



HAL
open science

**PLAQUETTES SANGUINES ET
MEGACARYOCYTES HUMAINS : IMPACT DE
DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ACIDE
DOCOSAHEXAENOÏQUE SUR LEUR ACTIVATION
ET LEUR ETAT REDOX**

Nicolas Guillot

► **To cite this version:**

Nicolas Guillot. PLAQUETTES SANGUINES ET MEGACARYOCYTES HUMAINS : IMPACT DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ACIDE DOCOSAHEXAENOÏQUE SUR LEUR ACTIVATION ET LEUR ETAT REDOX. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2008. Français. NNT: . tel-00345898

HAL Id: tel-00345898

<https://theses.hal.science/tel-00345898>

Submitted on 10 Dec 2008

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

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

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 1^{er} Décembre 2008

par

M. GUILLOT Nicolas

TITRE :

**PLAQUETTES SANGUINES ET MEGACARYOCYTES HUMAINS : IMPACT DE
DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ACIDE DOCOSAHEXAENOÏQUE SUR LEUR
ACTIVATION ET LEUR ETAT REDOX**

Directeur de thèse :

Dr Evelyne VERICEL

JURY : Pr Michel LAGARDE, Président
Dr Denis BLACHE, Rapporteur
Dr Philippe GUESNET, Rapporteur
Dr Evelyne VERICEL, Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur J. LIETO

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. COCHAT

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur G. CLERC

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

AVANT PROPOS

Le travail exposé dans cette thèse a fait l'objet d'une part de publications publiées ou soumises et d'autre part de communications lors de congrès ou de journées scientifiques.

PUBLICATIONS

Guillot N., Debard C., Calzada C., Vidal H., Lagarde M., & Véricel E.
Effects of docosahexaenoic acid on some megakaryocytic cell gene expression of some enzymes controlling prostanoid synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, 372, 4, pp 924-8.

Guillot N., Caillet E., Calzada C., Laville M., Lagarde M., & Véricel E.
Platelet redox status and function after increasing docosahexaenoic acid intake in human healthy volunteers. *Submitted*

Ibrahim S., **Guillot N.**, Pruneta-Deloche V., Charrière S., Calzada C., Guichardant M, Moulin P., Lagarde M. & Ponsin G.
Alterations in the transfer of phospholipids from very low density lipoproteins to activated platelets in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 2008, *in press*.

Calzada C., Véricel E., El Khoury G., **Guillot N.**, Draï J, Sassolas A., Peretti N., Ponsin G., Lagarde M. & Moulin P.
Evidence for oxidative stress and platelet hyper-reactivity in vitamin E-deficient abetalipoproteinemic patients. *Submitted*

COMMUNICATIONS

Guillot N., Caillet E., Calzada C., Carreras M., Laville M., Lagarde M., Véricel E.
Caractérisation *in vivo* of effects after increasing docosahexaenoic acid intake in human volunteers. *Research seminar of School of Medicine, University of Lyon, June 27 2008, Lyon France.*

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

Guillot N., Vidal H., Lagarde M. & Véricel E.
Docosahexaenoic acid effects on megakaryocytes MEG-01. *XIIth Congress of the Doctoral School of University of Lyon, 2008, Lyon, France.*

Guillot N., Lagarde M. & Véricel E.
Docosahexaenoic acid effects on redox status of megakaryocytes. *XIth Congress of the Doctoral School of University of Lyon, 2008, Lyon, France.*

Véricel E., Calzada C., **Guillot N.**, Benzaria A., Bonnet F., Carreras M., Guichardant M., Laville M., Mebarek S., Nemoz G., Prigent A-F. & Lagarde M.
Effects of increasing docosahexaenoic acid intake in human healthy volunteers on several blood parameters. A preliminary study. *VIth Congress of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, 2006, Cairns, Queensland, Australia.*

POSTERS

Véricel E., **Guillot N.**, Caillet E., Carreras M., Calzada C., Laville M. & Lagarde M.
Platelet redox status and function after increasing docosahexaenoic acid intake in human healthy volunteers. *VIIIth Congress of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, 2008, Kansas City, Missouri, USA.*

Guillot N., Carreras M., Laville M., Lagarde M. & Véricel E.
The Effects of docosahexaenoic acid in platelets (an *ex vivo* study) and in megakaryocytic cells (an *in vitro* study). *XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2007, Geneva, Switzerland.*

SOMMAIRE

Remerciements	6
Avant propos	7
Sommaire	9
Abréviations	12
Listes des figures et des tableaux	14
Introduction générale	15
Revue bibliographique	19
Mégacaryocytes	20
I. Moelle osseuse hématopoïétique	20
1. <i>Localisation de l'hématopoïèse</i>	20
2. <i>Structure de la moelle osseuse hématopoïétique</i>	20
2.1. Le cadre osseux	21
2.2. Compartiment vasculaire.....	21
2.3. Trame médullaire	21
2.4. Parenchyme hématopoïétique.....	22
II. Les cellules hématopoïétiques	22
1. <i>Les cellules souches hématopoïétiques</i>	22
2. <i>Les progéniteurs</i>	24
3. <i>Les précurseurs</i>	26
3.1. Endomitose.....	26
3.1.1. Processus de l'endomitose.....	26
3.1.2. Régulation de l'endomitose	27
3.2. Maturation des mégacaryocytes	27
4. <i>Formation des plaquettes : la thrombopoïèse</i>	28
4.1. Formation des proplaquettes	28
4.2. Libération des plaquettes.....	31
III. Régulation de la mégacaryocytopoïèse et de la thrombocytopoïèse	32
1. <i>Les cytokines</i>	32
2. <i>Facteurs de transcription</i>	34
Plaquettes sanguines	34
I. Structure	36
1. <i>Membrane plasmique</i> :	36
2. <i>Cytosquelette</i>	38
3. <i>Cytoplasme</i>	38
II. Physiologie plaquettaire	39
1. <i>Endothélium vasculaire</i>	40
2. <i>Plaquettes sanguines</i>	40
3. <i>Hémostase primaire</i>	41

3.1.	Adhésion	41
3.1.1.	Le complexe de glycoprotéines Ib-V-IX	44
3.1.2.	Glycoprotéine VI	44
3.2.	Activation des plaquettes	44
3.2.1.	Récepteurs d'activation	45
3.2.1.1.	Les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques, RCPG	45
3.2.1.2.	Les récepteurs à activité tyrosine kinase, RTK	48
3.2.1.3.	Les récepteurs de type intégrines	49
3.2.2.	Changement de forme des plaquettes	50
3.2.3.	Modifications biochimiques	50
3.3.	Agrégation des plaquettes	51
3.4.	Sécrétion et activité pro-coagulante des plaquettes	51
III.	Libération et métabolisme de l'acide arachidonique.....	52
1.	<i>Les membranes plaquettaires</i>	52
2.	<i>Libération de l'acide arachidonique</i>	53
2.1.	Les phospholipases.....	53
2.1.1.	Les phospholipases C	53
2.1.2.	Les phospholipases A ₂ (PLA ₂)	54
2.1.2.1.	Les sPLA ₂	54
2.1.2.2.	Les cPLA ₂	55
2.2.	Peroxydation enzymatique de l'acide arachidonique au niveau des plaquettes sanguines	56
2.2.1.	Réaction catalysée par la voie PGH synthase-Tx synthase	56
2.2.1.1.	Les PGH synthases 1 et 2.....	56
2.2.1.2.	La thromboxane synthase	60
2.2.2.	Réaction catalysée par la voie de la 12-lipoxygénase.....	60
IV.	Implication de l'état redox dans la physiologie plaquettaire.....	61
1.	<i>Définition et caractéristiques des ROS sur la fonction plaquettaire.....</i>	62
1.1.	Anion superoxyde O ₂ ^{•-}	62
1.2.	Le peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂ et le peroxyde ONOO ⁻	63
2.	<i>Peroxydation lipidique non enzymatique.....</i>	64
2.1.	Peroxydation non enzymatique	65
2.2.	Conséquence de la peroxydation lipidique.....	65
3.	<i>Mécanismes de défenses anti-oxydantes.....</i>	66
3.1.	La superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT).....	66
3.2.	Les Glutathion peroxydases (GPx).....	67
3.2.1.	Les GPx 1 et 4	67
3.2.2.	Activité des GPx.....	68
3.3.	La vitamine E	69
	L'acide docosahexaénoïque	69
I.	Les acides gras polyinsaturés (AGPI).....	71
1.	<i>Introduction</i>	71
2.	<i>Biosynthèse des phospholipides (PL).....</i>	74
3.	<i>Composition des phospholipides (PL)</i>	76
3.1.	Réaction de déacylation/acylation.....	76
3.2.	Réaction de transacylation	77
3.3.	Remodelage membranaire.....	77
II.	Rôles physiologiques des acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI).....	77
1.	<i>Cerveau.....</i>	77
2.	<i>AGPI n-3 et système cardiovasculaire.....</i>	78

2.1.	Rôles des AGPI n-3 sur le système cardiovasculaire	78
2.2.	DHA et plaquettes sanguines	79
2.3.	DHA et métabolisme de l'acide arachidonique	81
2.4.	DHA et état redox	81
2.5.	DHA et système circulatoire	83
3.	<i>Apports en DHA chez l'homme</i>	83
	Problématique	87
	Méthodologie	88
I.	Etude DOCOREDOX	89
II.	Mesure de l'agrégation plaquettaire	92
III.	Culture cellulaire	92
IV.	Traitement des cellules avec le DHA	91
V.	RT-PCR temps réel	90
	Résultats expérimentaux	95
	Article 1 Caractérisation de l'ingestion de doses croissantes de DHA sur la fonction des plaquettes et leur état redox.....	96
	Article 2 Effets de l'acide docosahexaénoïque sur l'expression de gènes mégacaryocytaires impliqués dans la synthèse des prostanoides.....	135
	Discussion générale	148
	Perspectives	158
	Bibliographie	160

Abréviations

12-HETE	Acide 12 S-hydroxy-eicosatétraénoïque
12-HpETE	Acide 12 S-hydroperoxy-5,8,10,14-eicosatétraénoïque
12-LOX	12-lipoxygénase
4-HNE	4-hydroxy-2,3-nonéanal
5-HT	5-hydroxy-tryptamine, sérotonine
AA	Acide arachidonique
ADP	Adénosine 5' diphosphate
AG	Acide gras
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AMPc	Adénosine 3',5' monophosphate
BFU-E	Progéniteurs érythrocytaires précoces
BFU-MK	Progéniteurs mégacaryocytaires précoces
CAT	Catalase
CD	« Cluster of differentiation »
CFU-E	Progéniteurs érythrocytaires tardifs
CFU-MK	Progéniteurs mégacaryocytaires tardifs
CLP	Progéniteurs communs lymphoïdes
CMP	Progéniteurs communs myéloïdes
c-Mpl	Récepteur thrombopoïétine
CoA	Coenzyme A
COX	Cyclooxygénase
cPLA ₂	Phospholipase A ₂ cytosolique
CXCR4	Récepteur SDF-1
DAG	Diacylglycérol
DHA	Acide docosahexaénoïque
DMS	Système membrane de démarcation
EPA	Acide eicosapentaénoïque
EPO	Erythropoïétine
FcR γ	Chaîne γ des récepteurs Fc
FOG-1	« Friend of GATA-1 »
GDP	Guanosine diphosphate
GMP	« Granulocyte/monocyte progenitors »
GP	Glycoprotéine
GPx	Glutathion peroxydase
GTP	Guanosine triphosphate
HAB	Hémangioblastes
HSC	« Hematopoietic stem cells »
ICAM	« Intercellular adhesion molecule »
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IP3	Inositol triphosphate
ITAM	« Immunoreceptor tyrosine based activation motif »
ITIM	« Immunoreceptor tyrosine based inhibition motif »
LAT	« Linker of activation of T cells »
MAP kinase	« Mitogen activated protein kinase »
MDA	Dialdéhyde malonique
MEP	« Megakaryocyte/erythrocyte progenitor »
MLC	Chaîne légère de myosine
MPP	Progéniteurs multipotents
NO	Monoxyde d'azote
P2X1	Récepteur ATP

P2Y1/12	Récepteur ADP
PAR	« Protease activated receptor »
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PECAM-1	« Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 »
PF-4	Facteur plaquettaire 4
PGG ₂ /PGH ₂	Prostaglandine G ₂ /H ₂
PGH synthase	Prostaglandine H synthase
PGI ₂	Prostacycline
PH	Domaine d'homologie à la pleckstrine
PI	Phosphatidylinositol
PI(4,5)P2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PI3 kinase	Phosphoinositide 3 kinase
PK A/B/C	Protéine kinase A/B/C
PL	Phospholipide
PLC	Phospholipase C
PS	Phosphatidylsérine
PSGL-1	« P-selectin glycoprotein ligand-1 »
RCPG	Récepteur couplés aux protéines G hétérotrimériques
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RTK	Récepteur à tyrosine kinase
SDF-1	« Stromal derived factor 1 »
SOD	Superoxyde dismutase
sPLA2	Phospholipase sécrétée
TNF α	« Tumor necrosis factor α »
TP α β	Récepteur thromboxane A ₂
TPO	Thrombopoïétine
Tx synthase	Thromboxane synthase
TxA ₂ /B ₂	Thromboxane A ₂ /B ₂
vWF	Facteur de von Willebrand

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 p. 23: Développement des mégacaryocytes et formation des plaquettes sanguines

Figure 2 p. 25: Expression des différents marqueurs caractéristiques de la mégacaryocytopoïèse

Figure 3 p. 29: Modifications morphologiques des précurseurs au cours de la mégacaryocytopoïèse

Figure 4 p. 37: Représentation des plaquettes sanguines

Figure 5 p. 42: Voies de signalisation mises en jeu lors de l'activation plaquettaire

Figure 6 p. 57: Métabolisme de l'acide arachidonique

Figure 7 p.59: Représentation schématique du promoteur des gènes des PGH synthases 1 et 2

Figure 8 p. 72: Formation des acides gras polyinsaturés n-3

Figure 9 p. 73 : Formation des acides gras polyinsaturés n-6

Figure 10 p. 75 : Synthèse des phospholipides

Figure 11 p. 93: Image des cellules MEG-01 par microscopie en contraste de phase

Tableau 1 p. 43: Ligands, récepteurs et voies de signalisation activés au niveau plaquettaire

Tableau 2 p. 84: Apports nutritionnels conseillés pour la population française

INTRODUCTION GENERALE

L'hémostase est un processus physiologique visant à maintenir l'intégrité vasculaire et la fluidité du sang. Cette fonction peut se décrire schématiquement en trois phases ; la première, l'hémostase primaire, met en jeu les propriétés de l'endothélium vasculaire et les plaquettes sanguines qui formeront un thrombus plaquettaire de manière à colmater la brèche vasculaire. La coagulation qui constitue la deuxième phase va consolider l'agrégat plaquettaire en formant un réseau de fibrine. Enfin la fibrinolyse interviendra pour favoriser la résorption du thrombus et rétablir les conditions normales de circulation du sang. Lorsque se produit une lésion d'un vaisseau, une partie du sous endothélium se retrouve en contact avec la lumière vasculaire. Il se met alors en place le processus d'hémostase primaire qui peut se subdiviser en 3 phases successives : *i*, l'adhésion des plaquettes aux protéines du sous endothélium (en particulier le collagène), *ii*, l'activation des plaquettes qui se caractérise par un changement de forme avec sécrétion de protéines pro-agrégantes et formation notamment de thromboxane A₂ à partir de l'acide arachidonique *iii*, l'agrégation des plaquettes via, entre autre, l'activation du récepteur au fibrinogène l'intégrine αIIbβ3.

Le contrôle de la fonction plaquettaire est primordial d'une part pour délimiter la formation du thrombus au site de la lésion, et d'autre part pour éviter en l'absence de lésion toute agrégation intempestive qui pourrait se traduire par des cas d'embolie pulmonaire par exemple. De plus, l'activation et l'agrégation des plaquettes participent à l'étiologie de pathologies comme l'athérosclérose et le diabète (Véricel *et al.*, 2004; Davi & Patrono, 2007). L'équilibre entre des espèces anti-oxydantes et pro-oxydantes, qui caractérise l'état redox, participe au contrôle de la fonction plaquettaire. Plus précisément, les travaux antérieurs de notre équipe ont montré un hyperfonctionnement des plaquettes de personnes âgées associé à un déséquilibre de l'état redox en faveur d'un stress oxydant. Cet hyperfonctionnement des plaquettes est caractérisé par une augmentation du métabolisme de l'acide arachidonique via les voies de la prostaglandine H synthase (PGH synthase 1) et de la 12-lipoxygénase. Cette dernière enzyme catalyse la formation d'acide 12-hydroperoxy eicosatétraénoïque (12-HpETE) à partir de l'acide arachidonique, tandis que la première enzyme est responsable de la synthèse, à partir de ce même acide gras, d'un prostanoïde pro-agrégant, le thromboxane A₂ dont le thromboxane B₂ constitue son dérivé inactif. De plus, les plaquettes de personnes âgées montrent une diminution du taux de vitamine E et de la quantité et de l'activité de l'enzyme anti-oxydante la glutathion peroxydase 1. Or cette dernière réduit les hydroperoxydes d'acides gras en particulier le 12-HpETE. L'augmentation de la durée de vie de cet hydroperoxyde potentialise l'activité de la PGH synthase 1 et ainsi la formation de

TxA₂ caractérisant de ce fait l'hyperfonctionnement et l'état pro-oxydant des plaquettes de personnes âgées (Véricel *et al.*, 1992; Rey *et al.*, 1994; Calzada *et al.*, 1997).

De nombreuses études épidémiologiques montrent l'effet protecteur des acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 d'origine marine, principalement l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), envers les maladies cardiovasculaires. La diminution de l'activité des plaquettes constitue un effet observable du DHA et de l'EPA (Dyerberg *et al.*, 1978; GISSI-Prevenzione-Investigators, 1999; Véricel *et al.*, 1999). Le DHA est caractérisé par la présence, au sein de sa structure de 22 atomes de carbone, de 6 insaturations. Or la présence de ses insaturations rend le DHA particulièrement sensible aux réactions d'oxydation, donnant lieu alors à la formation de produits de peroxydation comme les aldéhydes et notamment le dialdéhyde malonique (MDA). L'accumulation de ce type de métabolites participe à l'étiologie des maladies cardiovasculaires (Yagi, 1987) et dans les plaquettes, induit un état pro-oxydant. Notre équipe a montré *in vitro* que de fortes doses de DHA induisent d'une part une augmentation de MDA et d'autre part une diminution du taux de vitamine E plaquettaire. D'un autre côté de faibles doses de DHA diminuent le taux de MDA plaquettaire ; ces effets étant vraisemblablement reliés à la distribution du DHA au sein de certaines classes de phospholipides membranaires (Véricel *et al.*, 2003). Ainsi la notion de dose semble conditionner les effets du DHA sur la fonction et l'état redox des plaquettes sanguines.

Les AGPI comme le DHA sont une source d'énergie, des composants structuraux des cellules mais également des modulateurs de l'expression génique (De Urquiza *et al.*, 2000; Jump, 2002; Sampath & Ntambi, 2005). Alors que les effets des AGPI n-3 sur les cellules constituant les vaisseaux sanguins ou composant le tissu sanguin (monocytes par exemple) font l'objet de nombreuses publications, peu se sont concentrées sur les cellules souches hématopoïétiques à l'origine de ces cellules. Or l'action des AGPI n-3 sur de telles cellules pourrait avoir des conséquences sur le réseau vasculaire en général. Les mégacaryocytes sont localisés dans la moelle osseuse chez l'homme et produisent en permanence des plaquettes anucléées. L'analyse des effets du DHA sur les mégacaryocytes se justifie par la détermination si un AGPI n-3 peut modifier l'expression de gènes au niveau de cellules hématopoïétiques. Les plaquettes sont, comme nous l'avons mentionné, anucléées et ne contiennent pas d'ADN génomique. Or nous pouvons émettre l'hypothèse d'une adaptation transcriptionnelle des plaquettes au DHA par l'intermédiaire de leur cellule précurseur les

mégacaryocytes. Ceci est conforté par le fait que l'ensemble des protéines impliquées dans la structure et la fonction des plaquettes sont synthétisées au niveau de ces cellules.

La caractérisation des effets de l'ingestion de doses croissantes de DHA sur la fonction des plaquettes sanguines et leur état redox et la définition des mécanismes sous jacents constitue le but de cette thèse. Une première approche a consisté à analyser les conséquences de l'ingestion de doses croissantes de DHA (200, 400, 800 et 1600 mg DHA/j/14j) par des hommes indemnes de toutes affections cardiovasculaires ; il s'agit de l'étude DOCOREDOX qui est présentée dans l'article 1. La fonction des plaquettes a été évaluée par la mesure de l'agrégation en réponse à différents agonistes, et le métabolisme de l'acide arachidonique. Les marqueurs de l'état redox : les concentrations de vitamine E et de MDA ainsi que les activités des glutathion peroxydases 1 et 4, ont été mesurés. Enfin la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides, en particulier les phosphatidylcholines et les phosphatidyléthanolamines, a été déterminée au cours de cette étude.

Les effets géniques du DHA constituent la deuxième approche de ce travail. Pour cela les cellules de la lignée MEG-01 (modèle de mégacaryocytes humains en culture) ont été traitées avec différentes doses de DHA. Les effets transcriptionnels sur des gènes codants les enzymes impliquées dans *i*, le contrôle de l'état redox (glutathion peroxydase, superoxyde dismutase et catalase) *ii*, le métabolisme de l'acide arachidonique (PGH synthase, thromboxane synthase) et *iii*, les facteurs de transcription (PPAR) ont été évalués. Parallèlement les activités des enzymes clés (PGH synthase, glutathion peroxydase) ont été mesurées et la détermination de la composition en acides gras des phospholipides membranaires ont été réalisées. Ces résultats sont présentés dans l'article 2.

La partie résultats est précédée d'une revue bibliographique focalisée sur les mégacaryocytes, les plaquettes sanguines, le métabolisme de l'acide arachidonique et finalement sur le DHA. Une brève description méthodologique est présentée suite à la partie bibliographique. Enfin une discussion générale est présentée à la fin de ce manuscrit.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Mégacaryocytes

I. Moelle osseuse hématopoïétique

L'hématopoïèse se définit comme l'ensemble des mécanismes aboutissant à la formation et au renouvellement, continu et régulé, des différentes cellules sanguines. L'hématopoïèse est le travail de cellules spécialisées et se déroule dans un environnement particulier. Nous décrirons succinctement l'espace hématopoïétique puis les différents types cellulaires impliqués.

1. Localisation de l'hématopoïèse

La moelle osseuse constitue chez l'homme adulte, le dernier territoire où se déroule l'hématopoïèse. En effet les cellules sanguines d'origine mésodermique sont au cours du développement embryonnaire, d'abord produites dans le sac vitellin, au niveau des îlots de Wolf et Pander puis par le mésoblaste. La production mésodermique de cellules sanguines décroît progressivement à partir du 2^{ème} mois de la vie intra-utérine. Entre le 3^{ème} et le 6^{ème} mois, des îlots hématopoïétiques apparaissent au niveau du foie et de la rate. Entre temps, au cours du 4^{ème} mois, coïncidant avec l'ébauche des cellules osseuses, des cellules souches se différencient en cellules myéloïdes et colonisent progressivement les espaces situés entre les travées des os spongieux. Ces espaces, médullaires, constitueront à la naissance, le dernier siège où se développera l'hématopoïèse. Jusqu'à l'âge de 5 ans la cavité médullaire osseuse est une moelle rouge qui assure une hématopoïèse active. Progressivement se produit une infiltration d'adipocytes donnant une moelle jaune qui s'accroît avec l'âge. Finalement, chez l'homme adulte la moelle hématopoïétique se trouve localisée au niveau des cavités médullaires des os plats et courts (sternum, iliaque).

2. Structure de la moelle osseuse hématopoïétique

La fonction de la moelle osseuse est d'assurer en permanence la différenciation, la multiplication et la destruction des cellules sanguines. La moelle osseuse peut être schématiquement structurée en un cadre osseux, un compartiment vasculaire, une trame médullaire et un parenchyme hématopoïétique.

2.1. Le cadre osseux

Il est constitué de lamelles qui délimitent des espaces ou niches ; les ostéoblastes, les ostéocytes et ostéoclastes forment ces lamelles.

2.2. Compartiment vasculaire

Le réseau vasculaire est formé par l'arbre sinusoïdal à l'origine des sinus médullaires et par la barrière médullo-sanguine. Celle-ci est formée par (i) la paroi des sinus, cellules endothéliales qui forment une couche mince (ii) la lame basale des sinus, irrégulière et discontinue, (iii) les cellules adventitielles qui forment une couche discontinue et ne couvrent qu'une partie de la surface des cellules endothéliales et (iv) par les histiocytes macrophagiques. Des fibres nerveuses suivent cette arborescence vasculaire.

2.3. Trame médullaire

Le microenvironnement médullaire constitue un site nécessaire à la fixation, la différenciation et la multiplication des cellules myéloïdes. Cet environnement joue un rôle fondamental dans la régulation de l'hématopoïèse comme nous le verrons par la suite. Cette structure est constituée à la fois d'une matrice cellulaire et extracellulaire. La première comprend des cellules de différents types dont des histiocytes avec un cytoplasme riche en lysosomes et phagolysosomes. On trouve également des cellules interstitielles non phagocytaires comme des fibroblastes et des adipocytes. Enfin la matrice extracellulaire est constituée de fibres de collagènes principalement de type 1 et 3 synthétisées par les fibroblastes et des protéines non collagéniques comme la fibronectine et la thrombospondine.

2.4. Parenchyme hématopoïétique

Le parenchyme hématopoïétique constitué des différentes cellules myéloïdes et lymphoïdes prend place au sein de ces niches médullaires en contact étroit avec à la fois le réseau de sinusoides vasculaires et le tissu de soutien.

Après cette brève description anatomique de la moelle osseuse, nous allons décrire maintenant les différents types de cellules constituant le parenchyme hématopoïétique en nous focalisant sur les cellules impliquées dans la mégacaryocytopoïèse.

II. Les cellules hématopoïétiques

Le sang, tissu conjonctif liquide, est constitué d'éléments figurés : plaquettes, érythrocytes, polynucléaires (neutrophiles, basophiles et éosinophiles), lymphocytes et monocytes. Les cellules hématopoïétiques qui sont à l'origine de ces cellules, peuvent être regroupées au sein de 4 grands groupes en fonction de leur degré de différenciation. L'hématopoïèse regroupe des cellules souches pluripotentes, des progéniteurs, des précurseurs et enfin les cellules matures (**cf. Figure 1 p. 23**).

1. Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques, (HSCs, « hematopoietic stem cells ») premières cellules véritablement impliquées dans l'hématopoïèse, sont issues d'hémangioblastes (HAB). Ces derniers sont bipotents, capables de donner les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques (Choi, 1998). Les HSCs, mises en évidence par Till et McCulloch en 1961, sont peu nombreuses (0,01 à 0,05 % des cellules médullaires), et ont pour caractéristiques essentielles l'autorenouvellement et la totipotence, ce qui leurs confèrent la possibilité d'être à l'origine de l'ensemble des différentes lignées hématopoïétiques (Till & McCulloch, 1961). Au cours de leur engagement dans une voie de différenciation ces cellules perdent progressivement leur capacité d'autorenouvellement et

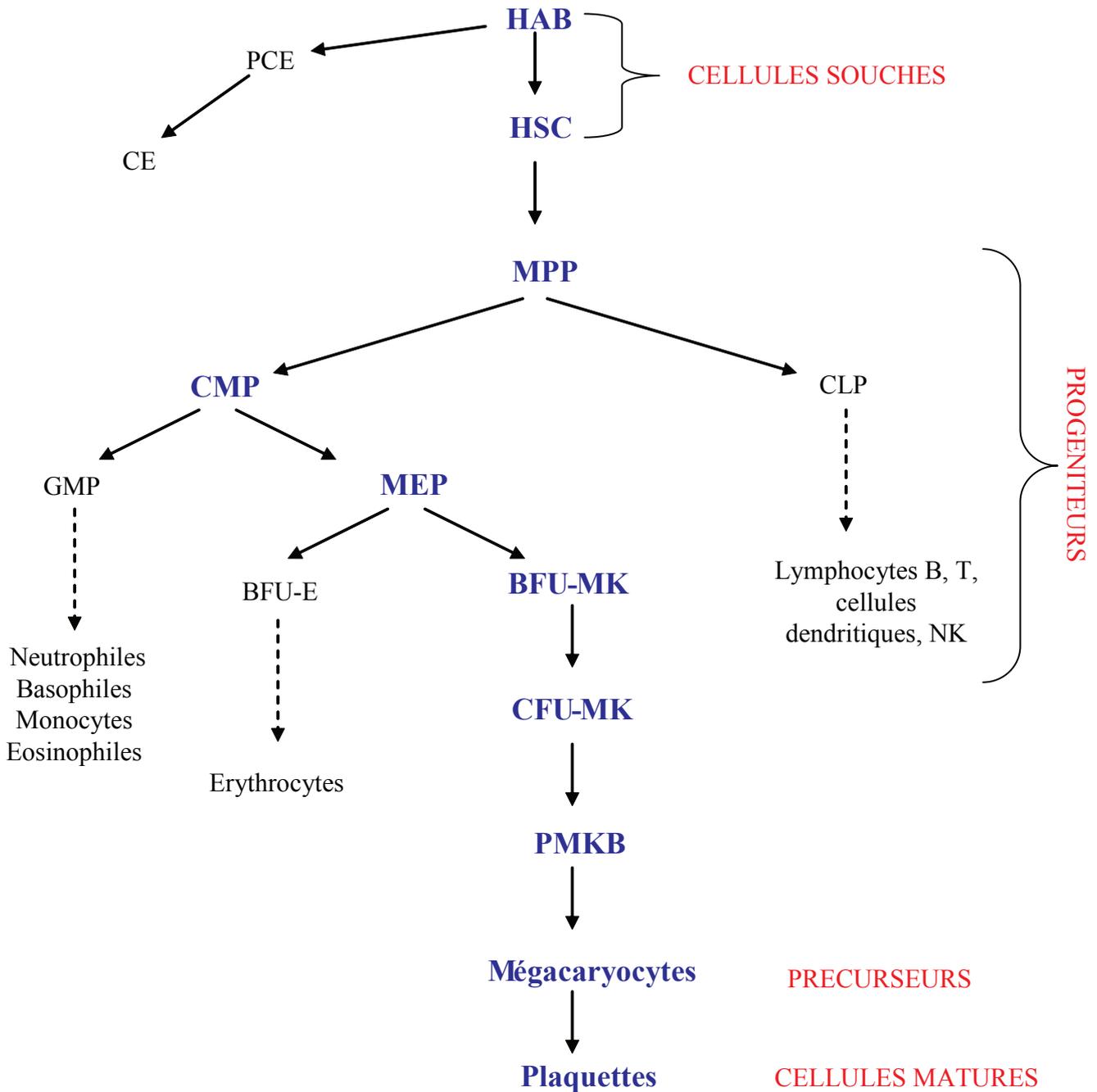


Figure 1 : Développement des mégacaryocytes et formation des plaquettes sanguines. HAB: hémangioblaste, HSC: cellule souche hématopoïétique, PCE: progéniteur de cellule endothéliale, CE: cellule endothéliale, MPP: progéniteur multipotent, CLP: progéniteur commun lymphoïde, CMP: progéniteur commun myéloïde, GMP: progéniteur granulocyte/monocyte, MEP: progéniteur érythrocyte/mégacaryocyte, BFU-E: “burst-forming unit erythrocyte” ou progéniteur érythrocyte précoce, BFU-MK: “burst-forming unit megakaryocyte” ou progéniteur mégacaryocyte précoce, CFU-MK: “colony-forming unit megakaryocyte” ou progéniteur mégacaryocyte tardif, PMKB: promégacaryoblaste.

leur totipotence. Les cellules souches hématopoïétiques expriment des marqueurs de surface spécifiques comme c-kit et Sca-1 (Bryder *et al.*, 2006).

2. Les progéniteurs

Les HSCs sont à l'origine des progéniteurs multipotents (MPP) qui seront à leur tour la source de deux lignées de progéniteurs : les progéniteurs communs lymphoïdes (CLP) et les progéniteurs communs myéloïdes (CMP). Ces cellules sont caractérisées par la perte progressive de leur auto-renouvellement au cours de leur différenciation. A partir des CMP, se formeront les progéniteurs GMP « granulocyte/monocyte progenitors » et les MEP « megakaryocyte/erythrocyte progenitor ». En réponse à différents stimuli, les MEP, cellules bipotentes, Lin- CD34+CD38+, donneront les progéniteurs érythrocytaires précoces (BFU-E) et tardifs (CFU-E) ou les progéniteurs mégacaryocytaires précoces (BFU-MK) et tardifs (CFU-MK) (Debili *et al.*, 1996). C'est à partir de ces progéniteurs restrictivement engagés dans cette voie que commence vraiment la lignée mégacaryocytaire. Progressivement ces progéniteurs perdent leur capacité de prolifération. Les promégacaryoblastes caractérisent la transition vers les précurseurs mégacaryocytaires.

Les progéniteurs mégacaryocytaires sont caractérisés par leurs marqueurs de surface de différenciation comme CD34, CD31, CD133 (Cf. **Figure 2 p. 25**). De plus l'expression de HLA-DR (récepteur de surface du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) permet de distinguer les BFU-MK (HLA-DR low) des CFU-MK (HLA-DRhigh) (Bridgell *et al.*, 1989). CD41 (ou glycoprotéine (GP) α IIb) et CD61 (glycoprotéine β 3) apparaissent relativement spécifiques des mégacaryocytes et des plaquettes chez l'adulte bien que les mastocytes puissent exprimer ces marqueurs (Kirshenbaum *et al.*, 2005). L'expression de CD41 précède tous les autres marqueurs plaquettaires. Ainsi les cellules CD34+CD41+CD42- correspondent aux CFU-MK. L'expression de CD42 (glycoprotéine, GPIb) est plus tardive, puis apparaît des marqueurs tels que c-Mpl (récepteur TPO), GP IV... La protéine CD34 disparaît progressivement au cours de l'endomitose (Debili *et al.*, 1992; Tomer, 2004).

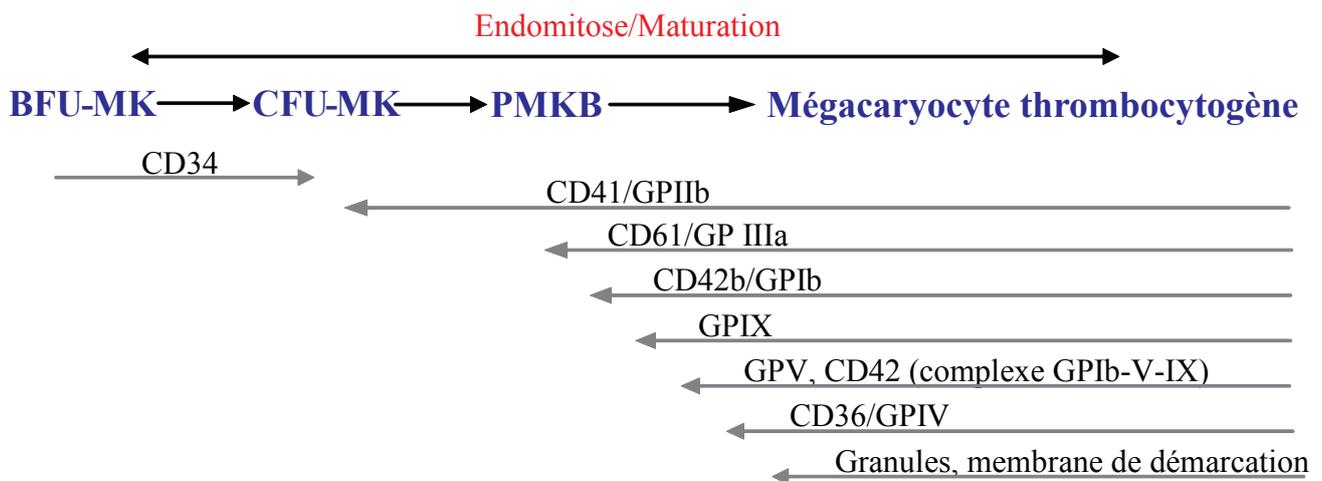


Figure 2 : Expression des différents marqueurs caractéristiques de la mégacaryocytopoïèse
 BFU-MK: “burst-forming unit megakaryocyte” progéniteur précoce, CFU-MK: “colony -
 forming unit megakaryocyte” progéniteur tardif, PMKB: promégacaryoblaste,
 GP: glycoprotéine, CD: cluster of differentiation.

3. Les précurseurs

Ces cellules ont perdu toutes capacités d'auto renouvellement et de prolifération. Ce sont les premières cellules morphologiquement identifiables et distinguables de chaque lignée et sont caractérisées par l'expression de protéines spécifiques. Les précurseurs mégacaryocytaires vont subir deux mécanismes fondamentaux caractéristiques de la mégacaryocytopoïèse : la polyploïdisation par le processus d'endomitose et la maturation cytoplasmique. Ces événements amèneront les précurseurs mégacaryocytaires au stade de mégacaryocytes producteurs de plaquettes ou thrombocytogènes.

3.1. Endomitose

3.1.1. Processus de l'endomitose

A partir de l'initiation de la synthèse des protéines plaquettaires, les mégacaryocytes entrent dans un processus d'endomitose. Il s'agit d'une réplication de l'ADN sans division cytoplasmique et nucléaire. Ce mécanisme permet de former des cellules polyploïdes à partir de cellules diploïdes. Il existe un équilibre entre la ploïdisation des mégacaryocytes et leur maturation. Les données de la littérature de ces dernières années ont permis de décrire les mécanismes généraux de ce processus. L'utilisation de mégacaryocytes humains issus de prélèvement de la moelle osseuse ainsi que l'utilisation de modèles animaux et cellulaires ont permis d'avancer que l'endomitose était une mitose incomplète. Nagata *et al.* ont défini via des techniques d'immunohistochimies les caractéristiques de l' endomitose mégacaryocytaire : absence d'anaphase B, de télophase et de cytokinèse (division du cytoplasme) (Nagata *et al.*, 1997). Par ailleurs, Roy *et al.* ont montré que la ségrégation des chromosomes était asymétrique dans le fuseau mitotique au cours de l'anaphase (Roy *et al.*, 2001).

Raslova *et al.* ont montré par des techniques d'analyses pangénomiques que le processus d'endomitose était accompagné d'une modification de l'expression d'un grand nombre de gènes (Raslova *et al.*, 2007). Un certain nombre de gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation et la fonction des plaquettes comme les glycoprotéines, le cytosquelette d'actine/myosine et de microtubules sont surexprimés. Par

ailleurs l'expression de tous les allèles des gènes codant pour α Ib, β 3, vWF (facteur de von Willebrand), c-Mpl, Fli-1, et FOG-1 sont transcriptionnellement actifs dans les mégacaryocytes 4N à 32N, démontrant ainsi un processus fonctionnel (Raslova *et al.*, 2003). Ces auteurs suggèrent que la polyploïdisation permet de modifier l'expression génique et d'augmenter la synthèse protéique.

Le mécanisme fonctionnel d'endomitose est un processus totalement intégré dans la différenciation et indispensable pour la formation des plaquettes. A terme la distribution des mégacaryocytes est la suivante : environ la moitié sont 16N, 23% 8N et moins, 22% sont 32N et plus (Tomer *et al.*, 1989). L'expression des intégrines α Ib β 3 (ou IbIIIa), Ib et CD36 sont directement corrélées avec la taille et la ploïdie des mégacaryocytes.

3.1.2. Régulation de l'endomitose

La régulation du cycle cellulaire des mégacaryocytes à ce stade n'est pas totalement déterminée cependant, plusieurs pistes ont été étudiées. Parmi les éléments contrôlant le cycle cellulaire les cyclines sont particulièrement impliquées. Ainsi les travaux de Geng *et al.*, ont montré que les souris cycline E^{-/-} présentent un défaut important dans la ploïdisation des mégacaryocytes alors que la prolifération des autres cellules hématopoïétiques n'est pas modifiée (Geng *et al.*, 2003). La surexpression de la cycline D3 ou D1 permet d'augmenter le degré de ploïdie dans les mégacaryocytes (Wang *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 2001; Ravid *et al.*, 2002). Baccini *et al.* ont démontré que p21 et p27 sont exprimés vraisemblablement dans les mégacaryocytes hyperploïdes matures. La surexpression de p21 sur des mégacaryocytes en culture stoppe le cycle endomitotique et permet une maturation cytoplasmique (Baccini *et al.*, 2001). Récemment Gilles *et al.* ont montré que la polyploïdisation mégacaryocytaire faisait intervenir la protéine p19^{INK4D}. Cette protéine stoppe l'étape de l'endomitose et favorise l'engagement de la maturation mégacaryocytaire pour permettre la formation des plaquettes (Gilles *et al.*, 2008).

3.2. Maturation des mégacaryocytes

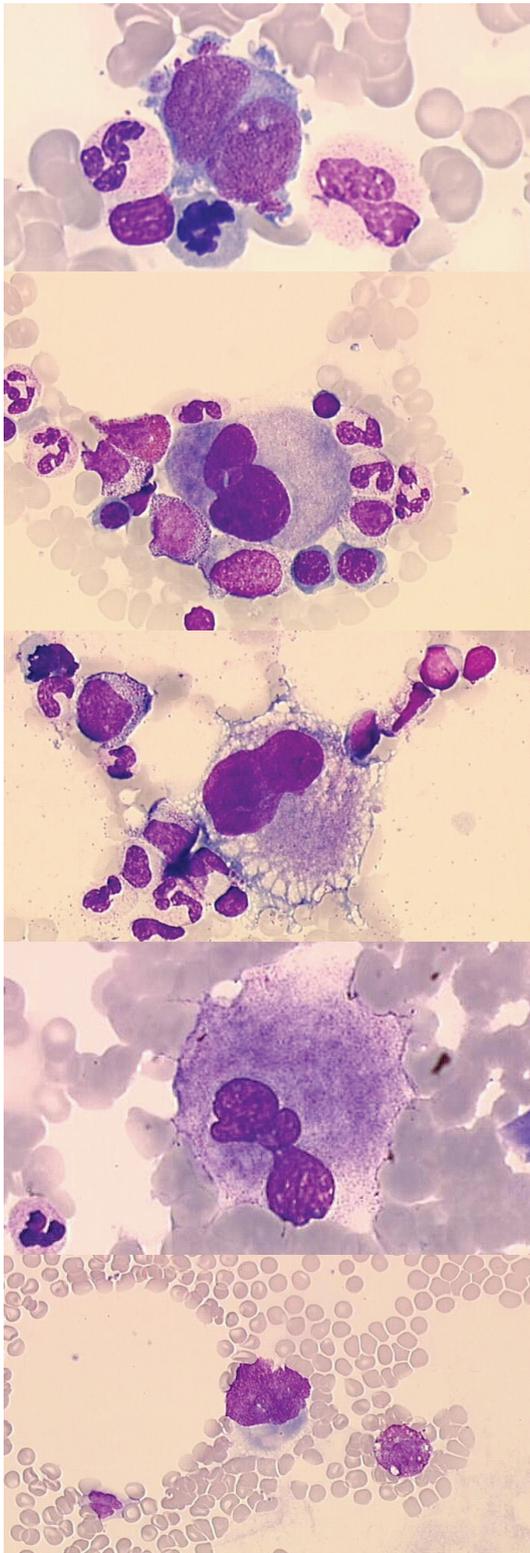
La maturation des mégacaryocytes est plus ou moins concomitante avec la polyploïdisation. Cette étape essentielle est visible par microscopie. Les modifications morphologiques sont accompagnées par une modification de l'expression de protéines plaquettaires. La figure 3 montre les différentes phases d'évolution morphologiques de mégacaryocytes précurseurs au cours de cette étape de maturation (**Cf. Figure 3 p.29**). Nous pouvons distinguer 4 stades de différenciation. Les mégacaryocytes de stade 1 (20% des cellules) expriment des protéines telles que la glycoprotéine α IIb. 2/3 des cellules en stade 1 de différenciation sont 16N. Les mégacaryocytes de stade 2 sont caractérisés par la présence de polyribosomes et par l'ébauche des granules α . L'intégrine β 3 et le fibrinogène sont synthétisés à partir de ce stade de différenciation. La majorité des mégacaryocytes précurseurs sont en stade 3 de différenciation, et sont caractérisés par l'expression de la quasi majorité des protéines plaquettaires. Enfin les mégacaryocytes thrombocytogènes ou de stade 4 représentent l'ultime stade de différenciation. Ces cellules sont identifiables par la présence de proplaquettes.

La formation d'un réseau de membranes de démarcation, l'augmentation du volume du cytoplasme, la production de granules sécrétoires en particulier de type α et l'expression des protéines plaquettaires sont les principaux événements de la maturation cytoplasmique des mégacaryocytes. L'acquisition de ces caractéristiques structurales et fonctionnelles par les mégacaryocytes va permettre la formation des plaquettes.

4. Formation des plaquettes : la thrombopoïèse

4.1. Formation des proplaquettes

A ce stade les mégacaryocytes sont polyploïdes (4N-128N) avec un noyau multilobé. Le cytoplasme renferme un important système membranaire interne (granules, réseau de membrane de démarcation). Ce système de membrane de démarcation (DMS) est en continuité avec la membrane plasmique et se définit comme un réservoir de membrane indispensable pour la formation des proplaquettes (Patel *et al.*, 2005).



Mégacaryocyte de stade 1 / Mégacaryoblaste

Taille de 30 à 40 μm
Cytoplasme basophile non granuleux

Mégacaryocyte stade 2 / Mégacaryocyte basophile

Taille : $\sim 80 \mu\text{m}$ diamètre
Noyau contour irrégulier
Cytoplasme basophile
Quantité du cytoplasme augmente

Mégacaryocyte stade 3 / Mégacaryocyte granuleux

Taille 50-100 μm diamètre
Cytoplasme acidophile et granuleux
Dilatation du système canaliculaire

Mégacaryocyte stade 4 / Mégacaryocyte thrombocytogène

Taille 50-120 μm de diamètre
Noyau dense, plurilobé

Mégacaryocyte stade ultime.

Le cytoplasme a presque entièrement disparu
Reste un noyau en phase de dégradation

Mégacaryocytopoïèse : durée 7-14 jours

Figure 3 : Modifications morphologiques des précurseurs au cours de la mégacaryocytopoïèse. Observations par microscopie d'un frottis médullaire coloré au May-Grumwald-Giemsa, (d'après le laboratoire d'hématologie du CHU d'Angers).

L'élaboration des plaquettes est un processus dynamique impliquant notamment les éléments du cytosquelette. La formation des proplaquettes nécessite une grande organisation de manière à transformer le cytoplasme des mégacaryocytes, cellules de grande taille donc d'un volume important (*i.e.* facteur 21 entre le volume d'une cellule 2N et d'une cellule 64N), en prolongements cytoplasmiques de 100 à 500 μm de long et de 2 à 4 μm de diamètre.

L'existence des proplaquettes a été démontrée à la fois sur des modèles murins (Poujol *et al.*, 1998; Italiano *et al.*, 1999), puis validée chez l'homme (Choi *et al.*, 1995; Cramer *et al.*, 1997). Les données de la littérature indiquent que la formation des proplaquettes commence à un seul endroit à la surface du mégacaryocyte. Puis par vagues successives se produit une arborescence pour former un réseau interconnecté de proplaquettes. L'allure générale de ces proplaquettes est une succession de renflements reliés par de fins ponts cytoplasmiques. La formation des proplaquettes se poursuit jusqu'à l'utilisation complète du cytoplasme et du DMS. A terme le noyau du mégacaryocyte est compacté et expulsé du corps de la cellule pour être dégradé. La libération des plaquettes ne se produit qu'à l'extrémité de ces proplaquettes. En effet Italiano *et al.* ont montré sur des mégacaryocytes de souris analysés en vidéo-microscopie, que la formation des plaquettes murines se fait à l'extrémité distale des proplaquettes (Italiano *et al.*, 1999).

Le système des microtubules (dimères de tubulines α et $\beta 1$) joue un rôle important dans la formation des proplaquettes et la libération des plaquettes (Cramer *et al.*, 1997). Les microtubules s'organisent en anneau à l'extrémité des proplaquettes de façon très similaire à leur organisation dans les plaquettes circulantes (Schulze *et al.*, 2004). La présence de la tubuline $\beta 1$ est indispensable à la formation des proplaquettes et des plaquettes et une absence de microtubules entraînent une thrombocytopenie (Tablin *et al.*, 1990; Schwer *et al.*, 2001).

L'organisation des proplaquettes et leur agencement est indispensable pour permettre une production importante et écologique de plaquettes. Italiano *et al.* ont montré sur des mégacaryocytes murins que les proplaquettes forment de nombreuses ramifications ce qui permet de multiplier considérablement les extrémités libératrices de plaquettes (Italiano *et al.*, 1999). De plus en utilisant la cytochalasine B (inhibiteur de l'assemblage de l'actine) les auteurs montrent que ceci n'empêche pas la formation et la croissance des proplaquettes mais que cela inhibe la formation de ramifications.

L'ensemble des organelles et des granules qui structure les plaquettes est acheminé essentiellement grâce au réseau de microtubules et aux protéines associées (dynéine, kinésine). Ainsi les plaquettes sont entièrement formées à l'extrémité des proplaquettes leur libération peut alors s'opérer.

4.2. Libération des plaquettes

Bien que la libération des plaquettes se produise à l'extrémité des proplaquettes, ces cellules ne possèdent pas un chimiotactisme fort. Ceci implique que les plaquettes doivent être libérées dans le courant sanguin donc dans les sinusoides médullaires de la moelle. Or la longueur des proplaquettes ne permet pas à l'ensemble des mégacaryocytes d'atteindre cette zone circulatoire. Les données de la littérature suggèrent un rôle important du stroma médullaire en particulier le collagène de type 1 ; les mégacaryocytes via les récepteurs GP VI et l'intégrine $\alpha 2\beta 3$ interagissent avec le collagène ce qui réduit la formation de proplaquettes à l'intérieur de la moelle (Sabri *et al.*, 2004). Le fibrinogène endothélial favorise la formation des proplaquettes. A ce titre, Larson *et al.* ont montré que la présence de l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$, récepteur au collagène et lorsqu'il est activé au fibrinogène, était indispensable pour la formation des proplaquettes (Larson & Watson, 2006a; b). Nous verrons qu'il est également important que les mégacaryocytes migrent vers les sinusoides vasculaires afin de permettre la libération des plaquettes. Cette migration est contrôlée par des cytokines notamment le SDF-1.

La machinerie de l'apoptose serait impliquée dans la formation des plaquettes. Les mégacaryocytes présentent lors de la libération des plaquettes à leur surface un marquage positif à l'annexine V, une fragmentation de l'ADN et leur noyau est excentré (Zauli *et al.*, 1997). De ce fait les expériences menées sur les protéines impliquées dans le phénomène d'apoptose ont été étudiées au niveau des mégacaryocytes matures. Ainsi la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans des mégacaryocytes CD41+ (ou GPIIb ou αIIb) inhibe totalement la formation des proplaquettes. Une fois les proplaquettes formées, l'activation des caspases devient diffuse dans tout le cytoplasme et conduit à l'apoptose du mégacaryocyte sénescant. En effet, l'élaboration de ces proplaquettes s'accompagne d'une activation des caspases 3 et 9. L'inhibition de l'activité des caspases empêche cette différenciation (De Botton *et al.*, 2002).

Au final après 7 jours environs de différenciation, un mégacaryocyte (l'ensemble représente 0,05% des cellules de la moelle osseuse) produira en moyenne 10^4 plaquettes ce qui conduit à la formation au total par l'ensemble des mégacaryocytes de 10^{11} plaquettes par jours. Dans les 5 litres de sang, chez l'homme, la numération plaquettaire se situe entre 150 et 400 000 plaquettes/ μ L où 1/3 des plaquettes sont séquestrées dans la rate. Leur durée de vie est en moyenne de 8 à 10 jours et la production de plaquettes peut être multipliée par 10 en cas de stress suggérant ainsi une homéostasie réactive (24-48 heures après une thrombocytopenie induite) (Deutsch & Tomer, 2006).

Ainsi la formation des plaquettes fait intervenir un certain nombre d'éléments : les mégacaryocytes qui vont les produire, un environnement qui conditionne en partie cette production, et des cytokines régulatrices. Comme nous allons le décrire succinctement dans la partie suivante, différents niveaux de signalisation sont mis en jeu favorisant ou diminuant l'équilibre à la fois de la mégacaryocytopoïèse et de la thrombocytopoïèse.

