. Les valeurs sont en revanche significativement plus basses par rapport aux DID avant et après incubation avec le β -OH. Elles sont d'autre part corrélées au rapport PE/PC (p < 0,05 et r = 0,64)

IV) DISCUSSION

IV.1) Dynamique membranaire

L'étude de la dynamique membranaire des ACD a mis en évidence une baisse de la fluidité des régions superficielles explorées par le 6-AS et ceci aussi bien par rapport aux témoins que par rapport aux DID. Cette diminution, bien qu'elle ne soit significative que par rapport aux témoins, pourrait être expliquée par la diminution du rapport PC/SM chez les ACD.

En revanche, la fluidité des régions caractérisées par le 12-AS chez les ACD ne présente aucune différence par rapport au groupe des témoins, et ceci en dépit d'un cholestérol membranaire plus élevé. En ce qui concerne la comparaison avec les DID, bien que la différence n'atteigne pas le seuil de la significativité, la fluidité est plus élevée dans le groupe des ACD, au niveau des régions profondes. Cette différence peut être due à un rapport PE/PC plus bas dans le groupe des ACD par rapport au groupe des DID.

IV.2) Composition membranaire

L'étude de l'effet *in vivo* du β -OH sur les membranes des hématies de patients en acidocétose a permis de déterminer une corrélation négative entre les phospholipides membranaires et les concentrations plasmatiques de β -OH et d'acétoacétate. Cette corrélation est en accord avec le résultat obtenu *in vitro* concernant la dégradation de certains phospholipides membranaires dans les érythrocytes de témoins et de DID incubés avec le β -OH.

Il faut rappeler que les DID sans acidocétose présentent des quantités élevées de PE et de PC. Les études *in vitro* ont démontré que le traitement au β -OH, permettait un retour des quantités de PE et de PC à des valeurs normales observées chez le témoin. Ces

valeurs sont également comparables à celles des ACD. Ceci montre bien que le traitement *in vitro* par le β -OH a représenté une bonne simulation de l'acidocétose *in vivo*, du moins au niveau de son effet sur la PE et la PC.

Au terme des études *in vitro*, nous avons conclu que l'action du β -OH s'exerçait au niveau des deux classes de phospholipides PE et PC, et nous avons suggéré que cette action faisait intervenir des systèmes de méthylation de la PE en PC. La relation positive entre la PC et la concentration plasmatique de β -OH, est également en faveur de cette hypothèse.

Les modifications des quantités de PE et de PC peuvent avoir des conséquences physiologiques. En effet, un événement très important de l'acidocétose est le développement d'une insulino-résistance. Plusieurs études ont suggéré que le pH acide pouvait être impliqué dans la diminution de la liaison de l'insuline à son récepteur (Whittaker et al, 1981). Cependant, d'autres auteurs ont rapporté que les corps cétoniques augmentaient la concentration des récepteurs de l'insuline. Cette augmentation est telle qu'elle compense la diminution de la liaison due à la baisse du pH (Merimee et al, 1976). Il a également été suggéré que les corps cétoniques pouvaient être responsables du maintien de la liaison de l'insuline à son récepteur lors de l'acidocétose. (Misbin et al, 1978). Le mécanisme par lequel les corps cétoniques amélioreraient la liaison de l'insuline à son récepteur reste encore inconnu. Néanmoins, des expériences ont démontré (Turyn et al, 1985) que la méthylation de la PE en PC induisait une augmentation marquée de la capacité totale de liaison de l'insuline, mais sans changement des constantes d'affinité du récepteur. La méthylation de la PE en PC semble en fait augmenter la liaison de l'insuline en permettant l'externalisation de récepteurs. En effet, l'incorporation de groupements méthyl dans les phospholipides facilite l'exposition de récepteurs membranaires jusque là masqués et augmente le nombre de récepteurs capables de se lier à l'insuline.

Les résultats que nous avons obtenus *in vitro*, font parfaitement le lien entre ces observations et l'effet du β -OH sur l'augmentation du nombre de récepteurs de l'insuline.

Par ailleurs, nos résultats permettent d'avancer plusieurs hypothèses concernant l'insulinorésistance survenant lors de l'ACD.

En premier lieu, l'acidocétose est caractérisée par une hyperglycémie qui résulte à la fois de l'augmentation de la production du glucose et d'une baisse de son utilisation. Or, il a été observé que l'hydrolyse des phospholipides par la PLA₂ s'accompagnait d'une diminution du transport du glucose de l'ordre de 75% (Kahlenberg et Banjo, 1972). L'activation de la PLA₂ par le β -OH et la dégradation des phospholipides pourrait alors avoir une influence inhibitrice sur le transport du glucose et donc sur son utilisation.

Par ailleurs, il est possible que l'insulinorésistance dans l'ACD puisse être due, au moins pour une part, aux modifications de la composition lipidique membranaire. Les compositions en PE et PC ne peuvent être incriminées, puisque leurs quantités sont comparables à celles obtenues chez les témoins. En revanche, nous avons déterminé dans la membrane des ACD une augmentation significative des quantités de SM et de PS. Des relations positives entre les quantités de PS et de SM d'une part et entre la PS et la glycémie d'autre part ont été observées.

Un effet inhibiteur de la PS sur le transport du glucose a été rapporté, l'incorporation de la PS dans des vésicules lipidiques inhibant jusqu'à 45% de l'activité des transporteurs de glucose. Cet effet semble indépendant des acides gras de la PS et être plutôt lié à la structure de sa tête polaire (Sandra et al, 1984).

Par ailleurs, l'élévation de la SM au cours de l'acidocétose peut être liée à plusieurs facteurs. L'acidocétose diabétique est en effet caractérisée par des concentrations plasmatiques très élevées des hormones de contre-régulation, le glucagon, les catécholamines et les corticoïdes. Il est possible que l'augmentation des quantités de SM dans la membrane lors de l'acidocétose diabétique puisse être due au taux élevé de glucocorticoïdes circulants. Ces derniers stimulent en effet la synthèse de la SM (Nelson et al, 1982; Nelson et Murray, 1982).

Or, la composition lipidique membranaire influence hautement la translocation et l'activation des transporteurs du glucose. Une élévation de la SM membranaire induit une diminution importante de l'activité des transporteurs du glucose (Sandra et al, 1984).

En conclusion, notre étude a démontré que la présence d'un excès de β -OH dans le plasma des sujets diabétiques pouvait provoquer des modifications membranaires autant au niveau de la dynamique que de la composition lipidique en affectant en particulier la PE et la PC. D'autres facteurs notamment hormonaux, pourraient être impliqués dans les variations des phospholipides membranaires et en particulier celles de la SM.

3ème PARTIE
OBESITE ET
INSULINORESISTANCE.

I) INTRODUCTION.

Les causes de l'insulinorésistance définie comme une sensibilité diminuée des tissus à l'action de l'insuline, ont été largement explorées par de nombreuses équipes, tant au niveau de la liaison de l'insuline à son récepteur qu'au niveau des événements post-récepteurs membranaires. Toutefois, l'influence éventuelle de perturbations au niveau des phospholipides membranaires a été peu étudiée. Or, le récepteur de l'insuline est une glycoprotéine transmembranaire insérée dans la bicouche lipidique et on pourrait s'attendre à des interactions étroites entre les phospholipides membranaires et le récepteur de l'insuline.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris une étude de la composition membranaire chez des sujets présentant des niveaux d'insulino-sensibilité différents. Etant donné le rôle bien connu de la fluidité membranaire sur les récepteurs membranaires (Farias, 1987), nous avons également entrepris une étude de ce paramètre.

Avant d'exposer nos résultats, il est apparu nécessaire de présenter quelques rappels. En effet, la compréhension de la pathogénèse de l'insulinorésistance n'est possible qu'avec une bonne connaissance des mécanismes d'action de l'insuline. Ces mécanismes restent encore mal connus, bien que de nombreux progrès aient été effectués dans ce sens, et en particulier au niveau de la structure et des fonctions du récepteur de l'insuline. En effet, on commence à appréhender l'éventualité de l'existence de substrats de signaux intracellulaires dérivant du métabolisme des phospholipides, et agissant comme seconds messagers ou médiateurs régulant plusieurs processus métaboliques reliés à l'action de l'insuline.

Par conséquent, nous avons détaillé plus spécifiquement l'effet de l'insuline sur le métabolisme des phospholipides, sur le relargage de ces substrats agissant comme signaux intracellulaires ainsi que les processus susceptibles d'être activés lors de leur génération.

Nous avons abordé également les sites éventuels où semblent se situer des lésions biochimiques impliquées dans l'insulinorésistance.

Enfin, en fonction des résultats que nous avons observés, une présentation du rôle de la sphingomyéline dans la transmission du signal s'est avérée nécessaire.

II) RAPPELS

II.1) Mécanisme d'action de l'insuline

II.1.1) Le récepteur de l'insuline

Le récepteur de l'insuline est une glycoprotéine de 300-400 kD insérée dans la membrane plasmique. C'est un hétérotétramère β - α - α - β constitué de deux sous unités α et de deux sous unités β reliées entre elles par des ponts disulfures. Il est constitué de plusieurs domaines (Taylor et Accili, 1994):

- a) un domaine extracellulaire contenant les deux sous unités α fixant l'hormone,
- b) un domaine membranaire contenant les deux sous unités β ,
- c) un domaine catalytique contenant l'activité catalytique.

Les sous unités α sont extracellulaires et leur domaine N terminal contient des sites de liaison de haute affinité pour l'insuline.

Les deux sous unités β sont transmembranaires et constituent cinq domaines distincts.

- a) une région extracellulaire reliée aux sous unités α par des ponts disulfures,
- b) une région transmembranaire constituant le point d'ancrage du récepteur à la membrane,
- c) une région juxtamembranaire jouant un rôle important dans l'endocytose du récepteur,

d) une région catalytique contenant le site de liaison de l'ATP et le site de phosphorylation de la tyrosine,

e) une région C terminale des sous unités β .

Figure 47: *Récepteur de l'insuline.*

II.1.2) Interaction insuline-récepteur

Une grande variété d'agents agissant à la surface cellulaire via des récepteurs sont connus pour opérer en augmentant le turnover des phospholipides inositols. Ils activent une phospholipase C (PLC) spécifique du phosphatidylinositol-4',5'-biphosphate (PIP₂). L'activation de la PLC semble se faire par l'intermédiaire d'une protéine G qui servirait de transducteur du signal permettant le couplage du récepteur à la PLC. La PLC provoque l'hydrolyse du PIP₂ en inositol 1',4',5'-triphosphate (IP₃), capable de mobiliser le calcium Ca²⁺ du réticulum endoplasmique et en 1,2-diacylglycérol (DAG) qui est capable d'activer un groupe de protéines kinases communément appelées PKC et qui sont activées par le calcium, les phospholipides acides et le DAG (Bollag et al, 1986).

Le DAG après activation de la PKC est rapidement reconverti en acide phosphatidique (PA), puis en CDP-diacylglycérol et enfin en PI qui sera converti en dérivés phosphatidyl inositol-4'-phosphate (PIP) et PIP₂. La voie du signal est ainsi régénérée et prête à une nouvelle stimulation (Figure 48).

Figure 48: Métabolisme des inositols

a) Les protéines G

Elle sont impliquées dans le couplage du récepteur de l'insuline aux autres systèmes du signal cellulaire. Il est possible que le récepteur phosphoryle directement la protéine G au niveau des résidus tyrosines, ou qu'un changement de configuration du récepteur qui serait induit par l'autophosphorylation provoque l'activation de la protéine G.

Les protéines G activent d'autres enzymes comme les phospholipases C hydrolysant le PI, initiant ainsi la séquence d'événements décrite plus haut.

b) La Phospholipase C

Elle est activée par le récepteur de l'insuline agissant via la protéine G. Elle permet l'hydrolyse de la PC en un groupement polaire phosphocholine et en DAG. Le DAG ainsi généré sera ensuite converti en PA, CDP-diacylglycérol, PI puis PI glycanes.

Il existe aussi une PLC spécifique du PI ou phosphatidylinositol-phosphodiesterase, qui permet une hydrolyse spécifique du PI (Figure 49).

c) La protéine kinase C

La PKC est connue pour phosphoryler plusieurs protéines au niveau des résidus sérine et thréonine et de ce fait induire leur activation. C'est une protéine de 80 kD constituée de deux domaines:

- un domaine catalytique de 50 kD contenant le site de liaison de l'ATP,
- un domaine régulateur de 30 kD contenant le site de liaison du DAG et du Ca^{2+} .

Elle existe sous plusieurs isoformes qui diffèrent par:

- leur abondance dans les différents tissus,
- leur susceptibilité à l'activation par le DAG et les esters de phorbol,
- leur immunoréactivité,
- leur spécificité pour les substrats et leurs effets biologiques.

II.1.3) Effets de l'insuline sur le métabolisme des phospholipides

L'insuline semble d'abord augmenter la synthèse des PIP₂, PIP, et/ou PI avant de stimuler leur hydrolyse (Farese, 1990). En fait, l'insuline augmente dans un premier temps la synthèse de l'acide phosphatidique (PA) *de novo*, ce qui entraîne une augmentation directe des PI, PIP, du PIP₂ et du DAG.

L'insuline augmente l'hydrolyse du PI par une PLC spécifique engendrant un DAG et un groupement (tête) polaire. Ce dernier est hydrophile et peut diffuser librement à travers les compartiments aqueux de la cellule pour activer plusieurs protéines. En revanche, le DAG est lipophile. Il reste donc membranaire et permet l'activation et la translocation de la PKC du cytosol vers la membrane (figure 49).

Figure 49. *Hydrolyse du phosphatidyl inositol et transmission du signal.*

II.1.4) Importance des groupements polaires dérivant des phospholipides et du 1,2-diacylglycérol en tant que médiateurs de l'action de l'insuline

Ces groupements relargués sous l'action de l'insuline après hydrolyse du PI et sans doute d'autres glycolipides, ont eux même une action sur de nombreuses enzymes. Ils sont probablement responsables de l'activation d'une enzyme, la glycérol-3-phosphate-acyltransférase permettant la synthèse *de novo* d'un acide phosphatidique. Ils sont également directement impliqués dans la synthèse du glycogène (Malchoff et al, 1987), la glycolyse, l'utilisation du glucose et la synthèse d'acides gras. Leur effet global est de promouvoir l'utilisation du glucose, son stockage en glycogène ou en lipides, et d'activer les processus oxydatifs et glycolytiques. Par ailleurs, ils diminuent l'activité d'autres enzymes telles que les méthyltransférases (Chiappe De Cingolani, 1992), l'adénylate cyclase (Larner, 1988), et les protéines kinases cAMP dépendantes (Malchoff et al 1987).

En ce qui concerne le DAG, c'est un produit lipophile qui reste localisé dans la membrane. Avec le Ca^{2+} , il permet la translocation de la PKC du cytosol vers la membrane, ainsi que sa liaison avec cette dernière (Berridge, 1984). De plus le DAG, le Ca^{2+} , et les phospholipides acides comme la PS ont la capacité de se lier à la PKC et de l'activer. L'activation de la PKC par le DAG requiert à la fois l'augmentation de la sensibilité de l'enzyme au Ca^{2+} et l'augmentation de l'activité intrinsèque de l'enzyme (Berridge, 1984).

II.1.5) Importance potentielle de l'activation du système DAG-PKC par l'insuline

L'insuline semble réguler un grand nombre de processus cellulaires par activation de la PKC.

Afin de les déterminer précisément, des études ont été menées utilisant des esters de phorbol qui sont des activateurs spécifiques de la PKC et qui ont à ce titre une action insulinomimétique. Ils sont en effet capables d'induire des effets similaires à ceux de

l'insuline, notamment au niveau du métabolisme des carbohydrates, du métabolisme des lipides, du transport ionique, de la synthèse des protéines et de l'activation de certains gènes.

Métabolisme des carbohydrates.

L'insuline stimule le transport du glucose dans plusieurs tissus, ceci s'effectuant par activation de la PKC. En effet les activateurs de la PKC qu'ils soient directs ou indirects, agissant par augmentation du DAG ont le même effet (Farese et al, 1985). Par contre, l'activation de la glycogène synthétase semble être due aux groupements ou têtes polaires agissant via des mécanismes de déphosphorylation.

Métabolisme des lipides.

L'effet activateur de l'insuline sur la synthèse *de novo* des acides gras semble être dû à l'activation de l'acétylcoA-carboxylase par des médiateurs dérivant des phospholipides comme les têtes polaires et le DAG, et par d'autres activateurs de la PKC. L'activation de cette enzyme se fait par des mécanismes de phosphorylation / déphosphorylation.

Synthèse des protéines.

L'insuline exerce un effet sur l'incorporation des acides aminés lors de la synthèse des protéines. Cet effet s'exerce également par l'activation de la PKC, qui va permettre la phosphorylation de la protéine S6 ribosomale (Parker et al, 1985) permettant d'augmenter la synthèse des protéines.

Effet de l'insuline sur le transport ionique.

L'insuline augmente les échanges Na^+/H^+ (Vara et Rozengurt, 1987) et l'activité de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPase. Les activateurs de la PKC ont des effets similaires, ce processus s'effectuant également par l'intermédiaire de la PKC.

II.2) L'insulino-résistance

L'insulinorésistance est définie comme une anomalie métabolique se caractérisant par une diminution de l'efficacité de l'insuline au niveau des cellules cibles, et donc d'une diminution de son action biologique.

L'insulinorésistance a été rapportée dans de nombreux tissus et apparaît être un syndrome qui est associé à un ensemble de pathologies comprenant le diabète non-insulinodépendant (DNID) (De Fronzo, 1992), l'obésité (Del Prato, 1992), l'hypertension (De Fronzo, 1992), ou les dyslipidémies (De Fronzo et Ferrannini, 1991).

L'insulinorésistance peut relever de plusieurs mécanismes physiopathologiques se situant à plusieurs niveaux:

Niveau pré-récepteur

a) dégradation accrue de l'insuline. Elle a déjà été observée au niveau des adipocytes de DNID.

b) complexation de l'insuline par des anticorps anti-insuline, ou présence d'anticorps anti-récepteur de l'insuline,

c) sécrétion d'insuline inactive agissant comme inhibiteur compétitif.

Niveau récepteur

a) Altération de la liaison de l'insuline à son récepteur, soit par la diminution du nombre de récepteurs ou de leur affinité. Une diminution de la liaison de l'insuline a déjà été observée au niveau des monocytes, adipocytes ou des érythrocytes de sujets diabétiques ou obèses (Seely et Olefsky, 1993).

b) Altération de la transduction du signal par diminution de l'activité kinasique du récepteur. Chez le DNID, l'activité tyrosine kinase au niveau des adipocytes, des monocytes et dans le muscle squelettique est diminuée. Néanmoins, la perte de poids

restaure l'activité du récepteur au niveau de l'autophosphorylation et de la phosphorylation des différents substrats. Les altérations de la protéine kinase ne semble pas constituer une altération primaire mais résulter d'un certain nombre d'autres altérations métaboliques (Garvey et Birnaum, 1993).

Niveau post récepteur

La liaison de l'insuline à son récepteur est normale mais le métabolisme intracellulaire sur lequel agit l'insuline, ainsi que la séquence des événements biochimiques intracellulaires sont altérés.

a) Des altérations soit génétiques, soit acquises au niveau du récepteur, de la protéine G, ou de certaines enzymes intervenant au cours de l'action de l'insuline comme la PLC, les enzymes synthétisant le PA et le PI, les enzymes du métabolisme du DAG, peuvent également conduire à des altérations dans la transmission du signal par les deux médiateurs que sont les têtes polaires et le système DAG-PKC.

b) Une altération directe de la PKC peut également survenir. En effet, il a été rapporté que le rat obèse fa/fa présentait une activation et une translocation de la PKC diminuées (Van Der Werve et al, 1984).

c) Une autre hypothèse impliquerait les systèmes de signal des phospholipides. Une augmentation de la production du DAG peut provoquer secondairement une diminution de la translocation de la PKC. L'action du DAG est en effet biphasique, et intervient négativement à haute concentration (Turinski et al, 1990). Des études sur le rat Zucker génétiquement obèse insulino-résistant, ont démontré que le taux de DAG augmentait de plus de 82% dans le foie et de 136% dans les tissus musculaires (Turinski et al, 1990).

Le mécanisme par lequel l'augmentation du DAG réduit la réponse à l'insuline doit impliquer à la fois une diminution de la liaison de l'insuline à son récepteur et une diminution de la phosphorylation de ce dernier. En effet, Bollag et al (1986) ont observé que la phosphorylation du récepteur de l'insuline au niveau des résidus sérines par la PKC

pouvait inhiber jusqu'à 65% de l'activité tyrosine kinase intrinsèque du récepteur et ceci à la fois en présence et en absence d'insuline. La stimulation excessive de ce système induirait donc la phosphorylation du récepteur au niveau du résidu sérine compromettant ainsi la phosphorylation du site tyrosine et donc la transmission du signal.

II.3) Métabolisme de la sphingomyéline. Rôle dans la transmission du signal

II.3.1) Généralités

Des études sur la régulation de la PKC ont permis la découverte du rôle de la sphingosine, métabolite de la SM, comme inhibiteur puissant de l'activation de la PKC par les esters de phorbol ou le DAG.