III. Régulation de la mégacaryocytopoïèse et de la thrombocytopoïèse

La régulation de la mégacaryocytopoïèse se fait via *i* l'environnement par les cytokines libérées, et *ii* les facteurs de transcription des mégacaryocytes. La finalité de cette régulation est de maintenir le nombre de plaquettes circulantes constant spécifique à l'individu. Les mécanismes vont donc agir sur *i* la différenciation des mégacaryocytes et *ii* sur la production des plaquettes par ces cellules.

1. Les cytokines

L'action des cytokines se fait à tous les niveaux de la mégacaryocytopoïèse et de la thrombopoïèse. Elles sont produites par les cellules hématopoïétiques, les cellules du stroma

médullaire, ou par des organes comme le foie pour ce qui concerne l'une des cytokines les plus importantes dans ce domaine la thrombopoïétine (TPO). Parmi les cytokines on peut citer celles qui stimulent la prolifération des progéniteurs comme le GM-CSF, IL-3, IL-6 IL-11, IL-1 et EPO. Il existe un certain nombre de cytokines qui répriment la mégacaryocytopoïèse. Ainsi nous pouvons citer le TGF β 1 « transforming growth factor », l'IL-4 et le PF-4 (Kuter *et al.*, 1992; Pang *et al.*, 2005).

Nous décrirons successivement la TPO, cytokine la plus importante dans la lignée mégacaryocytaire, son récepteur c-Mpl, puis le SDF-1 et enfin le PF-4.

La thrombopoïétine (TPO) est une glycoprotéine produite principalement par le foie puis de façon mineure par les reins et la moelle osseuse. La théorie actuelle tend à définir la TPO comme un agoniste de la prolifération et de la maturation mégacaryocytaire (Kirito & Kaushansky, 2006). Elle stimule l'expression de marqueurs comme la glycoprotéine α IIb β 3, la formation du système de membrane de démarcation et l'endomitose. En même temps il apparaît que la TPO ne serait pas impliquée dans la libération des plaquettes (Pang *et al.*, 2005; Szalai *et al.*, 2006).

La régulation du taux de TPO est intimement liée à son récepteur ; les plaquettes exposent à leur surface des récepteurs c-Mpl qui fixe la TPO, la séquestre et empêche ainsi sa biodisponibilité au niveau de la moelle créant un équilibre entre le taux de plaquettes circulantes et la production mégacaryocytaire (Kuter & Rosenberg, 1995). Le c-Mpl est exprimé principalement par les tissus hématopoïétiques, les HSC, les mégacaryocytes à tous les stades de différenciation et enfin par les plaquettes. La TPO engendre un changement conformationnel du récepteur c-Mpl ce qui permet l'activation de plusieurs voies de transduction du signal (Drachman *et al.*, 1999). L'activation des kinases JAK conduit à la phosphorylation des protéines STAT 3 et 5, impliquées dans la prolifération et la différenciation des cellules (Drachman *et al.*, 1997; Rojnuckarin *et al.*, 2001; Kirito *et al.*, 2003). ERK 1/2 est davantage impliquée dans la différenciation, l'endomitose et la formation des proplaquettes alors que la p38 MAP kinase semble plus importante dans la prolifération des mégacaryocytes (Rojnuckarin *et al.*, 1999). Geddis *et al.* ont mis en évidence le rôle indispensable de la PI3 kinase dans la médiation des effets de la TPO sur le cycle cellulaire et l'endomitose des mégacaryocytes (Geddis *et al.*, 2001).

La formation des proplaquettes bien qu'indispensable pour former les plaquettes doit s'accompagner d'une migration des mégacaryocytes au plus près des sinusoides vasculaires. Le stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) et son récepteur CXCR4 favorise la migration des mégacaryocytes vers la niche vasculaire permettant ainsi une interaction avec les cellules endothéliales des sinusoides ; cette interaction favorise la formation des proplaquettes (Riviere *et al.*, 1999; Avecilla *et al.*, 2004). Enfin la TPO provoque sur les mégacaryocytes la libération du PF-4 (facteur plaquettaire 4). Celui-ci inhibe spécifiquement la maturation de ces cellules ainsi que la formation des proplaquettes, suggérant ainsi un rétrocontrôle négatif de PF-4 sur l'action de la TPO sur les mégacaryocytes (Gewirtz *et al.*, 1989; Oda *et al.*, 2003).

2. Facteurs de transcription

De nombreuses expériences ont permis de mettre en évidence l'implication de certains facteurs de transcription dans la régulation de l'expression de gènes spécifiques des mégacaryocytes et des plaquettes. Le développement des mégacaryocytes et la formation des plaquettes sont contrôlés par un système coordonné de facteurs de transcription qui assure le remaniement de la chromatine et l'expression de gènes spécifiques. Parmi les différents facteurs de transcription GATA-1, FOG-1, Fli-1 et p45 NF-E2 sont particulièrement impliqués dans la mégacaryocytopoïèse et la thrombopoïèse.

Un certain nombre de gènes clés contiennent dans leur séquence promotrice des motifs de type WGATAR comme par exemple le facteur plaquettaire 4 (PF-4) et la glycoprotéine α IIb (Ravid *et al.*, 1991; Lemarchandel *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1993). Cette séquence consensus est le site de liaison des facteurs de transcription de la famille GATA. Le facteur de transcription GATA-1, protéine à doigts de zinc, est l'élément principal dans la détermination des cellules vers la lignée mégacaryocytaire (Tsang *et al.*, 1997) de plus il intervient à tous les stades de la différenciation des mégacaryocytes (Kaushansky, 2005).

Pour être fonctionnellement actif GATA-1 se dimérise avec différents facteurs de transcription dont le plus important est FOG-1 (Friend of GATA-1) protéine à 9 doigts de zinc (Tsang *et al.*, 1997). L'inactivation de FOG-1 conduit à une absence totale de

progéniteurs mégacaryocytaires (Tsang *et al.*, 1997). D'un point de vue fonctionnel GATA-1 et FOG-1 augmentent l'expression du gène codant pour la glycoprotéine α IIb (Gaines *et al.*, 2000). Un complexe réunissant les facteurs GATA-1, FOG-1 et Fli-1 permet d'augmenter l'expression des gènes de glycoprotéines IX, Iba, et du PF-4 (Wang *et al.*, 2002).

Athanasίου *et al.* ont montré que Fli-1 était un inhibiteur de la différenciation érythrocytaire et avantageait préférentiellement la différenciation mégacaryocytaire. Fli-1 intervient également dans la voie de différenciation des cellules MEP et conduit préférentiellement vers la lignée mégacaryocytaire (Athanasίου *et al.*, 2000). Récemment l'équipe de F. Morlé, a montré qu'un facteur de transcription, EKLF, inhibait l'action de Fli-1 au niveau de l'engagement des cellules MEP, ce qui conduit à favoriser la lignée érythrocyte et restreint la lignée mégacaryocyte (Bouilloux *et al.*, 2008).

L'action de p45 NF-E2 a été montrée sur *i* l'organisation du système des membranes de démarcation, *ii* le trafic des granules α via une action de p45 sur la petite protéine G, Rab27b, *iii* la tubuline β 1 impliquée dans la formation des proplaquettes est une cible de p45. (Lecine *et al.*, 2000; Tiwari *et al.*, 2003). Enfin Deveaux *et al.* ont mis en évidence l'effet activateur de p45 sur la transcription du gène de la thromboxane synthase (Deveaux *et al.*, 1997). Ainsi il apparaît que le facteur de transcription p45 NF-E2 agit essentiellement au cours de la maturation mégacaryocytaire.

Ainsi la régulation de la mégacaryocytopoïèse et de la thrombopoïèse fait intervenir l'environnement médullaire, des cytokines comme la TPO, et différents facteurs de transcription. L'ensemble étant un système coordonné conduit à une homéostasie plaquettaire.

Les plaquettes sanguines

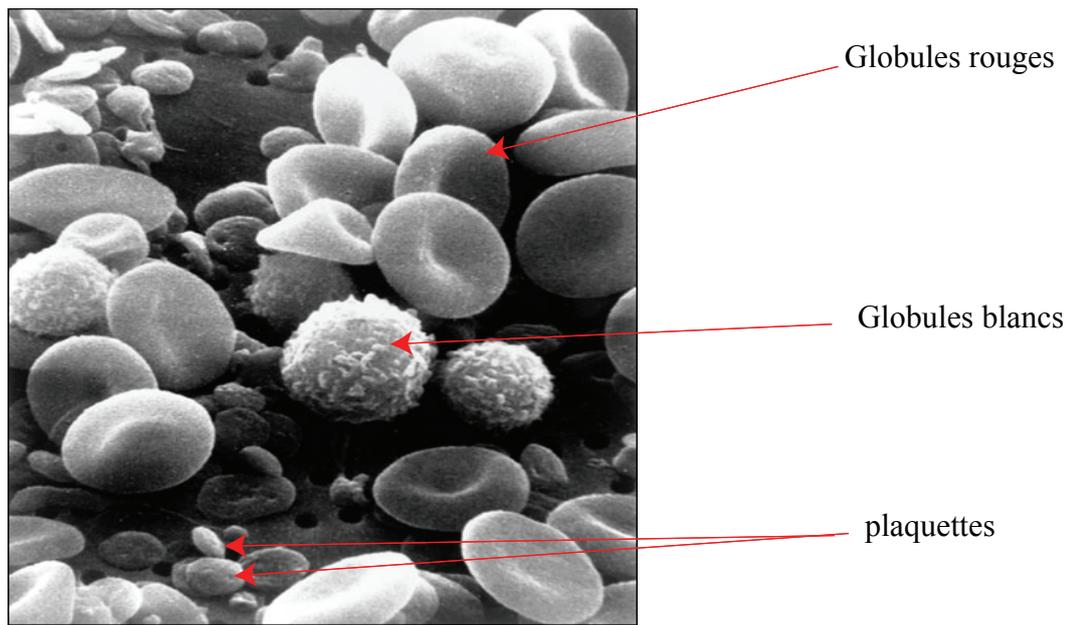
I. Structure

Les plaquettes sont les plus petits éléments circulant du sang. Elles se présentent au repos sous une forme discoïde avec un diamètre de 2 à 4 μm et un volume de 6 à 12 μm^3 . L'observation en microscopie électronique permet de distinguer 3 régions : la membrane plasmique, le cytosquelette et les différents organites intracellulaires (Cf. **Figure 4 p.37**) (Blache, 1992; George, 2000).

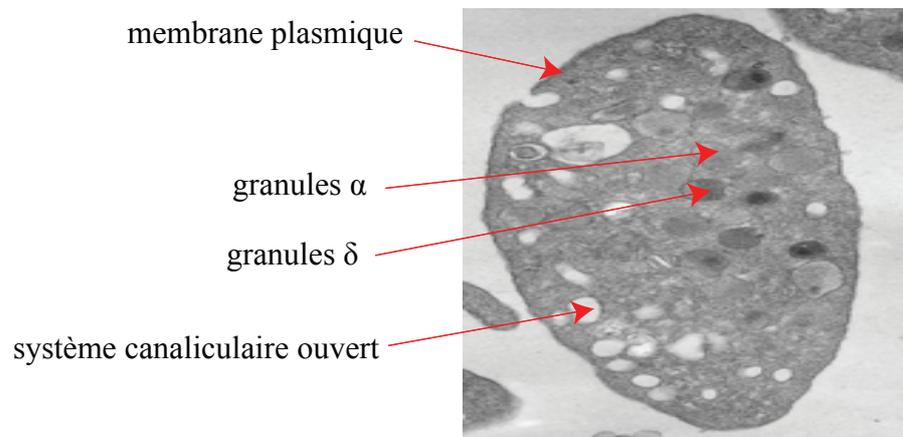
1. Membrane plasmique :

La membrane plasmique est constituée d'une bicouche de phospholipides contenant du cholestérol, lipide neutre, qui permet d'assurer une certaine stabilité et rigidité des membranes. Sont également insérés dans cette bicouche différents récepteurs dont les glycoprotéines impliquées dans la fonction plaquettaire. La membrane plasmique présente de nombreuses invaginations ouvertes sur l'extérieur formant ainsi le système canaliculaire ouvert. Ce système permet, lors de l'activation des plaquettes, la libération du contenu de leurs granules de sécrétions. Ce système constitue enfin une importante source de membrane mobilisable lors du changement de forme des plaquettes. De la même manière au niveau du cytoplasme plaquettaire, nous pouvons distinguer le système tubulaire dense, réseau de membrane semblable au réticulum endoplasmique qui séquestre le calcium et les enzymes impliquées dans la synthèse des prostaglandines. Il apparaît que les deux systèmes membranaires (système canaliculaire ouvert et tubulaire dense) soient étroitement liés pour favoriser la libération du contenu des granules de sécrétions.

A. Eléments figurés du sang, image de microscopie électronique



B. Ultrastructure de plaquettes sanguines par microscopie électronique



C. Plaquettes au repos (1) vs plaquettes agrégées (2)

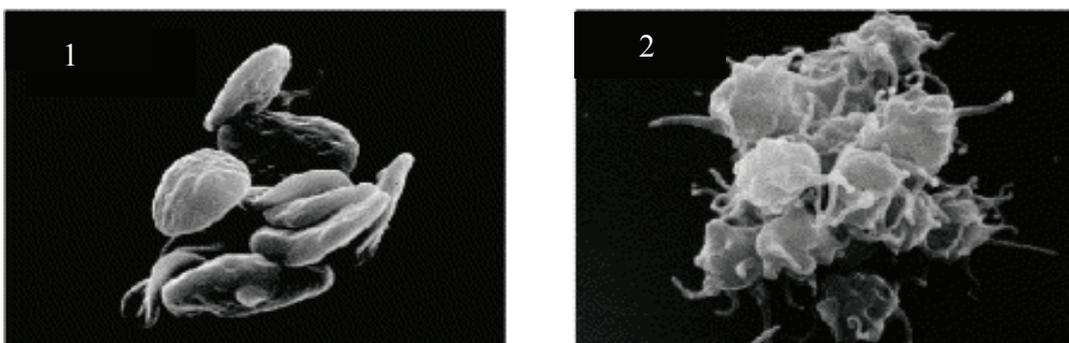


Figure 4 : Représentation des plaquettes sanguines. A. Eléments figurés du sang par microscopie électronique, B. Structure des plaquettes par microscopie électronique, C. Plaquettes au repos (1) et agrégées (2).

2. Cytosquelette

La membrane plasmique est supportée par un cytosquelette très développé, constitué par différents systèmes fibrillaires : les microtubules et les microfilaments d'actine. Ce cytosquelette joue un rôle important dans le changement de forme des plaquettes qui intervient lors de leur activation et de leur agrégation. Nous décrirons succinctement le réseau de microtubules et d'actine.

Le réseau sous membranaire de microtubules est responsable de la forme discoïde des plaquettes au repos. Ce réseau est l'assemblage de 8 à 12 tours de filament de microtubules. Dans les plaquettes les microtubules sont constitués de sous unité de dimères de tubuline α et β 1 qui s'organisent en protofilaments puis en filaments. Des protéines sont associées aux microtubules notamment la dynéine et la kinésine (Italiano & Shivdasani, 2003).

L'actine résulte de la polymérisation d'actine monomérique (actine G) en protofilaments qui vont s'associer deux à deux pour former le filament d'actine ou actine F. Environ 60% de l'actine est sous forme d'actine G dans les plaquettes au repos. Alors que le réseau de microtubules dans les plaquettes est principalement sous membranaire, le réseau d'actine s'organise différemment : on distingue un réseau intracellulaire et un réseau adjacent aux microtubules c'est-à-dire sous membranaire. Le réseau intracellulaire d'actine traverse de part en part la totalité du cytoplasme des plaquettes. Un maillage de courts filaments d'actine est présent sous les membranes plasmiques et du système canaliculaire ouvert. Différentes protéines sont associées aux filaments d'actines : on trouve l' α -actinine et la tropomyosine pour le réseau d'actine intracellulaire. La spectrine et la filamine sont essentiellement associées à l'actine sous membranaire. Une partie de ces protéines permet la liaison du réseau d'actine avec des protéines membranaires comme les glycoprotéines α Ib β 3 et Ib (Hartwig & DeSisto, 1991; Hartwig & Italiano, 2003).

3. Cytoplasme

Le cytoplasme des plaquettes est composé d'un grand nombre d'organites comme des mitochondries, des grains de glycogène et différents types de granules (Cf. **Figure 4 p.35**).

Parmi les différents types de granules, les granules α sont les plus abondantes. Elles renferment des protéines chimiokines comme le facteur plaquettaire 4 (PF-4), des facteurs de coagulation (V, XI, XIII), la β -thromboglobine, des IgG plasmatiques, des protéines d'adhésion (facteur von Willebrand vWF, fibrinogène) et des facteurs de croissance (PDGF, TGF- β). Les membranes des granules α renferment de nombreuses molécules comme l'intégrine α IIb β 3, la P-sélectine et PECAM-1.

Les granules δ ou denses (denses aux électrons en microscopie électronique) sont moins nombreuses que les granules α ; elles contiennent des nucléotides comme l'ADP et l'ATP synthétisé *in situ*, du Ca^{2+} et de la sérotonine (5-HT) captée elle du plasma.

Les lysosomes renferment un certain nombre d'enzymes comme des hydrolases acides, des phosphatases acides, de la collagénase...

Les autres types d'organites composant le cytoplasme plaquettaire sont les mitochondries siège de la chaîne respiratoire, les peroxysomes qui contiennent la catalase responsable de la réduction du peroxyde d'hydrogène.

Les plaquettes ne contiennent pas de noyaux néanmoins elles renferment des ARNm issus des mégacaryocytes. Elles possèdent l'équipement nécessaire (polyribosomes, réticulum endoplasmique rugueux) pour la traduction de ces ARNm. Cependant cette activité traductionnelle est principalement limitée aux plaquettes nouvellement formées ou activées par des agonistes (Gnatenko *et al.*, 2003).

II. Physiologie plaquettaire

La fonction hémostatique assure le maintien du sang à l'état liquide et la masse sanguine, conditions indispensables à la vie. Ceci impose la prévention de toute thrombose intra-vasculaire intempestive. A l'inverse, lors de la lésion de l'endothélium vasculaire, il est indispensable que la réponse physiologique adaptée, l'hémostase, puisse se dérouler

rapidement. L'hypothèse actuelle indique que la balance hémostatique est contrôlée par un équilibre entre les médiateurs anti-thrombogènes libérés par l'endothélium et ceux libérés par les plaquettes, pro-thrombogènes.

Nous décrirons succinctement le rôle de l'endothélium pour nous focaliser par la suite sur les plaquettes sanguines.

1. Endothélium vasculaire

L'endothélium vasculaire contrôle la réactivité plaquettaire via trois principaux mécanismes : *i* par le monoxyde d'azote (NO), synthétisé par les cellules endothéliales via l'enzyme eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) à partir de L-arginine et d'oxygène. Le NO augmente le taux intra-plaquettaire de GMPc, réduit le taux de calcium disponible et inhibe l'activité de la thromboxane synthase (Freedman & Loscalzo, 2003). *ii* par la prostacycline I₂ produite dans les cellules endothéliales principalement par la PGH synthase 2 et la prostacycline synthase à partir de l'acide arachidonique. La prostacycline déclenche via son récepteur (IP) couplé aux protéines G α s l'augmentation du taux intracellulaire d'AMPc ce qui au final inhibe la réponse plaquettaire (Moncada *et al.*, 1976; Cheng *et al.*, 2002). Et *iii* par l'ecto-adenosine diphosphatase ou ecto-ADPase enzyme exprimée par les cellules endothéliales qui limite la biodisponibilité en nucléotides pro-agrégants ADP et ATP (Marcus *et al.*, 2005; Davi & Patrono, 2007).

L'endothélium fait partie intégrante du système hémostatique. La balance hémostatique comprend de l'autre côté les plaquettes sanguines.

2. Plaquettes sanguines

Lors de la lésion de l'endothélium un déséquilibre de la balance hémostatique se produit en faveur de l'activation des plaquettes. En effet l'exposition par le sous-endothélium d'une surface pro-agrégante, la levée du frein anti-agrégant exercé par l'endothélium et

l'activité pro-agrégante de base des plaquettes, entraîne leur activation dont la finalité est de réduire la lésion de l'endothélium et de rétablir l'intégrité du vaisseau sanguin.

L'hémostase physiologique comprend un évènement déclenchant (lésion), des réactions qui font intervenir les plaquettes, l'endothélium et les facteurs de coagulation pour amener à une étape finale qui est la constitution d'un thrombus fibrino-plaquettaire.

Schématiquement on distingue l'hémostase primaire qui comprend l'ensemble des interactions plaquettes-vaisseaux sanguins, la coagulation qui est l'ensemble des mécanismes qui permettent la transformation du fibrinogène en fibrine, et la fibrinolyse qui est l'étape de dégradation du caillot. Hémostase primaire et coagulation sont *in vivo* des réactions concomitantes et interconnectées.

3. Hémostase primaire

L'hémostase primaire conduit à la formation d'un thrombus constitué par un agrégat de plaquettes reliées entre elles par le fibrinogène ; cette étape peut se suffire à elle-même lorsque les lésions sont de faibles importances. Elle se décompose de la manière suivante : *i*, les plaquettes doivent adhérer au sous endothélium exposé, ce qui conduit à *ii*, l'activation des plaquettes au cours de laquelle elles changent de forme et libèrent un certain nombre de médiateurs qui amplifient l'activation et le recrutement d'autres plaquettes circulantes, et *iii*, enfin la dernière étape est l'agrégation des plaquettes, via l'activation du récepteur plaquettaire au fibrinogène, l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Cf. **Figure 5 p.42**).

3.1. Adhésion

L'adhésion des plaquettes au sous endothélium est permise par différents récepteurs qu'elles expriment à leur surface. Le collagène, l'un des constituants du sous endothélium, est le principal élément d'adhésion des plaquettes. Le tableau 1 liste une partie de ces récepteurs. Nous décrivons les deux principaux récepteurs d'adhésion des plaquettes (Cf. **Tableau 1 p.43**).

Phase de réponse	Ligands	Récepteurs	Voie de signalisation déclenchée
Adhésion	vWF	GP Ib-V-IX	PI 3-kinase
	Collagène	Intégrine $\alpha 2\beta 1$, GP VI-FcR γ	PI 3-kinase, PLC γ
	Fibrinogène, fibrine	Intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$	
	Fibronectine	Intégrine $\alpha 5\beta 1$	
	Laminine	Intégrine $\alpha 6\beta 1$	
Propagation			
<i>1-activation</i>	thrombine	PAR 1 et 4	Gq, G12/13, PLC β
	ADP	P2Y1, P2Y12	Gq, Rho, PLC β Gi
	TxA ₂	TP α et TP β	Gq et G12/13, PLC β
	Adrénaline	$\alpha 2A$	Gz
	PGE ₂	EP3	Gi
	sérotonine	5-HT2A	Gq
<i>2-agrégation</i>	Fibrinogène, vWF, fibronectine	Intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ activée	PI 3-kinase, PLC γ
Stabilisation	P-sélectine	GP Ib-V-IX	
	CD40 ligand	Intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ activée	
Inhibition	PGI ₂ /PGE ₁	IP	Gs, AMPc, GMPc, PKA
	PGD ₂	DP	Gs, AMPc, GMPc, PKA

Tableau 1 : Ligands, récepteurs et voies de signalisation activés au niveau plaquettaire.

3.1.1. Le complexe de glycoprotéines Ib-V-IX

Il s'agit d'un complexe réunissant les glycoprotéines Ib α , Ib β , V et IX. Les mécanismes d'adhésion des plaquettes sont déterminés en grande partie par les forces d'écoulement du sang au site de la lésion. Lorsque les forces de cisaillement sont importantes, comme cela se rencontre au niveau des artères de faible diamètre ou des artérioles, l'adhésion des plaquettes au collagène se fait par l'intermédiaire du complexe de glycoprotéines (GP) Ib-V-IX lié au facteur von Willebrand (vWF) lui-même lié au collagène du sous endothélium. Cette interaction n'est pas nécessaire dans les zones de faibles forces de cisaillements rencontrées au niveau des veines ou des artères (Savage *et al.*, 1998; Jackson, 2007). De plus cette première interaction n'est pas en elle-même suffisante pour maintenir et consolider l'adhésion des plaquettes ; son bénéfice est néanmoins de permettre de ralentir les plaquettes au niveau du sous endothélium et de faciliter les interactions avec d'autres types de récepteurs d'adhésion dont les immunoglobulines de type GPVI.

3.1.2. Glycoprotéine VI

De façon similaire à la liaison du complexe GPIb-V-IX-vWF-collagène, l'interaction de la GPVI-FcR γ (FcR γ , dimère de chaînes γ , récepteur des Fc des immunoglobulines) avec le collagène permet de déclencher un certain nombre de signaux intra-plaquettaires permettant d'augmenter l'affinité des récepteurs pour leur ligand. Ainsi dans les conditions de forces de cisaillements faibles, l'interaction des plaquettes avec le collagène se fait essentiellement via les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et le complexe GPVI-FcR γ (Clemetson & Clemetson, 2001). L'absence de GPVI empêche toute adhésion et activation des plaquettes et empêche également l'activation d' $\alpha 2\beta 1$ suggérant son rôle primordial alors que $\alpha 2\beta 1$ aurait davantage une action de soutien (Jandrot-Perrus *et al.*, 1997; Nieswandt *et al.*, 2001).

3.2. Activation des plaquettes

Une fois l'adhésion des plaquettes stabilisée et solide, un processus plus ou moins concomitant d'activation peut s'opérer. L'activation des plaquettes est la réponse engendrée

par leur adhésion au site de la lésion. Cette activation se traduit par *i*, des modifications morphologiques des plaquettes, *ii*, la production de thromboxane A₂ (TxA₂), *iii*, l'activation du récepteur αIIbβ₃ et *iv*, la libération du contenu des granules de sécrétion α et δ. Ce processus s'auto-amplifie de manière à permettre aux plaquettes ainsi accumulées et activées au site de lésion de s'agréger.

Nous décrirons tout d'abord les récepteurs impliqués dans cette étape, puis les modifications morphologiques observées et enfin les principales voies métaboliques engagées et notamment celle permettant la production de TxA₂.