Dans des membranes modèles, la sphingosine exerce une inhibition compétitive sur l'activation de la PKC par le DAG. De même, sur des cellules intactes, la sphingosine inhibe des événements connus pour être médiés par l'activation de la PKC, comme la différenciation cellulaire des promyélocytes HL-60 en macrophages (Merill et al, 1986).

L'effet de la sphingosine sur la PKC suggère que les sphingolipides joueraient un rôle physiologique de précurseurs de molécules bioactives, qui agiraient comme biomodulateurs et seconds messagers. Il existerait ainsi un cycle des sphingolipides dans lequel des métabolites mineurs essentiellement la sphingosine et le céramide seraient générés de façon transitoire pour participer à la transduction de signaux cellulaires .

La sphingomyéline (SM) et ses dérivés constitueraient donc une voie nouvelle par laquelle l'information pourrait être transmise. La médiation des signaux s'étend donc également aux sphingolipides et ne se limite pas aux glycérophospholipides.

Il semble alors important de définir:

- les composantes du cycle de la SM, et les enzymes régulant l'hydrolyse de la SM et susceptibles d'être activées par une hormone,
- le rôle de l'hydrolyse de la SM et les produits générés,
- les inducteurs extracellulaires de l'hydrolyse et de la synthèse de la SM.

II.3.2) Les composantes du cycle de la SM

Selon les enzymes impliquées, on peut avoir des céramides, des céramides-phosphates, des lysosphingomyélines, des sphingosines, ou d'autres produits.

Les sphingolipides constituent des molécules structuralement complexes constituées de:

1) La sphingosine: c'est le 1,3-dihydroxy-2-amino-octadéca-4-ène; elle contient un groupement amine libre essentiel pour ses fonctions (Figure 50).

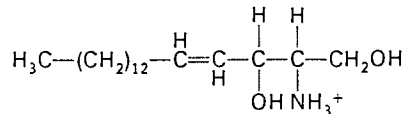


Figure 50: *Structure de la sphingosine.*

2) Un acide gras: le plus souvent des acides lignocérique, palmitique, ou stéarique reliés par une liaison amide à la sphingosine.

3) Une tête polaire en position 1 qui est constituée d'une part d'un acide non gras, pouvant être selon le cas un acide phosphorique, sulfurique, ou N-acétyl-neuranimique esterifiant la fonction alcool primaire, et d'autre part d'un groupement qui peut être soit une choline, ou des oses en particulier du galactose et éventuellement du glucose.

Les sphingolipides sont constitués pour l'essentiel de ces groupements. Néanmoins, selon leur nature, ils peuvent avoir une structure plus ou moins complexe.

a) Le céramide est le sphingolipide le plus simple. Il ne comporte qu'une molécule de sphingosine dont la fonction amine est unie à un acide gras par une liaison amide et ne porte qu'un hydroxyle en position 1.

Il sert de précurseur à la synthèse de sphingolipides plus complexes comme:

b) La sphingomyéline (N-Acylsphingosine 1-phosphocholine ou céramide phosphocholine) qui est constituée d'un céramide et d'une tête phosphocholine (Figure 51).

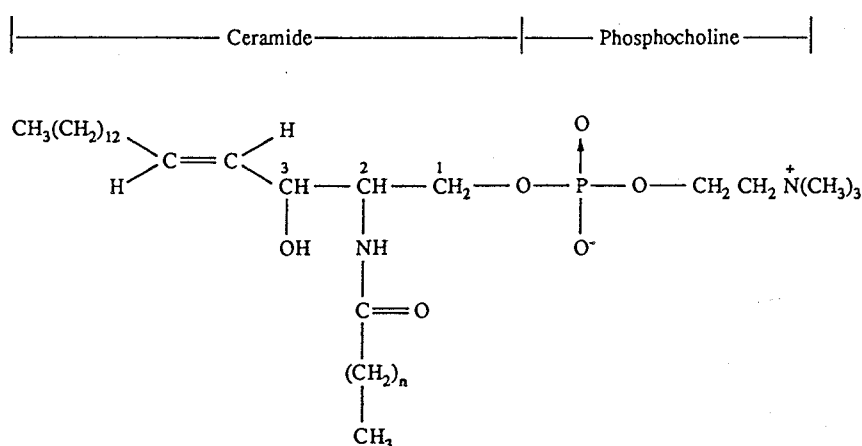


Figure 51. *Molécule de sphingomyéline. Structure constituée d'un céramide et d'une tête phosphocholine.*

La synthèse de la SM est assurée par une enzyme phosphatidylcholine céramide choline phosphotransférase qui catalyse le transfert d'une phosphocholine de la PC à un céramide. Cette réaction se déroule dans l'appareil de Golgi (Koval et Pagano, 1991.) puis la majorité de la SM est transférée par des vésicules jusqu'à la membrane plasmique.

c) Les glycolipides, contenant une ou plusieurs unités glycosidiques.
(Figure 52).

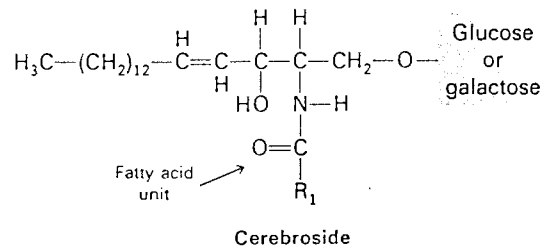


Figure 52 Structure générale des glycolipides.

d) Les glycosphingolipides acides, plus complexes encore, contenant soit des sulfates formant des sulfatides, soit un acide sialique formant des gangliosides.

Les enzymes impliquées dans le cycle de la SM sont:

- La sphingomyélinase neutre (SMase) , Mg^{2+} dépendante; elle est activée par le 1,2 diacylglycérol permettant la dégradation de la SM (Kolesnick, 1987) en céramide. Elle semble être associée à la membrane plasmique et se situer dans le feuillet externe.
- La céramidase, qui permet de déacyler le céramide en une base sphingoïde.

II.3.3) Hydrolyse de la sphingomyéline et transmission du signal

a) SPHINGOSINE et inhibition de la PKC.

La SM est rapidement synthétisée ou dégradée en réponse à différents signaux cellulaires, comme le $TNF\alpha$ (tumor necrosis factor α), la dexaméthasone ou l'interleukine 1 (Kolesnick, 1991). Les métabolites générés lors de sa dégradation peuvent servir d'inhibiteurs endogènes à la PKC (Hannun et al, 1986).

Des études *in vitro* ont démontré qu'en ajoutant la SMase aux cellules GH3, après translocation complète de la PKC, on inactivait la PKC en induisant sa redistribution dans le cytosol (Kolesnick, 1991). Un effet identique a été obtenu en rajoutant directement des bases sphingoides.

Des études ultérieures ont révélé que la SMase bloquait également les conséquences biologiques du signal de la PKC (Kolesnick, 1991; Merrill et al, 1986) comme la différenciation des cellules HL-60 en macrophages, l'activation des plaquettes et des neutrophiles, la modulation de la différenciation cellulaire et la mitogénèse .

b) CERAMIDE et phosphorylation des protéines.

L'autre mécanisme d'action des métabolites de la SM semble être indépendant de la PKC et implique à la fois la sphingosine et l'autre produit de dégradation de la SM, le céramide. Il intervient en altérant la phosphorylation des protéines.

Des études de Merrill et Jones (1989) , sur la phosphorylation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR ou epidermal growth factor receptor) suggèrent l'existence d'une thréonine kinase faisant partie de la famille des protéines kinases sérines/thréonines. Elle serait activée par les bases sphingoides (céramide et sphingosine) et serait responsable spécifiquement de la phosphorylation d'un site thréonine en dépit des autres sites potentiels de phosphorylation. Cette kinase a été identifiée (Hannun et Bell, 1993) comme faisant partie du sous groupe des sérine/thréonine phosphatases. Elle est appelée CAPP (Ceramide-Activated-Protein-Phosphatase) et semble être activée spécifiquement par le céramide.

L'hypothèse serait que l'activation de la CAPP par le céramide permettrait la modulation de l'activité d'autres kinases et phosphatases avec des effets multiples sur la phosphorylation des protéines (Mathias et Kolesnick, 1993)

II.3.4) Les inducteurs extracellulaires du cycle de la SM

L'activation biologique du cycle de la sphingomyéline est initiée par la liaison d'un ligand extracellulaire à son récepteur cellulaire. Les activateurs les plus connus du cycle de la SM sont la dexaméthasone (Ramachadran, 1990), le $\text{TNF}\alpha$ (tumor necrosis factor α) (Dressler K. A., 1992), l'interferon γ ($\text{IFN}\gamma$) et l'interleukine 1 ($\text{IL}1$) agissant sur des récepteurs membranaires et la vitamine D_3 agissant sur un récepteur nucléaire. Indépendamment de leur nature, les inducteurs peuvent être classés selon la nature de leur activation. Ainsi, le $\text{TNF}\alpha$ et l' $\text{IL}1$ semblent être des activateurs précoces causant une hydrolyse de la SM dans les 15-30 min, tandis que la vitamine D_3 et l' $\text{IFN}\gamma$ sont tardifs et n'agissent que dans les 2 heures suivant la stimulation..

II.3.5) Similitudes et différences entre le cycle de la SM et du PI

La SMase peut être comparée à la PLC. Elles permettent toutes deux l'hydrolyse des lipides membranaires et la génération de produits bioactifs, le DAG et les inositols phosphates pour la PLC et les bases sphingoides pour la SMase.

Le céramide et la sphingosine apparaissent comme les équivalents du DAG et de sa forme phosphorylée l'acide phosphatidique (PA).

Pour pousser l'analogie plus loin, si le DAG active une kinase spécifique la PKC, le céramide a également des propriétés similaires avec la CAPP.

Par ailleurs, le DAG et les céramides sont tous deux des intermédiaires de la synthèse de glycérophospholipides ou de sphingolipides respectivement. Cette synthèse sert à l'étape de terminaison du signal et la régénération de la voie pour une stimulation ultérieure.

Il existe néanmoins des différences entre le cycle du PI et celui de la SM, notamment au niveau de la cinétique. L'hydrolyse du PI est accomplie en quelques minutes, l'action du DAG ayant une demi-vie de quelques minutes. En revanche,

l'hydrolyse de la SM est plus lente (1 à 2 heures), la cinétique de régénération plus lente également.

Ceci reflète des processus métaboliques très différents entre les deux cycles, et souligne la différence des significations fonctionnelles des deux voies.

Le cycle de la SM est relié à de longs processus métaboliques comme la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaires, alors que le PI est surtout impliqué dans des processus rapides comme les activations cellulaires.

III) MATERIELS ET METHODES

III.1) Sujets

Soixante neuf obèses de sexe féminin hospitalisés en Médecine G pour un bilan d'obésité, ont été sélectionnées. Elles ne présentaient pas de trouble de la glycorégulation et ne prenaient aucune médication hormis la pilule oestro-progéstative pour certaines d'entre elles.

Les témoins au nombre de 28, également de sexe féminin, ont été sélectionnés selon des critères d'âge correspondants aux obèses et ne présentaient aucun trouble métabolique.

Tous les sujets ont été pesés et mesurés déshabillés le matin à jeun. L'indice de masse corporelle (BMI), calculé comme le rapport de la masse en Kg sur la taille en mètre au carré (P/T^2), a permis de différencier les sujets témoins (BMI inférieur à 25) des sujets obèses (BMI supérieur à 25).

Le rapport taille/hanche RTH a été établi en mesurant à l'aide d'un ruban-mètre la circonférence de la taille et des hanches. Il permet de séparer l'obésité en deux catégories : l'obésité gynoïde définie par un RTH inférieur à 0,85 et androïde par un RTH supérieur ou égal à 0,85.

III.2) Méthodes

III.2.1) Explorations métaboliques

a) Test de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO).

Les sujets, le matin à jeun ont ingéré en moins de cinq minutes 75 g de glucose dilués dans 200 ml d'eau froide. Sept prélèvements ont été réalisés dans des tubes de 5 ml contenant du fluorure de Na^+ et de l'oxalate de K^+ , aux temps t_0 , t_{30} , t_{60} , t_{90} , t_{120} , t_{150} et t_{180} afin de doser la glycémie. Parallèlement, l'insulinémie a été dosée aux même temps dans des tubes contenant de l'héparinate de Na^+ .

Une glycémie à jeun inférieure à 1,4 g/l et comprise entre 1,4 et 2 g/l à 2h a permis d'éliminer les sujets présentant une intolérance aux glucides. Une glycémie à jeun supérieure ou égale à 1,4 g/l ou une glycémie à 2 h supérieure ou égale à 2 g/l a permis d'éliminer les sujets présentant un diabète (DNID).

b) Bilan lipidique.

Au temps t_0 de l'HGPO ont également été dosés la cholestérolémie et le taux des triglycérides plasmatiques, le cholestérol HDL et LDL ainsi que les apoprotéines AI et B selon les méthodes décrites dans le chapitre du diabète.

III.2.2) Composition membranaire

La détermination du cholestérol membranaire, des phospholipides, et l'analyse des différentes classes de phospholipides par CLHP, ont été effectués selon les protocoles décrits en annexe.

III.2.3) Fluidité membranaire

La détermination de la fluidité membranaire a été effectuée sur des membranes isolées. Les sondes utilisées sont le TMA-DPH et le DPH. Les protocoles utilisés sont décrits en annexe.

III.2.4) Tests statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ déviation standard.

La normalité de la distribution au sein de la population a été vérifiée par un test d'aplatissement et d'asymétrie.

La population d'obèses a été divisée en tertiles et une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée par le test de Krukall-Wallis pour la comparaison des trois sous groupes.

Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour la comparaison deux à deux des trois sous groupes.

Des tests de corrélation ont permis de déterminer les relations entre les différents paramètres.

Une analyse de régression multiple a permis de déterminer l'importance des facteurs responsables de la variation d'un paramètre donné.

IV) RESULTATS.

IV.1) Paramètres cliniques et plasmatiques

Le tableau 36 résume les caractéristiques cliniques et biochimiques moyennes des témoins et des obèses.

Tableau 36. *Caractéristiques cliniques et biochimiques des témoins et des patients obèses.*

	Témoins (n=28)	Obèses (n=69)	Mann-Whitney (p)
Age (ans)	32,9 ± 6,30 ^a	36,6 ± 10,9	NS
BMI (kg/m ²)	20,7 ± 1,40	36,41 ± 6,90	< 0,0001
Cholestérol plasmatique (mmol/l)	4,8 ± 0,6	5,3 ± 0,9	NS
Triglycérides plasmatiques (mmol/l)	0,8 ± 0,3	1,22 ± 0,6	NS
Glycémie (mmol/l)	4,2 ± 0,7	5,2 ± 0,6	NS
Insulinémie I ₀ (mmol/l)	5,6 ± 2,9	12,5 ± 6,6	< 0,0001

^a Valeurs moyennes ± Ecart type.

On constate que le groupe des obèses présente des différences significatives avec celui des témoins au niveau de l'insulinémie.

IV.2) Fluidité membranaire

Les valeurs moyennes d'anisotropie de la fluorescence émise par les différentes sondes sont rassemblées dans le tableau 37.

Tableau 37. *Anisotropies de la fluorescence $\langle r \rangle$ émise par le DPH et le TMA-DPH incorporés dans les membranes de témoins et de patients obèses.*

	Témoins (n=28)	Obèses (n=69)	Mann-Whitney (p)
DPH	$0,254 \pm 1.10^{-3}$ ^a	$0,254 \pm 5.10^{-3}$	NS
TMA-DPH	$0,269 \pm 1.10^{-3}$	$0,270 \pm 1.10^{-3}$	NS

^a *Valeurs moyennes $\pm$ erreur standard.*

La comparaison des deux échantillons par le test non paramétrique de Mann-Whitney ne révèle aucune différence significative entre le groupe témoin et les obèses.

Il faut noter que l'absence de différence entre de la fluidité membranaire des témoins et celle des obèses est en contradiction avec certaines données de la littérature. En effet, la majorité des auteurs rapportent une baisse de la fluidité membranaire chez les obèses.

Le tableau suivant rappelle les différents travaux déjà effectués sur la fluidité membranaire des obèses et les résultats obtenus avec la sonde fluorescente DPH.

Tableau 38. *Données de la littérature.*

AUTEUR	Anisotropie (témoins)	Anisotropie (obèses)	Fluidité (obèses)
Béguinot/1986	0,162	0,190	diminuée
Ciancarelli/1988	0,207	0,233	diminuée
Ferretti/1991	0,166	0,183	diminuée
Levy/1993	0,205	0,214	diminuée
Caimi/1991	-	-	diminuée
Cremel/1989	0,212	0,211	normale

IV.3) Composition lipidique membranaire

Les paramètres lipidiques membranaires pour les deux groupes sont regroupés dans le tableau 39, ainsi que leur comparaison.

Tableau 39. *Composition lipidique membranaire des hématies des sujets témoins et des patients obèses.*

	Témoins (n=28)	Obèses (n=69)	Mann-Withney (p)
Cholestérol membranaire	155,2 ± 6,5 ^a	149,5 ± 4	NS
Phospholipides membranaires	441 ± 15	438 ± 13	NS
Rapport C/PL	0,36 ± 0,03	0,35 ± 0,01	NS
Phosphatidyléthanolamine	147 ± 8,5	156 ± 5,7	NS
Sphingomyéline	79 ± 4,1	74,8 ± 2,2	NS
Phosphatidylsérine	67 ± 8,4	54 ± 2,9	NS
Phosphatidylcholine	148 ± 5	147 ± 4,7	NS

^a Valeurs moyennes exprimées en µg/mg de protéines ± ES

Aucune différence significative entre les compositions des lipides membranaires des sujets obèses et celle des témoins n'est observée.

Nous constatons par conséquent une absence de différence, autant au niveau de la fluidité, que de la composition membranaire, entre la population d'obèses étudiée prise dans son ensemble et les témoins.

Au vu de ces résultats on peut émettre l'hypothèse que l'obésité en tant que telle n'influencerait pas la fluidité et la composition membranaire. Nous avons alors recherché d'autres paramètres associés à l'obésité et pouvant être à l'origine d'altérations de ces paramètres, en particulier l'insulinorésistance.

L'insulinémie à jeun I_0 a été choisie comme index d'insulinosensibilité (Laakso, 1993). Etant donné que la distribution de l'insulinémie n'est pas normale, nous avons recherché des corrélations entre le logarithme de l'insulinémie et les différents paramètres cliniques, plasmatiques et membranaires. Tous les paramètres qui ne présentaient pas une distribution normale ont été transformés sous forme logarithmique (tableau 34).

Tableau 40. *Coefficients de corrélation entre Log(insulinémie) et les différents paramètres.*

	r	p
Age	-0,25	NS
Log (RTH)	0,28	<0,05
Log (BMI)	0,31	< 0,05
Log ApoB	0,27	< 0,05
Apo A I	0,27	< 0,05
Triglycérides plasmatiques	0,22	NS
Glycémie	0,16	NS
Cholestérol membranaire	0,22	NS
Phospholipides membranaires	0,36	< 0,005
Rapport C/PL	- 0,11	NS
Phosphatidyléthanolamine	0,36	< 0,005
Sphingomyéline	0,60	< 0,0001
Phosphatidylsérine	0,04	NS
Log (Phosphatidylcholine)	0,09	NS
Anisotropie < r > (DPH)	0,33	< 0,01

On constate que l'insulinémie à jeun est fortement corrélée avec un certain nombre de ces paramètres.

Les corrélations obtenues avec le BMI et le RTH indiquent que dans la population d'obèses étudiés, les individus les plus insulino-résistants sont ceux ayant les plus fort BMI et présentant plutôt une obésité androïde.

L'insulinémie est également corrélée à certains paramètres membranaires comme la fluidité, la quantité totale de phospholipides, ainsi que les quantités de PE et de SM.

A partir de ces résultats, le groupe des obèses a été divisé en trois sous groupes de 23 individus en fonction de leur indice d'insulinosensibilité.

IV.4) Effet de l'insulino-sensibilité

Les valeurs moyennes des paramètres cliniques, plasmatiques et des caractéristiques membranaires sont rassemblés dans les tableaux 39, 40, 41, et 42.

Sur le Tableau 41 on constate que les seules différences présentes entre les trois groupes concernent les paramètres cliniques de l'obésité que sont le BMI et le RTH.

Tableau 41: *Influence de l'insulinosensibilité sur les paramètres cliniques et plasmatiques des sujets obèses.*

	I-sensibilité élevée(n=23)	I-sensibilité moyenne(n=23)	I-sensibilité faible (n=23)	KruskalWallis (p)
Age (ans)	39,3 ± 11,8 ^a	36,2 ± 11,5	34,3 ± 9,1	NS
BMI (kg/m ²)	32,96 ± 4,3	37,4 ± 7,7*	38,26 ± 7,2†	< 0,005
RTH	0,82 ± 0,07	0,85 ± 0,09	0,88 ± 0,11*	< 0,05
Cholestérol plasmatique (mmol/l)	5,3 ± 0,7	5,4 ± 1,1	5,2 ± 0,9	NS
Triglycéride plasmatique (mmol/l)	1,2 ± 0,6	1,1 ± 0,5	1,3 ± 0,6	NS
Glycémie (mmol/l)	5,0 ± 0,6	5,4 ± 0,5	5,3 ± 0,8	NS
Apo AI	1,55 ± 0,25	1,48 ± 0,27	1,35 ± 0,14*	< 0,05
Apo B	1,02 ± 0,31	1,14 ± 0,30	1,12 ± 0,23	NS
Insulinémie (mmol/l)	6,9 ± 1,9	11,4 ± 1,1	19,41 ± 6,7	-

^a : Valeurs exprimées en Moyennes ± Ecart type

*: (p < 0,05) par rapport au premier groupe.

† (p < 0,005) par rapport au premier groupe

En ce qui concerne les valeurs d'anisotropie de fluorescence émises par la sonde DPH, elles indiquent une baisse de fluidité chez les obèses les plus insulino-résistants (Tableau 40).

Tableau 42: *Anisotropies de la fluorescence <r> émise par le DPH et le TMA-DPH pour les différents groupes.*

Anisotropie <r>	I-sensibilité élevée (n=23)	I-sensibilité moyenne (n=23)	I-sensibilité faible (n=23)	p KruskalWallis
DPH	0,252 ± 0,005 a	0,254 ± 0,005	0,256 ± 0,002 **	< 0,05
TMA-DPH	0,268 ± 0,002	0,269 ± 0,002	0,273 ± 0,001 *	NS

a : Valeurs exprimées en Moyennes ± ES.

******: (p < 0,01) par rapport au premier groupe.

*****: (p < 0,05) par rapport au premier groupe.

Au niveau du rapport C/PL, on ne note aucune différence significative entre les trois groupes. Ils sont en revanche, différents au niveau de leurs quantités de cholestérol et de phospholipides, les moins insulinosensibles présentant les quantités de phospholipides les plus élevées (tableau 43).

Tableau 43: *Paramètres lipidiques membranaires.*

	I-sensibilité élevée(n=23)	I-sensibilité moyenne (n=23)	I-sensibilité faible (n=23)	p KruskalWallis
Cholestérol	157,3 ± 9,18 a	165,5 ± 5,7	171,1 ± 10,2	NS
Phospholipides	395,2 ± 17,9	437,9 ± 14,7*	481,3 ± 18,0 **	< 0,005
Rapport C/PL	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,35 ± 0,02†	NS

a Valeurs moyenne exprimées en µg/mg de protéines ± ES

***** (p < 0,05) comparé au troisième groupe.

****** : (p < 0,005) comparé au premier groupe.

† : p < 0,05 par rapport au premier groupe.

Enfin le tableau 44 met en évidence des différences significatives au niveau des quantités de SM et de PE entre les différents groupes d'obèses.

Tableau 44: *Classes de phospholipides membranaires.*

	I-sensibilité élevée (n=23)	I-sensibilité moyenne (n=23)	I-sensibilité faible (n=23)	(p) Kruskal Wallis
PE	130,1 ± 8,6 ^a	164,8 ± 7,4 ^{††}	179,6 ± 11,5 ^{††}	< 0,001
SM	62,3 ± 3,3	72,8 ± 2,6 [*]	88,5 ± 3,7 ^{° +}	< 0,0001
PS	56,4 ± 4,9	50,9 ± 4,8	58,4 ± 5,5	NS
PC	141,7 ± 9,8	145,7 ± 6,6	158,7 ± 8,3	NS
TOTAL	395,2 ± 17,9	430,1 ± 14,7	481,2 ± 18,4 ^{†φ}	< 0,005

^a Valeurs moyennes exprimées en µg/mg de protéines ± ES

*: (p < 0,05) par rapport au premier groupe.

° (p < 0,0001) par rapport au premier groupe.

+ : (p < 0,001) par rapport au deuxième groupe.

†† (p < 0,0005) par rapport au premier groupe

† (p < 0,005) par rapport au premier groupe

φ : (p < 0,05) par rapport au deuxième groupe

Les obèses les plus insulinorésistants présentent les valeurs les plus élevées de SM et de PE. Ces différences sont directement liées à l'insulinorésistance. Les tests de corrélations effectués (Tableau 40) entre l'insulinémie et les différents paramètres ont démontré que l'insulinémie est directement liée à la quantité de SM dans la membrane, (p < 0,0001), ainsi qu'à la quantité de PE membranaire, (p < 0,001).

La régression multiple a par ailleurs révélé que la SM membranaire expliquait à elle seule 35 % de la variation de l'insulinémie dans le groupe des obèses, le deuxième paramètre étant le taux de triglycérides plasmatiques et le troisième la fluidité membranaire. Ces trois paramètres ensemble expliquant 49 % de la variation de l'insulinémie. La sphingomyéline se révèle donc un facteur membranaire important relié à l'insulinorésistance.

V) DISCUSSION

L'obésité est souvent associée à d'autres désordres métaboliques tels que le diabète non insulino-dépendant, des altérations des lipides plasmatiques et l'insulinorésistance.

Dans cette étude nous nous sommes particulièrement intéressés à ce dernier facteur et aux modifications membranaires qu'elles soient biochimiques ou biophysiques pouvant y être associées.

L'environnement lipidique est en effet fondamental à la fois pour la liaison de l'insuline à son récepteur et pour l'action de l'insuline. De nombreux auteurs ont déjà rapporté une baisse de la fluidité membranaire chez les obèses (cf. tableau 38). Toutefois, aucune donnée concernant l'insulino-sensibilité n'a été prise en compte. Les études concernant la composition membranaire dans l'obésité restent assez restreintes. Neufeld et al (1987) ont néanmoins rapporté des quantités de cholestérol membranaire plus élevées chez les obèses. Bruneau et al (1987) ont par ailleurs montré que l'augmentation du cholestérol membranaire dans des hépatocytes en culture induisait une baisse de la fluidité membranaire qui était associée à des altérations de l'action de l'insuline conduisant à un état d'insulinorésistance.

En revanche, très peu d'études ont été orientées vers le rôle de la composition de la membrane en phospholipides. L'essentiel des travaux a été centré sur l'influence des acides gras, de leur altération, des répercussions sur la fluidité membranaire et les éventuelles conséquences de telles modifications sur le fonctionnement du récepteur insulinique (Luly et al 1981; Juhan-Vague et al, 1986; Popp Snidjers et al 1987; Field et al, 1990; Pelikanova et al, 1991; Wahle et al, 1991;)

Au cours de notre étude, nous n'avons observé aucune différence entre notre population d'obèses et les témoins, que ce soit au niveau de leur fluidité membranaire ou

au niveau de la composition lipidique membranaire. Nous en avons conclu que ces paramètres n'étaient pas directement influencés par l'obésité, mais certainement par des altérations qui lui sont associées. Une étude statistique a permis de mettre en évidence le rôle probable de l'insulinorésistance.

En effet, nous avons constaté des corrélations entre l'insulinémie (Io), le marqueur d'insulinosensibilité choisi, la fluidité membranaire et certaines classes de phospholipides.

La répartition de la population étudiée en trois groupes en fonction de leur insulinémie a permis de constater que dans la population d'obèses, les individus les plus insulinorésistants sont ceux ayant les plus forts BMI et présentant plutôt une obésité androïde.

Au niveau des paramètres membranaires, les obèses les plus insulinorésistants se caractérisent par la fluidité la plus basse et par les quantités de SM et de PE les plus élevées.

V.1) Dynamique

La baisse de la fluidité membranaire chez les obèses les plus insulinorésistants n'est pas étonnante. Plusieurs auteurs ont souligné l'importance de la dynamique membranaire sur le fonctionnement du récepteur à insuline. Des changements de la fluidité membranaire, l'environnement immédiat des récepteurs, peuvent induire des altérations dans l'activité de ces récepteurs.(Shinitzki, 1984). L'affinité et le nombre de récepteurs semblent également être influencés par la fluidité membranaire et la composition lipidique. En effet, ces paramètres peuvent induire des modifications de la liaison de l'insuline à son récepteur et/ou certaines actions de l'insuline (Ginsberg et al, 1981,1982; Field et al, 1988).

V.2) Composition lipidique membranaire

Il est bien connu que la fluidité est influencée par le contenu membranaire en cholestérol. Nous n'avons néanmoins déterminé aucune différence significative entre les quantités de cholestérol des trois groupes. Par ailleurs, il n'existe aucune corrélation entre la baisse de la fluidité membranaire et les quantités de cholestérol membranaire. Nous pouvons donc conclure que le cholestérol membranaire n'est pas impliqué dans la baisse de la fluidité membranaire observée chez les obèses les plus insulino-résistants.

En revanche, en ce qui concerne les phospholipides, les obèses les plus insulino-résistants présentent des quantités en PE et SM significativement plus élevées. Ces deux phospholipides qui sont caractérisés par des acides gras à chaînes saturées, sont positivement corrélés à l'indice I_o . Ils pourraient alors par le biais de leur action rigidifiante être impliqués dans la diminution de l'insulino-sensibilité. Cet effet semble être plus marqué pour la SM, une relation négative ayant été dégagée entre le contenu membranaire en SM et la fluidité membranaire.

Le mécanisme d'action de ces deux phospholipides peut être lié à plusieurs facteurs.

Les variations de la PE peuvent jouer un rôle sur la protéine kinase C. L'activité de la PKC est sensible aux interactions entre les différentes têtes polaires des phospholipides. Ces interactions sont modulées par les variations du degré d'insaturation de la PC, par le contenu membranaire en PE et en cholestérol (Salter et al, 1994).

Dans des membranes artificielles, l'augmentation du degré d'insaturation des AG de la PC potentialise la stimulation de la PKC. En revanche, en présence de PE, l'activité de la PKC diminue avec l'augmentation du degré d'insaturation de la PC. L'effet de l'augmentation concomitante de la PE et du degré d'insaturation de la PC sur la PKC n'est pas dû à une interaction spécifique entre les deux phospholipides. L'activité de la PKC est en fait modulée par les paramètres structuraux de la bicouche lipidique et notamment par

l'espacement des têtes polaires des phospholipides et les différentes interactions énergétiques s'établissant entre ces groupements. Il existe une configuration optimale de la bicouche lipidique permettant une insertion et des changements conformationnels de la PKC correspondant à son activité maximale. En présence des acides gras insaturés de la PC, une augmentation de la quantité de PE induirait une diminution de la distance entre les têtes polaires et entraverait la pénétration du domaine régulateur de la PKC à l'intérieur de la bicouche ainsi que l'établissement des interactions hydrophobes stabilisant la conformation active de l'enzyme (Salter et al, 1994).

Par conséquent, l'augmentation de la PE au niveau des obèses les plus insulino-résistants pourrait donc induire une altération des paramètres structuraux de la bicouche lipidique et une diminution de l'activité de la PKC. Néanmoins, la nature des AG de la PC et leur degré d'insaturation chez les obèses restent à explorer.

D'autre part, une augmentation de la SM a également été relevée chez les obèses les plus insulino-résistants. L'analyse multivariée révèle que la quantité de SM interviendrait pour 35% dans les variations de l'insulinémie.

L'augmentation de la SM chez les obèses les plus insulino-résistants peut dériver d'une altération des échanges entre la membrane de l'érythrocyte et la lipoprotéine Apo A1. En effet, la relation négative observée entre l'insulinémie et le taux d'Apo A1 indique une baisse de cette dernière chez les obèses les plus insulino-résistants. L'Apo A1 étant responsable sélectivement de la désorption de la SM à partir de la membrane, cette baisse pourrait conduire à un enrichissement de la membrane en SM (Forte, 1995).

Par ailleurs, l'augmentation des quantités de SM membranaire chez les obèses les plus insulino-résistants pourrait être liée à un facteur hormonal. En effet, l'obésité (Bégin-Heick, 1994, Van Gaal et al, 1992) et en particulier l'obésité androïde a été rapportée comme étant associée à la fois à une insulino-résistance et à un hypercorticisme (Marin et al, 1992; Migeon et al, 1963). Plusieurs auteurs ont démontré l'effet stimulateur de la dexaméthasone sur la synthèse de la SM dans divers types cellulaires (Johnston

1980; Nelson et Murray, 1982; Nelson et al, 1982), et notamment dans les cellules graisseuses de l'épididyme (Murray, 1979) où la dexaméthasone stimule sélectivement la synthèse de la SM. Cet événement est corrélé à l'inhibition du transport du glucose. Des études *in vitro* ont par ailleurs confirmé le rôle de la SM sur le transport du glucose. L'incorporation de SM dans un modèle micellaire constitué d'un mélange équimolaire de PE et de PC provoque une diminution du transport du glucose de l'ordre de 57 % (Sandra et al, 1984).

L'action inhibitrice de la SM s'exerce également directement sur la transmission du signal de l'insuline. La SM est en effet un puissant inhibiteur de la phosphatidylinositol phosphodiesterase qui est la PLC spécifique du PI (Dawson et al, 1985). Nous avons déjà cité le rôle des produits du métabolisme du PI (têtes polaires et DAG) dans la médiation du signal de l'insuline. L'inhibition de la PLC par la SM bloquerait la séquence des événements biochimiques et empêcherait la transduction du signal.

L'action de la SM pourrait également dériver de son métabolisme. En effet, les corticostéroïdes sont impliqués non seulement dans la stimulation de la synthèse de la SM mais également dans sa dégradation. La dexaméthasone exerce une action stimulatrice sur la sphingomyelinase et cette action s'accompagne d'une augmentation de la quantité de sphingosine dans la membrane (Nelson et Murray, 1982; Ramachandran et al, 1990). Or, la sphingosine a une action inhibitrice sur le système de signal de l'insuline. Celle-ci peut s'exercer de deux manières, soit par inhibition de la PKC, soit par altération de la phosphorylation de protéines impliquées dans la transmission du signal.

La sphingosine est connue pour être un puissant inhibiteur de la PKC (Merill et al, 1986). Elle intervient non seulement en empêchant sa translocation du cytosol vers la membrane, mais elle est capable également d'inhiber directement les effets physiologiques de la PKC et donc par ce fait empêcher l'action de l'insuline.

Le mécanisme d'action de la sphingosine semble être un effet de compétition avec le DAG, l'inhibition se faisant par interaction avec le domaine lipidique de la PKC (Hannun

et al 1986). Des études structurales ont révélé que le groupement amine libre de la sphingosine était nécessaire pour cette inhibition (Merill et Jones, 1989).

Par ailleurs, Smal et De Meyts (1989) ont démontré, au niveau des adipocytes murins, que l'inhibition de la PKC par la sphingosine empêchait la lipogénèse. Cette action semble se faire par l'inhibition de l'utilisation du glucose par les cellules. Plusieurs auteurs ont également rapporté un effet inhibiteur de la sphingosine sur le transport du glucose et son oxydation (Nelson et Murray, 1986, Robertson et al, 1989).

L'autre niveau d'action de la sphingosine concerne les réactions de phosphorylation. En effet, l'insuline stimule l'autophosphorylation des sous unités β de son récepteur, et cette phosphorylation initiale joue un rôle important dans les processus intracellulaires de signal (Shoelson et al, 1991). Or la sphingosine inhibe l'autophosphorylation du récepteur à insuline par la tyrosine kinase *in vitro* et *in situ* (Arnold et Newton, 1991). Elle agit en réduisant l'activité de la tyrosine kinase intrinsèque du récepteur, en diminuant son affinité pour l'ATP. La sphingosine inhibe donc la transduction du signal déjà au niveau du récepteur, mais semble-t-il sans affecter l'affinité de ce dernier pour l'insuline. Par ailleurs, l'action de la sphingosine sur la PKC peut également se faire au niveau de l'autophosphorylation de cette dernière par inhibition de son activité sérine/thréonine kinase (Hannun et al 1986, Arnold et Newton, 1991; Hannun et Bell, 1993).

Par ailleurs, récemment de nombreux auteurs ont rapporté le rôle du $\text{TNF}\alpha$ dans l'insulinorésistance. Des études ont indiqué la présence de $\text{TNF}\alpha$ dans le tissu adipeux d'animaux obèses. Ceci pourrait résulter d'une élévation de l'expression de $\text{TNF}\alpha$ qui semble être fréquente et fortement liée à l'insulinorésistance.

Les effets du $\text{TNF}\alpha$ sur l'action de l'insuline peuvent être directs ou indirects. Les effets indirects s'effectuent par l'élévation des hormones de contrerégulation. L'infusion du $\text{TNF}\alpha$ chez des animaux augmente le taux de glucocorticoïdes et d'épinephrine. Ces deux hormones sont impliquées dans l'insulinorésistance, notamment les catécholamines qui sont

connues pour augmenter le taux d'AMPc intracellulaire qui conduit à l'activation de la protéine kinase A qui elle même inhibe l'activité kinasique propre du récepteur de l'insuline.

L'action directe du $\text{TNF}\alpha$ sur des cellules insulinosensibles a été par ailleurs démontrée sur deux systèmes d'une très grande importance: d'une part le GLUT4 et d'autre part le récepteur de l'insuline lui même.

Des travaux récents suggèrent que la voie de la sphingomyéline à travers la génération d'un second messenger, le céramide, joue un rôle essentiel dans l'initiation des cascades de phosphorylation et dephosphorylation générées par le $\text{TNF}\alpha$ (Krönk et al , 1992; Kolesnick et Gold, 1994).

Il a par ailleurs été rapporté que le $\text{TNF}\alpha$ induisait non seulement une «down régulation» du transporteur GLUT4, mais aussi une inhibition de l'utilisation du glucose stimulée par l'insuline. Un effet du $\text{TNF}\alpha$ sur l'activité kinasique intrinsèque du récepteur de l'insuline a également été mise en évidence. Ainsi l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline et de la phosphorylation du substrat IRS1 est diminuée en présence de $\text{TNF}\alpha$ (Feinstein, 1991). La diminution de l'efficacité catalytique du récepteur est par ailleurs associée à une forte inhibition de l'utilisation du glucose (Hostamisligil et al, 1994).

Une preuve plus directe du rôle du $\text{TNF}\alpha$ dans l'insulino-résistance a été fournie par des expériences de neutralisation du $\text{TNF}\alpha$ avec un anticorps soluble constitué du récepteur du $\text{TNF}\alpha$ greffé à une immunoglobuline IgG (Hofmann, 1994). Les rats *fa/fa* Zucker traités à l'anticorps (TNFR-IgG) affichaient une sensibilité à l'insuline et une utilisation du glucose périphérique stimulée par l'insuline de 2 à 3 fois supérieure. La neutralisation du $\text{TNF}\alpha$ permet une augmentation nette de la phosphorylation du récepteur et de l'IRS-1 en réponse à l'insuline. Ce traitement permettait par ailleurs une réduction nette à la fois de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie et une nette diminution du taux d'acides gras libres.



Les éléments discutés et rapportés ci-dessus suggèrent par conséquent que l'inhibition de l'action de l'insuline peut être transmise autant par la synthèse que par la dégradation de la SM. Les rôles du cortisol et du $\text{TNF}\alpha$ dans la synthèse et/ou la dégradation de la SM peuvent être déterminants.

Il est évident que l'érythrocyte ne représente pas le meilleur modèle pour une étude approfondie de ces phénomènes. En effet, l'érythrocyte n'est pas une cellule insulinosensible. De plus, il est caractérisé par l'absence de machinerie enzymatique et le métabolisme des phospholipides est très limité. Néanmoins, l'augmentation de la quantité de SM dans l'érythrocyte pourrait refléter un état membranaire général pouvant exister en cas d'insulinorésistance dans l'ensemble des cellules et en particulier dans les cellules insulinosensibles. Il serait intéressant d'effectuer la même étude sur des cellules telles que les adipocytes. Des études complémentaires comprenant une analyse des AG des différents phospholipides et en particulier ceux de la PC pourraient apporter des éléments pour définir de façon plus précise le rôle de la PE dans la modulation de l'activité de la PKC. Il serait par ailleurs nécessaire d'entreprendre une approche quantitative des différents métabolites de la SM pouvant être présents au sein de la membrane, de l'activité de la sphingomyélinase responsable de leur génération, ainsi que des différents effecteurs capables de stimuler cette voie.

**CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES.**



L'objectif de ce travail a été d'étudier la composition et la fluidité membranaire des érythrocytes de sujets présentant des troubles métaboliques tels que le diabète ou l'obésité.

Nous avons consacré la première partie de ce travail à l'étude des paramètres biochimiques et biophysiques de la membrane érythrocytaire de patients diabétiques insulinodépendants déséquilibrés. Les résultats obtenus indiquent une diminution de la fluidité membranaire associée à une augmentation du cholestérol et des phospholipides membranaires. La détermination des quantités individuelles des différentes classes de phospholipides a permis de montrer des modifications dans les quantités des classes majeures de phospholipides. Toutes les modifications observées, qu'elles soient d'ordre dynamique ou biochimique, ont pu être reliées à l'un ou l'autre des deux problèmes inhérents à l'état diabétique, à savoir les altérations des lipides plasmatiques et l'hyperglycémie.

La seconde partie de ce travail a concerné la détermination de l'influence du β -hydroxybutyrate sur les paramètres membranaires étudiés. Nous avons consacré une large partie de l'étude à l'action *in vitro* du β -OH sur les érythrocytes de sujets sains et diabétiques. Nos observations ont permis de formuler l'hypothèse de l'intervention des systèmes de méthylation de la PE et de dégradation de la PC lors de l'action du β -OH. La validité de cette hypothèse a été vérifiée. Nous avons également tenté d'expliquer l'action différentielle du β -OH sur les érythrocytes des sujets sains et des patients diabétiques.