3.2.1. Récepteurs d'activation

Les récepteurs plaquettaires d'activation peuvent être regroupés au sein de 4 groupes selon le type de récepteurs et de signal engendré. Nous distinguons ainsi les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG), les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), les récepteurs de type intégrine et enfin les récepteurs canaux comme P2X₁, récepteur à l'ATP qui permet une entrée massive de Ca²⁺ dans les plaquettes (Hechler *et al.*, 2003).

Nous décrirons les principaux récepteurs puis les principales voies de signalisation impliquées.

3.2.1.1. Les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques, RCPG

Le recrutement de davantage de plaquettes est permis par l'accumulation dans une zone restreinte au niveau de la lésion, de médiateurs produits et/ou libérés par les plaquettes. Ces médiateurs sont principalement les nucléotides ADP/ATP, le thromboxane A₂ (TxA₂) produit par les plaquettes, et la thrombine générée via le facteur tissulaire plasmatique sur la surface des plaquettes. Ces médiateurs agissent au niveau des plaquettes via des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques ou RCPG. Les protéines G sont constituées de trois sous unités Gα, Gβ et Gγ. Les différentes sous unités Gα exprimées par les plaquettes sont Gα_s, q, 12/13, z et i2/3 (Wettschureck & Offermanns, 2005)

Récepteurs à l'ADP

L'ADP libéré des granules δ des plaquettes et dont l'action est auto et paracrine, se fixe aux RCPG P2Y1 et P2Y12 (Gachet, 2006; Murugappa & Kunapuli, 2006). P2Y1 est couplé à la protéine $G\alpha_q$ alors que P2Y12 à $G\alpha_{i2}$. La présence des deux types de récepteurs semble nécessaire pour une action complète de l'ADP (Jin & Kunapuli, 1998). P2Y12 contribuerait plus spécifiquement que P2Y1 dans l'exposition par les plaquettes d'une membrane pro-coagulante et ainsi dans la génération de thrombine. (Andre *et al.*, 2003; Leon *et al.*, 2003). La réponse plaquettaire à la thrombine ou au TxA_2 est potentialisée par les deux types de récepteurs suggérant ainsi le rétrocontrôle positif de ces agonistes via l'ADP et ses récepteurs pour maintenir et augmenter l'activation des plaquettes (Fabre *et al.*, 1999).

Récepteurs à la thrombine

La thrombine est le deuxième effecteur principal intervenant entre autre au cours de cette étape d'activation. Cette protéine catalyse la transformation du fibrinogène en fibrine, protéine indispensable pour stabiliser l'agrégat de plaquettes. La thrombine est synthétisée, après la lésion de l'endothélium, sur une surface pro-coagulante et grâce à l'action des facteurs de coagulation et du facteur tissulaire. La production locale de thrombine à la surface des plaquettes facilite son action sur ses récepteurs. Ceux-ci appartiennent aux RCPG appelés PAR « protease-activated receptor » (Coughlin, 2005). La thrombine se lie à son récepteur, hydrolyse la partie N-terminale de ce récepteur démasquant ainsi une nouvelle extrémité responsable de l'activation. Les récepteurs PAR sont couplés aux protéines $G\alpha_q$, 12/13 et i. Les plaquettes chez l'homme expriment les récepteurs PAR1 et PAR4. Les expériences ont montré que PAR1 est sensible à de faibles concentrations de thrombine alors que PAR4 nécessite au contraire de fortes doses de ligand (Kahn *et al.*, 1999).

Récepteurs au thromboxane A_2

Le TxA₂ est issu comme nous le verrons plus loin du métabolisme de l'acide arachidonique. Il agit localement en raison de sa courte demie-vie sur les récepteurs RCPG TP α et β également des cibles pour les prostaglandines PGG₂ et PGH₂. Ils sont couplés aux protéines G α q et 12/13 (Offermanns *et al.*, 1994). Dans les plaquettes, TP α est majoritaire par rapport à TP β . L'inactivation chez la souris des récepteurs au thromboxane entraîne un défaut de formation d'un thrombus stable et réduit la progression de la plaque athéromateuse chez les souris ApoE^{-/-} (Cheng *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2004).

Signalisation induite par les RCPG

Pour induire la formation d'un thrombus, les agonistes, thrombine, ADP et TxA₂ vont activer des protéines G spécifiques et ainsi permettre le changement de forme, la dégranulation et l'activation du récepteur α Ib β 3.

L'ADP active les protéines G α q et i alors que le TxA₂ et la thrombine stimulent les sous unités G α q et G α 12/13. Des expériences d'inactivation sélective des sous unités G α ont permis de mettre en évidence certaines de leurs caractéristiques dans la réponse plaquettaire. Ainsi, les sous unités G α q, 13 et i2 apparaissent comme les plus importantes d'un point de vue fonctionnel au niveau des plaquettes.

Plus précisément, la sous unité G α q active les isoformes β 2 et β 3 de la phospholipase C (PLC) présentes dans les plaquettes. L'activation de la PLC β conduit à la formation à partir du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PI4,5-P2) d'inositol triphosphate (IP3) et de diacyl glycérol (DAG) qui seront responsable respectivement de l'augmentation du calcium intracellulaire et de l'activation de la protéine kinase C (Johnson *et al.*, 1996; Offermanns *et al.*, 1997). L'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire provenant essentiellement du système tubulaire dense joue un rôle fondamental dans l'activation de nombreuses enzymes comme certaines phospholipases A₂ dont nous verrons la fonction au niveau du métabolisme de l'acide arachidonique.

Le Ca²⁺ et le diacylglycérol (DAG), activent la protéine CalDAG-GEFI, qui stimule la GTPase Rap1B impliquée dans l'activation de l'intégrine α Ib β 3 (Crittenden *et al.*, 2004; Cifuni *et al.*, 2008). En même temps il semblerait que Rap1B puisse être activée par la PI3-

kinase (Woulfe, 2005). Deux voies de signalisation seraient donc impliquées dans l'activation de l'intégrine α IIb β 3 : celle faisant intervenir la sous unité $G\alpha$ q, PLC β , DAG et Ca^{2+} , l'autre $G\alpha$ i, PI3-kinase, le point commun étant l'activation de la protéine Rap1B.

La sous unité $G\alpha$ 13 est impliquée dans la voie de la kinase Rho (Hart *et al.*, 1998; Fukuhara *et al.*, 2001). Cette dernière inhibe l'activité de la phosphatase des chaînes légères de la myosine (MLC phosphatase) ce qui provoque une accumulation de chaînes légères de myosine phosphorylées impliquées dans le changement de forme des plaquettes.

Le récepteur à l'ADP, P2Y₁₂, est couplé à la protéine $G\alpha$ i ; celle-ci inhibe l'activité de l'adénylate cyclase ce qui limite l'accumulation d'AMPc et ainsi favorise l'activation plaquettaire. Cette sous unité comme les sous unité $G\beta/\gamma$, est impliquée dans l'activation de la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3-kinase) (Clapham & Neer, 1997). Les PI3-kinases sont des enzymes qui phosphorylent les positions 3 du noyau inositol des phosphoinositols (PIP) pour donner des PI3-P, PI3,4-P2, PI3,5-P2 et PI3,4,5-P3. Le PI 3,4-P2 est le substrat de la PLC γ 2 tandis que le PI3,4,5-P3 permet la translocation vers la membrane de protéines contenant dans leur séquence un domaine PH « pleckstrin homology domain » notamment porté par la PLC γ 2. Ceci suggère que la PI3-kinase apporte le substrat pour l'action de la PLC γ 2, mais son implication dans l'activation directe de cette PLC n'est pas prouvée. (Cifuni *et al.*, 2008).

3.2.1.2. Les récepteurs à activité tyrosine kinase, RTK

Les récepteurs à activité tyrosine kinase provoquent une fois activés, une cascade de phosphorylation sur des résidus tyrosines. Soit le récepteur possède cette activité intrinsèque c'est le cas par exemple du récepteur de la thrombopoïétine (c-Mpl), soit le récepteur est associé à des tyrosines kinases comme la GPVI- FcR γ et le complexe Ib-V-IX.

Le dimère de FcR γ contient deux sites ITAM « Immunoreceptor tyrosine-based activatory motifs ». La phosphorylation de ces motifs induit une cascade de signalisation faisant intervenir des tyrosines kinases Syk et des protéines adaptatrices membranaires LAT « Linker for Activation of T-cells ». Au final ce complexe permet la phosphorylation et l'activation de la phospholipase C γ 2. De plus la protéine LAT est associée à la PI3-kinase

qui génère notamment le substrat de la PLC γ . Les domaines ITAM peuvent subir une régulation via des protéines transmembranaires contenant des domaines ITIM « Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs ». Parmi ces protéines PECAM-1 serait un inhibiteur de la signalisation impliquant GPVI-FcR γ (Watson *et al.*, 2001). La signalisation induite par la GPIb-V-IX suit les mêmes voies.

3.2.1.3. Les récepteurs de type intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères associant une sous unité α et une sous unité β . Au niveau des plaquettes sont exprimées les intégrines α IIb β 3, α 2 β 1, α 5 β 1, α v β 3 et α 6 β 1. L'intégrine α IIb β 3 joue un rôle fondamental dans la réponse plaquettaire ; c'est la glycoprotéine la plus abondante dans les plaquettes et lie dans les conditions basales, le vWF et la vitronectine et lorsqu'elle est activée le fibrinogène. Son activation est indispensable pour permettre les interactions plaquettes-plaquettes et la formation d'un thrombus. Enfin un défaut de son expression ou de son fonctionnement entraîne une pathologie hémorragique sévère la thrombasthénie de Glanzmann (Nurden, 2005).

Les plaquettes reçoivent deux types de signalisation : une voie « inside-out » qui regroupe tous les événements qui concourent à l'activation des intégrines et particulièrement la glycoprotéine α IIb β 3. L'activation des intégrines déclenche une signalisation « outside-in » responsable de la réponse plaquettaire et notamment la libération du contenu des granules de sécrétion. La partie intracytoplasmique des intégrines permet le déclenchement de différents signaux parmi lesquels nous pouvons citer les phosphorylations de tyrosines kinases comme Src (Oberfell *et al.*, 2002). Les intégrines sont en étroite relation avec les PI3-kinases présentes dans les plaquettes (PI3 kinase α , β γ et δ) (Selheim *et al.*, 2000). La partie intracytoplasmique des intégrines est en outre associée avec des protéines du cytosquelette comme l' α -actinine et la filamine (Van der Flier & Sonnenberg, 2001).

L'activation plaquettaire associe plusieurs voies de signalisation interconnectées, dont la finalité est de permettre des modifications morphologiques, et d'amplifier la libération des agonistes pour le recrutement et la formation d'un agrégat de plaquettes.

3.2.2. Changement de forme des plaquettes

En réponse aux agonistes, thrombine, ADP et TxA₂, les plaquettes via des modifications de leur cytosquelette passent d'une forme discoïde à une forme sphérique avec émission de filopodes ou de lamellipodes. Ces modifications s'accompagnent de la libération du contenu des granules de sécrétion renfermant des agonistes de l'agrégation plaquettaire. Ceci implique donc des réarrangements des éléments du cytosquelette c'est-à-dire des filaments d'actine et de myosine.

On observe une modification importante de l'organisation des filaments d'actine qui se fait en trois étapes : *i* perte de l'organisation du réseau d'actine sous membranaire par augmentation du calcium intracellulaire, *ii* formation de sites de nucléation et de polymérisation et *iii* assemblage de filaments d'actine pour la formation des filopodes et lamellipodes. Les filopodes sont des expansions cytoplasmiques longues sous tendues par une organisation des filaments d'actine associant les protéines telles que l' α -actinine et la fascine. Ils permettraient un ralentissement des plaquettes au site de lésion alors que la formation de lamellipodes, expansions membranaire plates en forme de feuillet, permettraient un étalement recouvrant une plus grande surface (Falet *et al.*, 2002; Small *et al.*, 2002; Jackson, 2007).

Lors du changement de forme des plaquettes se produit la phosphorylation des chaînes légères de myosine. Cette phosphorylation est sous la dépendance du système Ca²⁺-calmoduline et de la voie Rho-kinase (Nachmias *et al.*, 1985). En l'absence de la sous unité G α 13, aucun agoniste (thrombine, TxA₂ ou ADP) ne déclenche de modifications morphologiques, d'activation de la voie Rho-kinase ou de phosphorylation des chaînes légères de myosines (Moers *et al.*, 2003).

3.2.3. Modifications biochimiques

Nous avons mentionné les différentes voies de signalisation engagées lors de l'activation des plaquettes. D'une manière globale, les principales conséquences de l'activation plaquettaire sont *i*, une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire qui active un certain nombre de protéines kinases (PKC, PI3-kinase) et des phospholipases (PLC et PLA₂) et *ii* une

diminution du taux d'AMPc. De plus le processus d'activation déclenche l'une des voies les plus importantes : la libération de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires et son métabolisme. En effet cet acide gras est la source d'un agoniste très puissant de l'agrégation, il s'agit du thromboxane A₂ (TxA₂). Nous détaillerons par la suite ce métabolisme.

L'activation permet le changement de forme des plaquettes, la libération du contenu des granules de sécrétions et enfin l'activation de l'intégrine αIIbβ3. L'ensemble de ces événements préparent les plaquettes à former un agrégat permettant au final de colmater la brèche vasculaire.

3.3. Agrégation des plaquettes

La principale conséquence de l'activation des plaquettes est d'activer l'intégrine αIIbβ3. Il s'agit d'un hétérodimère transmembranaire qui lie, une fois activé, le fibrinogène et le vWF or la nature dimérique du premier et multimérique du second favorise la formation d'un maillage. La signalisation inside-out plaquettaire consécutive à leur activation induit un changement conformationnel de l'intégrine αIIbβ3 augmentant ainsi son affinité pour le fibrinogène (Bennett, 2005). La signalisation outside-in engendrée par la liaison de l'intégrine αIIbβ3 au fibrinogène participe à la dégranulation plaquettaire (Offermanns, 2006).

Au final, l'amas de plaquettes est stabilisé par ses interactions avec le fibrinogène. Un réseau de fibrine former par l'activité pro-coagulante des plaquettes consolidera cet agrégat.

3.4. Sécrétion et activité pro-coagulante des plaquettes

La sécrétion du contenu des granules plaquettaires permet d'augmenter l'intensité du signal d'activation et d'agrégation des plaquettes. Chronologiquement se produit d'abord la libération du contenu des granules α puis δ et enfin celui des lysosomes (Reed *et al.*, 2000; Flaumenhaft, 2003).

Enfin au cours du changement de forme se produit également un remodelage de la membrane plasmique des plaquettes. En effet ceci se traduit par une exposition de phosphatidylsérine à la face externe des plaquettes offrant ainsi une surface électronégative indispensable pour l'activation de certains facteurs de coagulation notamment pour la formation de thrombine (Bouchard & Tracy, 2001; Heemskerk *et al.*, 2002). La thrombine issue de la prothrombine, clive l'extrémité N-terminale des chaînes α et β du fibrinogène. Les monomères de fibrine ainsi formés polymérisent entre eux pour former un réseau.

L'activation des plaquettes et l'activation des cascades de coagulation sont deux phénomènes complémentaires et simultanés. La coagulation fait intervenir des facteurs de coagulation pour permettre la formation d'un réseau de fibrine qui enserre et consolide l'amas de plaquettes. La coagulation plasmatique fait intervenir des protéines de la coagulation, la vitamine K et le facteur tissulaire. Les facteurs de coagulation, zymogènes, sont désignés par des chiffres romains ; on distingue *i*, les facteurs vitamine K dépendants (prothrombine, facteurs VII, IX et X). Ils sont synthétisés dans le foie en présence de vitamine K. *ii*, Les cofacteurs (facteurs V et VIII). *iii*, Le facteur XIII qui stabilise le caillot de fibrine et enfin les facteurs XI, XII, la prékallikréine et le kininogène de haut poids moléculaire.

La coagulation est un processus local ainsi des inhibiteurs comme l'antithrombine, les protéines C et Z et le TFPI « tissue factor pathway inhibitor » maintiennent cette réaction au site de la lésion de l'endothélium.

III. Libération et métabolisme de l'acide arachidonique

1. Les membranes plaquettaires

Les membranes des plaquettes sont constituées principalement de phospholipides (>65%), de lipides neutres comme le cholestérol (20-30%) et de glycolipides (5%). Les phospholipides sont constitués d'un glycérol sur lequel sont acylés en position sn-1 en général un acide gras saturé ou monoinsaturé, en position sn-2 un acide gras polyinsaturé et en sn-3 un phosphate et un groupement polaire. Il existe différentes classes de phospholipides répartis dans les plaquettes de la façon suivante : 55% de phosphatidylcholine (PC), 21 % de

phosphatidyléthanolamine (PE), 7% de phosphatidylsérine (PS), et 15% de phosphatidylinositol (PI) (Guichardant & Lagarde, 1983).

L'acide arachidonique (20 :4 n-6) est l'acide gras polyinsaturé majeur (20%) constituant les phospholipides membranaires plaquettaires. Nous le trouvons dans notre organisme ayant une origine soit alimentaire soit endogène par néosynthèse hépatique à partir de son précurseur le 18 :2 n-6. Il est principalement estérifié en position sn-2 des phospholipides de type PC et PE. L'apport de l'acide arachidonique dans les plaquettes se fait par le pool d'acides gras non estérifiés transporté par l'albumine plasmatique. Une fois dans les plaquettes, l'acide arachidonique peut soit servir de substrat énergétique soit être incorporé dans les phospholipides ; dans ce cas, il est d'abord transformé en son dérivé acyl-CoA par une acyl-CoA synthétase (arachidonoyl-CoA synthétase pour l'AA) puis transféré sur un phospholipide par une acyl-CoA transférase.

2. Libération de l'acide arachidonique

Comme nous l'avons décrit précédemment, un certain nombre de voies de signalisation sont enclenchées lors de l'activation des plaquettes. Elles agissent en synergie pour amplifier cette activation et permettre l'agrégation des plaquettes. L'une des conséquences de cette activation est la libération et le métabolisme de l'acide arachidonique qui se traduit par la formation entre autres de thromboxane A₂. Les principales étapes de ce métabolisme sont *i* la libération de l'AA des phospholipides par l'intervention de phospholipases A₂ qui hydrolysent spécifiquement les positions sn-2 des phospholipides, *ii* transformation via la prostaglandine H synthase et la thromboxane synthase pour former le thromboxane A₂.

2.1. Les phospholipases

2.1.1. Les phospholipases C

Comme nous l'avons vu précédemment les plaquettes contiennent plusieurs isoformes de phospholipase C. Deux sont particulièrement impliquées dans la fonction plaquettaire : la PLC γ essentiellement associée aux RTK et intégrines, et la PLC β associée aux RCPG. L'action des PLC est de provoquer l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire en le libérant du système tubulaire dense où il est stocké, et d'activer la protéine kinase C. L'une des conséquences est l'activation des phospholipases de type A_2 .

2.1.2. Les phospholipases A_2 (PLA $_2$)

Les PLA $_2$ catalysent la réaction d'hydrolyse en position sn-2 des glycérophospholipides membranaires ce qui conduit à la formation d'acides gras non estérifiés et de lysophospholipides. Cette réaction est particulièrement importante lorsque l'acide gras libéré est l'acide arachidonique. Les autres produits comme la lysophosphatidylcholine, précurseur du PAF « platelet activating factor », sont également impliqués dans l'activation des plaquettes.

Il existe plusieurs types de PLA $_2$: les sPLA $_2$, cPLA $_2$, iPLA $_2$ et la PAF-AH (acétylhydrolase) (Kudo & Murakami, 2002). Nous décrirons celles impliquées dans la physiologie des plaquettes sanguines : les sPLA $_2$ et cPLA $_2$.

2.1.2.1. Les sPLA $_2$

In vitro, les sPLA $_2$ hydrolysent la liaison ester sn-2 des glycérophospholipides sans préférence particulière pour l'acide gras présent à cette position. Cette réaction enzymatique nécessite du Ca^{2+} en concentration mM et un pH entre 7-9. Il existe plusieurs types de sPLA $_2$ parmi lesquelles les sPLA $_2$ du groupe II, qui agissent au niveau de phospholipides anioniques comme les phosphatidylglycérol, les PE, les PS et les PC.

Les plaquettes contiennent dans leurs granules de sécrétion la sPLA $_2$ -IIA. La sPLA $_2$ -IIA est constitutivement exprimée dans les tissus comme la rate, le thymus et la moelle

osseuse. Kuwata *et al.* suggèrent que la cPLA₂ libère des acides gras des phospholipides, qui deviennent substrat des 12/15 lipoxygénases. Les hydroperoxydes ainsi formés permettent *i* d'augmenter l'expression du messager de la sPLA₂-IIA induite par des cytokines IL-1 β ou TNF α et *ii* de potentialiser l'action d'hydrolyse de cette enzyme, seule réaction envisageable dans les plaquettes anucléées.

Les données de la littérature indiquent que la sPLA₂-IIA reconnaît préférentiellement une surface membranaire activée comme c'est le cas des plaquettes en présence d'agonistes (Akiba *et al.*, 1997; Kuwata *et al.*, 2000). Enfin la sPLA₂-IIA libérée par les plaquettes activées augmente la production de prostacycline par les cellules endothéliales (Murakami *et al.*, 1993).

2.1.2.2. Les cPLA₂

Les cPLA₂ appartiennent toutes au groupe IV des PLA₂. Il existe trois isoenzymes : cPLA₂ α , β et γ avec une masse moléculaire de 85, 110 et 60 kDa respectivement. La cPLA₂ α est ubiquitaire et constitutive de nombreux tissus sauf des lymphocytes T et B matures. Les cPLA₂, transloquées vers la membrane de façon Ca²⁺-dépendante, hydrolysent des acides gras en sn-2. La cPLA₂ α est la seule enzyme qui présente une sélectivité de substrat ; le degré d'insaturation, la position des doubles liaisons et la longueur de l'acide gras en sn-2 influence la spécificité de substrat de la cPLA₂ α . Elle hydrolyse principalement les phospholipides contenant en sn-2 un AA. La libération de l'AA par la cPLA₂ α est accélérée par la présence de phospholipides oxydés à des concentrations submicromolaires (Nigam & Schewe, 2000).

L'activité de la cPLA₂ α est régulée par la phosphorylation de ses résidus sérine 505, 515 et 727 par les MAP kinases de type Erk et p38. L'activité d'hydrolyse des cPLA₂ requiert une concentration de Ca²⁺ de l'ordre du micromolaire. Dans certains cas il apparaît nécessaire qu'il y ait activation au préalable de la sPLA₂ pour ensuite induire l'activation de la cPLA₂ (Huwiler *et al.*, 1997; Anthonsen *et al.*, 2001).

En résumé principalement deux types de PLA₂ sont impliqués dans le métabolisme de l'acide arachidonique : les cPLA₂ et les sPLA₂.

2.2. Peroxydation enzymatique de l'acide arachidonique au niveau des plaquettes sanguines

Dans les plaquettes, suite à sa déacylation des phospholipides via l'action des cPLA₂, l'acide arachidonique sera métabolisé en divers dérivés à 20 carbones ou eicosanoïdes notamment par la voie de la prostaglandine H synthase (PGHsynthase 1/2, ou COX1/2) et la voie de la 12-lipoxygénase (12-LOX) (Smith & Song, 2002). Les plaquettes contiennent majoritairement la PGH synthase 1 et dans une très faible fréquence l'isoforme 2. Seul 10% des plaquettes de sujets sains expriment la PGH synthase 2. Elle n'intervient pas de manière significative dans la formation de thromboxane A₂ ce qui n'est pas le cas chez des personnes atteintes de pathologies de type thrombocytopenie. La présence de la PGH synthase 2 dans les plaquettes est en partie à l'origine de la résistance à l'aspirine observée chez certaine personne (Rocca *et al.*, 2002). Nous décrivons dans un premier temps la voie PGH synthase et thromboxane synthase puis la voie de la 12-lipoxygénase (Cf. **Figure 6 p. 57**).

2.2.1. Réaction catalysée par la voie PGH synthase-Tx synthase

2.2.1.1. Les PGH synthases 1 et 2.

Les PGH synthases 1 et 2 ont les mêmes propriétés structurales et enzymologiques. Les PGH synthases contiennent une activité cyclooxygénase (COX) et une activité hydroperoxydase (POX) ; la première catalyse la bis oxygénation de l'AA pour former un endoperoxyde cyclique : la PGG₂, la deuxième réduit le groupement 15 hydroperoxyl de la PGG₂ en dérivé hydroxyl : la PGH₂. Les activités COX et POX sont situées sur deux sites différents de la protéine. Les données de la littérature suggèrent que l'activité COX une fois activée est indépendante de l'activité POX (Koshkin & Dunford, 1999). En d'autres termes les réactions COX et POX ne sont pas étroitement liées l'une à l'autre.