Le deuxième volet de cette seconde partie a été consacré à une étude *in vivo* de la fluidité et de la composition lipidique membranaires d'érythrocytes de patients diabétiques en acidocétose. Les perturbations membranaires observées et la confrontation avec les données de l'étude *in vitro* ont permis de préciser le rôle du β -hydroxybutyrate et de déceler d'autres perturbations liées à l'acidocétose diabétique.

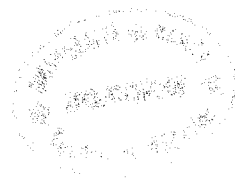
Enfin, la dernière partie de ce travail a été consacrée à l'étude des paramètres membranaires d'érythrocytes de sujets obèses présentant des degrés variables d'insulinosensibilité. Des perturbations dans la dynamique et la composition lipidique ont également été décelées affectant en particulier la sphingomyéline..



L'étude des différents paramètres membranaires que nous avons menée sur différentes situations de désordres métaboliques a permis de mettre en évidence de nombreuses altérations. Dans chacune des parties que nous avons traitées, nous avons tenté autant que possible de comprendre à la fois les causes et les effets de ces modifications. Néanmoins, une approche plus précise de ces altérations semble nécessaire. En effet, les altérations dynamiques de la membrane érythrocytaire sont en relation avec des modifications chimiques des composants de la membrane, qui sont elles mêmes influencées par leur environnement plasmatique. Il serait indispensable de s'intéresser à la composition des lipoparticules plasmatiques notamment leur composition en phospholipides, et aux éventuelles altérations au niveau des échanges qu'elles établissent avec la membrane.

D'autre part, une étude conjointe de la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides et de la peroxydation lipidique semble également nécessaire pour expliquer de façon plus approfondie les altérations observées chez le diabétique. Il serait intéressant également de joindre à ces perspectives la détermination du degré de glycation des protéines membranaires et son éventuelle influence sur la dynamique et /ou la composition membranaire.

ANNEXES



I) PREPARATION DES MEMBRANES D'HEMATIES

I.1) Tampons

- Solution physiologique de NaCl (0,9%)
 - Tampon hémolyse
 - NaCl 10mM.
 - EDTA 1mM.
 - TRIS 1mM.

I.2) Lavages

Afin de récupérer uniquement les hématies, l'échantillon de sang est lavé 3 fois à 220g, à 4°C dans une solution de NaCl à 9%, pour éliminer le plasma ainsi que les éléments figurés du sang tels que les leucocytes.

I.3) Hémolyse

Le culot d'hématies est resuspendu dans du tampon hémolyse dans un volume correspondant à 10 fois le volume de sang de départ. Il est ensuite maintenu sous agitation magnétique à 4 °C pendant 30 min, puis centrifugé à 20000g pendant 10min.(J 21, Beckman, Palo Alto, Ca, USA).

Le culot de membranes obtenu est ensuite soumis à une série de lavages dans du tampon hémolyse, afin d'éliminer l'hémoglobine libérée au cours de l'hémolyse. L'opération est répétée 4 à 5 fois jusqu'à obtention d'un culot de membranes parfaitement blanc, qui sera ensuite resuspendu dans du tampon hémolyse. L'échantillon de membranes est fractionné pour les différents dosages puis conservé à - 80°C.

II) DOSAGES BIOCHIMIQUES

II.1) Protéines membranaires: méthode de Lowry

II.1.1) Principe

L'estimation quantitative des lipides membranaires a été faite par rapport à la quantité de protéines présente dans la membrane. Il est donc important de choisir une méthode fiable et reproductible pour le dosage des protéines et nous avons choisi la méthode de LOWRY (Lowry et al, 1951).

Cette méthode consiste en un dosage colorimétrique, la coloration bleue finale étant due à une réaction se déroulant en deux étapes:

a) Réaction des protéines avec le cuivre:

Elle se passe en milieu alcalin et donne naissance à un complexe cuivrique.

b) Oxydation du complexe par le réactif de Folin:

La réaction se fait essentiellement entre des résidus ayant des chaînes oxydables tels que la tyrosine ou le tryptophane et l'acide phosphomolybdique-phosphotungstique (Legler et al, 1985).

II.1.2) Réactifs

A) SOLUTION ALCALINE DE TARTRATE:

NaHCO ₃	49,0 mM.(Prolabo réf: 27778.293)
Tartrate de Na ⁺ , K ⁺	1,70 mM.(Prolabo réf: 27068.23)
NaOH	0,10 M.(Prolabo réf: 28252.293)
QSP	1000 ml.

B) SOLUTION CUIVRIQUE:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,5 %.(Merck réf: 2790.0250)

C) SOLUTION CUIVRIQUE ALCALINE PREPAREE EXTEMPORANEMENT:

Solution alcaline de tartrate 50 ml.

Solution cuivrique 1 ml.

D) FOLIN (PROLABO REF: 31360.264).

II.1.3) Protocole de dosage

A 1 ml de suspension membranaire sont ajoutés 10 ml de solution cuivrique alcaline. Après 15 min d'incubation, 1 ml de réactif de Folin dilué au 1/4 dans de l'eau distillée est ajouté au mélange. 1ml de tampon hémolyse est traité de façon similaire et constituera le blanc. Au bout de 15 min, la lecture est effectuée à 750 nm sur un spectrophotomètre UV visible (UV-160, Shimadzu, Kyoto, Japon).

Les valeurs d'absorbance obtenues sont rapportées à une courbe étalon déterminée par rapport à l'albumine et qui est définie par l'équation suivante:

$$Y = 87,3 x^2 + 66,974 x - 0,567.$$

avec Y = Concentration en protéines,

et X = DO à 750 nm.

II.2) Lipides membranaires. Méthode de Rose et Oklander

II.2.1) Principe

L'extraction des lipides de la membrane érythrocytaire est effectuée selon la méthode de Rose et Oklander (Rose et Oklander, 1965). C'est une méthode simple, rapide et reproductible permettant l'extraction quantitative du cholestérol et des phospholipides membranaires, avec un rendement optimal. Le principe de la méthode est basé sur la

combinaison d'un solvant polaire, l'isopropanol, destabilisant les liaisons hydrogènes, et d'un solvant non polaire, le chloroforme, entraînant les lipides membranaires.

II.2.2) Réactifs

Isopropanol (Prolabo, ref 20848.321).

Chloroforme (Prolabo ref 22716.321).

II.2.3) Protocole

L'extraction est faite avec 1ml de suspension membranaire, la concentration protéique correspondante se situant toujours entre 300 et 500 µg de protéines/ml de suspension. Des expériences préliminaires ont démontré que le rendement de l'extraction était optimal dans cette gamme de concentration.

A 1ml de suspension membranaire, sont ajoutés 11 ml d'isopropanol. Le mélange est ensuite agité latéralement sur un plateau vibrant pendant 15 min avant d'ajouter 7 ml de chloroforme. Après une nouvelle agitation de 15 min, les extraits sont filtrés sur un filtre hydrophobe (Whatman 1 ps). L'étape de filtration permet d'éliminer les débris membranaires dénaturés par les solvants.

Un blanc est prévu également en traitant parallèlement 1ml de tampon hémolyse

Les extraits lipidiques sont ensuite évaporés à 37°C sous un flux d'azote.

L'évaporation est totale au bout de 60 à 90 min. Le résidu sec ainsi obtenu est ensuite resuspendu dans 2,5 ml de chloroforme.

Ce volume est calculé de façon à obtenir des concentrations de cholestérol et de phospholipides se situant vers le centre des gammes étalon respectives.

II.3) Cholestérol. Méthode de Zak et Zlatkis

II.3.1) Principe

La détermination de la quantité de cholestérol membranaire, a été faite par la méthode décrite par Zak et Zlatkis (1969), utilisant l'ophtalaldéhyde. Elle est basée sur la réaction du cholestérol avec les aldéhydes aromatiques (Rudel et Morris, 1973). C'est une méthode sensible, permettant l'obtention d'une coloration rose stable. Elle offre de plus l'avantage d'éviter les interférences avec la bilirubine, comme c'est le cas dans la méthode de Liebermann et Burchard (Liebermann, 1980). D'autre part, l'ophtalaldéhyde réagissant spécifiquement avec le cholestérol, les interférences dues aux autres stérols (Zak 1977) existant dans la membrane peuvent être évitées.

II.3.2) Réactifs

Ophtalaldéhyde (OPT, Sigma Saint Louis USA).(réf: P1378)

Acide acétique glacial (Prolabo, réf 20104.298).

Acide sulfurique (Merck réf: K 04063331

La solution d'OPT est préparée extemporanément à raison de 0,5 mg d'OPT/ml d'acide acétique.

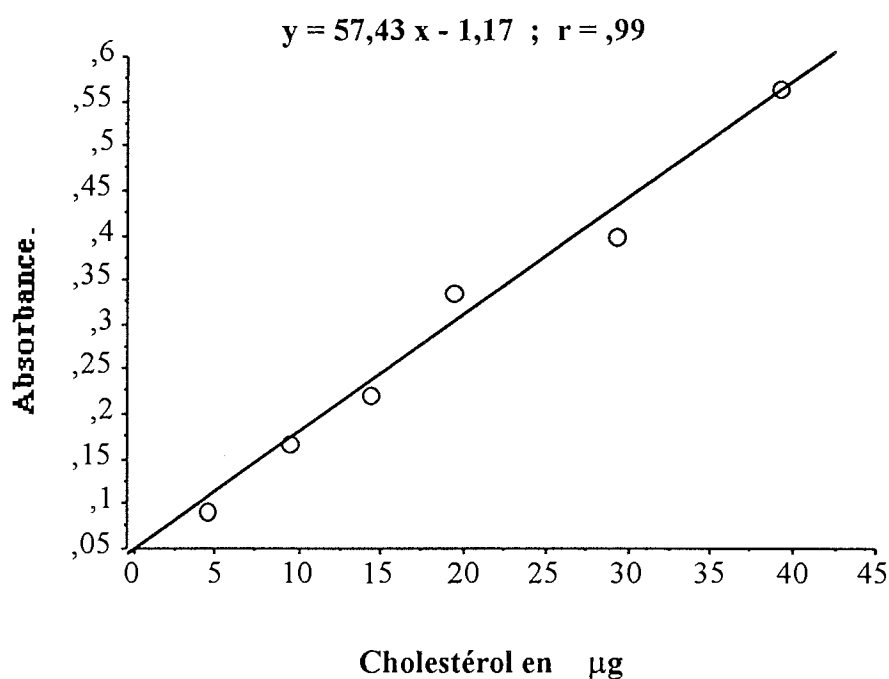
II.3.3) Protocole de dosage

A 250 µl de chaque suspension chloroformique: extrait lipidique, blanc ou gamme étalon, sont ajoutés 2ml de la solution d'OPT. Une agitation vigoureuse au vortex est nécessaire.

Après 15 min d'incubation, 1ml d'acide sulfurique est ajouté. Le mélange est également homogénéisé vigoureusement jusqu'à obtention d'une coloration rose. La lecture de la densité optique est effectuée à 560 nm.

II.3.4) Courbe d'étalonnage

Sur la figure 50 est représentée la courbe d'étalonnage obtenue pour le dosage du cholestérol.



II.4) Extraction des phospholipides. Méthode de Folch

L'étape d'extraction des phospholipides est effectuée de la même manière que pour le cholestérol. Néanmoins, une étape supplémentaire de lavage de l'extrait lipidique est nécessaire avant évaporation afin d'éliminer le phosphate inorganique.

L'extrait est lavé selon la méthode de Folch, avec une solution de KCl 50 mM (Folch et al, 1957).

Cette opération permet à la fois d'éviter les interférences avec l'hème et d'éliminer les lipides non phosphoriques. Les extraits sont lavés à trois reprises avec à chaque fois 2,8 ml de solution de KCl. Ils sont ensuite centrifugés à 300 g pour accélérer la séparation des deux phases, aqueuse et organique. La phase aqueuse est éliminée par aspiration, tandis que la phase organique est filtrée sur un filtre Whatman, avant d'être évaporée. Le résidu sec est resuspendu dans 2,5 ml de chloroforme.

II.5) Dosage des phospholipides. Méthode de Bartlett

II.5.1.) Principe

La méthode de Bartlett est basée sur le dosage du phosphore obtenu par hydrolyse des phospholipides par l'acide perchlorique (Cynamon et al 1984). C'est une méthode sensible, reproductible, permettant l'obtention d'une coloration bleue stable à 830 nm.

II.5.2) Réactifs

a. Solution I

Ammonium heptamolybdate (Prolabo réf: 21276.185)

4,9mM.

b. Solution II (réductrice)

Ammidol:

Bisulfite de sodium 20% (Merck réf: 28.36.292) 25 ml.

Diamino2,4 phénol dichlorate (Prolabo réf: 23.298.184)

50mM

c. Acide perchlorique à 70% (Merck réf: C. 664119).

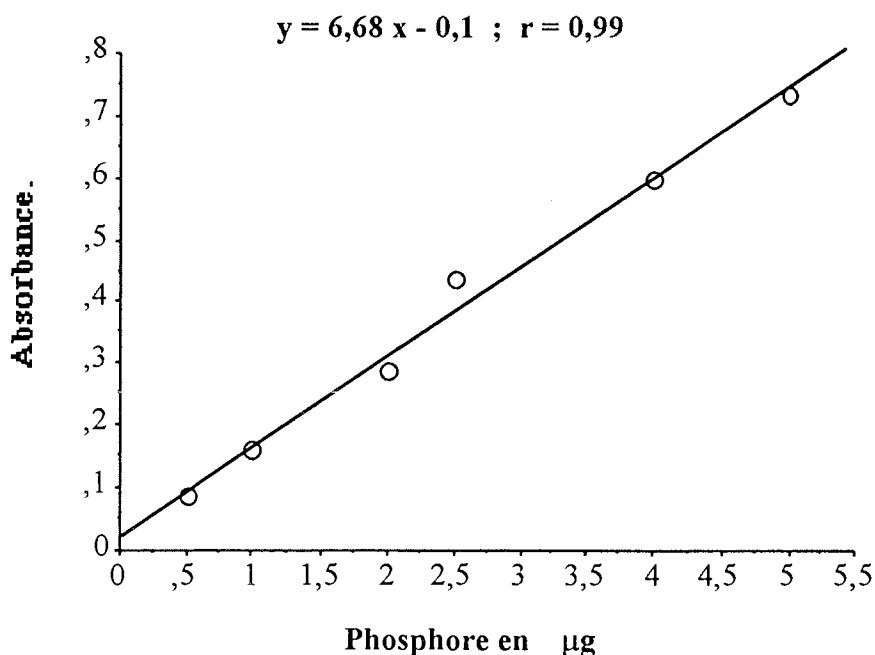
II.5.3) Protocole de dosage

Pour le dosage, 500 µl de l'extrait lipidique sont utilisés. Le chloroforme contenant l'extrait est évaporé sous azote et le résidu sec obtenu est hydrolysé par 400 µl d'acide perchlorique, dans un bain de sable maintenu à une température de 220 °C. La coloration brune disparaît progressivement le long de la digestion pour donner une solution transparente. La réaction dure environ 5 min. Le dosage du phosphate inorganique obtenu après l'hydrolyse est alors quantifié en utilisant une solution finale de 5 ml, comprenant:

- 4,2 ml d'eau.
- 0,2 ml de solution I.
- 0,2 ml de solution II.

Après agitation, le mélange est placé pendant 7 min dans un bain marie à 100°C. Ensuite, les tubes sont mis en attente pendant 15 min à température ambiante. Les mesures d'absorbance sont ensuite effectuées à 830 nm au spectrophotomètre.

Sur la figure 51 est représentée la courbe d'étalonnage obtenue pour le dosage des phospholipides.



III) POLARISATION DE FLUORESCENCE. DETERMINATION DE LA FLUIDITE MEMBRANAIRE

III.1) Intérêt

Les méthodes spectroscopiques d'émission moléculaire et en particulier la polarisation de fluorescence, permettent d'approcher la fluidité membranaire grâce à l'analyse de la faculté de rotation de sondes fluorescentes incorporées dans la structure membranaire .

La technique de polarisation de fluorescence se révèle d'un grand intérêt dans l'étude des relations structure-fonctions des membranes biologiques.

Une fois incorporés dans le système biologique, les marqueurs fluorescents traduisent les phénomènes de diffusion des lipides et/ou des protéines, et reflètent également les interactions lipides-protéines ainsi que la cohésion membranaire (Donner et al, 1985).

III.2) Principe

Les sondes fluorescentes sont excitées par une lumière polarisée verticalement. En fonction de la cohésion du milieu, la sonde sera plus ou moins mobile entraînant une dépolarisation plus ou moins importante de la lumière. L'analyse des composantes de l'intensité de fluorescence émise, polarisée respectivement parallèlement et perpendiculairement à la direction de polarisation de la lumière excitatrice, permet de déterminer un paramètre variant de manière inverse à la fluidité : l'anisotropie de fluorescence émise $\langle r \rangle$.

Ainsi, dans une solution fluide, les molécules excitées à l'aide d'une lumière polarisée ont le temps de se réorienter après excitation, et une émission de fluorescence faiblement polarisée est obtenue.

En revanche, si la viscosité de la solution est élevée, la molécule excitée ne pourra plus se réorienter totalement pendant sa durée de vie et l'on peut observer alors des anisotropies de fluorescence particulièrement élevées.

Cependant, les sondes fluorescentes ne donnent d'informations que sur leur environnement immédiat. En fonction des phénomènes que l'on veut approcher, il est important de choisir les marqueurs selon leur localisation dans la membrane. D'autres critères devront également figurer dans le choix d'une sonde fluorescente.

III.3) Choix des marqueurs fluorescents

Pour qu'une molécule fluorescente soit utilisée comme marqueur, plusieurs caractéristiques doivent être remplies et certains paramètres doivent être maîtrisés (Andre et al, 1987).

- Les propriétés spectroscopiques
- Les interactions avec les constituants membranaires
- Les perturbations éventuelles provoquées par l'introduction des sondes dans la membrane
- Leur localisation au sein de la membrane
- Les interférences possibles avec des molécules exogènes
- La stabilité des sondes.

III.3.1) Les propriétés spectroscopiques

Il est évident que les propriétés spectroscopiques de la sonde fluorescente doivent être différentes de celles des constituants membranaires. De plus, il faudrait qu'une fois les

sondes incorporées dans les membranes, leurs caractéristiques spectroscopiques varient uniquement avec la nature de l'environnement dans lequel elles sont incorporées.

III.3.2) Perturbations causées par la sonde

L'introduction d'une sonde dans une membrane provoque des perturbations qui vont dépendre de la forme et de la taille de la sonde. Mais généralement pour des concentrations faibles, la perturbation du milieu n'est pas très importante. La sonde doit par ailleurs être stable dans le milieu biologique dans lequel elle est incorporée.

III.3.3) Localisation des sondes dans les membranes

La connaissance de la localisation et l'orientation des sondes dans la membrane est nécessaire à une bonne interprétation des données expérimentales

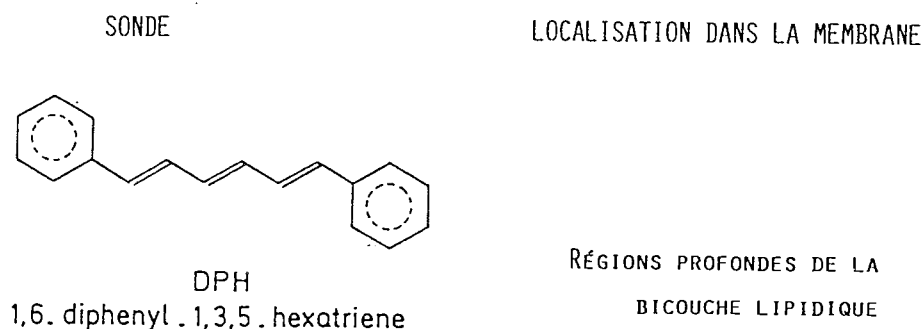
III.3.4) Interférences avec les molécules exogènes

Lors d'études d'interactions cellulaires avec des molécules exogènes, comme les médicaments, hormones, l'apparition d'interférences entre ces différents composés et la sonde fluorescente, peut entraîner des modifications dans les propriétés spectroscopiques de ces dernières, telles que la durée de vie et l'intensité de fluorescence. De telles modifications peuvent induire des artéfacts dans les mesures. Il est donc indispensable dans ces cas d'associer d'autres techniques de fluorescence telles que les techniques de fluorescence résolue dans le temps.

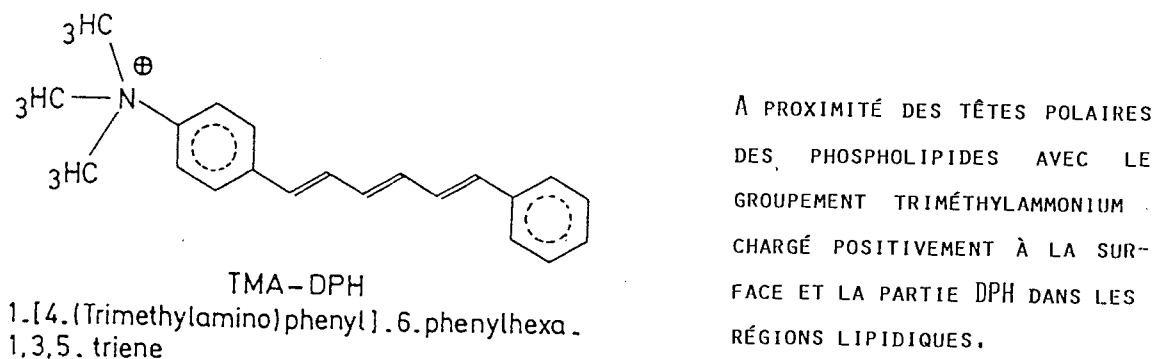
III.3.5) Sondes utilisées

Les sondes utilisées dans le cadre de notre études ont été les suivantes: le 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH). L'émission de fluorescence de cette sonde en milieu hydrophobe présente un rendement quantique élevé. Elle est par contre peu fluorescente en solution aqueuse. Cette molécule s'incorpore facilement dans les membranes et le marquage est stable. Cependant, la localisation exacte du DPH dans les structures

lipidiques n'est pas bien définie. On peut uniquement supposer qu'il se localise dans les régions hydrocarbonées .



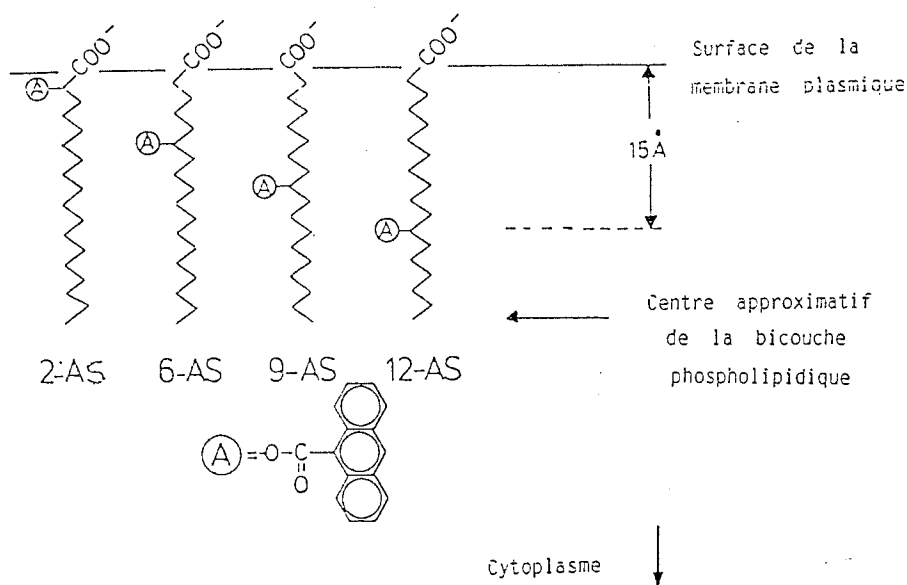
L'autre sonde utilisée est le triméthylammoniumdiphénylhexatriène (TMA-DPH) . Elle se localise au niveau des têtes polaires des phospholipides contrairement au DPH, et pénètre beaucoup plus lentement à l'intérieur des cellules. C'est un marqueur plus sélectif de la membrane.



D'autres marqueurs ont l'avantage sur les précédents d'avoir une position plus définie dans les membranes. En effet, les acides gras fluorescents présentent un chromophore qui peut être greffé sur différents carbones de la chaîne d'acide gras.

Nous avons utilisé des acides n-(-9-anthroyloxy) stéariques avec n=6 ou n=12, qui sont appelés 6-AS ou 12-AS selon la position du chromophore sur le 6^{ème} et 12^{ème} carbone de la chaîne acyle. Ces sondes peuvent explorer des régions différentes de la

membrane, superficielles pour le 6-AS et plus profondes pour le 12-AS (Thulborn et al, 1979).



III.4) Protocole

III.4.1) Appareillage

Les mesures sont effectuées sur un appareil de polarisation de fluorescence en excitation continue, (Fluofluidimètre, Régulest Florange, France). La longueur d'onde d'excitation (365 nm) est sélectionnée par un filtre interférentiel. L'émission est mesurée à travers un filtre à bande passante centré sur 420 nm pour le DPH et le TMA-DPH, et 450 nm pour l'étude avec les acides stéariques fluorescents. Ces caractéristiques pour les acides stéariques permettent une élimination partielle de l'effet inhibiteur de l'hémoglobine et autorisent des mesures sur des hématies intactes.

III.4.2) Réactifs

Les acides n-(-9-anthroyloxy) stéariques n=6 et n=12 (Molecular Probes, Eugene city, Or, USA) sont dissous dans de l'éthanol à la concentration de $2 \cdot 10^{-3}$ M. Ces solutions sont stockées à l'obscurité à -20°C et renouvelées tout les 15 jours.

Le DPH (Aldrich, Strasbourg, France) et le TMA-DPH (Molecular Probes, Eugene city, Or, USA) sont dissous respectivement dans du tétrahydrofurane et du N-N-dimethyl formamide à la concentration de $2 \cdot 10^{-3}$ M. Les solutions sont stockées à l'obscurité, à 4°C et renouvelées toutes les 2 semaines.

III.4.3) Marquage des hématies avec les sondes fluorescentes

a) Tampon phosphate (PBS):	NaCl: 137mM.
	KCl: 2,7mM.
	Na_2HPO_4 6mM.
	KH_2PO_4 : 1,5mM.
	Glucose: 5mM.

b) Marquages des hématies intactes avec les acides stéariques.

Le sang est préalablement lavé dans une solution de NaCl à 0,9 %, puis resuspendu dans du tampon PBS.

A 3 ml de suspension cellulaire (9 à $10 \cdot 10^6$ cellules), sont ajoutés 3 μl de la solution de sonde fluorescente. Les échantillons marqués sont ensuite incubés 30 min à l'obscurité et à 37°C .

Les acides n-(-9-anthroyloxy) stéariques étant fluorescents en milieu aqueux, les déterminations de polarisation de fluorescence sont faites après un lavage supplémentaire, afin d'éliminer les molécules de marqueur libres dans la suspension. Le surnageant est éliminé après une centrifugation de 10 min à 300 g et les cellules resuspendues dans 3 ml de PBS avant d'effectuer les mesures à 25°C .

c) Marquages des membranes érythrocytaires avec le DPH et le TMA-DPH.

Les suspensions des membranes d'érythrocytes sont ajustées à une concentration de 50 µg de protéines par ml.

Pour le marquage, 0,5 µl de solution de marqueur sont ajoutées par ml de suspension membranaire, pour obtenir une dilution finale du marqueur à 10^{-6} M. L'incubation se fait à 37°C à l'obscurité et les durées sont de 15 min pour le TMA-DPH et de 30 min pour le DPH. Les mesures d'anisotropies sont ensuite effectuées à 25°C.

IV) CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

IV.1) Intérêt

La CLHP est une technique chromatographique qui permet la séparation d'un mélange d'espèces chimiques variables.

Les avantages de la CLHP sont sa rapidité, sa précision ainsi que les possibilités de son application à un large éventail de produits.

En CLHP, la phase mobile est liquide, et présente donc l'avantage de séparer bien plus de composés que la chromatographie gazeuse où le paramètre de volatilité requis représente un caractère limitatif.

Les deux phases du système, la phase liquide mobile et la phase stationnaire solide sont confinées dans un même espace. Le débit de la phase mobile peut être contrôlé et la pression générée.

L'échantillon élué de la colonne est directement détecté par un système branché en série. Ceci représente un avantage par rapport aux autres méthodes de chromatographies liquides telles que la couche mince qui requiert des étapes supplémentaires de révélation, de détection et éventuellement de dosage. Ceci nous amène au troisième avantage qui est la quantification directe.

IV.2) Composition du système chromatographique

Le système chromatographique est constitué d'une pompe permettant de délivrer un flux de solvant uniforme, d'une boucle d'injection dans laquelle on introduit l'échantillon, d'une colonne permettant la séparation, d'un détecteur pour l'identification des composés séparés et d'un système d'acquisition et de traitement des données.

IV.3) Difficultés de la séparation des phospholipides

Les lipides sont séparés en lipides non polaires comme les esters d'acides gras, les triglycérides et le cholestérol. Les classes majeures de lipides polaires sont les cérebrosides, les sphingolipides et les phospholipides.

La caractérisation des phospholipides par CLHP est très difficile à cause de leur caractère amphiphatique. Ils sont constitués d'une part par une moitié non polaire, le phosphate de diacylglycérol, couplé à des groupements allant du simple H^- à l'inositol-4,5-diphosphate, l'éthanolamine, la sérine ou la choline. Ces groupement séparent d'ailleurs les phospholipides en espèces différentes, leur conférant des charges et des propriétés chimiques différentes.

Grâce à la présence de longues chaines hydrocarbonées et de groupements esters faiblement polaires, les lipides présentent de nombreuses propriétés comme celles d'être extraits par les solvants organiques et d'être très solubles dans le chloroforme. En revanche, leur détection est difficile car ils ne présentent qu'un chromophore faible, le groupement ester.

IV.4) Choix de la colonne et du mode chromatographique

La chromatographie des phospholipides peut être mieux réalisée sur colonne de silice simple ou greffée polaire. La séparation se fait par simple adsorption sur gel de silice.

Les molécules de soluté (S) vont venir s'adsorber sur le support -la silice- pour ensuite entrer en compétition avec les molécules de la phase mobile (M) provoquant un processus d'adsorption/désorption à la surface de l'adsorbant.

Le temps de rétention d'un soluté dépend de cette compétition entre le soluté et la phase mobile.

IV.5) Choix du solvant

Etant donné leur faible caractère polaire, l'analyse des phospholipides requiert l'utilisation de solvants, d'additifs ou de modérateurs qui aient une large faculté de se polariser. De plus, les différentes classes se situent dans un large intervalle de polarité nécessitant l'utilisation de gradients d'élution constitués de différents solvants.

Pour la séparation de lipides non polaires, la phase initiale est constituée de chloroforme, suivie par un gradient formé d'un mélange de méthanol, d'eau et d'ammoniaque, permettant la séparation de lipides plus polaires.

L'eau est la composante la plus importante dans la séparation des phospholipides, l'augmentation progressive de la teneur en eau de la phase mobile augmente sa polarité et permet la séparation de produits de plus en plus polaires.

Les phospholipides sont divisés en trois catégories selon leur comportement:

a) Les phospholipides à groupement choline: l'eau est essentielle pour l'élution de ces produits, le méthanol les retarde.

b) Les phospholipides contenant des groupements hydroxyles: ils se comportent selon un mode d'adsorption normal. Le méthanol accélère leur élution et l'eau intervient plus sur la forme du pic que sur le temps de rétention.

L'ordre d'élution dépend fortement du nombre de groupements hydroxyles. Le groupement phosphate par contre ne participe apparemment que très modérément à la force d'adsorption.

c) Le troisième groupe présente des propriétés intermédiaires: il est constitué de phospholipides contenant des groupements amines, ces derniers semblant plus efficaces à s'adsorber que les groupements hydroxyles.

L'ammoniaque est utilisé comme contre-ion. Il augmente la résolution de phospholipides contenant des groupements ionisables et ceci en améliorant non seulement

la vitesse de séparation mais aussi le mécanisme de rétention des phospholipides. L'ajout d'une base compétitive à faible concentration permet également d'améliorer la symétrie des pics. La séparation de la PS du PI devient également plus aisée.

Dans ces conditions, les profils d'élutions obtenus sont représentés par un premier groupe de pics contenant les triglycérides résiduels, le cholestérol et les autres lipides neutres. Le deuxième groupe de pics contient quant à lui les phospholipides et probablement d'autres lipides polaires.

L'ordre d'élution des phospholipides est défini comme suit: PE, PI, PS, PC, puis SM.

Le problème de l'optimisation des paramètres d'élution des phospholipides sur des colonnes d'adsorption est compliqué. Des phospholipides présentant de petites variations au niveau de la longueur des chaînes d'acides gras ou de leur degré d'insaturation ne sont séparés que partiellement et souvent présentent des épaulements. Ainsi, on peut rencontrer des pics multiples pour la PE et la PC dus à des différences dans les espèces d'acides gras. C'est également le cas pour la SM du globule rouge humain qui est ainsi éluee en deux pics, ce phénomène étant du à la présence de grandes différences dans les longueurs des acides gras

IV.6) Choix du détecteur

Les lipides ne contiennent pas de pics spécifiques d'absorption. Néanmoins, grâce à la présence de centres insaturés et de groupements fonctionnels tels que les groupements carbonyle, carboxyle, phosphate, amine ou amine quaternaire, ils sont capables d'absorber à 203-214 nm. Ces longueurs d'onde se situent dans des régions où la sensibilité des détecteurs est très faible.

De plus, l'analyse des phospholipides requière l'utilisation de solvants qui ne sont pas transparents à ces longueurs d'ondes. L'eau, le propanol, l'hexane et l'acétonitrile restent utilisables vu leur faible absorption. En revanche, l'emploi du chloroforme, du

benzène ou de l'acétone devient impossible. Une dernière difficulté vient du fait que la séparation des phospholipides se fait par gradient, ce qui génère une grande dérive de la ligne de base.

Au vu de ces éléments, le choix d'un détecteur à diffusion de lumière paraît tout à fait indiqué.

Les détecteurs à diffusion de lumière:

Ils sont appelés parfois détecteurs de masse. Leur principe de fonctionnement repose sur une nébulisation de l'éluant chromatographique par voie pneumatique (air ou azote), suivie d'une évaporation des solvants et d'un entraînement dans une chambre optique de mesure des solutés moins volatiles sous forme de particules de faible dimension. La quantité de lumière diffusée par ces fines particules traversant la radiation lumineuse est proportionnelle à la masse de soluté injectée. Comme les solvants sont évaporés, seule une phase vapeur traverse le faisceau optique sans donner de signal de diffusion et de ce fait les gradients d'élution (éluants aqueux tamponnés-solvants organiques) sont utilisables sans provoquer de dérive de ligne de base.

Les inconvénients majeurs souvent mentionnés pour ce genre de détecteurs résident dans leur consommation élevée en gaz et leur domaine étroit de réponse linéaire en fonction de la concentration.

IV.7) Appareillage utilisé

La séparation des phospholipides a été effectuée avec un système HPLC Gold, (Beckmann, Palo Alto, Ca, USA), équipé de plusieurs modules: une pompe 126, un détecteur 166, et un module d'interface permettant la compatibilité avec le détecteur à diffusion de lumière. Tous ces modules sont programmables. Le système Gold est relié à un moniteur IBM équipé d'un logiciel d'analyses Gold.

Le détecteur utilisé est un modèle DDL 21 (Eurosep Instruments, Cergy Pontoise, France).

Les séparations ont été effectuées en phase normale, sur une colonne en gel de silice contenant des particules de 5 µm de diamètre (Lichrosob Silica gel Si 60, 5 µm , 4 x 250 mm, Merck-Clévenot, Nogent sur Marne, France).

IV.8) Réactifs

IV.8.1) Standards

La calibration du détecteur a été effectuée avec des concentrations différentes de lipides standards (Sigma, Saint Louis, MO. USA) se situant dans le domaine de linéarité du détecteur.

L-α- Phosphatidyléthanolamine (réf P 7523)

L-α- Phosphatidylinositol (réf P 2517).

L-α- Phosphatidyl-L-sérine (réf P 8518).

L-α- Phosphatidylcholine (réf P 6638).

Sphingomyéline. (réf S 7004)

L-α- Lysophosphatidylcholine (réf L 4129)

La lysophosphatidylcholine a constitué par ailleurs notre standard interne.

Les standards lipidiques sont conservés dans du chloroforme en présence d'un antioxydant le 2,6-Di-butyl-p-cresol (BHT) 5mg/100ml, (Sigma. Saint Louis. MO. USA).à -20°C

Les extraits lipidiques sont séparés également en présence de BHT, 5mg/100ml.

VI.8.2) Solvants

Méthanol: (Prolabo, réf 20865. 297).

Chloroforme: (Prolabo, réf 22716.321).

Ammoniaque: (Prolabo, réf 21188.29).

IV.9) Protocole

IV.9.1) Préparation des échantillons

Avant l'extraction, 100 µg de lysophosphatidylcholine pour 1 mg de protéines sont ajoutés à la suspension membranaire. Les lipides sont extraits en présence d'un antioxydant (BHT), selon la méthode de Rose et Oklander décrite précédemment. Après évaporation, le résidu lipidique est resuspendu dans du chloroforme, puis filtré sur un filtre Whatmann 0,45 µm avant d'être injecté dans la colonne. La réponse du détecteur étant très différente d'un phospholipide à l'autre, deux dilutions différentes ont été déterminées afin d'obtenir une résolution et une quantification optimales des pics de phospholipides. Une première injection correspondant à 100 µg de protéines est d'abord effectuée et permet la quantification des phospholipides PS, PC, et SM. Une seconde est faite ensuite avec une dilution au 1/10 en vue de la quantification de la PE. Les volumes d'injections sont de 100 µl.

IV.9.2) Séparation des phospholipides

Nous avons utilisé un protocole de séparation par gradient inspiré de la méthode de Stolyhwo et Martin (1987), utilisant dans la phase A 100% de chloroforme et dans la phase B un mélange de méthanol, eau, ammoniaque, et chloroforme (92:5:2:1, v/v). Les solvants sont filtrés sur un filtre 0,45 µm avant utilisation.

Le profil du gradient est défini par les paramètres suivants:

Temps	Solvant A	Solvant B	Débit ml/min
0 min	100%	0%	1,5
10 min	20%	80%	1
20 min	0%	100%	1,5
30 min	0%	100%	1,5
35 min	100%	0%	1
45 min	100%	0%	1,5

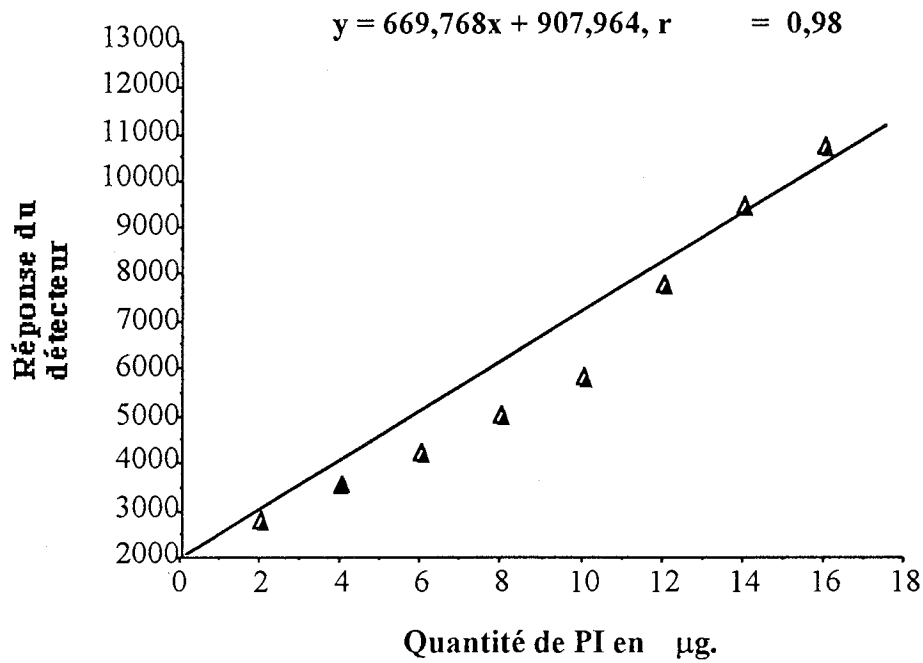
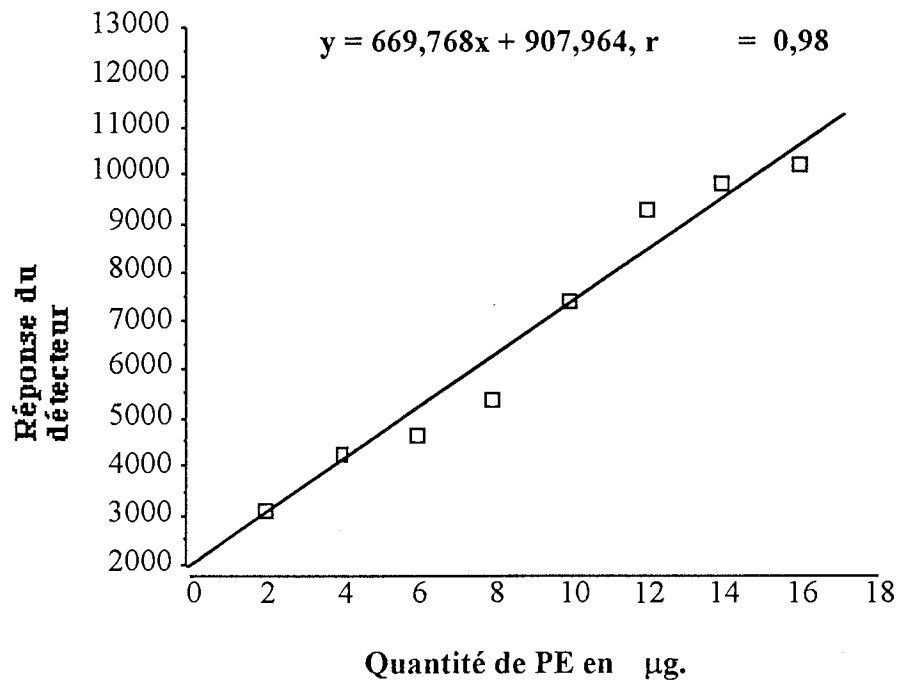
IV.8.3) Détection des phospholipides

La température de nébulisation du solvant et des particules séparées a été fixée à 80°C, et la pression d'air à 1,5 bar. Ces conditions ont été déterminées dans des essais préliminaires comme correspondant à la réponse optimale du détecteur.