L'AA est le substrat préférentiel des PGH synthases 1 et 2, mais ces deux enzymes peuvent métaboliser d'autres acides gras n-3 et n-6 à 20 carbones par exemple le 20 :5n-3 et

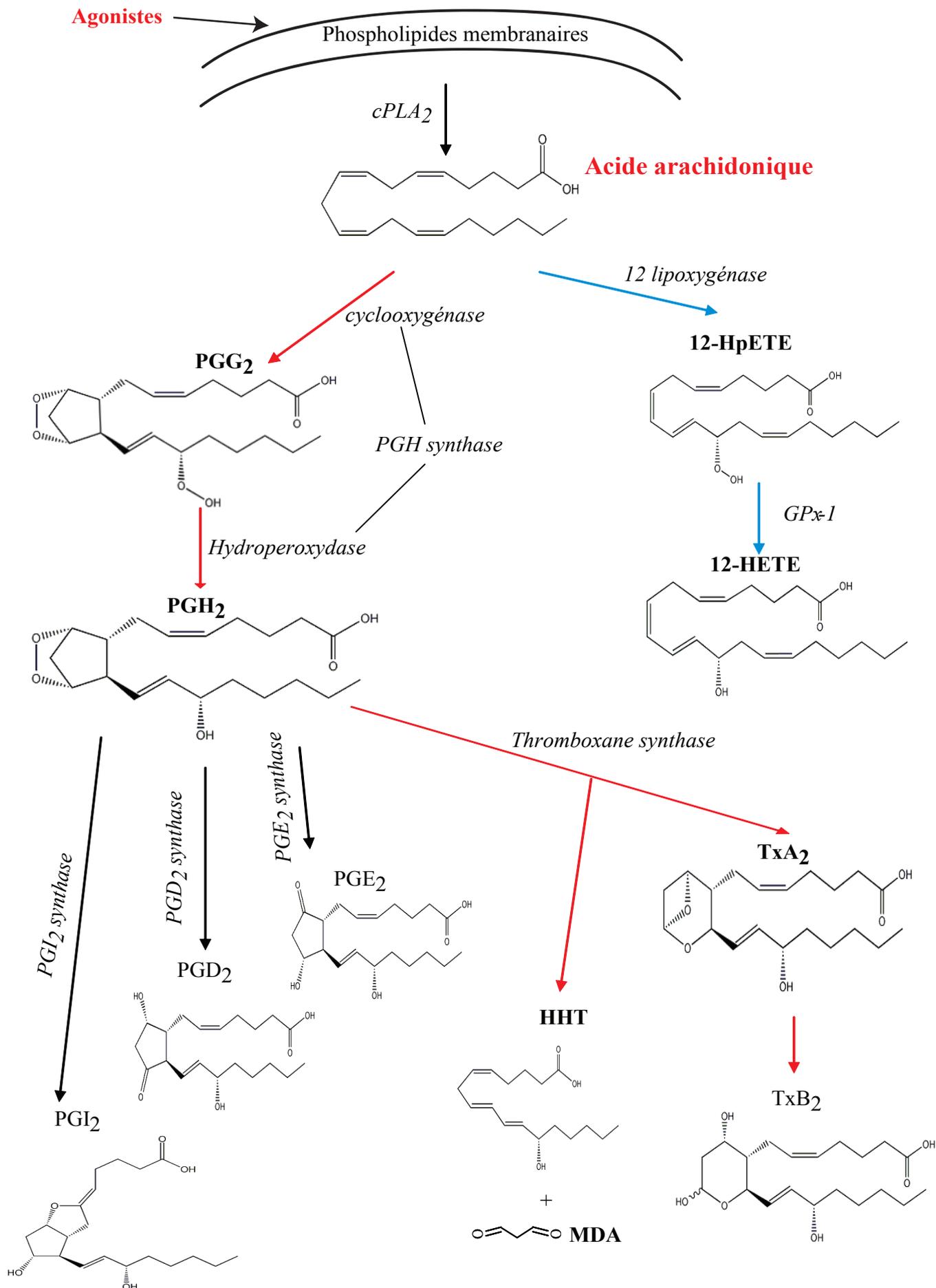


Figure 6 : Métabolisme de l'acide arachidonique.

Suite à l'action d'un agoniste, l'activation de la cPLA₂ induit la libération de l'acide arachidonique estérifié en position sn-2 des phospholipides membranaires. Cet AG peut être oxygéné par deux systèmes enzymatiques. Le premier conduit à la synthèse de thromboxane A₂ via la PGH synthase et la thromboxane synthase et le deuxième permet la formation de l'hydroperoxyde 12 HpETE par la 12 lipoxygénase. D'autres prostaglandines sont synthétisées de façon mineure via des enzymes spécifiques. La PGI₂ synthase n'est pas présente dans les plaquettes mais dans les cellules endothéliales

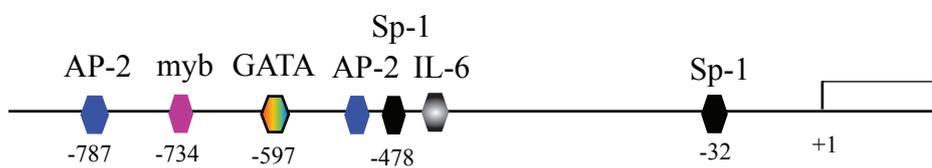
le 20 :3 n-6 (Baer *et al.*, 1991). L'activité COX nécessite la présence d'hydroperoxydes pour fonctionner : la PGH synthase 1 demande 10 fois plus d'hydroperoxydes pour fonctionner que la PGH synthase 2. De plus la glutathion peroxydase cytosolique inhibe spécifiquement l'activité COX de la PGH synthase 1 (Capdevila *et al.*, 1995; Kulmacz & Wang, 1995).

Le gène de la PGH synthase 1 fait environ 22kb avec 11 exons. Le transcrit de 2.8kb traduit donne une hémoglycoprotéine d'environ 576 AA, de 70 kDa (Tanabe & Tohnai, 2002). La séquence promotrice du gène montre différents sites de cis-régulation pour les facteurs de transcription comme GATA. La PGH synthase 1 est exprimée de manière constitutive dans de nombreux types de tissus. La partie 5' du gène ne possède pas de régions TATA ou CAAT indiquant qu'il s'agit vraisemblablement d'un gène de ménage (Cf. **Figure 7 p.59**). Le gène de la PGH synthase 2 fait 8,3 kb. Trois variants de transcrit de 4.6 4.0 et 2.8 kb ont été identifiés (Hla & Neilson, 1992; Jones *et al.*, 1993).

Les deux gènes sont portés par des chromosomes différents (9q32-q33.3 pour PGH synthase 1 et 1q25.2-q25.3 pour PGH synthase 2) (Funk *et al.*, 1991; Tay *et al.*, 1994). Alors que la PGH synthase 1 est totalement inhibée par l'aspirine (acétylation de la sérine en position 529) il apparaît que la PGH synthase 2 y soit moins sensible (Bhattacharyya *et al.*, 1995). Par contre les deux enzymes ont le même Km vis-à-vis de l'acide arachidonique (Smith & Dewitt, 1996).

Suite à l'action de la PGH synthase 1 essentiellement, la PGH₂ ainsi formée sera métabolisée dans les plaquettes par une thromboxane synthase en thromboxane A₂ (TxA₂), puissant agent proagrégant.

(A) Promoteur de la PGH synthase 1 humaine



(B) Promoteur de la PGH synthase 2 humaine

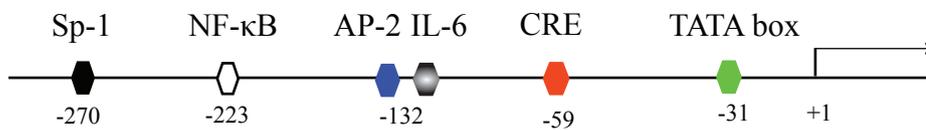


Figure 7 : Représentation schématique du promoteur du gène des PGH synthases 1 (A) et 2 (B).

2.2.1.2. La thromboxane synthase

La thromboxane synthase (Tx synthase) catalyse deux types de réactions: la première est l'isomérisation de la PGH₂ qui conduit à la formation de TxA₂. La seconde réaction est une fragmentation de la PGH₂ en acide 12-hydroxy-5,8,10-heptadécatriénoïque (12-HHT) et en malondialdéhyde (MDA) (Diczfalusy *et al.*, 1977).

La première description de la Tx synthase date de 1976 et a été découverte dans les plaquettes (Needleman *et al.*, 1976). C'est une hémoprotéine de 60 kDa qui appartient à la famille des cytochromes P450 (Yokoyama *et al.*, 1991). Chez l'homme, le gène de la thromboxane synthase est localisé sur le chromosome 7q34-35. Le transcrit fait 2.1 kb (Miyata *et al.*, 1994). Au cours de la différenciation des mégacaryocytes l'expression de la Tx synthase est concomitante à celle de l'intégrine αIIb mais elle n'est pas impliquée dans la formation des plaquettes (Vitrat *et al.*, 2000). L'expression du gène de la Tx synthase est réprimée par PPAR γ via une interaction avec le facteur de transcription NRF2 (Ikeda *et al.*, 2000). Enfin le facteur de transcription p45-NFE2 augmente l'expression de cette enzyme via un site NF-E2/AP-1 situé à -98/-88 dans la région 5' du gène (Deveaux *et al.*, 1997).

La voie de la PGH synthase-thromboxane synthase aboutit à la formation de thromboxane A₂, fondamental dans l'activité des plaquettes sanguines. Une autre voie de transformation de l'acide arachidonique est également présente dans les plaquettes : elle fait intervenir une 12-lipoxygénase.

2.2.2. Réaction catalysée par la voie de la 12-lipoxygénase

La 12 S-lipoxygénase, dioxygénase à fer non hémique, introduit un atome d'oxygène dans la structure de l'acide arachidonique pour former l'acide 12 S-hydroperoxy-5,8,10,14-eicosatétraénoïque (12-HpETE). Les données de la littérature indiquent l'existence de 3 isoformes de 12 S-lipoxygénase localisées au niveau des leucocytes, des plaquettes et de l'épiderme. La 12-lipoxygénase leucocytaire montre 80% d'homologie avec la 15 lipoxygénase si bien qu'on les regroupe sous le terme de 12/15 lipoxygénase (Sun & Funk,

1996). Par contre il y a seulement 40% d'homologie entre la 5 lipoxygénase et la 12-lipoxygénase ce qui suggère que ce sont deux enzymes différentes. Le gène de la 12-lipoxygénase plaquettaire nommé Alox12p, fait environ 13-17 kb. Chez l'homme ce gène est situé sur le chromosome 17p13.1. (Yoshimoto *et al.*, 1992).

Dans les plaquettes, la thrombine entraîne une translocation de la 12-lipoxygénase du cytoplasme vers la membrane (Ozeki *et al.*, 1999). D'un point de vue régulation le NFκB réprime l'expression de la 12-lipoxygénase plaquettaire (Arakawa *et al.*, 1995).

Le 12-HpETE est ensuite réduit en son dérivé hydroxylé le 12-HETE par la glutathion peroxydase 1. La présence d'hydroperoxydes d'acides gras potentialise l'activité de la PGH synthase cependant le 12-HpETE et le 12-HETE inhiberaient l'agrégation induite par le TxA₂ (Croset & Lagarde, 1983).

La formation de thromboxane A₂, via la PGH synthase et la thromboxane synthase ainsi que la synthèse de 12-HpETE, par la 12-lipoxygénase, sont les principaux produits de l'acide arachidonique dans les plaquettes. Ce métabolisme est dépendant de l'oxygène ce qui nous conduit à analyser le rôle général de l'état redox des plaquettes dans leur fonction.

IV. Implication de l'état redox dans la physiologie plaquettaire

L'interaction plaquettes-vaisseau sanguin est fondamentale dans la régulation de la fonction plaquettaire. L'activité des plaquettes est étroitement contrôlée d'une part pour déclencher la formation d'un thrombus mais également pour limiter cette activation. L'activation des plaquettes est intimement liée à des situations physiopathologiques comme l'athérosclérose (Davi & Patrono, 2007). La fonction plaquettaire est modulée par un certain nombre de facteurs et notamment par les dérivés actifs de l'oxygène (ROS). Il est en effet connu depuis un certain nombre d'années que l'augmentation de la quantité de ROS dans le flux sanguin piège le monoxyde d'azote (NO), puissant agent anti-agrégant, augmente la réactivité des plaquettes, en diminuant l'effet anti-agrégant de l'endothélium. De plus les

données de la littérature montrent que les plaquettes sont également capables de produire des ROS et que ceux-ci sont impliqués dans la régulation de l'activité plaquettaire. L'agrégation des plaquettes en réponse à l'acide arachidonique ou à la thrombine est marquée d'une part via une augmentation de leur consommation en oxygène et d'autre part via une augmentation significative de leur taux de glutathion oxydé (Bressler *et al.*, 1979; Burch & Burch, 1990). Il apparaît que l'état redox des plaquettes constitue une caractéristique importante impliquée dans leur régulation fonctionnelle (Loscalzo, 2003).

1. Définition et caractéristiques des ROS sur la fonction plaquettaire

L'origine des espèces réactives de l'oxygène (ROS) réside dans la réduction électron par électron de la molécule d'oxygène. Ce processus survient au cours de réactions physiologiques comme au cours de la respiration mitochondriale, de l'activité d'oxydases ou bien encore au cours de la détoxification de certains médicaments. Les ROS ayant une réactivité très importante, due à leur électron non apparié, peuvent attaquer les lipides, les protéines et l'ADN et entraîner la formation de produits délétères pour la fonctionnalité ou la survie des cellules. D'une manière générale, ces molécules sont générées en faibles quantités et éliminées par divers antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques. Il existe donc un équilibre entre la production et l'élimination de ces ROS ce qui définit l'état redox.

Le terme ROS désigne les radicaux oxygénés caractérisés par un électron non apparié (anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$, les radicaux hydroxyle HO^{\bullet} , peroxyde ROO^{\bullet} , et alkoxyde RO^{\bullet}), et les dérivés de l'oxygène non radicalaire comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'oxygène singulet 1O_2 et l'ozone O_3 . Nous décrirons les espèces les plus impliquées dans la fonction plaquettaire.

1.1. Anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$

L'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ est formé via l'action d'oxydase comme la NAD(P)H oxydase et au niveau de la chaîne respiratoire. Sa durée de vie dans un milieu biologique est très courte car il subit un processus de dismutation. Cette réaction de dismutation thermodynamiquement endothermique ne peut se faire dans un milieu aprotique (sans H^+).

Ceci explique le fait de la présence en grande quantité d'anion superoxyde au niveau de l'espace intermembranaire. Cependant en présence de protons cette réaction est spontanée et accélérée par la superoxyde dismutase. Cette réaction suit le schéma suivant :



L'anion superoxyde a la capacité d'arracher des protons, et de casser la liaison ester des acides gras (des-estérification des phospholipides). Cette réaction ne se rencontre qu'au niveau de zones non protonées comme entre les deux feuilletts d'une membrane et génère un radical peroxyde ROO^\bullet . Ce type de réaction à terme déstabilise les membranes et peut conduire à la lyse de la cellule. L'anion superoxyde est le précurseur de deux dérivés : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxyde d'azote (ONOO^-).

Le collagène induit une production retardée d'anions superoxyde (de 2 à 3 minutes après la stimulation) ce qui suggère que ces derniers agissent sur le recrutement des plaquettes et la croissance du thrombus. Il a été montré que le collagène active la NAD(P)H oxydase principale source d'anions superoxyde dans les plaquettes et que ces derniers participent à l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$.

La NAD(P)H oxydase est la principale source de ROS (notamment d'anion superoxyde) dans les plaquettes (Seno *et al.*, 2001). C'est une enzyme constituée de plusieurs éléments dont une sous unité catalytique p91^{PHOX} et une sous unité régulatrice p22^{PHOX} (Arthur *et al.*, 2008). Le collagène, la thrombine et l'analogue stable du TxA_2 (U46619)) provoquent une production de ROS vraisemblablement via la PI3 kinase. Cette production est inhibée par un inhibiteur de la NAD(P)H oxydase et en partie par l'aspirine. Enfin le changement de forme des plaquettes et leur agrégation est inhibé par un inhibiteur de la NAD(P)H oxydase (Begonja *et al.*, 2005) (Clutton *et al.*, 2004).

1.2. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le peroxyde d'azote ONOO^-

En l'absence de peroxydases, de catalase ou de métaux de transition le peroxyde d'hydrogène est une molécule stable. La réaction entre le peroxyde d'hydrogène et les ions

Fe^{2+} conduit à la formation d'un radical hydroxyle HO^\bullet . Ce type de radical a une durée de vie très courte de l'ordre de la nanoseconde, mais est particulièrement agressif et peut déstabiliser par exemple les liaisons insaturées des acides gras.

Au niveau des plaquettes, la thrombine provoque des modifications du potentiel de membrane mitochondriale induisant la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Lopez *et al.*, 2007). Le peroxyde d'hydrogène potentialise l'agrégation des plaquettes en réponse à la thrombine, le collagène et le TxA_2 (Freedman, 2008). Les données de la littérature indiquent que l' H_2O_2 stimule la libération d'AA par la cPLA $_2\alpha$ via la protéine kinase C et l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (Han *et al.*, 2003). Enfin, Sporn *et al.* et Cane *et al.* ont montré que l' H_2O_2 diminuait le taux d'ATP cellulaire ce qui diminue l'activité des enzymes responsables de l'acylation des acides gras notamment l'arachidonoyl-coA synthétase. Au final le taux d'acide arachidonique libre s'accumule dans le cytoplasme plaquettaire (Sporn *et al.*, 1992; Cane *et al.*, 1998).

Le peroxyde d'azote résulte de la réaction entre l'anion superoxyde et le monoxyde d'azote NO^\bullet . Sa réactivité est modulée par la présence de HCO_3^- . Plus précisément, en présence de HCO_3^- , le peroxyde d'azote inhibe moins l'activité de la caspase 3 (Ascenzi *et al.*, 2006). Il provoque la nitration de protéines qui contiennent des résidus tyrosines comme la prostacycline synthase. Ceci a aussi comme effet de piéger le NO , rendant son action anti-agrégante moins efficace.

2. Peroxydation lipidique non enzymatique

Les ROS possèdent diverses cibles notamment les acides gras polyinsaturés on parle alors de peroxydation lipidique non enzymatique. La présence dans la structure de ces acides gras, d'atome d'hydrogène bis-allyliques facilement oxydables explique cette attractivité pour les ROS. L'action des ROS, sur les acides gras polyinsaturés, prend une ampleur considérable puisqu'ils permettent, à un élément très abondant, l'oxygène, d'agir sur les acides gras ainsi transformés. En effet, l'oxygène dans son état fondamental est inerte et ne peut pas réagir avec les acides gras polyinsaturés ; par contre une fois transformé par un ROS, les acides gras sont la cible de l'oxygène.

2.1. Peroxydation non enzymatique

La réaction de l'oxygène $^3\text{O}_2$ sur les acides gras polyinsaturés est un processus en chaîne qui se déroule en trois étapes : initiation, propagation et terminaison.

L'étape d'initiation commence par la soustraction sur un acide gras d'un atome d'hydrogène d'un carbone placé entre deux doubles liaisons ce qui conduit à la formation d'un radical lipidique alkyle R^\bullet . Les radicaux qui initient ce type de réaction sont généralement les radicaux hydroxyles HO^\bullet et hydroperoxydes HOO^\bullet .

Phase de propagation : le radical lipidique alkyle, R^\bullet , suite à un réarrangement moléculaire, réagit avec l'oxygène pour donner un radical peroxyde ROO^\bullet . Celui-ci se transforme, en arrachant un atome d'hydrogène à un acide gras voisin, en hydroperoxyde ROOH . L'acide gras qui vient de donner un atome d'hydrogène est alors converti en radical lipidique alkyle R^\bullet et va de ce fait réagir avec l'oxygène pour donner un radical peroxyde ROO^\bullet .

L'hydroperoxyde lipidique ROOH , peut être oxydé en présence de métaux de transition comme le Fe^{2+} ou le Cu^{2+} et former des aldéhydes. La combinaison de deux radicaux lipidiques en produits non radicalaires stoppe cette réaction en chaîne. Il se produit une dimérisation, grâce à la pression de l'oxygène, le plus souvent de radicaux peroxydes entre eux. Certains antioxydants provoquent la rupture de cette réaction en chaîne en piégeant les radicaux peroxyde. **C'est l'étape de terminaison.**

2.2. Conséquence de la peroxydation lipidique

Les dérivés lipidiques ainsi générés vont interagir avec de nombreuses molécules conduisant à leur inhibition, ou leur destruction. Les radicaux peroxydes (ROO^\bullet) perturbent les interactions hydrophobes, conduisant notamment à des altérations structurales au niveau des membranes. Ainsi l'instabilité membranaire provoque des modifications au niveau même de la fluidité et de la perméabilité des membranes ce qui altère les récepteurs qui y sont ancrés et

d'une façon plus large engage la survie cellulaire. De plus, les hydroperoxydes (ROOH) sont à l'origine de composés comme les aldéhydes. Ces derniers comme le 4-hydroxy-2,3-nonéanal (4-HNE) ou le dialdéhyde malonique (MDA) peuvent former des adduits au niveau de résidus lysine, histidine ou cystéine, formant au final des pontages intra et intermoléculaires, rendant ainsi non fonctionnelles les molécules cibles. Dans le cas de l'acide arachidonique, son oxydation non enzymatique aboutit également à la formation d'isoprostanes, utilisables comme marqueur de peroxydation de cet acide gras.

3. Mécanismes de défenses anti-oxydantes

Le terme antioxydant regroupe différents éléments : *i*, des protéines à activité enzymatique notamment la superoxyde dismutase (SOD), les glutathion peroxydases (GPx) et la catalase. *ii*, des protéines sans activité enzymatique, qui vont séquestrer les métaux de transition, comme l'albumine, la ferritine. *iii*, des éléments liposolubles comme la vitamine E, le β -carotène. *iv*, des éléments hydrosolubles, vitamine C et acide urique.

Nous décrirons la SOD, les GPx, la catalase et la vitamine E et leur rôle dans la fonction plaquettaire.

3.1. La superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT)

Il s'agit d'un groupe de métallo-enzymes ubiquitaires. On distingue chez les mammifères 3 isoformes de superoxyde dismutase, chacun issu d'un gène spécifique, caractérisé par le type d'ion cofacteur mais qui catalysent la même réaction. Ainsi on distingue la SOD cytosolique ou à cuivre-zinc (Cu/Zn-SOD, SOD1), la SOD mitochondriale ou SOD à manganèse (Mn-SOD, SOD2), et la SOD extracellulaire également à cuivre et zinc (EC-SOD, SOD3). Le principe de leur action est d'accélérer considérablement la vitesse de dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 . La génération d' H_2O_2 à première vue n'est pas un processus antioxydant puisque des ROS peuvent être générés à partir de ce composé mais l'élimination d' $O_2^{\bullet -}$ permet de limiter les réactions de de-estérification des phospholipides membranaires et le taux de peroxy-nitrite qui piège le NO. Les données de la

littérature indiquent que l'activation des PPAR α ou β augmente l'expression de la Cu/Zn-SOD au niveau des cellules endothéliales (Faraci & Didion, 2004)

La catalase est une protéine hémique qui catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène. Elle est localisée essentiellement dans les peroxysomes. La protéine est un tétramère de 4 chaînes de 500 acides aminés environs. Chez l'homme elle se trouve sur le locus 11p13.

3.2. Les Glutathion peroxydases (GPx)

3.2.1. Les GPx 1 et 4

Les glutathion peroxydases catalysent deux types de réaction : elles réduisent *i*, les hydroperoxydes lipidiques (ROOH) en dérivés alcool correspondant et *ii*, le peroxyde d'hydrogène en eau. Ces réactions ont en commun que les GPx utilisent essentiellement le glutathion comme co-substrat.

Il existe plusieurs isoformes de GPx : quatre d'entre elles contiennent une sélénocystéine dans leur site actif. La sélénocystéine est un acide aminé dérivé d'une sérine ayant subi une modification co-traductionnelle et comportant un atome de sélénium. Les données de la littérature distinguent parmi les GPx à sélénocystéines la GPx intracellulaire cytosolique 1 (cGPx ou GPx1) et la GPx4 (PHGPX « Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase ») toutes les deux sont exprimées dans les plaquettes (Brigelius-Flohe, 1999).

La GPx4 est un monomère de 19 kDa, spécifique des hydroperoxydes d'acides gras. Elle possède entre 30 et 40 % d'homologie avec la GPx1. La particularité de la GPx4 est d'interagir directement au niveau des hydroperoxydes d'acides gras encore intégrés dans les phospholipides ; elle ne dépend donc pas de l'action au préalable d'une phospholipase A₂ pour cliver les hydroperoxydes d'acides gras.

Sutherland *et al.* ont mis en évidence la présence de la GPx4 au niveau des plaquettes et des mégacaryocytes et ont montré que l'activité plaquettaire de la GPx4 est 60 fois moins importante que celle de la GPx1 (Sutherland *et al.*, 2001). Januel *et al.* ont mis en évidence le changement de localisation de la GPx4 au cours de l'activation des plaquettes. En effet, lorsque les plaquettes sont au repos l'activité de la GPx4 est majoritairement localisée au niveau de la membrane plasmique (47% contre 29 % au niveau des mitochondries et 23% dans le cytosol). Une fois activée par la thrombine, la GPx4 est transférée du cytoplasme vers la membrane plasmique (Januel *et al.*, 2006).

La GPx1, cytosolique, est capable de transformer l'H₂O₂ et les hydroperoxydes d'acide gras. Cependant à la différence de la GPx4, les hydroperoxydes doivent être présents dans le cytoplasme pour être métabolisés par la GPx1. La GPx1 utilise spécifiquement le glutathion comme co-substrat à la différence de la GPx4 moins sélective (acide lipoïque, dithiothréitol). La GPx1 (23kDa) est un tétramère où chaque sous unité contient une sélénocystéine. Blankenberg *et al.* ont mis en évidence qu'une faible activité de la GPx1 érythrocytaire était associé à un risque de survenue de maladies cardiovasculaires (Blankenberg *et al.*, 2003).

3.2.2. Activité des GPx

Ricetti *et al.* ont mis en évidence une augmentation de l'activité de la GPx1 après une supplémentation en sélénium (Ricetti *et al.*, 1994). Des résultats similaires sont observés concernant la GPx4 au niveau à la fois de son expression et de son activité. L' α -tocophérol, antioxydant de la famille de la vitamine E, aurait tendance à diminuer l'expression de la GPx4 dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) (Sneddon *et al.*, 2003).

L'activité GPx et la vitamine E sont étroitement liées contre la peroxydation lipidique. La vitamine E génère en cassant la chaîne de propagation de la peroxydation des lipides, des hydroperoxydes. Ceux-ci sont alors réduits par les GPx en alcools. L'activité cyclooxygénase et lipoxygénase nécessite une certaine quantité d'hydroperoxydes pour fonctionner or l'activité des GPx étant de cataboliser les hydroperoxydes ceci induit donc un effet inhibiteur

des GPx sur l'activité de ces enzymes en particulier sur la 12-lipoxygénase et la PGH synthase 1 et 2 (Huang *et al.*, 1999).

Les plaquettes ont la capacité de produire du NO ; la présence de l'enzyme NO synthase (eNOS et iNOS) a été caractérisée dans les plaquettes (Mehta *et al.*, 1995) . Le NO bloque l'action de la thrombine sur les plaquettes en inhibant l'activation de la PI3 kinase et de la PLA₂. L'activité GPx potentialise l'effet inhibiteur du NO en réduisant les hydroperoxydes qui le piègent (Freedman *et al.*, 1995). Le glutathion est un co-substrat important dans un grand nombre de réactions. Ainsi la déplétion en glutathion dans les plaquettes diminue l'activité GPx, diminue le taux d' α -tocophérol et augmente la peroxydation lipidique (Calzada *et al.*, 1991).