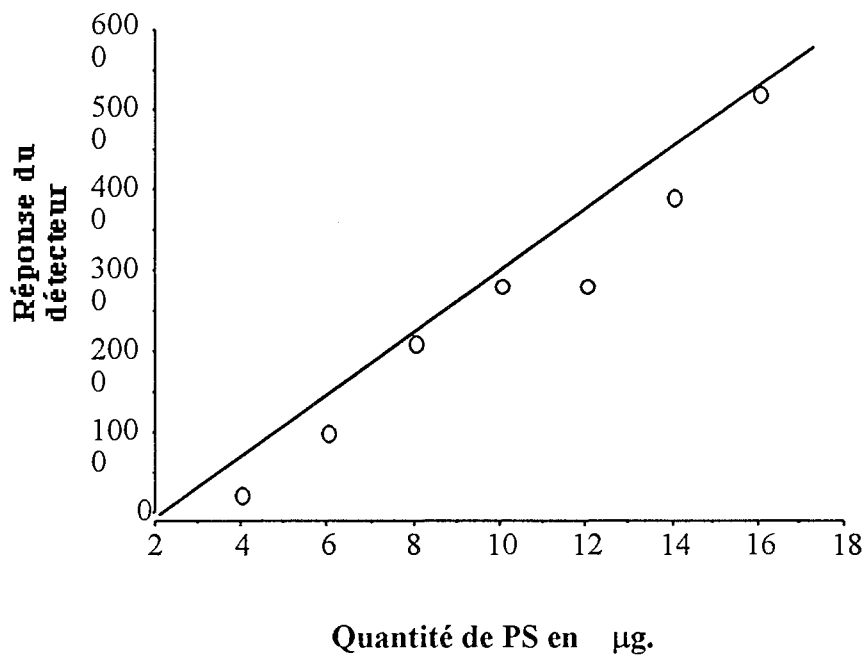
Des essais préliminaires pour la détermination des domaines de linéarité du détecteur ont également été réalisés pour les différents phospholipides.

Des calibrations de l'appareil sont régulièrement effectuées avec différentes concentrations de phospholipides et des contrôles sur 2 ou 3 points sont par ailleurs réalisés avant toute série d'injections.

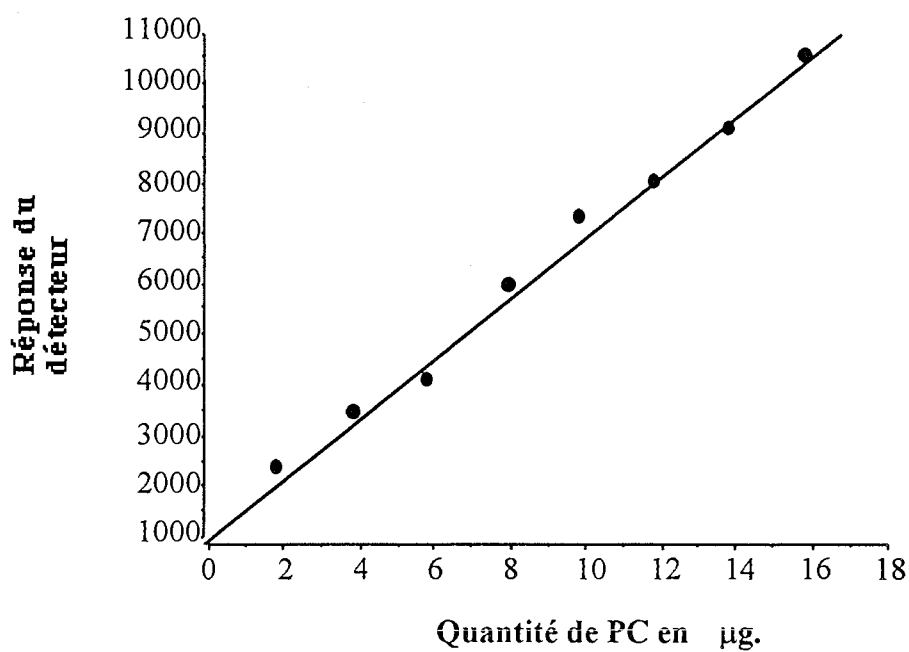
COURBRES DE CALIBRATIONS DES DIFFERENTS PHOSPHOLIPIDES.

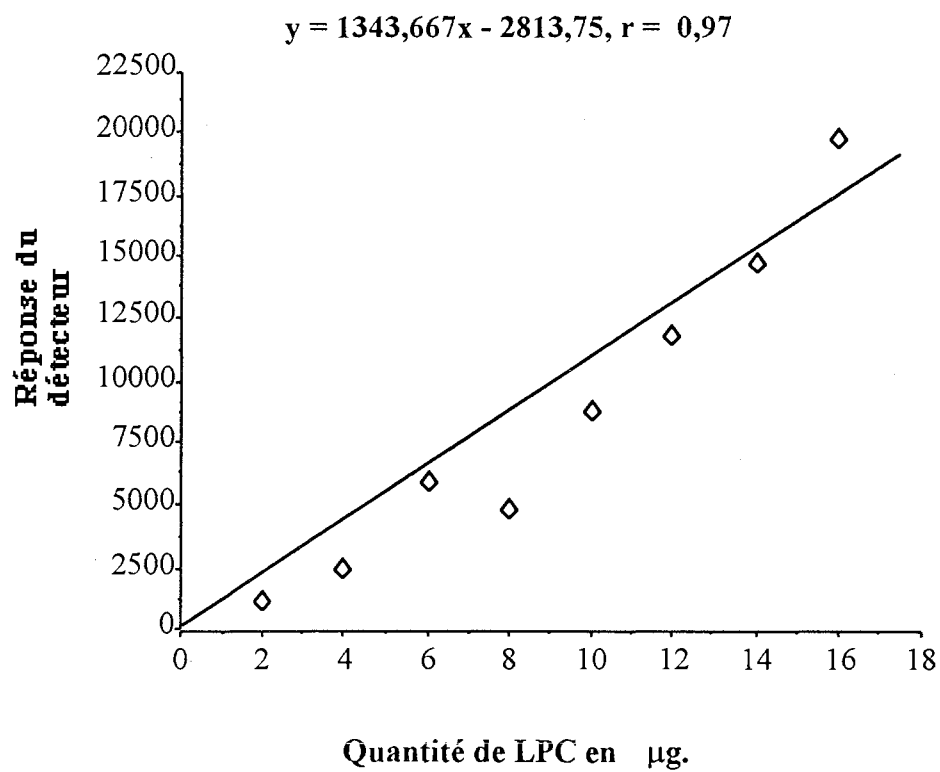
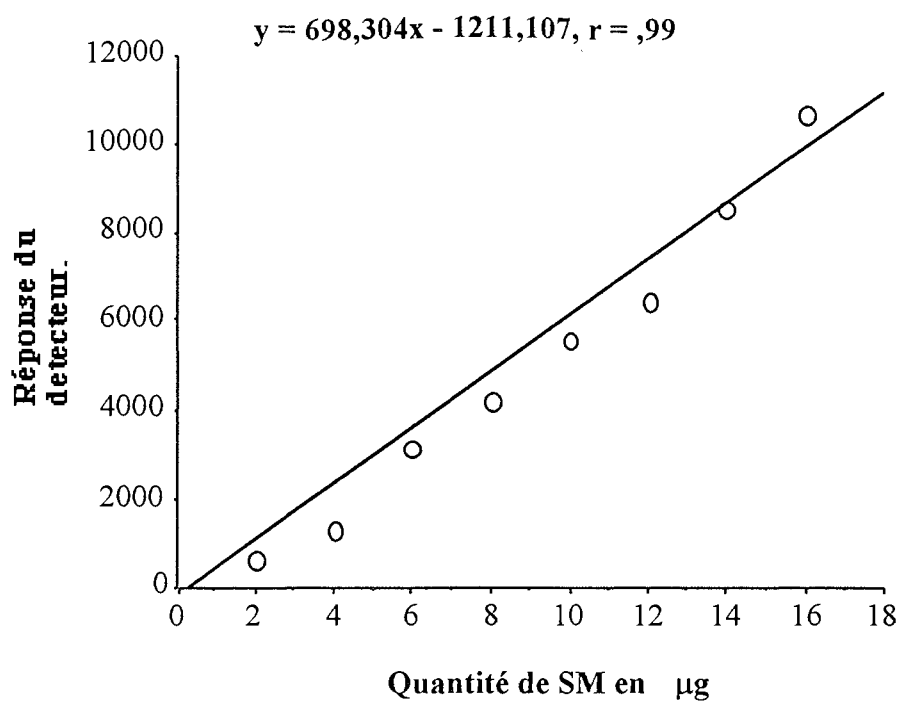


$$y = 382,018x - 1054,321; r = 0,98$$

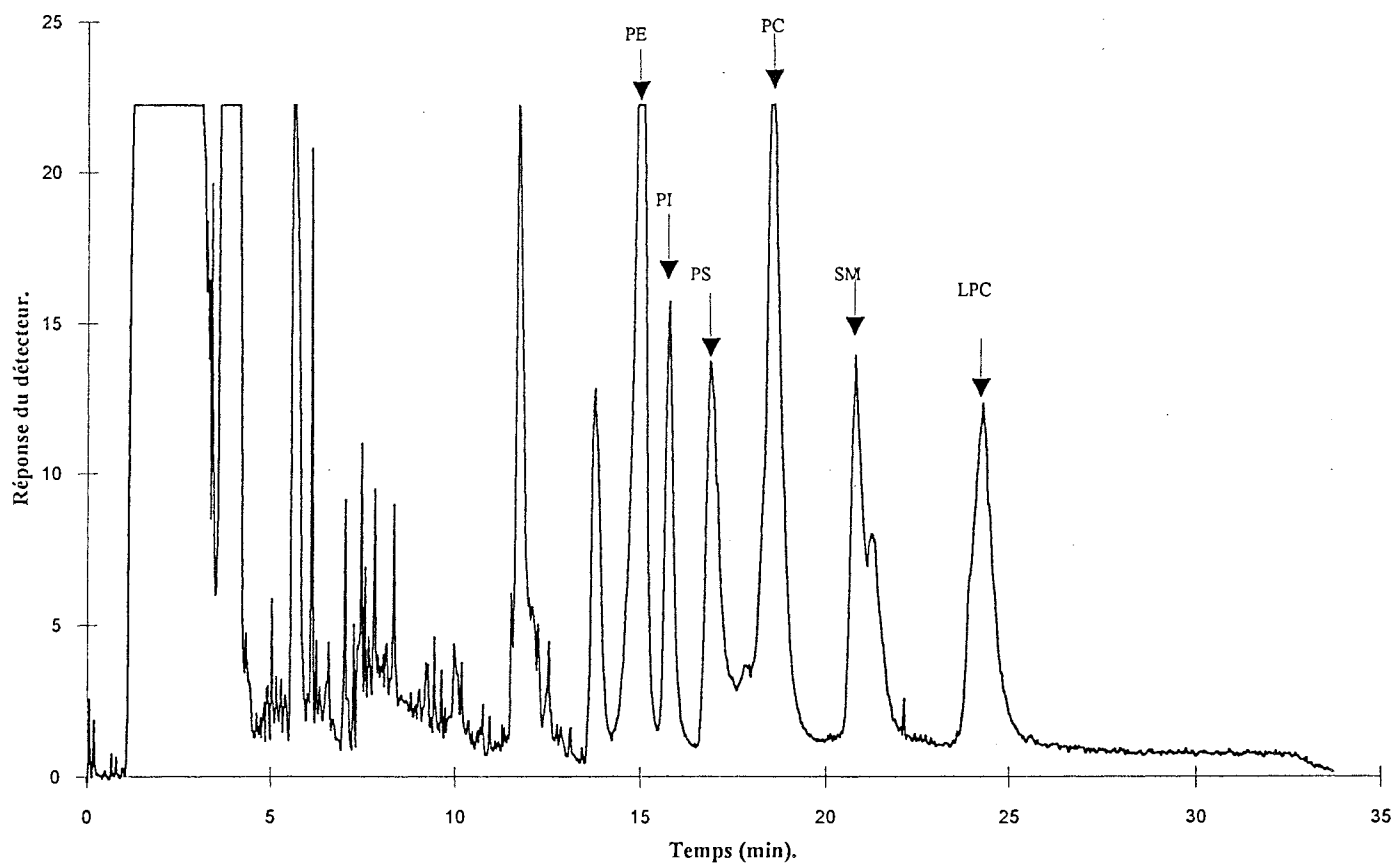
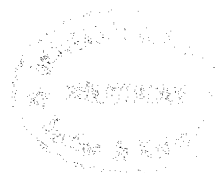


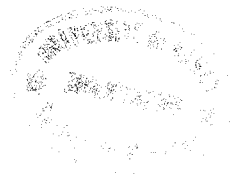
$$y = 649,708x + 129,25; r = 0,99$$





Profil de séparation par CLHP des classes majeures de phospholipides

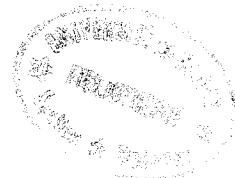




V) TESTS STATISTIQUES.

- Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel de statistiques *StatView®*.
- Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ erreur standard.
- Les différences ont été retenues comme étant significatives à partir de $p < 0,05$.
- La normalité de la distribution des valeurs au seins des groupes a été testée par un test d'aplatissement et asymétrie.
- La comparaison entre deux groupes a été effectuée par un test t.
- La comparaison entre plusieurs groupes a été effectuée par un test de Kruskal-Wallis, et la comparaison deux par deux par le test de Mann-Whitney.
- Le test de Student a été utilisé pour la comparaison des groupes appariés avant et après intraction avec le β -OH.
- Les tests de régressions linéaires ont permis de rechercher les corrélations entre les différents paramètres.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES.



. Allam S. Q., Alam B. S., Ren Y. F.

Adenylate cyclase activity, membrane fluidity and fatty acid composition of heart in essential fatty acid deficiency.

J Mol Cell Cardiol., 19: 465-475, 1987.

. Allam S. Q.

Effect of essential fatty acid deficiency on acyl group, membrane fluidity and adenylate cyclase activity in plasma membrane of rat mandibular salivary glands.

J. Nutr., 116: 1620-1630, 1986.

. Andre J. C., Bouchy M., Donner.

On diffusion in organized assemblies and in biological membranes.

Biorheology, 24: 237-272, 1987.

. Arduini A., Stern A., Storto S., Belfiglio M., Mancinelli G., Scurti R., Federeci G.

Effect of oxidatif stress on membrane phospholipid and protein organization in human erythrocytes.

Arch Biochem Biophys., 273: 112-120, 1989.

. Arnold R. S., Newton A. C.

Inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase by sphingosine.

Biochemistry, 30: 7747-7754, 1991.

. Axelrod L., Levine L.

Plasma prostaglandin level in rat with diabetes mellitus and diabetic ketoacidosis.

Diabetes, 31: 994-1001, 1982.

. Bahsen M., Burrin J. M., Johnston D. J., Pernet A., Walker M., Alberti K. G. M. M.

Mechanism of catecholamine effects on ketogenesis.

Amer J Physiol., 247: E173-E180, 1984.

. Baldini P., incerpi S., Lambert-Gardini S., Spinedi A.

Membrane lipid alterations and Na⁺-pumping activity in rythrocytes from IDDM and NIDDM patients.

Diabetes, 38: 825-831, 1989.

. Barenholz Y., Thompson T. E.

Sphingomyelins in bilayers and biological membranes.
Biochim Biophys Acta, 604:129-158, 1980.

. Barenholz Y., Gatt S.

Dans : Phospholipids (*Hawthorne J. N., Ansell G. B. eds.*),
Ch. 4; `Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982.

. Beck-Nielsen H., Pedersen O., Lindskov H. O.

Impaired cellular insulin binding and insulin sensitivity induced by high-fructose feeding in normal subjects.
Am J Clin Nutr; 33:273-278, 1980.

Beguino F., Tramontano D., Duilio C., Formisano S., Beguino L., Mattioli P., Mancini M., Aloj S. M.

Alteration of erythrocyte membrane lipid fluidity in human obesity.
J Clin Endocrinol Meta; 60: 1226-1230, 1986.

. Begin-Heick N.

Liver β -adrenergic receptors, G proteins, and adenyl cyclase activity in obesity-diabetes syndromes.
Amer Physiol Soc; 363: C1664-C1672, 1994.

. Berlin E., Bhathena S.J., Judd J.T., Nair P.P., Jones D.Y., Taylor P.R.

Dietary fat and hormonal effects on erythrocytes membrane fluidity and lipid composition in adult women.
Metabolism, 38 n° 8:790-796, 1989.

. Berridge M. J.

Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers.
Biochem J; 220: 345-360, 1984.

. Beutler B., Cerami A.

The biology of cachexin/TNF α primary mediator of the host response.
Annu Re. Immunol; 7 : 625-655, 1989.

. Bing R. F., Haegerty A. M., Thurston H., Swales J. D.

Ion transport in hypertension: are changes in the cell membrane responsible ?
Clin Sci; 71: 225-230, 1986.

. Birlouez-Aragon I., Scalbert-Menanteau P., Morawiec M., Shafieezadeh M.
Evidence for relationship between protein glycation and red cell membrane fluidity.
Biochem Biophys Res Comm., 170: 1107-1113, 1990.

. Boivin P.
Interactions moléculaires des protéines de la membrane et déformabilité érythrocytaire.
Path Biol., 32: 717-735, 1984.(a)

. Boivin P.
Membrane érythrocytaire: structure protéique normale et pathologie constitutionnelle.
Progrès en Hématologie, 6: 3-49, 1984.(b)

. Bollag G. E., Roth R. A., Beaudoin J., Mochly- Rosen D., Koshland D.E. Jr.
Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity.
Proc Nat Acad. Sc; 83: 5822-5824, 1986.

. Borkman M., Storlien L.H, Pan D.A., Jenkins A.B., Chisholm D.J., Campbell L.V.
The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids.
N Engl J Med ; 28: 238-244, 1993.

. Brenner R. R.
Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acid.
Prog Lip Res; 18: 41-47, 1981.

. Bruneau C., Hubert P., Waksman A., Beck J.P., Staedel-Flaig C.
Modifications of cellular lipids induce insulin resistance in cultured hepatoma cells.
Biochim Biophys Acta, 928:297-304, 1987 (a)

. Bruneau C., Staedel-Flaig C., Crémel G., Leray C., Beck J.P., Hubert P.
Influence of lipid environment on insulin binding in cultured hepatoma cells.
Biochim Biophys Acta, 928:287-296, 1987 (b)

. Bryszewska M., Leyko W.
Effect of insulin on human erythrocyte membrane fluidity in diabetes mellitus.
Diabetologia, 24:311-313, 1983

. Bryszewska M., Watala C., Torzecka W.

Changes in fluidity and composition of erythrocyte membranes and in composition of plasma lipids in type I diabetes.

Brit J Haemat., 62 : 111-116, 1986.

. Burack R. W., Biltonen R. L.

Lipid bilayer heterogeneities and modulation of phospholipase A2 activity.

Chem Phys Lipids, 73: 209-222, 1994.

. Burch R. M., Luini A., Axelrod J.

Phospholipase A2 and phospholipase C are activated by distinct GTP-binding proteins in response to α_1 -adrenergic stimulation in FRTL5 thyroid cells.

Proc Nat Acad Sci., 83: 7201-7205, 1986.

. Cabrero C., Merida I., Ortiz P., Mato J. M.

Effect of alloxan on S-adenosylmethionine metabolism in rat liver.

Biochem Pharmacol., 35: 2261-2264, 1986.

. Caimi G., Catania A., D'Asaro S., Serra A., Catalano C., Bono A., Sarno A.

Red cell phospholipids and membrane microviscosity in diabetics.

Clinical Hemorheol., 8 : 939-944, 1988.

Caimi G., Lo Presti R., Serra A., Catania A., D'Asaro S., Verga S., Buscemi S., Sarno A.

Rheological determinants and red cell lipidic pattern in essential obesity, in obese subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) and in obese subjects with impaired glucose tolerance (IGT).

Microcirc-Endothelium-Lymphatics, 7:293-302, 1991

. Candiloros H., Zeghari N., Muller S., Donner M., Drouin P., Ziegler O.

Decreased membrane fluidity in poorly controlled insulin dependent diabetes mellitus: role of ketone bodies.

Diabetes Care, 1995, *sous presse.*

. Cerione R. A.

Reconstitution of receptor / GTP-binding protein interactions.

Biochim Biophys Acta, 1071: 473-501, 1991.

- . **Chabanel A., Flamm M. , Sung K. L. P., Lee M. M., Schachter D., Chien S.**
Influence of the cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity.
Biophys J. , 44: 171-176, 1983.
- . **Chiappe De Cingolani G. E.**
Phospholipid methyltransferase activity in diabetic rat fat cells: effect of isoproterenol and insulin.
Mol Cell Biochem., 115: 97-103, 1992.
- . **Ciancarelli-Tozzi M.G., Tozzi E., Di Giulio A., D'Alfonso A., Troiani-Sevi E., De Matteis F, Oratore A.**
Properties of erythrocyte membrane in obese children.
Cell Mol Biol., 33:355-362, 1988.
- . **Cignarelli M., Blonda M., Cospite M.R., Damato A., Nardelli G., Giorgino R.**
Alteration of erythrocyte lipid pattern and of some membrane related functions as consequence of plasma lipid disorder in diabetes mellitus.
Diabète Métab., 9: 272-276, 1983.
- . **Cohen C.**
M.The role of band 4.1 in the association of actin with erythrocyte membrane.
Biochemistry, 23: 4488-4495, 1984.
- . **Cooper R. A.**
Lipids of human red cell membrane: normal composition and variability in disease.
Sem Hematol., 7, 296-319, 1970.
- . **Cooper R .A.**
Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease.
N Engl J Med., 297 : 371-377, 1977.
- . **Cooper D. R., Hernandz H., Kuo J. Y., Farese R.V..**
Insulin increases the synthesis of phospholipid and diacylglycerol and protein kinases C activity in rat hepatocytes.
Archiv Biochem Biophys., 276: 486-494, 1990.
- . **Cornelius P., Marlow M., Pekala P. H.**
Monokine regulation of glucose transporter mRNA in L6 myotubes.
Biochem Biophys Res Commun., 165: 429-436, 1989.

. Coscia C. J., Belcheva M., Gao X. M., Chuang D.M.

Effect of up-regulation on delta opioid receptor GTP sensitivity and distribution in subcellular compartments.

Prog Clin Biol Res., 328: 157-160, 1990.

. Craig A., Goodman D. B. P., Rasmussen H.

Definition of pathway of the membrane phospholipid fatty acid turnover in human erythrocytes.

J Lipid Res., 21: 292-299, 1980.

Cremel G., Barlier S., Bruneau C., Burgun C., Filliol D., Hubert P., Leray V., Staedel C.

Effet du microenvironnement lipidique sur les fonctions membranaires.

Dans : *Biomembranes et Nutrition* , 1989, 195: pp 177-186.

. Cynamon H. A., Isenberg J. N., Nguyen C. H.

A rapid method for erythrocyte membrane phospholipids determination.

Clin Chim Acta, 144: 65-70, 1984.

. Dawson M.C., Hemington N., Irvine R.F.

The inhibition of diacylglycerol-stimulated intracellular phospholipases by phospholipids with a phosphocholine-containing polar group.

Biochem J., 230:61-68, 1985.

. De Fronzo R. A.

Insulin resistance, hyperinsulinemia, and coronary disease: a complex metabolic web.

Curr Science, 11-25, 1992.

. De Fronzo R. A., Ferrannini E.

Insulin Resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dislipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease.

Diabetes Care, 14: 173-194. 1991.

. Del Prato.S.

Hyperinsulinémie. Causes et mécanismes.

Presse Médicale, 21: 1312-1317, 1992.

. De Luise M., Blackburn G.L., Flier J.S.

Reduced activity of the red-cell sodium-potassium pump in human obesity.
N Engl J Med., 303:1017-1022, 1980

. Devaux P. F., Zachowski A., Favre E., Fellman P., Cribier S., Gelgwerth D., Herve P., Seigneuret M.

Translocation énergie dépendante des amino-phospholipides dans la membrane des globules rouges.
Biochimie, 68: 383-393, 1986.

. Donner M., Stoltz J. F.

Fluorescence polarisation applied to cellular microrheology.
Biorheology, 10: 821-827, 1985.

. Dressler K., Mathies S., Kolesnick R. N.

Tumor necrosis factor- α activates the sphingomyelin signal transduction pathway in cell-free system.
Science, 255: 1715-1718, 1992.

. Dutta-Roy A.K., Ray T.K., Sinha A.K.

Control of erythrocyte membrane microviscosity by insulin.
Biochim Biophys Acta, 816:187-190, 1985

. Eder P.S., Soong C.J., Tao M.

Phosphorylation reduces the affinity of protein 4.1 for spectrin.
Biochemistry, 25: 1764-1770, 1988.

. Einchenberger K., Böhni P., Winterhalter K. H., Kawato S., Richter C.

Microsomal lipid peroxidation causes an increase in the order of the membrane lipid domain.
FEBS Lett., 142: 59-62, 1982.

. Engelmann B., Op den Kamp J. A., Roelofsen B.

Replacement of molecular species of phosphatidylcholine: influence on erythrocyte Na transport.
Am J Physiol., 258: C682-C691, 1990.

. Engelmann B., Streich S., Schöthier U. M., Richter W. O., Duhm J.

Changes of membrane phospholipid composition of human erythrocyte in hyperlipidemias. I. Increased phosphatidylcholine and reduced sphingomyelin in patients with elevated levels of triacylglycerol-rich lipoproteins.

Biochim Biophys Acta, 1165: 32-37, 1992.

. Faas H.F., Carter W. J.

Altered fatty acid desaturation and microsomal fatty acid composition in the streptozotocin diabetic rat.

Lipids, 15: 953-961, 1980.

. Farese R. V.

Lipid-derived mediators in insulin action.

Proc Soc Exp Biol Med., 312-324, 1990.

. Farese R. V., Standaert M.L., Barnes D. E., Davis J. S., Pollet R. J.

Phorbol esters provokes insulin like effect on glucose transport, amino acid uptake and pyruvate deshydrogenase activity in BC3H-1 cultured myocytes.

Endocrinology, 116: 2650-2655, 1985.

. Farias R., Bloj B., Morero R. D., Sineriz F., Trucco P. E.

Regulation of allosteric membrane-bound enzymes through changes in membrane lipid composition.

Biochim Biophys Acta, 415: 231-251, 1975.

. Farias R. N.

Insulin-membrane interactions and membrane fluidity changes.

Biochim Biophys Acta, 906: 459-468, 1987.

Feingold K. R., Grunfeld C.

Role of cytokine in inducing hyperlipidemia.

Diabetes, 41: 97-101, 1992.

Feinstein R., Kanety H., Papa M.Z., Lunenfeld B.

Tumor necrosis factor- α suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates.

J Biol Chem., 268: 26055-26058, 1993.

. Ferretti G., Curatola G., Bertoli E., Catassi C., Giorgi P.L.

Erythrocyte membrane fluidity and changes in plasma lipid composition : a possible relationship in childhood obesity.

Biochem Med Metab Biol., 46:1-9, 1991.

. Field C.J., Ryan E.A., Thompson A.B.R., Clandinin M.T.

Dietary fat and the diabetic state alter insulin binding and the fatty acyl composition of adipocyte plasma membrane.

Biochem J., 253: 417-424, 1988.

. Field C.J., Ryan E.A., Thomson A.B.R., Clandinin M.T.

Diet fat composition alters membrane phospholipid composition, insulin binding, and glucose metabolism in adipocytes from control and diabetic animals.

J Biol Chem., 265:11143-11150, 1990.

. Finotti P., Palatini P.

Reduction of erythrocyte (Na^+ , K^+) ATPase activity in type I (insulin-dependent) diabetic subjects and its activation by homologous plasma.

Diabetologia, 29: 623-628, 1986.

. Flemming J.W., Klinberg D., Gabig T.G., Boswell H.S.

Restauration of adenylate cyclase responsiveness in murine myeloid leukemia permits inhibition of proliferation by hormone. Butyrate augments catalytic activity of adenylate cyclase.

Blood, 71: 1003-1011, 1988.

. Folch J., Lees M., Stanley G.H.

A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.

J Biol Chem., 226: 497-509, 1957.

. Forte T.M., Bielicki J.K., Goth-Golstein R., Selmek J., McCall A.

Recruitment of cell phospholipids and cholesterol by apolipoproteins A-II and A-I: formation of nascent apolipoprotein-specific HDL that differ in size, phospholipid composition, and reactivity with LCAT.

J Lipid Res., 36: 148-157, 1995.

. Freisleben H.J., Pukert S., Wiernsperger N., Zimmer G.

The effect of glucose, insulin and metformin on the order parameters of isolated red cell membranes.

Biochem Pharmacol., 43: 1185-1195, 1992.

. Freyburger G., Gin H., Dousseau F., Lorient-Roudeau M. F., Boisseau M. R.

Erythrocyte membrane fluidity in diabetics : fluorescence measurement and rheological analysis.

Clinical Hemorheol., 8 : 159-164, 1988.

. Freyburger G., Gin H., Heape A., Juguelin H., Boisseau M. R., Cassagne C.

Phospholipid and fatty acid composition of erythrocytes in type I and type II diabetes.

Metabolism, 38 : 673-678, 1989.

. Galster A.D., Clutter W.E., Cryer P.E., Collins J.A., Bier D.M.

Epinephrin plasma threshold for lipolytic effect in man: measurments of fatty acid transport with (1-¹³C) palmitic acid.

J Clin Invest., 67: 1729-1738, 1981.

Garay R.P., Dagher G., Pernollet M.G., Devynk M.A., Meyer P.

Inherited defect in Na⁺,K⁺-co-transport system in erythrocytes from essential hypertensive patients.

Nature, 284: 281-283, 1980.

.Garnier M., Attali J.R., Valensi P., Delatour-Hanss E., Gaudoy F., Koutsouris D.

Erythrocyte deformability in diabetes and erythrocyte membrane lipid composition.

Metabolism, 39 : 794-798, 1990.

. Garvey W.T., Birnbaum M.J.

: Cellular insulin action and insulin resistance.

Baillière's Clin Endocrinol Met., 7:785-873, 1993.

. Ginsberg B.H., Brown T.J., Simon I., Spector A.A.

Effect of the membrane lipid environment on the properties of insulin receptors.

Diabetes, 30:773-781, 1981.

. Ginsberg B.H., Jabour J., Spector A.A.

Effect of alterations in membrane lipid unsaturation on the properties of the insulin receptor of Ehrlich ascites cells.

Biochim Biophys Acta, 690:157-164, 1982.

Girard J., Perdereau D., Foufelle F., Prip-Buus C.

Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones

FASEB J., 8: 36- 42, 1994.

. Gold J.C., Phillips M.C.

Effect of membrane lipid composition on the kinetics of the cholesterol exchange between lipoprotein and different species of red blood cells.

Biochim Biophys Acta, 1027: 85-92, 1990.

. Goldberg R. B.

Lipid disorders in diabetes.

Diabetes Care, 4 : 561-572, 1981.

. Guerci B., Ziegler O., Drouin P.

Hyperlipidemia in diabetes recent developments.

Presse Medicale, 23: 82-88, 1994.

Grunfeld C., Fengold K.R.

The metabolic effects of tumor necrosis factor and other cytokines.

Biotherapy, 3: 143-158, 1991.

. Hagve T.A.

Effects of unsaturated fatty acids on cell membrane functions.

Scand J Clin Lab Invest., 48:381-388, 1988.

. Halestrap P. A., Poole R. C., Cranmer S. L.

Mechanism of regulation of lactate, pyruvate and ketone body transport across the plasma membrane of mammalian cells and their metabolic consequences.

Biochem Soc Trans., 18: 1132-1135, 1990.

Halliwell B., Gutteridge J. M. C., Cross C. E.

Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now?

J Lab Clin Med., 119: 598-620, 1994.

. Hannun Y.A., Loomis C.R., Merrill A.H., Bell R.M.

Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets.

J Biol Chem., 261:12604-12609, 1986.

. Hannun Y.A., Bell R.M.

The sphingomyelin cycle: a prototypic sphingolipid signalling pathway.

Advan Lipid Res., 25: 27-41, 1993.

. Häring H.U.

The insulin receptor: signalling mechanism and contribution to the pathogenesis of insulin resistance.

Diabetologia, 34: 848-861, 1991.

. Hirata F., Axelrod J.

Enzymatic synthesis and rapid translocation of phosphatidylcholine by two methyltransferases in erythrocyte membranes.

Proc Nat Acad Sci., 75: 2348-2352, 1978.

. Hirata F., Strittmatter W.J., Axelrod J.

β -adrenergic receptor agonists increase phospholipid methylation, membrane fluidity, and β -adrenergic receptor-adenylate cyclase coupling.

Proc Nat Acad Sci., 76: 368-372, 1979 (a).

. Hirata F., Corcoran B.A., Venkatasubramanian K., Shiffmann E., Axelrod J.

Chemoattractants stimulate degradation of methylated phospholipids and release of arachidonic acid in rabbit leukocytes.

Proc Nat Acad Sci., 76: 2640-2643, 1979 (b).

. Hirata F., Axelrod J.

Phospholipid methylation and biological signal transmission.

Science, 209: 1082-1090, 1980.

. Hirata F.

Regulation of membrane fluidity by phospholipid methylation. Dans: Membrane fluidity in biology. Vol: 4. *Cellular aspects* (Aloia, R.C. and Boggs, J.M., eds.), Academic Press, New York, 1985. pp: 247-257

. Hofmann C., Lorentz K., Braithwait S. S., Colca J. R., Palazuk B. J., Hotamisligil G. K., Spiegelman B. M.

Altered gene expression for tumor necrosis factor- α and its receptor during drug and dietary modulation of insulin resistance.

Endocrinology, 164 : 264-270, 1993.

. Hotamisligil G. S., Shargil N. S., Spiegelman B. M.

Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role of obesity linked insulin resistance.

Science, 259: 87-91, 1993.

. Hunt V. J., Dean R.T., Wolff S.P.

Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing.

Biochem J., 256: 205-212, 1988.

. Huot S. J., Aronson P. S.

Na⁺, H⁺ exchanger and its role in essential hypertension and diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 14: 522-535, 1991.

. Imai A., Gershengorn M.C.

Evidence for tight coupling of thyrotropin-releasing hormone receptors to stimulated inositol triphosphate formation in rat pituitary cells.

J Biol Chem., 260: 10536-10540, 1985.

. Jain S. K.

Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes.

Biochim Biophys Acta, 937: 205-210, 1988.

. Jain S. K., McVie R., Duett J., Herbst J.

Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes.

Diabetes, 38: 1539- 1543, 1989

. Jain S. K., Levine S.N., Duett J., Hollier B.

Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats.

Metabolism, 9: 971-975, 1990.

. Jelesma C. L., Axelrod J.

Stimulation of phospholipaseA2 activity in bovine rod outer segment by $\beta\gamma$ subunits of transducin and its inhibition by α subunit.

Proc Nat Acad Sci., 84: 3623-3627, 1987.

. Johnston D., Mattews E.R., Melnykovych G.

Glucocorticoid effect on lipid metabolism in HeLa cells: inhibition of cholesterol synthesis and increased sphingomyelin synthesis.

Endocrinology, 1.7: 1482-1488, 1980.

. Jones D. B., Carter R. D., Haitas B., Mann J. I.

Low phospholipid arachidonic acid values in diabetic platelets.

Brit Med J., 286: 173-175, 1983.

. Jones D. B., Jennings P. E., Wakefield A., Winkler J., Lunec J., Barnett A. H.

Increased free-radical products in diabetic microangiopathy (Abstract).

Diabetologia, 29: 554, 1986.

. Jos J., Thévenin M., Dumont G., Beyne P.

Effet du contrôle métabolique sur les lipides plasmatiques dans le diabète insulino-dépendant de l'enfant et de l'adolescent.

Diabète Métab., 11 : 174-180, 1985.

. Juhan-Vague I., Driss F., Roul C., Darcet Ph., Aillaud M. F., Vague Ph.

Abnormalities of erythrocytes membranes lipids in insulin-dependant diabetics are improved by short term strict control of diabetes.

Clinical Hemorheol., 4 : 455-459, 1984.

. Juhan-Vague I., Rahmani-Jourdheuil D., Mishal Z, Roul C., Mourayre Y., Aillaud M.F., Vague P.

Correction by insulin added in vitro of abnormal membrane fluidity of the erythrocytes from type I (insulin-dependent) diabetic patients.

Diabetologia, 29:417-420, 1986.

. Kahlenberg A., Banjo B.

Involvement of phospholipids in the D-glucose uptake activity of isolated human erythrocytes membranes.

J Biol Chem., 247: 1156-1160, 1972.

. Kamada T., Otsuji S.

Lower levels of erythrocytes membrane fluidity in diabetic patients. A spin label study.
Diabetes, 32 : 585-591, 1983.

. Kamada T., Baba Y., Otsuji S.

Biochemical changes in membrane related to rheological properties of diabetic erythrocytes. Dans: Blood flow in large arteries: Applications to atherogenesis and clinical medicine. *Liepsch DW (ed)*
Monogr Atheroscler., Basel, Karger, 15: 198-208 1990.

. Kan C., Ruan Z., Bittman R.

Interaction of cholesterol with sphingomyelin in bilayer membranes: evidence that hydroxy group of sphingomyelin does not modulate the rate of cholesterol exchange between vesicles.
Biochemistry, 30: 7759-7766. 1991.

. Kassis S.

Modulation of receptor-coupled adenylate cyclase system in HeLa cells by sodium butyrate.
Biochemistry, 24: 5666-5672, 1985.

. Kassis S., Sullivan M., Fishman P. H.

Modulation of beta-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase by chemical inducers of differentiation: effect on beta receptors and inhibitory regulatory protein G.
J Recept Res., 8: 627-644, 1988.

. Kelly K.L., Jose M., Jarett M., Jarett L.

The polar head group of novel insulin-sensitive glycopospholipid mimics insulin action on phospholipid methyltransferase.
FEBS Lett., 209: 238-242, 1986.

. Kelly K. L., Wong E. H. A.

Hormonal regulation of phospholipid methyltransferase by 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent and independent mechanisms.
Endocrinology, 120: 2421-2427, 1987.

. Kissebah A. H., Fraser T. R.

The in vitro ¹⁴C-cyclic AMP production by normal human adipose tissue in response to some hormones and in controlled diabetic adipose tissue.

Hormone. Metab. Res., 4: 72-77, 1972.

. Koval M., Pagano R. E.

Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin.

Biochim Biophys Acta, 1082: 113-125, 1991.

. Kolesnick R. N.

Sphingomyelin and derivatives as cellular signals.

Prog Lipid Res., 30: 1-38, 1991.

. Kolesnick R., Gold W.

The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin 1 signaling.

Cell, 77: 325-328, 1994.

. Kowluru A., Rana R.S., MacDonald M.J.

Stimulation of phospholipid methylation by glucose in pancreatic islets.

Biochem Biophys Res Comm., 122: 706-711, 1984.

. Krönk M., Shutze S., Scheurich P., Pfizenmaier K.

TNF signal transduction and TNF responding genes.

Immunol Ser., 56: 189-216, 1992.

. Kruh J.

Effects of sodium butyrate, a new agent, on cells in culture.

Mol Cell Biochem., 42: 65-82, 1982.

. Laakso M.

How good a marker is insulin level for insulin resistance ?

Amer J Epidemiol., 137:959-965, 1993.

. Lang C.H., Dobrescu C. Bagby G.J.

Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output.

Endocrinology, 130: 43-52, 1992.

. Larner J.

Insulin signaling mechanism. Lessons from the old testament of glycogen metabolism and the new testament of molecular biology.

Diabetes, 37: 262-273, 1988.

. Larsen T.S., Severson D.L.

Influence of exogenous fatty acids and ketone bodies on rates lipolysis in isolated ventricular myocytes from normal and diabetic rats.

Can J Physiol Pharmacol., 68: 1179-1181, 1990.

. Le Petit-Thévenin J., Nobili O., Boyer J.

Decreased acylation of phosphatidyl choline in diabetic rat erythrocytes.

Diabetes, 37: 142-188, 1988.

. Legler G., Muller-Platz C. M., Mentges-Hettkamp M., Pflieger G., Julich E.

On the chemical basis of the Lowry determination.

Anal Biochem., 150: 278-287, 1985.

. Levitzki A.

From epinephrine to cyclic AMP.

Science, 241: 800-806, 1988.

. Levy Y., Elias N., Cogan U., Yeshurun D.

The effect of weight loss on erythrocyte membrane function in patients with morbid obesity. In: *Obesity in Europe 91 Ailhaud G, ed. John Libbey & Company*, 1993;35-38.

. Liebermann C.

Ueber das oxychinoterm.

Chem Zentr., 61, 25-27, 1980.

. Logothetis D. F., Kurachi Y., Galper J., Neer E. J., Clapham D. F.

The β subunits of GTP-binding proteins activates the muscarinic K^+ channel in heart.

Science, 235: 321-326, 1987.

. Lohse M. J.

Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization.

Biochim Biophys Acta, 1179: 171-188, 1993.