3.3. La vitamine E

Parmi les éléments antioxydants liposolubles on trouve la vitamine E (Mustacich *et al.*, 2007). La vitamine E est un terme générique qui regroupe 4 formes de tocophérols (α , β , γ et δ) et 4 formes de tocotriénols (α , β , γ et δ). La structure de base est un noyau chromanol sur lequel est fixée une chaîne saturée à 16 carbones. Les tocotriénols se différencient des premiers par la présence de 3 double liaisons dans cette chaîne latérale. Les différents tocophérols se distinguent par le nombre et la position des groupements méthyles sur le noyau chromanol. La forme la plus active et la plus abondante dans les plaquettes est l' α -tocophérol de plus la fonction des tocotriénols est encore incertaine (Sen *et al.*, 2007).

La vitamine E piège le radical peroxyde (ROO \cdot) pour former un hydroperoxyde (ROOH) et un radical tocophéroxyde (VitE-O \cdot). Ce dernier réagit avec la vitamine C ou tout autre donneur d'hydrogène, pour régénérer la vitamine E (VitE-OH). La vitamine E est absorbée parallèlement aux graisses et est transportée via les chylomicrons. La distribution de la vitamine E aux tissus et cellules périphériques se fait essentiellement par les lipoprotéines via la lipoprotéine lipase. Chan *et al.* ont montré que l'ajout d' α -tocophérol sur la lignée de mégacaryocytes MEG-01, augmente l'activité de la cPLA₂, via une augmentation de l'expression de la protéine et accroît la libération d'acide arachidonique (Chan *et al.*, 1998).

L'ajout d'acide arachidonique sur une suspension de plaquettes provoque la transformation de cet acide gras et parallèlement la consommation de la vitamine E intrinsèque. Les résultats de Chan *et al.*, indiquent que le taux de vitamine E est diminué de moitié dans la première minute de stimulation et que le principal consommateur serait la 12-lipoxygénase (Chan *et al.*, 1991). La vitamine E inhibe l'agrégation induite par le collagène et la formation de TxA₂ de manière dose dépendante vraisemblablement en inhibant la formation d' H₂O₂ produit lors de l'action du collagène (Pignatelli *et al.*, 1999). Enfin il semblerait que la vitamine E inhibe la phosphorylation de la PKC ce qui limite l'agrégation plaquettaire induite par l'acide arachidonique (Freedman & Keaney, 2001).

L'acide docosahexaénoïque

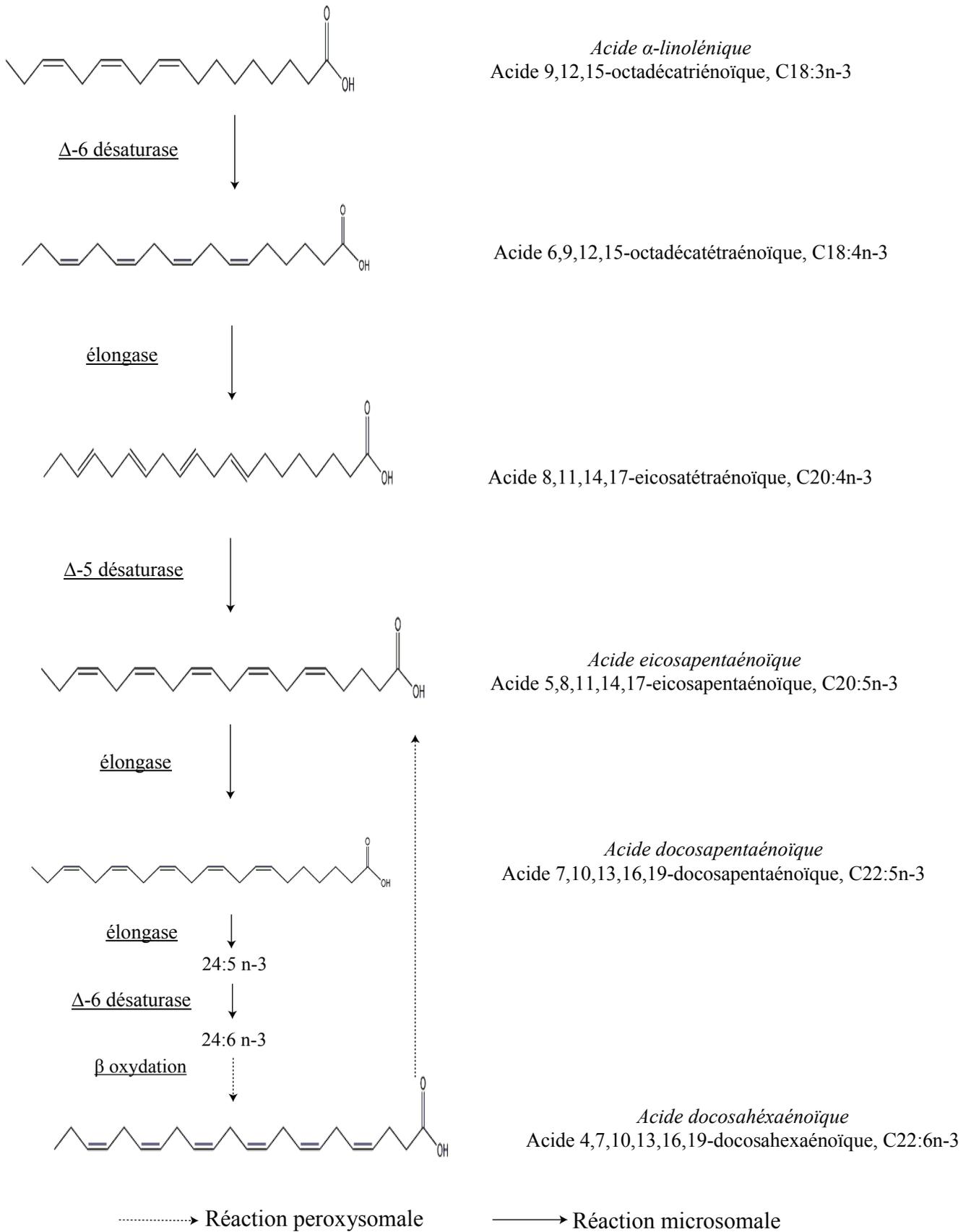
I. Les acides gras polyinsaturés (AGPI)

1. Introduction

Les acides gras (AG) sont constitués d'une chaîne hydrocarbonée, celle-ci pouvant contenir des doubles liaisons ou insaturations. Ainsi on distingue les acides gras saturés comme l'acide palmitique (16 :0), monoinsaturés et polyinsaturés parmi lesquels on trouve l'acide arachidonique (AA, 20 :4n-6), l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20 :5n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22 :6n-3). La nomenclature usuelle indique successivement le nombre de carbones constituant la chaîne hydrocarbonée, puis le nombre d'insaturations et enfin la position de la première insaturation après la fonction méthyle du carbone terminal. Les AG insaturés se répartissent dans quatre familles : n-9, n-7, n-6 et n-3.

Chaque famille d'AG est constitué d'un AG précurseur qui, via une série de réactions d'élongation et de désaturation, produit des AG comme l'AA et le DHA. Ces précurseurs sont l'acide linoléique (18 :2n-6) et l'acide α -linoléique (18 :3n-3) pour les AG n-6 et n-3 respectivement. Les mammifères ne possèdent pas l'équipement enzymatique, en l'occurrence les Δ -12 et -13 désaturases, pour synthétiser *de novo* ces deux précurseurs (Yamanaka *et al.*, 1980). Ainsi le 18 :2n-6 et le 18 :3n-3 sont qualifiés d'AG indispensables et doivent donc être apportés par l'alimentation (Cf. Figures 8 et 9 p. 72-73).

La transformation des précurseurs en leurs dérivés s'opère essentiellement dans les hépatocytes. Ce processus de conversion fait intervenir une série alternée de désaturations, ou élimination de deux atomes d'hydrogène entre deux carbones adjacents, et d'élongations, ou addition de deux atomes de carbones. Les réactions débutent du côté de la fonction carboxylique, si bien que la première insaturation du précurseur sera conservée. Ainsi chaque précurseur donnera uniquement des dérivés de la même famille d'acide gras. La conversion



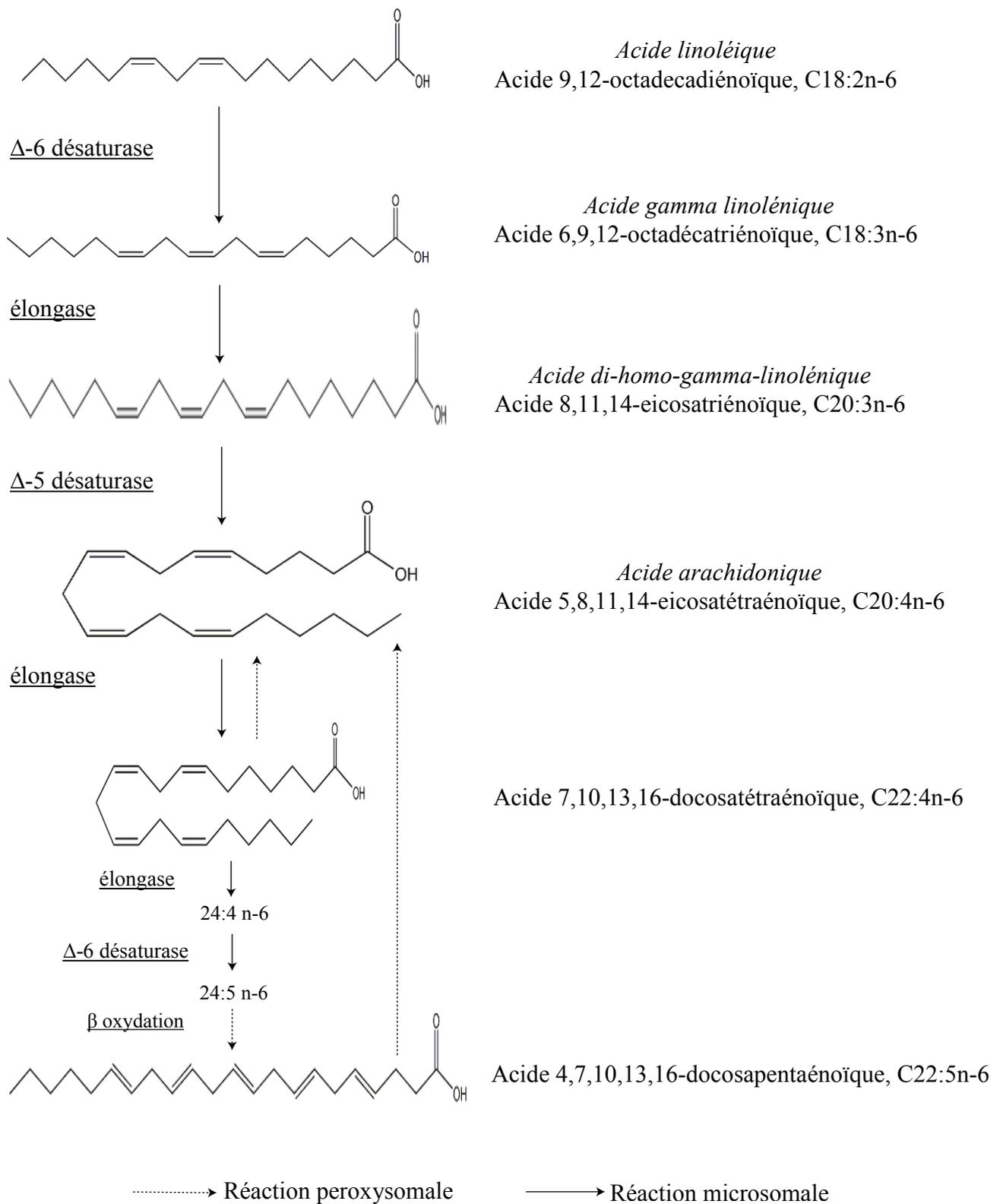


Figure 9 : Formation des acides gras polyinsaturés de la famille n-6

des AG de la série n-6 et n-3 utilise les mêmes enzymes entraînant de ce fait une compétition entre les deux voies (Sprecher, 1981). De plus le rendement de cette réaction est très faible de l'ordre de 2% pour la formation de DHA à partir du 18 :3n-3.

Le principal dérivé du 18 :2n-6 est l'acide arachidonique dont nous avons déjà discuté son importance au niveau des plaquettes. A partir du 18 :3n-3, les réactions de désaturations/élongations, aboutissent à la formation d'acide éicosapentaénoïque ou EPA (20 :5n-3) et de DHA (22 :6n-3), ce dernier étant l'élément final de cette conversion.

La formation de DHA à partir de l'EPA se fait via une élongation du 20 :5n-3 en 22 :5n-3, puis une deuxième élongation induit la formation de 24 :5n-3. Ce dernier via l'action d'une $\Delta 6$ -désaturase est transformé en 24 :6n-3 puis subit une β -oxydation peroxysomale, pour donner le 22 :6n-3 (Voss *et al.*, 1991).

Les AG sont catabolisés via la β -oxydation : ce processus a lieu dans les mitochondries où il est couplé à la chaîne respiratoire, et dans les peroxysomes, essentiellement pour les AG à longue chaîne (supérieur à 20 carbones). Au cours de la β -oxydation peroxysomale, les AG comme le DHA (22 :6n-3) et le 22 :4n-6 sont rétroconvertis respectivement en 20 :5n-3 (EPA) et 20 :4n-6 (AA) (Hagve & Christophersen, 1986).

Outre leur rôle dans le métabolisme énergétique, les AG ont une fonction structurale importante en tant que constituant des phospholipides (PL). Deux voies d'intégration des AG dans les PL sont décrites : les AG s'insèrent dans les PL via la synthèse *de novo* des PL ou grâce à des réactions de déacylation/acylation ou transacylation.

2. Biosynthèse des phospholipides (PL)

La synthèse des PL se fait à partir de l'acide phosphatidique et du diacylglycérol (Vance & Vance, 2004). Comme nous l'avons vu dans les plaquettes, deux classes de PL sont majoritaires : les phosphatidylcholines (PC) et les phosphatidyléthanolamines (PE). Les PC sont synthétisées principalement par les voies de la CDP-choline et de la méthylation. Les PE sont synthétisées par les voies de la CDP-éthanolamine et de la phosphatidyléthanolamine décarboxylase (Cf. **Figure 10 p.75**).

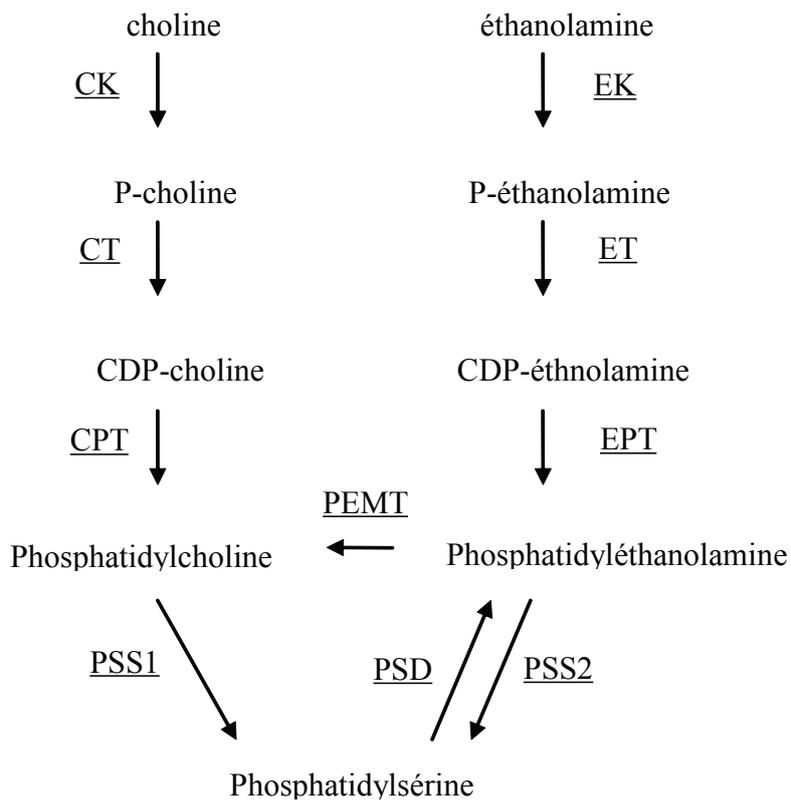


Figure 10 : Synthèse des phospholipides, d'après Vance & Vance, 2004

CK : choline kinase, EK : ethanolamine kinase, CT : phosphocholine cytidyltransférase, ET : phosphatidyléthanolamine cytidyltransférase, CPT : 1,2-diacylglycérol cholinephosphotransférase, EPT: 1,2-diacylglycérol ethanolamine phosphotransférase, PSS1/2: phosphatidylsérine synthase 1/2, PSD: phosphatidylsérine décarboxylase, PEMT: phosphoéthanolamine N-méthyltransférase.

La voie de la CDP-choline a été décrite par Kennedy & Weiss (Kennedy & Weiss, 1956). Cette voie de synthèse fait intervenir successivement une choline kinase qui transforme la choline, apportée par l'alimentation, en phosphocholine. Une phosphocholine cytidyltransférase (CT) permet de produire à partir de la phosphocholine, la CDP-choline qui sera transférée sur un diacylglycérol via la cholinephosphotransférase (CPT) pour former ainsi une phosphatidylcholine. Une autre voie permet de produire des PC : elle est due à la méthylation des PE par la phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférase à partir de S-adénosyl-L-méthionine.

Les deux voies majeures de la synthèse des PE sont celle décrite par Kennedy & Weiss et la décarboxylation de la phosphatidylsérine (PS). La première comme pour les PC implique l'action d'enzymes telles que l'éthanolamine kinase, la phosphatidyléthanolamine cytidyltransférase, et l'éthanolamine transférase. La décarboxylation des phosphatidylsérines (PS) se produit grâce à l'action de la PS décarboxylase.

La synthèse des PS se fait par échange de base Ca^{2+} dépendante avec les PC et PE grâce aux enzymes phosphatidylsérine synthase 1 et 2. Enfin les PI sont synthétisés via la CDP-diacylglycérol inositol phosphotransférase à partir de l'acide phosphatidique.

3. Composition des phospholipides (PL)

La composition des phospholipides peut être modifiée selon trois cascades de réactions : déacylation/acylation, transacylation coenzyme A dépendante ou indépendante.

3.1. Réaction de déacylation/acylation

Ce processus a été décrit par Lands et Merkl (Lands & Merkl, 1963): les AG estérifiés en position sn-2 des PL sont clivés par une phospholipase A_2 , permettant à un autre AG préalablement activé sous la forme d'acyl-CoA par une acyl-CoA synthétase, de réacyler la position sn-2 via une 1-acyl-2-lysophospholipide acyltransférase. Comme nous l'avons vu dans les plaquettes, il existe une acyl-CoA synthétase spécifique de l'acide arachidonique ce

qui permet une réacylation efficace de cet AG. Les 1-acyl-2-lysoPC sont les accepteurs préférentiels des acyl-CoA alors que les 1-acyl-2-lysoPE/PI le sont dans une moindre mesure.

3.2. Réaction de transacylation

Les réactions de transacylation catalysent le transfert d'AG d'un phospholipide à un autre sans faire intervenir d'AG libres. Les réactions de transacylation sont soit CoA indépendante soit CoA dépendante. Le premier type de réactions utilise préférentiellement les diacyl-GPC comme donneur d'AG à 20 ou 22 carbones ayant plus de 3 insaturations et les principaux accepteurs sont les plasmalogènes. Le deuxième type de réactions, permet le transfert d'AG en présence de coenzyme A. Le donneur d'AG reste préférentiellement le diacyl-GPC et les accepteurs sont, dans les plaquettes, d'abord les 1-acyl-lyso-PS puis PE et enfin PI (Kramer & Deykin, 1983).

3.3. Remodelage membranaire

La distribution des phospholipides au sein de la membrane est asymétrique ; en effet notamment au niveau des plaquettes, le feuillet externe renferme environ 85% de sphingomyéline (SM), et 65% des PC. Alors que le feuillet interne renferme la quasi-totalité des PS et plus de 80% des PE. Enfin plus de 80 % des PI et de ses dérivés (PIP2) sont situés du côté interne de la membrane. Le maintien de cette asymétrie est assuré par des protéines de types flippase/floppase, qui assurent le maintien des PS et PE du côté interne de la membrane, et scramblase, davantage bidirectionnelle (Yamaji-Hasegawa & Tsujimoto, 2006).

II. Rôles physiologiques des acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI)

1. Cerveau

Le DHA est l'acide gras polyinsaturé majeur du cerveau : il représente environ 14% des acides gras du cortex préfrontal de l'homme adulte. Il s'accumule préférentiellement dans les cônes de croissance, les synaptosomes, les astrocytes, la myéline, les membranes mitochondriales et la substance grise. Le DHA a des fonctions importantes au niveau du cerveau par exemple il améliore les capacités cognitives (Barcelo-Coblijn *et al.*, 2003; McCann & Ames, 2005). Les études ont mis en évidence l'implication du DHA dans le développement de l'arborisation neuronale, la transmission sérotoninergique et dopaminergique. Les prématurés présentent un déficit cérébral en DHA, et les enfants nés prématurés présentent des troubles au niveau de la maturation de la substance grise (Calderon & Kim, 2004; McNamara & Carlson, 2006).

2. AGPI n-3 et système cardiovasculaire

Les données de la littérature concernant les effets des acides gras en particulier polyinsaturés de la famille n-3 mettent en évidence leurs rôles dans les maladies cardiovasculaires. Outre leurs implications dans les processus inflammatoires et leurs rôles immunomodulateurs (Thies *et al.*, 2001), les AGPI n-3 peuvent être hypotriglycéridémiants, hypotenseurs et antiarythmiques (Calder, 2004). Les différentes études épidémiologiques montrent également une relation inverse entre la consommation de poisson et les maladies cardiovasculaires (Kromhout *et al.*, 1985; von Schacky, 2003; 2006).

2.1. Rôles des AGPI n-3 sur le système cardiovasculaire

Les premiers travaux mettant en lumière l'implication des acides gras n-3 dans les maladies cardiovasculaires ont été établis par Dyerberg et al. En effet, les différents résultats obtenus essentiellement chez les Inuits du Groenland, montrent une relation inverse entre les maladies cardiovasculaires et la consommation de poissons gras (soit 2,1g EPA+DHA/j). Plus tard, l'équipe de Dyerberg a mis en évidence le rôle des acides gras n-3, contenus dans les poissons consommés, dans les effets observés chez les Inuits. En effet, la proportion d'EPA et de DHA notamment dans les phospholipides plaquettaires est plus importante chez cette population par rapport à la population de référence en l'occurrence la population danoise (Dyerberg & Bang, 1979; Bang & Dyerberg, 1980). Parmi les effets observés, les Inuits

présentent un temps de saignement plus long, dû à une réponse moins rapide à l'agrégation des plaquettes. L'hypothèse des auteurs était que la forte proportion d'EPA dans les phospholipides, serait à l'origine des effets observés via sa transformation en prostaglandine anti-agrégante.

Depuis un grand nombre d'études épidémiologiques d'intervention ou d'observation ont permis d'approfondir les liens qui peuvent exister entre les AGPI n-3 et les maladies cardiovasculaires.

L'étude « Diet And Reinfarction Trial » (DART) a montré une réduction significative (29%) de la mortalité chez des hommes ayant survécu à un infarctus du myocarde et qui avaient consommé en parallèle du poisson (plus de deux fois par semaine) soit un apport de 500 à 800 mg/jour d'AG n-3. Burr *et al.* ont montré que cet effet était dû aux AG n-3 (Burr *et al.*, 1989; Van Horn *et al.*, 2008). L'étude prospective GISSI qui consistait à analyser les effets des AGPI n-3 (850 mg d'EPA + DHA sous forme d'esters éthyliques/j pendant 3,5 ans) en prévention secondaire chez des personnes ayant survécues à un infarctus du myocarde a montré une réduction significative de la mortalité totale, de la mortalité cardiovasculaire et de la mortalité subite (GISSI-Prevenzione-Investigators, 1999). Trois études d'observation la « Chicago Western Electric Study », la « Physicians Health Study » et la « Seven Countries Study » ont montré que la consommation pendant 4 semaines de 17 à 45g de poissons/jour réduisait significativement chez les hommes la mortalité cardiovasculaire d'environ 34 à 52% (Daviglus *et al.*, 1997; Albert *et al.*, 1998; Oomen *et al.*, 2000).

2.2. DHA et plaquettes sanguines

L'ensemble des résultats des nombreuses études épidémiologiques ayant montré le lien entre les AGPI n-3 et les maladies cardiovasculaires a conduit à analyser plus spécifiquement les mécanismes d'action de ces AG. Plus particulièrement sur les éléments impliqués dans les pathologies cardiovasculaires et notamment les plaquettes sanguines et leur réponse c'est-à-dire l'hémostase/ thrombose.

Goodnight *et al.* ont mis en évidence le lien entre la composition des membranes en acide gras et la fonction plaquettaire *in vivo*. En effet la consommation d'huile de saumon

pendant 4 semaines par des volontaires sains, induit une augmentation du taux d'EPA et une réduction de celui de l'acide arachidonique dans les plaquettes. Cela s'accompagne d'une augmentation du temps de saignement significative mais non pathologique et d'une inhibition de l'agrégation induite par l'ADP (Goodnight *et al.*, 1981). De plus, certains travaux ont montré que 2,1g de DHA et 0,8g EPA/j/6 semaines (sous la forme d'esters éthyliques) diminuent significativement l'agrégation des plaquettes induite par le collagène (Sanders & Hinds, 1992).

La consommation de 6g de DHA et de 3,5g EPA, (sous la forme d'esters éthyliques pendant 6 semaines) augmente l'EC50 du U46619 (agoniste du récepteur au TxA_2) significativement alors que l'utilisation de 4,5g d'EPA et de 3,35g de DHA ne provoque pas de tels résultat ; ceci suggère une action du DHA sur le métabolisme du TxA_2 (Scheurlen *et al.*, 1993). La consommation par des sujets sains de 6 g/j de DHA (esters éthyliques) induit au bout de 6 jours de traitement une accumulation de l'acide gras à la fois dans les phospholipides plasmatiques et plaquettaires. Parallèlement les auteurs observent une inhibition de l'agrégation des plaquettes induite par le collagène et l'ADP (von Schacky & Weber, 1985). Enfin la prise de 4 g de DHA/j (esters éthyliques/ 6 semaines) par des patients atteint d'hypertension associé à un diabète de type 2, réduit la réponse plaquettaire au collagène et la génération de TxB_2 par rapport à un groupe placebo (huile d'olives) (Woodman *et al.*, 2003).

Bien qu'*ex vivo* les résultats de nombreuses études signalent la diminution de la synthèse de TxA_2 après un traitement avec des AG n-3 (EPA et DHA), les résultats *in vivo* sont plus nuancés (Knapp, 1997). En effet, la consommation d'AGPI n-3 (environ 10g/j pendant 4 semaines) provoque une diminution d'une part de la pression artérielle (systolique et diastolique) et d'autre part de la teneur en métabolite urinaire de TxA_2 . Parallèlement les auteurs notent une augmentation du métabolite urinaire du TxA_3 issu de l'EPA (Knapp & FitzGerald, 1989). Cependant von Schacky *et al.* n'observent pas dans leur étude d'excrétion urinaire des métabolites de l'EPA bien que la teneur en EPA et en DHA soit augmentée significativement dans les plaquettes de sujets sains (von Schacky & Weber, 1985).

D'après Kris-Etherton *et al.*, bien que les AGPI n-3 soient clairement impliqués dans la diminution de la réponse plaquettaire à certains agonistes notamment le collagène, la

consommation de moins de 3g/j de ces AG ne serait être associée à des conséquences hémorragiques cliniques significatives (Kris-Etherton *et al.*, 2003).

2.3. DHA et métabolisme de l'acide arachidonique

La supplémentation en AGPI n-3, EPA et DHA, modifie dans les plaquettes le métabolisme de l'acide arachidonique et la synthèse de ses dérivés issus de la voie de la PGH synthase et de la 12-lipoxygénase (Leaf & Weber, 1988). En effet, l'EPA remplace l'acide arachidonique dans les phospholipides membranaires ce qui induit une diminution de TxA₂. Au niveau des plaquettes et des cellules endothéliales, l'EPA est converti par la PGH synthase en PGD₃ et PGI₃, prostaglandines antiagrégantes, et par la thromboxane synthase en TxA₃, sans activité proagrégante. Le DHA n'est pas substrat de la PGH synthase du fait de sa structure, mais il peut l'inhiber (Corey *et al.*, 1983). Le DHA est un inhibiteur compétitif de la PGH synthase : 150 µM de DHA inhibe l'agrégation plaquettaire induite par 450 µM d'AA exogène (Rao *et al.*, 1983).

Le DHA peut être métabolisé par la 12-lipoxygénase plaquettaire et conduire à la formation de dérivés hydroxylés comme le 14-OH-22 :6n-3, antagoniste du récepteur au thromboxane A₂. Les travaux de Swann (Swann *et al.*, 1990), ont montré *in vitro*, que l'enrichissement des plaquettes en EPA ou en DHA se produisait quasi exclusivement dans les phospholipides et en particulier dans les phosphatidylcholines. Ceci s'accompagnait d'une diminution de la réponse des plaquettes à l'action d'un agoniste du TxA₂, l'U46619. Cette inhibition est significativement liée à la voie de synthèse du thromboxane A₂ car aucun effet n'était observé sur l'agrégation induite par d'autres médiateurs comme la thrombine. Enfin l'EPA et le DHA inhibent, *in vitro*, significativement l'affinité du récepteur au TxA₂ pour son ligand (Corey *et al.*, 1983; Swann *et al.*, 1990; Parent *et al.*, 1992).

2.4. DHA et état redox

Outre son action sur le métabolisme de l'acide arachidonique, le DHA peut altérer l'état redox cellulaire et en particulier celui des plaquettes sanguines. La structure même du DHA (6 insaturations) le rend sensible aux réactions des radicaux libres, ce qui engendre la

formation de produit de peroxydation comme nous l'avons vu précédemment dont l'aldéhyde le malondialdéhyde (MDA) (Wagner *et al.*, 1994).

Plusieurs études ont montré que de fortes doses de DHA augmentaient la peroxydation au niveau plaquettaire. En effet l'enrichissement *in vitro* des plaquettes en EPA ou en DHA augmente à la fois l'activité et l'expression protéique de la glutathion peroxydase 1 (GPx1). Ces effets étant davantage significatifs avec le DHA. Parallèlement à cet enrichissement en DHA, se produit une diminution notable de la teneur en vitamine E plaquettaire et une augmentation de MDA. Le traitement à l'épicatéchine, flavonoïde de la famille des polyphénols, prévient les effets du DHA. Ainsi les effets du DHA sur la GPx1 auraient pour origine primaire les effets pro-oxydants de cet acide gras (Polette *et al.*, 1996; Lemaitre *et al.*, 1997).

La consommation de faibles doses de DHA par les personnes âgées réduit l'état pro-oxydant des plaquettes. En effet, les plaquettes de personnes âgées présentent à l'état basal, un déséquilibre de leur état redox en faveur d'un état pro-oxydant. Plus précisément, les plaquettes de personnes âgées forment plus de métabolites oxygénés formés à partir d'acide arachidonique comparativement à des plaquettes de sujets plus jeunes (Véricel *et al.*, 1985). De plus, le taux de MDA est significativement plus important par rapport à une population plus jeune. Enfin, le taux de vitamine E et l'activité GPx-1 sont déprimés par rapport aux niveaux observés dans les plaquettes de sujets jeunes (Véricel *et al.*, 1992). Or la consommation de DHA, 150 mg/jour/ pendant 42 jours (plus 30 mg d'EPA) sous forme de triglycérides, par des personnes âgées, induit au niveau des plaquettes, d'une part une diminution de la production basale de Tx_{B2} (métabolite inactif du Tx_{A2}), et d'autre part augmente le taux de vitamine E et diminue la concentration de MDA (Véricel *et al.*, 1999).

Les effets du DHA seraient en partie liés aux concentrations utilisées. Le traitement de plaquettes *in vitro* avec de fortes doses de DHA provoque à la fois une augmentation de MDA et la formation de 12-HETE (métabolite de l'acide arachidonique via la 12-lipoxygénase) et une diminution du taux de vitamine E. Par contre l'utilisation de faibles concentrations de DHA diminue significativement le taux de MDA. Parallèlement à ses effets observés *in vitro*, l'incorporation du DHA dans les différentes classes et sous classes de phospholipides est différente selon les doses de DHA utilisées. En effet à faible concentration le DHA s'incorpore dans les plasmalogènes de phosphatidyléthanolamine, alors qu'à fortes doses le

DHA se retrouve à la fois dans les plasmalogènes, les diacylphosphatidyléthanamines et les diacylphosphatidylcholines. Ces résultats indiquent d'une part l'effet dose du DHA et d'autre part ses effets en relation avec l'incorporation dans les différentes classes et sous classes de phospholipides (Véricel *et al.*, 2003).

2.5. DHA et système circulatoire

Les effets des AGPI n-3 ne se limitent pas aux plaquettes. L'hémostase implique également les cellules endothéliales qui produisent à la fois du NO et la prostacycline (PGI₂) qui est synthétisée à partir de l'acide arachidonique. L'EPA et le DHA diminuent, *in vitro*, l'expression transcriptionnelle et protéique de la PGH synthase sur les cellules endothéliales bovines en culture primaire. Dans le même temps ils provoquent une augmentation modérée mais significative du taux de MDA (Gilbert *et al.*, 1999). De plus le DHA diminue *in vitro* la production de PGI₂ suite à l'action d'agonistes sur des cellules endothéliales (Achard *et al.*, 1997). Le DHA diminue de façon dose dépendante l'expression de protéines pro-inflammatoires et pro-athérogéniques dont VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) induite par le TNF α sur des cellules endothéliales humaines. Ces effets, *in vitro*, sont corrélés à l'incorporation du DHA dans les lipides membranaires (De Caterina *et al.*, 1994). Le DHA exerce des effets différents selon le type de cellules endothéliales. En effet des expériences ont montré que sur des cellules endothéliales de la rétine et de l'aorte bovines que le DHA à forte doses (100 μ M) induisait un stress oxydant marqué par l'augmentation de MDA. Cependant une dose plus faible entraîne une diminution de l'activité et de l'expression de la GPx1 dans un seul des types cellulaires étudiés (Delton-Vandenbroucke *et al.*, 2001).

3. Apports en DHA chez l'homme

La question de la dose d'AGPI n-3 et en particulier pour l'EPA et le DHA étant importante, la notion d'apports nutritionnels conseillés (ANC) a dû être abordée par différents organismes dont l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) (Cf. **Tableau 2 p.84**).

En 2001, l'AFSSA indiquait un ANC de 120 mg de DHA/jours pour l'homme adulte, valeur basée sur l'apport énergétique total en lipide de 33%. Le rapport de "l'*International*

Kcal/j		Acides gras saturés	18 :2n-6	18 :3n-3	AGPI (n-6 et n-3)	DHA	Total
Homme adulte	g/j (% AET)	19,5 (8)	10 (4)	2 (0,8)	0,5 (0,2)	0,12 (0,05)	81 (33)
Femme adulte	g/j (% AET)	16 (8)	8 (4)	1,6 (0,8)	0,4 (0,2)	0,10 (0,05)	66 (33)
Femme enceinte	g/j (% AET)	18 (8)	10 (4,4)	2 (0,9)	1 (0,4)	0,25 (0,1)	76,5 (33,7)
Personnes âgées	g/j (% AET)	15 (8)	7,5 (4,4)	1,5 (0,9)	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)	62,5 (33,7)

Tableau 2 : Apports nutritionnels conseillés (ANC) pour la population française.

Valeurs établies selon l'apport énergétique total (AET), avec un apport lipidique basé à 33% de l'AET et sur un rapport 18 :2n-6/18 :3n-3 égal à 5.

D'après « ANC pour la population française », A.Martin, Tec&Doc, ed. France : CNERNA-CNRS, AFSSA, 2001

Society for the Study of Fatty Acids and Lipids- ISSFAL” “*Report on Dietary Intake of Essential Fatty Acids*” de juin 2004, recommande à des fins de « bonne santé cardiovasculaire » la consommation d’au moins 500 mg/j d’EPA +DHA.

En 2006, l’*American Heart Association Nutrition Committee*, recommande la consommation d’au moins 2 fois par semaine de poissons et dans le cas de personnes ayant des antécédents de pathologies cardiovasculaires, elle préconise un apport d’environ 1 g d’EPA + DHA/ jour. (Lichtenstein *et al.*, 2006).

Le “Food and Nutrition Board” de l’Académie Nationale de Médecine des USA, en 2005 dans son rapport “*Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids*” indique que les recommandations acceptables pour des personnes en bonne santé (AMDR, Acceptable Macronutrient Distribution Range) sont entre 1,3 et 2,7 g d’acide α -linoléique/j et que la consommation jusqu’à 3 g d’EPA+DHA est bonne pour la santé, suggérant peut être des effets secondaires au-delà de cette dose. La consommation en 2002, aux USA, d’EPA et de DHA est entre 0,1 et 0,2 g/j, avec un rapport AG totaux n-6/n-3 dans la ration alimentaire de 10 :1 (Kris-Etherton *et al.*, 2002).

Les doses d’EPA et de DHA optimales qui pourraient protéger 98% de la population mondiale ont été estimées par Hibbeln *et al.* (Hibbeln *et al.*, 2006). Selon ce groupe, 26 % de la morbidité due à une pathologie cardiovasculaire et 99 % de la morbidité imputable à des troubles bipolaires sont potentiellement modifiables par un apport nécessaire et suffisant en acides gras polyinsaturés n-3. Selon ces auteurs, la consommation en EPA+DHA des Japonais apparaît la plus pertinente pour protéger la majorité de la population ; leur ration alimentaire contient 750 mg d’EPA+DHA/j soit 0,37 % de l’apport énergétique total. Pour arriver aux taux d’EPA et de DHA présent dans les tissus des sujets japonais (60% d’AGPI n-3 parmi les AGPI totaux) il faudrait, d’après les auteurs, que la population américaine consomme au moins 3,6 g d’EPA+DHA/j pour un apport énergétique total de 2000 kcal/j

Remarque : sources d’AGPI n-3 et en particulier de DHA

L'apport d'AGPI n-3 comme nous l'avons mentionné apparaît bénéfique pour la santé en particulier pour le système cardiovasculaire. Les animaux dont l'homme sont incapables (absence de matériel enzymatique) de synthétiser les précurseurs des AGPI n-3 et même de les convertir en AGPI n-3 (faible taux de conversion). Ainsi il est indispensable de consommer des aliments riches en AG n-3 et particulièrement en AGPI n-3. Les poissons contiennent de grande quantité de ces AG cependant, leur teneur en EPA et en DHA est sensible à plusieurs facteurs : l'espèce considérée, la saison et la zone de pêche, l'âge, et les méthodes de préparation. De plus le contenu dépend aussi de l'alimentation des poissons car comme pour les mammifères ils ne peuvent synthétiser *de novo* l'acide α -linoléique. Ceci est d'autant plus pertinent surtout en ce qui concerne l'alimentation des poissons d'élevage. Les huiles végétales de lin, colza et noix sont particulièrement riche en acide α -linoléique, mais étant donné la faible conversion de cet acide gras en EPA et DHA chez l'homme, ces huiles ne permettraient pas à terme d'enrichir significativement la ration alimentaire en EPA et DHA. Autres sources d'EPA et de DHA : les microalgues marines de type *Cryptheconidium cohnii*, présentent l'avantage d'être utilisées *in vitro* et de produire des AGPI n-3 EPA ou DHA, non contaminés par des polluants rencontrés dans certaines zones de pêche (Racine & Deckelbaum, 2007).

Problématique

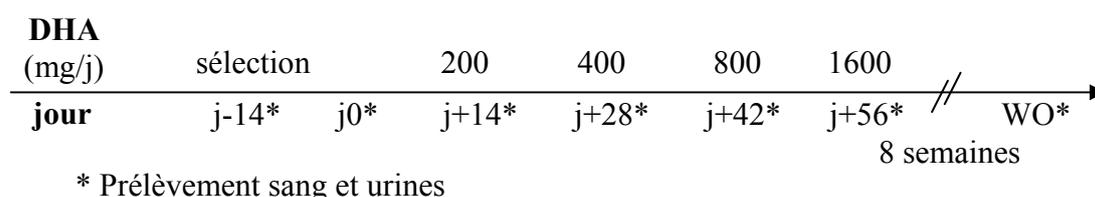
Cette synthèse bibliographique met en évidence l'absence de données spécifiques des effets du DHA sur les plaquettes et l'ambiguïté des données relatives à ses effets par rapport aux doses utilisées. En effet la plupart des études menées sur les AGPI n-3 traitent des effets de l'association EPA plus DHA ; peu d'études sont conduites avec un seul AGPI. Les plaquettes sanguines sont les éléments importants dans l'hémostase en générale mais également dans l'étiologie de nombreuses pathologies cardiovasculaires. L'analyse des effets de l'ingestion de doses croissantes de DHA sur ce type cellulaire constitue donc une approche originale. Les données de la littérature soulignent également que le DHA à forte dose peut augmenter le stress oxydant. Or ce stress peut entraîner des effets délétères et contrebalancer les effets bénéfiques des AGPI n-3 dans la prévention des maladies cardiovasculaires. Par conséquent, l'objectif de ce travail était dans un premier temps de déterminer d'une part les effets du DHA sur la fonction des plaquettes et d'autre part en fonction des doses utilisées d'analyser son impact sur le stress oxydant. Pour cela, l'ingestion par des hommes d'âge moyen de DHA sous forme de triglycérides constitue une approche expérimentale écologique par rapport à des études réalisées *in vitro*. De plus, les données relatives aux effets potentiels des AGPI n-3 et en particulier du DHA sur les cellules souches hématopoïétiques sont peu nombreuses voir absente en ce qui concerne les mégacaryocytes. Une (ou plusieurs) action(s) directe(s) du DHA sur de telles cellules pourrait expliquer ces mécanismes d'actions ; ceci constitue le deuxième objectif de ce travail de thèse. Les mégacaryocytes constituent une population très réduite des cellules de la moelle osseuse elle-même très limitée et difficile à obtenir chez l'homme. L'utilisation de mégacaryocytes en culture offre une alternative aux mégacaryocytes issus de biopsie et de plus la lignée MEG-01 est d'origine humaine. Pour atteindre nos objectifs, nous avons analysé les compositions en acides gras des phospholipides membranaires. La fonction des plaquettes a été étudiée (agrégation et étude du métabolisme de l'acide arachidonique) ; les effets du DHA sur les cellules mégacaryocytes ont été recherchés à un niveau transcriptionnel. Enfin l'état redox par les mesures des produits d'oxydation lipidique ainsi que les concentrations et activités d'anti-oxydants particulièrement présents dans les plaquettes constituent la dernière étape de ces analyses.

METHODOLOGIE

Nous détaillerons dans cette partie quelques méthodes utilisées lors de nos expériences, l'ensemble des techniques étant résumées dans les articles 1 et 2.

I. Etude DOCOREDOR

Le protocole de cette étude a été approuvé par le Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB). Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes dirigé par le Pr. M. Laville. Le CRNH est le promoteur de cette étude, le Pr. M. Laville l'investigateur coordonnateur et le Pr. M. Lagarde l'investigateur principal. Le sang recueilli au cours de cette étude a permis à différents chercheurs de l'Unité d'explorer différents paramètres en particulier les lipoprotéines (Dr. C. Calzada) et les lymphocytes (Dr. A.F. Prigent). Le protocole de DOCOREDOR était le suivant : chaque témoin devait prendre 200 mg DHA/j/14j puis 400, 800 et 1600 mg de DHA. Avant et après chaque changement de doses, le sang et les urines étaient recueillis. Les gélules de DHA (200 mg DHA sous forme de triglycéride/gélule, Decola) ne contiennent aucun autre acide gras n-3. On trouve une faible quantité de vitamine E (0,125 mg/gélule). La moyenne d'âge des témoins était de 58,1 ans, tous indemne de pathologies cardiovasculaires. En moyenne 8 semaines après la fin du dernier traitement une prise de sang et un recueil d'urines étaient effectués. Le protocole de l'étude DOCOREDOR est schématisé ci-dessous.



En vue d'une collaboration avec un groupe de chercheurs du Riken au Japon, nous avons entrepris une analyse des effets géniques du DHA chez l'Homme au cours de l'étude DOCOREDOR. Le protocole consiste en une extraction des ARN du sang de chaque témoin et pour chaque dose de DHA ingérée et d'analyser par une technologie de puces à ADN les effets transcriptionnels du DHA. Nous avons réalisés l'extraction des ARN via le kit

« PAXgene Blood RNA kit, PreAnalytiX, Qiagen/BD ». Le protocole de ce kit consiste en deux centrifugations successives de 4000 g puis en un isolement des ARN sur une membrane sélective. Bien que l'analyse sur puce n'a pas encore été réalisée, des résultats préliminaires montrent d'une part une bonne qualité des ARN extraits et d'autre part par RT PCR temps réel, l'expression de la PGH synthase 1 et la glutathion peroxydase 1. Les premières mesures pratiquées sur 4 témoins ne nous permettent pas pour l'instant de conclure sur les variations obtenues.

II. Mesure de l'agrégation plaquettaire

Préparation du sang et test d'agrégation des plaquettes sanguines

Un volume de 90 mL de sang est prélevé par ponction veineuse antécubitale sur anticoagulant (ACD, acide citrique, citrate, dextrose). Le sang est centrifugé pendant 17 minutes à 200 g à 20°C. Le surnageant (ou plasma riche en plaquette, PRP) est ensuite acidifié à pH 6,4 afin de limiter l'agrégation des plaquettes. Ce PRP est alors centrifugé à 900 g pendant 12 minutes à 20°C. Le culot plaquettaire ainsi obtenu est repris dans un tampon tyrode-HEPES (en mM, NaCl 140; KCl 2,7; NaHCO₃ 12, NaH₂PO₄ 0,41; MgCl₂ 1; glucose 5,5; HEPES 5; pH 7,35). Parallèlement 500 µL de sang sont utilisés pour une analyse des plaquettes par cytométrie en flux. Nous avons entrepris une mesure de l'expression de l'intégrine αIIbβ3 grâce à un anticorps monoclonal couplé FITC anti αIIbβ3 activé de Biocytex. La mesure de la fluorescence fixée aux plaquettes permet de déterminer le pourcentage de plaquettes activées dans l'échantillon.

Le principe de l'agrégation repose sur une méthode turbidimétrique développée sur le plasma riche en plaquettes par Born en 1962 (Born, 1962). La suspension plaquettaire présente une certaine turbidité ce qui diminue la transmission d'un faisceau lumineux à travers cette suspension. L'addition d'un agoniste de l'agrégation dans les conditions d'agitation constante induit l'agrégation des plaquettes et permet une augmentation de la transmission du faisceau lumineux. Ce changement de transmission est détecté par une cellule photoélectrique et la cinétique est retranscrite sur un enregistreur couplé à ce système. L'agrégation totale (transmission du faisceau lumineux à 100%) est calibrée sur 400 µL de tyrode-HEPES. Le 0 % de transmission est réglé sur 400 µL de suspension plaquettaire sans

agoniste. Les plaquettes sont pré-incubées 2 min. à 37°C puis l'agoniste est ajouté. Cette réaction est mesurée sur 4 min. à 37°C.

III. Culture cellulaire

Dans nos expériences nous avons utilisé un modèle de mégacaryocytes humains en culture établis par Ogura *et al.* à partir de cellules appartenant à un homme atteint d'une leucémie myéloïde chronique. Cette lignée, nommée MEG-01, présente toutes les caractéristiques des mégacaryocytes notamment par la présence de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. En condition de culture, la quasi majorité des cellules ne sont pas adhérentes et se présentent sous forme d'amas cellulaire ou de cellules isolées. Le nombre moyen de chromosome dans ces cellules est 56 à 58. Dans notre étude, les cellules MEG-01 ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC, LGC Promochem, Molsheim, France).

Les conditions de culture sont les suivantes : les cellules sont cultivées avec du milieu IMDM (Iscove's Modified Dubelcco's Medium) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (issu du même lot pour l'ensemble des expériences) et antibiotiques. Le milieu IMDM permet une croissance plus rapide des cellules par rapport à un milieu de type RPMI 1640. Les cellules sont cultivées dans un volume adéquat de milieu, en général 8 mL pour une « flask » de 25 cm². Le milieu est renouvelé totalement 3 fois par semaine : toutes les cellules sont récupérées (grattoir pour les cellules adhérentes) et centrifugées à 150 g à température ambiante. Les cellules sont ensemencées à 300000 par mL et maintenues à une densité inférieure à 10⁶ cellules par mL. Afin de maintenir une confluence inférieure à 50 % les cellules sont diluées au 1/3 chaque semaine. Avant et après chaque expérience, les cellules sont comptées et la viabilité est mesurée par coloration au Bleu Trypan (dilution 1/2). Nous avons établi un seuil minimal de 80% de cellules viables pour effectuer toutes les expériences. Un test de prolifération cellulaire (MTT, « dimethylthiazol dipheniltetrazolium bromid », Roche) après les traitements avec le DHA a été réalisé. En pratique ce test mesure la transformation du MTT en cristaux bleus de formazan par une enzyme mitochondriale la succinate deshydrogénase. Les cristaux ainsi formés sont détectés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 550 nm. Aucune condition expérimentale (10 et 100 μM DHA pendant 6 heures et 48 heures) ne diminue ou augmente la prolifération cellulaire. En d'autres termes nous pouvons exclure tout effet toxique ou prolifératif du DHA dans les conditions

utilisées. La figure 11 montre l'aspect général de ces cellules dans nos conditions de culture (Cf. Figure 11 p.93).

Les cellules sont conservées dans l'azote liquide dans un milieu cryoprotectant (milieu de culture complet supplémenté en DMSO, diméthyl sulfoxyde, 5% v/v). En pratique les cellules sont placées à 4°C pendant une heure puis à -20°C pendant 4 heures, -80°C une nuit puis dans l'azote liquide. La décongélation des cellules pour les mettre en culture doit être très rapide : en pratique l'ampoule de cellules placée dans l'azote est directement placée dans un bain à 37°C, les cellules sont ensuite rapidement mises en culture. Le milieu cryoprotectant est éliminé 24 heures plus tard.

IV. Traitement des cellules avec le DHA

Les cellules sont incubées avec différentes doses de DHA. Celui-ci est apporté sous forme liée à l'albumine humaine délipidée avec un rapport DHA/albumine de 1 :10 et 1 :1 pour 10 et 100 µM de DHA respectivement. La formation du complexe DHA (après évaporation de l'éthanol) albumine est réalisée par incubation sous azote toute la nuit à 37°C et sous agitation.

V. RT-PCR temps réel

Après traitement par le DHA les ARN totaux des cellules MEG-01 sont extraits au TRIzol (Chomczynski & Sacchi, 1987) puis quantifiés à 260 nm sur un « NanoDrop » à partir de 1 µL d'ARN totaux. Le degré de pureté des ARN est mesuré sur la base du rapport de l'absorption à 260 et 280 nm. Les ARNm sont rétrotranscrits comme indiqué dans l'article 2. Le gène HPRT-1 (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase 1) a été utilisé de manière à normaliser les résultats obtenus pour chaque gène. Les couples d'amorces des gènes analysés au cours de la PCR sont les suivants :

HPRT1 Forward TTGCTGACCTGCTGGATTAC

HPRT1 Reverse AGTTGAGAGATCATCTCCAC

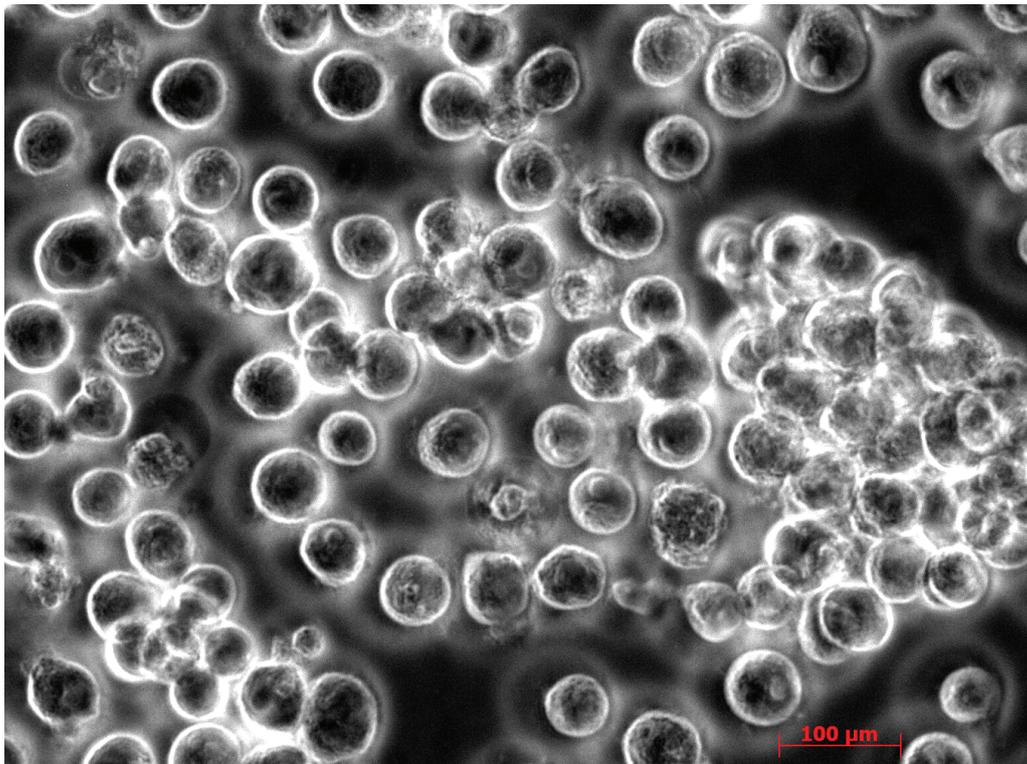


Figure 11 : Image des cellules MEG-01 par microscopie en contraste de phase.