- . Lopes-Virella M.F., Klein R.L., Lyons T. J., Stenvenson H.C., Witzum J.L.**
Glycosylation of low-density lipoprotein enhances cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages.
Diabetes, 37: 550-557, 1988.
- . Lowry O.H., Rosebrough J.N., Farr A, Randall J.R.**
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J Biol Chem., 193:265-275, 1951.
- . Luly P., Baldini P., Incerpi S., Tria E.**
Insulin effect in vitro on human erythrocyte plasma membrane.
Experientia, 37:431-433, 1981.
- . Lyons T.J., Patrick J. S., Baynes J. W., Cornell J. A., Lopes-Virella M. F.**
Glycation of low density lipoprotein in patients with type I diabetes : correlation with other parameters of glycaemic control.
Diabetologia, 29: 685-689, 1986.
- . Malchoff C. D., Huang L., Gillepsie N., Palasi C.V., Shwartz F. W., Cheng K., Hewlett E. L., Larner J. A.**
A putative mediator of insulin action which inhibits adenylate cyclase and adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase: partial purification from rat liver ; site and mechanism of action.
Endocrinology, 120: 1327-1337, 1987.
- . Marin P., Darin N., Amemiya T., Andersson B., Sverker J., Björntorp P.**
Cortisol secretion in relation to body fat distribution in obese premenopausal women.
Metabolism, 41:882-886, 1992.
- . Marshall S. M., Walker M., Alberti K. G. M. M.**
Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic non-ketotic coma.
International Textbook of Diabetes Mellitus. Wiley J. and Sons Ltd 1992
- . Mathias S. , Kolesnick R.**
Ceramide: a novel second messenger.
Advan Lipid Res., 25: 65-90, 1993.

. Matkovics B., Varga S., Szabo L., Witas H.

The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes.

Hormone Metab Res., 14: 77-79, 1982.

. Mazzanti L., Rabini A., Testa I., Bertoli E.

Modifications induced by diabetes on the physicochemical and functional properties of erythrocyte plasma membrane.

Europ J Clin Invest., 19: 84-89, 1989.

. Mc Millan D.E.

Insulin, diabetes, and the cell membrane: an hypothesis.

Diabetologia, 24: 308-310, 1983.

. Mc Murchie E. J.

Dietary lipids and the regulation of the membrane fluidity and function.

Dans: *Physiological regulation of membrane fluidity*, Aloia RC, Eds. New York: Alan R. Liss, Inc, 1988 189-237.

. McRae J. R., Day R. P., Metz S. A., Halter J. B., Ensick J. W., Robertson R. P.

Prostaglandin E metabolic levels during ketoacidosis.

Diabetes, 34: 761-766, 1985.

. Merrill A. H., Sereni A. M., Stevens V. L., Hannun Y. A., Bell R. M., Kinkade J. M.

Inhibition of phorbol ester-dependent differentiation of human promyelocyte leukemic (HL-60) cells by sphinganine and other long-chain bases.

J Biol Chem., 261: 12610-12615, 1986.

. Merrill A. H., Jones D. D.

An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism.

Biochim Biophys Acta, 1044: 1-12, 1989.

. Merimee T. J., Pulkkinen A. J., Lofton S.

Increased insulin binding by lymphocyte receptors induced by β -OH.

J Clin Endocrinol Metab., 43: 1190-1192, 1976.

. Migeon C.J., Green O.C., Eckert J.P.

Study of adrenocortical function in obesity.

Metabolism, 12:718, 1963

- . Misbin R. I., Pulkkinen A. J., Lofton S., Merimee T. J.**
Ketoacids and the insulin receptor.
Diabetes, 27: 539-542, 1978.
- . Mombers C. P., Verkileij A. J.**
The interaction of spectrin-actin and synthetic phospholipids. The interaction with phosphatidylserine.
Biochim Biophys Acta, 551: 271-281, 1979.
- . Momchilova A., Petkova D., Koumanov K.**
Rat liver microsomal phospholipase A₂ and membrane fluidity.
Int J Biochem., 18: 659-663, 1986.
- . Muller S., Ziegler O., Donner M., Drouin P., Stoltz J.F.**
Rheological properties and membrane fluidity of red blood cells and platelets in primary hyperlipoproteinemia.
Atherosclerosis, 83:231-237, 1990
- . Muller S., Donner M., Drouin P., Stoltz J. F.**
Lipid fluidity of erythrocyte membrane : failure to demonstrate alterations in diabetes mellitus.
Clinical Hemorheol., 7 : 619- 629, 1987.
- . Murray D.K., Ruhmann-Wennhold A., Nelson D.H.**
Dexamethasone effect on the phospholipid content of isolated fat cell ghosts from adrenalectomised rats.
Endocrinology, 105: 774, 1979.
- . Nakano J., Ishiin T.**
Effect of ketone bodies on hormone-, theophylline- and dibutyryl cyclic AMP-induced lipolysis and on cyclic AMP-phosphodiesterase.
Res Commun Chem Pathol Pharm., 1: 485-496, 1970.
- . Nambi P., Whitman M. H., Schmidt D. B., Heckman G. D., Stassen F. L., Crooke S. T.**
Induction of functional β -adrenergic receptors in rat aortic smooth muscle cells by sodium butyrate.
Biochem Pharmacol., 35: 3813-3820, 1986.

. Nelson D.H., Murray D.K., Brady R.O.

Dexamethasone-induced change in the sphingomyelin content of human polymorphonuclear leukocytes in vitro.

J Clin Endocrinol Metab., 54:292-295, 1982.

. Nelson D.H., Murray D.K.

Dexamethasone increases the synthesis of sphingomyelin in 3T3-L1 cell membranes.

Proc Nat Acad Sci., 79:6690-6692, 1982.

. Nelson D.H., Murray D.K.

Sphingolipids inhibit insulin and phorbol ester stimulated uptake of 2-deoxyglucose.

Biochem Biophys Res Commun., 138:463-467, 1986.

. Neufeld N.D., Ezrin C., Corbo L., Long D., Bush M.A.

Effects of caloric restriction and exercise on insulin receptors in obesity : association with changes in membrane lipids.

Metabolism, 35:580-587, 1986.

. Neufeld N.D., Harris M., Corbo L.M., Koduri A.

Effect of glyburide in type II diabetes mellitus.

Diabetes, 36:1351-1356, 1987.

. O'Brian R. M., Housley M. D., Milligan G., Siddle K.

The insulin receptor tyrosyl kinase phosphorylates holomeric forms of the guanine nucleotide regulatory protein G_i and G_o .

FEBS Lett., 212: 281-188, 1987.

. Obermaier-Kusser B., Mühlbacher C., Mushack J., Rattenhuber E., Fehlmann M., Häring H.U.

Regulation of glucose carrier activity by $AlCl_3$ and phospholipase C in fat cells.

Biochem J., 256: 515-520, 1988.

. Orly J., Schramm M.

Fatty acids as modulators of membrane functions: catecholamine-activated adenylate cyclase of the turkey erythrocyte.

Proc Nat Acad Sci., 72: 3433-3437, 1975.

. Ohta H., Yatomi Y., Sweeny E. A., Hakomori S., Igarashi Y.

A possible role of sphingosine induction of apoptosis by tumor necrosis factor- α in human neutrophils.

FEBS Lett., 355: 267-270, 1994.

. Parker P. J., Katkan M., Waterfield M. D., Leader D. P.

The phosphorylation of ribosomal protein S6 by protein kinase C.

Eur J Biochem., 148: 579-586, 1985.

. Pelikànova T., Kohout M., Vàlek J., Steefka Z.

Fatty acid composition and erythrocyte membranes in type 2 (non-insulin-dependant) diabetic men.

Metabolism, 40 : 175-180, 1991.

. Pitcher J. A., Inglese J., Higgins J. B., Arriza J. L., Kim C. C., Benovic J. L., Kwatra M. M., Caron M. G., Lefkowitz R. J.

Role of $\beta\gamma$ subunits of G proteins in targeting the β -adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors.

Science, 257: 1264-1267, 1992.

. Popp-Snijders C., Schouten J.A., Heine R.J., Van Der Meer J., Van Der Veen E.A.

Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids improves insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetes.

Diabetes Res., 4:141-147, 1987.

. Prasad K.N., Sinha P.K.

Effect of sodium butyrate on mammalian cells in culture: a review.

In vitro, 12: 125-132, 1976.

. Rabini R.A., Galassi R., Fumelli P., Doussey N., Solera M.L., Valdigui P., Curatola G., Ferretti G., Taus M., Mazzanti L.

Reduced (Na^+ , K^+) ATPase activity and plasma lysophosphatidylcholine concentrations in diabetic patients.

Diabetes, 43: 915-919, 1994.

. Rajeswari P., Natarajan R., Nadler J. L., Kumar D., Kalra V.

Glucose induces lipid peroxidation and inactivation of membrane-associated ion-transport enzymes in human erythrocytes in vivo and in vitro.

J Cell Physiol., 149: 100-109, 1991.

. Ramachandran C. K., Murray D. K., Nelson D. H.

Dexamethasone increases neutral sphingomyelinase activity and sphingosine levels in 3T3-L1 fibroblasts.

Biochem Biophys Res Comm., 167: 607-613, 1990.

. Reed C.F.

Phospholipid exchange between plasma and erythrocytes in man and dog.

J Clin Invest., 47: 749-759, 1968.

Reid T. R., Torti F. M., Ringold G. M.

Evidence for two mechanisms by which tumor necrosis factor kills cells.

J Biol Chem., 264: 4583-4589, 1993.

. Rillerts E., Van Gaal L., Xiang D., Vansant G., De Leeuw I.

Blood viscosity in human obesity relation to glucose tolerance and insulin status.

Int J Ob., 13, 739-745, 1989.

. Robertson D. G., DiGirolamo M., Merrill A. H., Lambeth Jr., Lambeth J. D.

Insulin-stimulated hexose transport and glucose oxidation in rat adipocytes is inhibited by sphingosine at step after insulin binding.

J Biol Chem., 264: 6773-6779, 1989.

. Robinson A. M., Williamson D. H.

Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues.

Physiol Rev., 60: 143-187, 1990.

. Rose H. G., Oklander M.

Improved procedure for extraction of lipids from human erythrocytes.

J Lipid Res., 6: 428-431, 1965.

. Ross E. M.

Phosphatidylcholine-promoted interaction of catalytic and regulatory protein of adenylate cyclase.

J Biol Chem., 257: 10751-10758, 1982.

. Rothenberg P. L., Kahn C. R.

Insulin inhibits pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of G-protein. Evidence of a novel interaction between receptors and G-protein.

J Biol Chem., 263: 15546-15552, 1988.

. Rudel L. L., Morris M. D.

Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde.

J Lipid Res., 14: 364-366, 1973.

. Ruiz-Gutierrez V., Stiefel P., Garcia-Donas M. A., Acosta D., Carneado J.

Cell membrane fatty acid composition in type I (insulin-dependent) diabetic patients: relationship with sodium transport abnormalities and metabolic control.

Diabetologia, 36: 850-856, 1993.

. Salter S. J., Kelly M. B., Taddeo F. J., Ho C., Rubin E.

The modulation of protein kinase C activity by membrane lipid bilayer structure.

J Biol Chem., 269: 4966-4871, 1994.

. Sandra A., Fyler D.J., Marshall S.J.

Effects of lipids on the transport activity of the reconstituted glucose transport system from rat adipocyte.

Biochim Biophys Acta, 778:511-515, 1984.

. Sato Y., Hotta N., Sakamoto N., Ohishi N., Yagi K.

Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients.

Biochem Med. , 21: 104-107, 1979.

Seely. B. L., Olefsky J. M.

Potential cellular and genetic mechanisms of insulin resistance in the common disorders of diabetes and obesity.

Baillière's Clin Endocrinol Met., 7:187-252, 1993.

. Sena A., Rebel G., Bieth R., Hubert P., Waksman A.

Lipid composition in liver and brain of genetically obese (ob/ob), heterozygote (ob/+) and normal (+/+) mice.

Biochim Biophys Acta, 710:290-296, 1982.

. Shade D. S., Eaton P.

The regulation of plasma ketone body concentration by counter-regulatory hormones in man.

Diabetes, 5-10, 1978.

. Shakir M. K. M., Reed L. H., O Brian J. T.

Decreased phospholipase A2 activity in plasma and liver in uncontrolled diabetes mellitus.

Diabetes, 35: 403-411, 1986.

. Shiga T., Maeda N.

Influence of membrane fluidity on erythrocyte functions.

Biorheology, 17: 485-499, 1980.

. Shinitzky M.

Membrane fluidity and cellular functions.

In: Shinitzky M, ed. *Physiology of membrane fluidity*. Boca Raton: CRC Press, 1984; pp 1-53.

. Shoelson S. E., Boni-Schnetzler, Pilch P. F., Kahn C. R.

Autophosphorylation within insulin receptor β -subunits can occur as intramolecular process.

Biochemistry, 30: 7740-7746, 1991.

. Shohet S. B.

Release of phospholipid fatty acid from human erythrocytes.

J Clin Invest., 49: 1668-1678, 1970.

. Singer S.J., Nicholson.G.L.

The fluid mosaic model of cell membrane.

Science, 172: 720-731, 1972.

. Skipski V.P.

Quantitation, Composition and Metabolism, Dans: Blood Lipids and Lipoproteins:

(Nelson, G. D., ed.): *Wiley-Interscience, New York*. 1972, pp 471-483

. Smal J., De Meyts P.

Sphingosine an inhibitor of protein kinase C, suppresses the insulin-like effect of growth hormone in rat adipocytes.

Proc Nat Acad Sci., 86: 4705-4709, 1989.

. Spector A.A., Yorek M.A.

Membrane lipid composition and cellular function.

J Lipid Res, 26: 1015-1035, 1985.

. Stephens J. M., Pekala P. H.

Transcriptional repression of the GLUT4 and C/ABP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor- α .

J Biol Chem., 266 : 21839-21845, 1992.

. Stolyhwo A., Martin M.

Analysis of lipid classes by HPLC with the evaporative light scattering detector.

J Liq Chromatogr., 1237-1253, 1987.

. Takeda H., Maeda H., Fukushima H., Nakamura N., Yzawa H.

Increased platelet phospholipases activity in diabetic subjects.

Thromb Res., 24: 131-141, 1981.

. Taylor A. J., Jennings P. E., Barnett A. H., Pandov H.I., Lawson N.

An alternative explanation for the changes in erythrocyte fatty acid observed in diabetes mellitus.

Clin Chem., 33: 2083-2085, 1987.

. Taylor S. I., Accili D.

The structure and function of insulin receptors.

Curr Opin Endocrinol Diabetes, 231-238, 1994.

. Tefft R.E., Carruthers A., Melchior D.L.

Reconstituted human erythrocyte sugar transporter activity is determined by bilayer lipid head groups.

Biochemistry, 25:3709-3718, 1986.

. Testa I., Rabini R. A., Fumelli P., Bertoli E.

Abnormal membrane fluidity and acetylcholinesterase activity in erythrocytes from insulin-dependant diabetic patients.

J Clin Endocrinol Metab., 67: 1129-1133, 1988.

. Thulborn K. R., Tilley L. M., Sawyer W. H., Treloar F. E.

The use of n-(9-anthroyloxy) fatty acids to determine fluidity and polarity gradients in phospholipid bilayers.

Biochim Biophys Acta, 558: 166-178, 1979.

. Tozzi-Cianciarelli M. G. D'Alfonso A., Tozzi E., Troianisevi E., de Matter G.

Fluorescence studies of aged erythrocyte membranes

J Cell Mol Biol., 35: 113-120, 1989.

. Tu B. P., Suescun E. A., Yang S. Y.

Effect of age related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A₂: modulation by dietary restriction.

Mech Age Dev., 65: 17-33, 1992.

. Turinsky J., O'Sullivan D.M., Bayly B.P.

1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo.

J Biol Chem., 265:16880-16885, 1990.

. Turyn D., Scacchi G. E., Dellacha J. M.

Unmasking of insulin receptors in rat submaxillary gland microsomes: effect of high ionic strength, phospholipase C and S-adenosyl-L-methionine.

Biochim Biophys Acta, 845: 333-342, 1985.

. Urano S., Hashizume M. H., Tochigi N., Matsuo M., Shiraki M., Ito H.

Vitamin E and susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics.

Lipids, 26 : 58-61, 1991.

. Uzel N., Sivas A., Uysal M., Oz H.

Erythrocyte lipid peroxydation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus.

Hormone Metab Res., 19: 89-90, 1987.

. Van Deenen L. L. M., De Gier J.

Lipid of the red cell membrane .

Dans *The red cell*. D. M. Surgenor, ed. Academic Press, Inc., New York. 1974 :pp 47-211.

. Van Der Werve G., Zaninetti D., Lang U., Valloton M. B., Jeanrenaud B.

Identification of a major defect in insulin-resistant tissues of genetically obese (fa/fa) rats.

Diabetes, . 36: 310-314, 1984.

Van Gaal L., Vanderkam S., Duysburgh I., De Leeuw I.

Endocrine abnormalities related to total and regional fat mass accumulation.

Acta Clin Belg., 47: 37-45, 1992.

. Van Putten J. P.M., Wieringa T., Krans H. M.J.

Low PH and ketoacids induced insulin receptor binding and postbinding alterations in cultured 3T3 adipocytes.

Diabetes, 34: 744-750, 1985.

. Vance J.E.

The use of newly synthesized phospholipids for assembly into secreted hepatic lipoproteins.

Biochim Biophys Acta, 1006: 59-69, 1989.

. Vara F., Rozengurt E.

Stimulation of Na^+/H^+ antiport activity by epidermal growth factor and insulin occurs without activation of protein kinase C.

Biochem Biophys Res Commun., . 130: 646-653, 1985.

Vaulont S., Kahn A.

Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates

FASEB J., 8, 28-35, 1994.

. Vidal J. C., McIntyre J. O., Churchill P., Andrew J. A., Pehuet M., Fleisher S.

Influence of diabetes on rat liver mitochondria: decreased insaturation and D- β -hydroxybutyrate dehydrogenase activity.

Arch Biochem Biophys., 224: 643-658, 1983.

Vilcek J., Lee T. H.

Tumor necrosis factor.

J. Biol. Chem., 266 : 7313-7316, 1994.

. Wahle K.W.J., Milne L., McIntosh G.

Regulation of polyunsaturated fatty acid metabolism in tissue phospholipids of obese (fa/fa) and lean (Fa/-) Zucker rats.

Lipids, 26:16-22, 1991.

. Wali R.K., Jaffe S., Kumar D., Kalra V. K.

Alteration in organisation of phospholipids in erythrocytes as factor in adherence to endothelial cells in diabetes mellitus.

Diabetes, 37: 104-110, 1988.

. Watala C., Kodacka M., Loba A., Jozwiak Z., Nowak N.

Analysis of membrane fluidity alterations and lipid disorders in type I diabetic children and adolescents.

Acta Diabetol., 24 : 141-148, 1986.

. Watala C., Kordacka M.

Non enzymatic glycosylation of proteins. II. Does glycosylation of low density lipoprotein affect lipid composition of erythrocyte membranes?.

Ann Clin Res., 19: 194-197, 1987.

. Watala C.

In vitro glycation of red blood cell proteins: high levels of glucose lower lipid fluidity of erythrocyte membranes.

Exp Pathol., 33: 233-238, 1988.

. Watala C., Jözwiak Z.

The phospholipid composition of erythrocyte ghosts and plasma lipoproteins in diabetes type I in children.

Clin Chim Acta, 188 : 211-220, 1990.

. Watala C.

Hyperglycemia alters the physico-chemical properties of proteins in erythrocyte membrane of diabetic patient.

Int J Biochem., 24: 1755-1761, 1992.

. Watala C.

Altered structural and dynamic properties of blood cell membranes in diabetes mellitus.
Diabetic Med., 10:13-20, 1993.

. Weiss M., Kekker U., Stauffacher W.

Effect of epinephrine and somatostatin-induced insulin deficiency on ketone body kinetics and lipolysis in man.
Diabetes, 33: 738-744, 1984.

. Whittaker J., Cuthbert C., Hammond V., Alberti K. G. M. M.

Impaired insulin binding to isolated adipocytes in experimental diabetic ketoacidosis.
Diabetologia, 21: 563-568, 1981.

. Winocour P.D., Watala C., Rathbone R.L.

Membrane fluidity is related to the extent of glycation of proteins, but not to alteration in the cholesterol to phospholipid molar ratio in isolated platelet membranes from diabetic and control subjects.
Thromb Haemost., 33: 738-744, 1988.

. Winocour P.D.

The role of platelets in pathogenesis of diabetic vascular disease.
Dans: *Complications of Diabetes Mellitus. Molecular and cellular biology of Diabetes Mellitus. (Draznin, B., Melmed, S et LeRoith, D.,eds) Vol III, New York, Alan R. Liss Inc.*, 1989, pp37-47,.

. Wolff S. P., Dean R. T.

Glucose autoxidation and protein modification: the potential role of autoxidative glycosylation in diabetes.
Biochem J., 245: 243-250, 1987.

. Wu D., Katz A., Simon M. I.

Activation of phospholipase C β_2 by the α and $\beta\gamma$ subunits of trimeric GTP-binding protein.
Proc Nat Acad Sci., 90: 5297-5301, 1993.

. Yki-Järvinen H.

Glucose toxicity.
Endocrine Rev., 13: 415-431, 1992.

. Zak B.

Cholesterol methodologies: a review.

Clin Chem., 23: 1201-1214, 1977.

. Ziegler O., Got I., Drouin P.

Lipoprotéines et diabète.

Dans: *Traité de diabétologie*, Tchobrousky G., Slama G., Assan R., Freychet P., eds. Pradel Editions, Paris, 1990, pp 231-249.

. Zlatkis A., Zak B.

Study of new cholesterol reagent.

Anal Biochem., 29: 143-148, 1969.

Nom : ZEGHARI

Prénom : Nezha

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en BIOLOGIE ET SANTÉ

Spécialité : Génie Biologique et Médical

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 31 MAI 1995 Lu p 185

Le Président de l'Université