Cu-Zn SOD Forward TGAAGAGAGGCATGTTGGAG
Cu-Zn SOD CCACCTTTGCCCAAGTCATC
CAT Forward TCAGGATGTGGTTTTCACTG
CAT Reverse GTGTAAAATTTCACTGCAAAC
GPx1 Forward GTGAGCCTGGGCTCCCTGCG
GPx1 Reverse ACTTGAGGGAATTCAGAATC
GPx-4 Forward GGGCTACAACGTCAAATTCG
GPx-4 Reverse GTGAAGTTCCACTTGATGGC
P22^{phox} (NAD(P)H oxydase) Forward AGAGGAAGAAGGGCTCCACC
P22^{phox} (NAD(P)H oxydase) Reverse ACCGAGAGCAGGAGATGCAG
PPAR β/γ Forward AACTGCAGATGGGCTGTGAC
PPAR β/γ Reverse GTCTCGATGTCGTGGATCAC
PPAR δ Forward TCTCTCCGTAATGGAAGACC
PPAR δ Reverse GCATTATGAGACATCCCCAC
PGH synthase 1 Forward GTGTGTGTGACCTGCTGAAG
PGH synthase 1 Reverse GCTGCAGGAAATAGCCACTC
Tx synthase Forward TTGCAGAGACGCTGAGGATG
Tx synthase Reverse CACGGCCATCTCTAGCACAG

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1ère PARTIE

**Caractérisation de l'ingestion de doses croissantes de DHA sur la fonction des plaquettes
et leur état redox**

Nicolas GUILLOT, Emilie CAILLET, Catherine CALZADA, Martine LAVILLE, Michel
LAGARDE & Evelyne VERICEL

Laboratoire Régulations Métaboliques Nutrition et Diabètes
Unibversité de Lyon, INSERM U870, INSA de Lyon, INRA 1235, HCL
Villeurbanne, France.

Soumis

INTRODUCTION

De nombreuses études épidémiologiques d'observations et d'interventions ont démontré le rôle bénéfique des acides gras polyinsaturés n-3 au cours des maladies cardiovasculaires (Van Horn *et al.*, 2008). Parmi ceux-ci les données de la littérature indiquent que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) sont biologiquement les plus actifs (Kris-Etherton *et al.*, 2002). Les bénéfices de ces acides gras en particulier du DHA dans les pathologies cardiovasculaires peuvent être limités par leur structure. En effet la présence dans la structure du DHA de 6 insaturations le rend particulièrement sensible aux processus d'oxydation en particulier de peroxydation. Le processus de peroxydation aboutit à la formation de métabolites (hydroperoxydes, aldéhydes comme le dialdéhyde malonique, MDA) et l'accumulation de ces produits peut engendrer des effets toxiques (Wagner *et al.*, 1994). Par ailleurs certaines données de la littérature soulignent l'augmentation de ces produits d'oxydation lors de certaines études de supplémentation en acide gras polyinsaturés n-3 (Allard *et al.*, 1997).

Les plaquettes sanguines sont l'un des principaux éléments de l'hémostase mais sont également impliquées dans l'étiologie des pathologies cardiovasculaires (Davi & Patrono, 2007). Les études pionnières menées sur les Inuits par Dyerberg & Bang ont démontré le rôle inhibiteur des AGPI n-3 sur l'activation et l'agrégation des plaquettes sanguines (Dyerberg & Bang, 1979). Plusieurs études ont permis par la suite de déterminer les effets de différents AGPI n-3 (EPA et DHA) en utilisant dans la majorité des cas des doses d'acides gras très importantes. Plus précisément au niveau de la fonction plaquettaire, l'un des principaux événements impliqué dans l'activation et l'agrégation des plaquettes est la génération de thromboxane A₂ (TxA₂). Ce prostanoloïde pro-agrégant est issu de la transformation de l'acide arachidonique, AGPI n-6, par notamment la PGH synthase. L'activité de cette enzyme est inhibée par le DHA ce qui réduit la synthèse de TxA₂, et suggère donc le rôle anti-agrégant du DHA (Corey *et al.*, 1983). Dans le même temps l'acide arachidonique peut être transformé dans les plaquettes en acide 12 hydroperoxy eicosatétraénoïque (12-HpETE) via la 12-lipoxygénase. Cet hydroperoxyde est ensuite réduit par une enzyme anti-oxydante la glutathion peroxydase 1 (GPx1). Outre le rôle anti-agrégant observé au niveau des plaquettes de personnes âgées, le DHA contribue à la régulation de l'état redox de ces cellules. Notre équipe a montré *in vitro* sur les plaquettes sanguines, que le DHA pouvait selon la dose utilisée avoir des effets anti-oxydants ou au contraire pro-oxydants (Véricel *et al.*, 2003). Plus

précisément, de fortes doses de DHA provoquent dans les plaquettes une augmentation de la peroxydation lipidique mise en évidence par le taux de dialdéhyde malonique (MDA), et une réduction de la concentration en vitamine E. Lorsque de faibles doses de DHA sont utilisées, cela se traduit par une diminution significative du taux de MDA et une préservation du taux de vitamine E. Cet effet anti-oxydant du DHA à faible dose est corroboré par l'étude de Véricel *et al.*, au cours de laquelle le DHA à faible concentration réduit l'état pro-oxydant des plaquettes de personnes âgées (Véricel *et al.*, 1999).

Ainsi il apparaît que la dose de DHA utilisée pourrait conditionner les effets de cet acide gras d'une part sur l'état redox des plaquettes et d'autre part sur l'activité de ces cellules. L'objectif de l'étude présentée ici et nommée DOCOREDOR, était de déterminer *ex vivo* les effets de l'ingestion de doses croissantes (200, 400, 800 et 1600 mg) de DHA sur à la fois la fonction des plaquettes sanguines et leur état redox (équilibre entre les espèces pro-oxydantes et anti-oxydantes). Cette étude a été réalisée sur des hommes âgés entre 55 et 65 ans indemnes de toutes affections cardiovasculaires. Différents paramètres plaquettaires ont été évalués comme : leur fonction via les tests d'agrégation et le métabolisme de l'acide arachidonique, l'état redox via la mesure des taux de vitamine E et de MDA plaquettaire et enfin la composition en acides gras des phospholipides membranaires.

Increasing intakes of docosahexaenoic acid and their effects on platelet
functions and redox status in healthy men.

Nicolas Guillot, Emilie Caillet, Martine Laville, Catherine Calzada, Michel Lagarde and
Evelyne Véricel.

1- Université de Lyon, F-69622, Lyon, France ; 2- INSERM U870, IMBL, F-69621, Villeurbanne
3- INSA de Lyon, RMND, F-69621, Villeurbanne; 4- INRA U1235, F-69921,
Oullins ; 5- Hospices Civils de Lyon, F-69003, Lyon

Corresponding author :

Dr. Evelyne Véricel

INSERM U.870 – INSA de Lyon

Régulations Métaboliques, Nutrition et Diabètes

Bât Louis Pasteur, IMBL, INSA

20 ave. Albert Einstein

69621 Villeurbanne Cedex

France

Tel : +33 4 72 43 84 79

Fax : +33 4 72 43 85 24

evelyne.vericel@insa-lyon.fr

Increasing DHA intake, platelets and redox status

This work was supported by INSERM and a grant from GLN. NG was a recipient for a grant
from the French Ministry of Education and Research.

ABSTRACT

Background : Dietary fish or fish oil rich in n-3 fatty acids (n-3 FAs), e.g. docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), can ameliorate cardiovascular events.

However, few studies have addressed the effects of DHA as the only n-3 FA on platelet reactivity and oxidative stress, and dose-related studies are limited.

Objectives : The main objectives of the present study were to determine the effects of increasing DHA consumption on both platelet function and oxidative stress in healthy male volunteers.

Design : 12 healthy male volunteers (aged 53-65 y) were assigned to consume a daily ingestion of successively 200, 400, 800 and 1600mg DHA as the only n-3 FA for two weeks each dose, without interruption. Blood and urine samples were collected after overnight fasting before DHA supplementation, after each dose, and eight weeks arrest of supplementation.

Results : From the first dose of DHA (200 mg /day for two weeks), a significant increase of DHA proportion was observed both in plasma lipids and platelet phospholipids and DHA was incorporated in a dose-response fashion. From supplementation with 400 mg DHA, platelet reactivity was significantly decreased. Platelet vitamin E concentration increased after 200 mg DHA only while p38 MAPK phosphorylation decreased. Urinary isoprostane level was also significantly lowered after the lowest dose DHA but was increased after the highest.

Conclusions : These findings show that low supplementation with DHA (400-800 mg/day) lowered platelet function. In addition, a supplementation of 200 mg DHA for two weeks induced an antioxidant effect.

INTRODUCTION

Evidence from epidemiologic (1) and clinical trials (2,3) indicates that n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) can protect against cardiovascular diseases (4), and it is widely accepted that eicosapentaenoic (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic (DHA, 22:6n-3) acids are the most biologically potent fatty acids. However some studies suggest that DHA could have more potent and beneficial effects than EPA (5). Despite these described protective effects, some studies failed to report a beneficial association between n-3 PUFAs consumption and cardiovascular events (6). Among some explanations for these discordant results, one of them pertains to the high unsaturation of n-3 PUFAs. Indeed, DHA is highly oxidizable owing to the presence of its six double bonds in the 22-carbon fatty acyl chain (7). The peroxidation process provides a variety of lipid peroxides including malondialdehyde and other aldehyde breakdown products which may modify lipids, lipoproteins, proteins and nucleic acids. Such a peroxidation has been implicated in the etiology of a number of diseases including cardiovascular diseases (8,9). Moreover, several studies have reported high peroxidation index and oxidative stress in some dietary interventions with high doses of n-3 PUFAs (10-12).

Because circulating blood platelets are known to play a crucial role in the regulation of hemostasis and thrombosis (13) and consequently in the major cardiovascular complications (14), some studies have focused on the effects of n-3 PUFAs on platelet function. This started from the pioneering report of Dyerberg and Bang (15) showing that Inuits had an attenuated platelet reactivity. In the same way, most studies that have examined the effects of n-3 PUFAs on platelet aggregation, have involved large amounts of these fatty acids (16,17). However, we have previously shown that low intake of DHA may reduce both platelet reactivity and oxidative stress in elderly people (18,19). It then appears that those n-3 PUFAs, and in

particular DHA, might alter the cell redox status positively or negatively, depending on the concentrations used (20).

The molecular steps of platelet activation are numerous including the release of arachidonic acid (AA) from membrane phospholipids by the Ca^{2+} -sensitive arachidonoyl-selective 85-kDa cytosolic phospholipase A_2 (cPLA₂) (21). Once arachidonic acid is released, it can be oxygenated by the lipoxygenase and cyclooxygenase pathways. The former pathway oxygenates arachidonic acid into 12-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid (12-HpETE), which is then reduced into 12-hydroxy-eicosatetraenoic acid (12-HETE) by a cytosolic glutathione-dependent peroxidase (22). The latter pathway converts arachidonic acid into prostaglandin endoperoxides further isomerized into thromboxane A_2 (TxA₂), a potent proaggregatory and vasoconstricting substance (23) that rapidly breaks down to form the stable and inactive end-product thromboxane B_2 (TxB₂).

The main objectives of this study were to determine the effects of increasing DHA consumption on both platelet function and oxidative stress in a group of healthy male volunteers.

SUBJECTS AND METHODS

Participants

The study consisted of twelve healthy male subjects aged between 53 and 65 years (mean age 58.1 y). The inclusion criteria for the study were as follows: male, aged 50-65 y, free of any physiologic or psychological illness that could influence the study results, no regular use of medicine and no drugs known to affect platelet function.

All subjects entered the study voluntarily and written informed consent was obtained from each subject before entry into the study. The study was approved by the local ethics

committee « Comité consultatif de protection des personnes dans la recherche médicale de Lyon A ».

Study design

All subjects supplemented their usual diet with daily consumption of capsules Pro-Mind (Decola, Belgium). Each capsule contained 200 mg DHA in triglyceride from algal oil, 175 mg gelatin, 0.125 mg DL- α -tocopherol and 0.125 mg ascorbic palmitate. The supplementation consisted of the daily ingestion of successively 200, 400, 800 and 1600 mg DHA for two weeks each dose, without interruption. The volunteers were asked not to deviate from their dietary habits during all the study period. Blood and urine samples were collected after overnight fasting, before DHA supplementation, after each DHA dose, and after eight weeks arrest of supplementation (**Figure 1**). Compliance was assessed by the number of capsules returned, and the accumulation of DHA in plasma and platelet lipids (see results).

Blood preparation and isolation of platelets

Blood samples were collected in tubes containing acid-citrate-dextrose (ACD, 0.8% citric acid, 2.2 % sodium citrate, and 2.45 % dextrose, 6 :1 vol/vol) and platelets were isolated by a previously described method (24). Briefly, blood was centrifuged at 200 x g for 15 min at 20°C to obtain platelet-rich plasma (PRP). PRP was acidified to pH 6.4 with 0.15 M citric acid and immediately centrifuged at 900 x g for 10 min at 20°C. The resulting platelet pellet was resuspended in a Tyrode-HEPES buffer solution (24). The supernatant removed from above the platelet pellet was centrifuged at 2000 x g for 10 min at 20°C to obtain platelet-poor plasma.

Plasma lipid analysis

Plasma lipids were extracted twice with 9 vol of chloroform/ethanol (2:1, v/v) containing 50 μ M BHT in presence of 1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine and cholesteryl heptadecanoate. Phospholipids and cholesterol esters were separated by thin-layer chromatography (TLC) using the solvent mixture hexane/diethylether/acetic acid (80:20:1, v/v) and corresponding spots, visualized by spraying the plates with 2',7'-dichlorofluorescein, were scrapped off the silica gel. Phospholipids and cholesterol esters were transmethylated for 90 min at 100°C with 5% concentrated sulfuric acid in methanol (25). The resulting fatty acid methyl esters (FAME) were analyzed by gas-liquid chromatography (GC) using a Hewlett Packard chromatograph (6890 series), equipped with a BPX 70 capillary column (60 m x 0.25 mm, SGE, Supelco, Bellefonte, PA, USA). FAME peaks were identified by comparison with commercial standards (PUFA-2, component FAME mix, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Values were calculated as mole percentages (mol %) of all FAME determined (C_{16} to C_{24}).

Platelet phospholipid analysis

Platelet lipids were extracted twice with 9 vol of chloroform/ethanol (2:1, v/v) containing 50 μ M BHT in presence of 1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine and 1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine. In a first step, phospholipids were separated from neutral lipids by TLC on silica gel 60G plates and phospholipid classes were then resolved in a second step by the eluent system chloroform/methanol/methylamine 60:25:5 (v/v/v) (26). Phospholipids were visualized by spraying the plates with 2',7'-dichlorofluorescein and the corresponding spots for phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) were scrapped off the silica gel. PC and PE were transmethylated and analyzed by GC as described above.

Aggregation studies

Platelet aggregation was induced by Horm collagen (from Nycomed, Austria) and performed in a Chronolog dual-channel aggregometer (Coulter, Margency, France) according to the turbidimetric method of Born (27).

Arachidonic acid cascade study

The oxygenation of exogenous AA through the cyclooxygenase and lipoxygenase pathways was determined by incubating 2.2 $\mu\text{mol/L}$ of [$1\text{-}^{14}\text{C}$] AA (specific activity 2.07 GBq/mmol) with platelets for 4 min at 37°C. Reactions were terminated by the addition of ethanol (3 vol), and the samples were extracted twice with chloroform (6 vol) in the presence of butylated hydroxytoluene (BHT) as an antioxidant. Lipid residues were submitted to TLC, and oxygenated products were visualized and quantified with a Berthold TLC analyzer radioscanner (Berthold LB511) (28). Proteins were assayed according to the Bradford method (29) using bovine albumin as a standard.

p38 MAPK activation (upstream in AA release)

Platelets were lysed, electrophoresed and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were incubated with anti-phospho-p38 MAPK and then with anti-p38 MAPK polyclonal antibodies (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) overnight, washed, and incubated with goat antirabbit horseradish peroxidase conjugate for 1 hour (30). Then, phospho-p38 MAPK and p38 MAPK were visualized using the enhanced chemiluminescence detection system.

Platelet vitamin E

Determinations of α -tocopherol concentrations were performed according to a previously described method (18). Briefly, after extractions with hexane, tocopherol isomers were separated by reverse-phase HPLC and detected by fluorimetry (excitation and emission λ of 295 and 340 nm, respectively).

Platelet cytosolic glutathione peroxidase activity

Measurement of platelet cytosolic glutathione peroxidase (cGPx or GPx-1) activity was carried out according to the method described by Paglia and Valentine (31) as modified by Chaudière and Gérard (32).

Urinary isoprostane

Spot urines have been collected and stored immediately at -80°C . The 8-iso-PGF_{2 α} concentrations were determined with the use of an ELISA kit from Oxford Biomedical research (Oxford, MI) and expressed per mg creatinine. Creatinine concentrations were measured with a kit from Oxford Biomedical research (Oxford, MI).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed by using Statview version 5 for Windows version. Non parametric Friedman test was used to analyze the differences for all the variables. When statistically significant effects were found ($P < 0.05$), Wilcoxon post test was used to identify group differences. Differences were also considered significant when $P < 0.05$. Only differences between values at baseline and values at the end of each two weeks DHA supplementation or after the washout period were reported. Results are summarized by means and SEM.

RESULTS

The fatty acid composition of capsules was verified by GC. The capsules contained 40% DHA and 1.2 % 18:2n-6, 22.2 % monounsaturated fatty acids (18:1n-9 : 20.2 % and 16:1n-7 : 2%) and 36.6 % saturated fatty acids (16:0 : 14%, 14:0 :16% and 12:0 : 6.6%).

Baseline characteristics

Subjects followed the DHA supplementation without any reported difficulty. The treatments were well tolerated and the subjects had no complaints or side effects. According to self-report, the subject's lifestyle was unchanged throughout the study. A significant increase of HDL-cholesterol was observed after the « 1600 mg DHA » treatment compared with baseline. There were no detectable significant differences in the other biological variables measured (**Table 1**).

Fatty acid composition of plasma phospholipids

Supplementation of the diet with increasing DHA doses induced significant changes in plasma phospholipids (**Table 2**). A modest but significant increase (16 %) of DHA was already observed after the daily supplement of 200 mg DHA for 2 weeks compared to baseline. DHA proportions increased in a dose-dependent manner to reach a 2.2 fold increase after the daily supplement 1600 mg of DHA. These results reflected acceptable compliance with the DHA treatment. These changes were accompanied by concomitant significant decreases of di-homo- γ -linolenic acid (DGLA ; 20:3n-6) and AA (20:4n-6). We can also note that 22:5n-3 proportion decreased minimally but significantly from the daily 200mg DHA while 20:5n-3 proportion did not change. Proportions of saturated fatty acids,

monounsaturated fatty acid and linoleic acid (18:2n-6) remained constant. The proportions of all fatty acids were not significantly different at baseline and after the washout period.

Fatty acid composition of plasma cholesteryl esters

As shown in **Table 3**, DHA contents in plasma cholesteryl esters were significantly higher after all supplementations of DHA while DGLA contents were significantly decreased compared to baseline. Only the daily supplement of 1600 mg DHA induced a significant increase of EPA proportion and a significant decrease of AA content. The proportions of these fatty acids were not significantly different at baseline and after the washout period.

Fatty acid composition of platelet phosphatidylcholine

A significant increase of DHA (28%) in platelet PC was already detected after the daily supplement of 200 mg DHA (**Figure 2**). The increase was related to the daily dose of DHA supplement to reach 156% after the highest dose. EPA proportions in platelet PC were unaffected by DHA treatment while platelet PC 22:5n-3 decreased slightly after the daily supplement of 400 mg DHA (**Figure 2**). The decrease of arachidonic acid content was only significant after the highest dose of DHA compared to baseline (11.7 ± 0.3 vs 12.7 ± 0.3 , $p < 0.05$). The proportions of all fatty acids were not significantly different at baseline and after the washout period except for DHA. The proportions of the main saturated fatty acids (16:0, 18:0), monounsaturated fatty acids (16:1, 18:1) and n-6 polyunsaturated fatty acids (18:2n-6, DGLA) did not change with DHA supplementation (results not shown).

Fatty acid composition of platelet phosphatidylethanolamine

DHA treatment yielded a significant higher proportion of DHA (26 %) in platelet PE compared to baseline (**Figure 3**) after the daily DHA supplement of 200 mg to reach 98%

after the highest supplement (**Figure 3**). In contrast, 22:5n-3 contents decreased significantly from the daily treatment of 200 mg DHA compared to baseline contents. A significant increase of EPA was only induced after the daily supplement of 1600 mg DHA (**Figure 3**). The proportions of these fatty acids were not significantly different at baseline and after the washout period except for EPA. Proportions of saturated fatty acids (16:0, 18:0, 16:0 dimethyl acetal and 18:0 dimethyl acetal) did not change after supplementation of DHA (results not shown).

Platelet aggregation

As shown in **Figure 4**, platelet aggregation induced by 0.05 µg/mL collagen was significantly decreased after the daily supplementation of 400 mg DHA compared to baseline (before supplementation) and the most important decrease of platelet aggregation was obtained after the 800 mg DHA supplementation (-70%) with a tendency to reverse after 1600 mg DHA. When platelet aggregation was induced by a higher concentration of collagen (0.2 µg/mL), the same results were observed after the daily supplementation of 800 and 1600 mg DHA (**Figure 4**).

Cyclooxygenase and lipoxygenase enzyme activities

Incubations of platelets with exogenous arachidonic acid allowed us to measure the specific oxygenation of this fatty acid by the cyclooxygenase and lipoxygenase. Interestingly, DHA affected the production of the main products of cyclooxygenase. A tendency to the decrease of TxB₂ was observed after the daily dose of 200 mg and this was significant after 400 and 800 mg DHA but not after the daily supplement of 1600 mg when compared to baseline. Similar results were observed for HHT but the decrease was only significantly

different after the dose of 800 mg. The formation of 12-HETE, the lipoxygenase end-product, was also significantly decreased after 800 and 1600 mg DHA (**Table 4**).

Platelet p38 MAPK phosphorylation

Given that p38 MAPK activation is a key signal for platelet activation (29), the level of phosphorylated MAPK was measured. Noteworthy, a significant decrease of p38 MAPK phosphorylation ($80.4 \pm 5.6 \%$, $n=12$, $P<0.05$) after the daily dose of 200 mg DHA compared to baseline (100%). However, no significant differences were found after higher doses of DHA compared to baseline.

Platelet antioxidant status

To evaluate the antioxidant status, two markers were measured. First, the concentrations of α -tocopherol, an effective lipophilic antioxidant and free radical scavenger, were determined in platelets. A significant 16.5 % increase was observed after two weeks of 200 mg daily DHA supplementation versus baseline (**Figure 5**). Interestingly, the levels of vitamin E were not significantly affected by increasing doses of DHA (**Figure 5**). Second, GPx-1 plays a key role in the protection of cells from oxidative damage and we found that its activity was not affected by DHA treatment compared to baseline activity (data not shown).

Lipid peroxidation

8-iso-PGF_{2 α} (or 15-isoprostane F_{2t}) was measured in urine. It was significantly decreased after the daily supplement of 200 mg DHA, and in contrast, significantly increased after the daily supplement of 1600 mg DHA, when compared to baseline (**Figure 6**).

DISCUSSION

There are accumulating evidences that n-3 PUFAs have cardiovascular protective effects. However, depending on the dose, DHA may have diverse effects, and precise cellular and molecular mechanisms are not completely known. This study is the first to principally determine the effects of increasing DHA supplementation on plasma and platelet lipids, redox status and platelet function.

Several reports indicate an antihypertensive effect of n-3 PUFAs both on diastolic and systolic pressures after high doses of these PUFAs (33,34). Moreover, we have previously shown that low doses of n-3 PUFAs can decrease systolic blood pressure in an elderly population characterized by a high baseline systolic blood pressure (18,19). In this study, we did not find any significant decrease of systolic blood pressure in healthy subjects, characterized by a normal systolic blood pressure, supplemented with low to moderate doses of DHA. We determined the effect of increasing DHA supplementation on concentrations of plasma lipids and no triacylglycerol-lowering effect was observed in our study, although there was a trend from 800 mg/day supplements. Literature reports that DHA-induced reduction in plasma triacylglycerols has been obtained after high supplementation of DHA (at least 3g/d) and in hypertriglyceridemic subjects (35,36). In contrast, our results are consistent with those of Hamazaki et al. (37) and Theobald et al. (38) obtained in normolipidic subjects supplemented with moderate doses of DHA (1.8 g/d and 0.7g/d of DHA, respectively). As already reported (39), the highest DHA supplementation induced a slight but significant increase of HDL cholesterol. However, LDL cholesterol also tended to increase and the HDL cholesterol /LDL cholesterol ratio did not change.

The plasma fatty acid profile usually reflects the dietary fatty acid profile. In most populations, EPA and DHA are consumed in small quantities and are therefore reported in low proportions in plasma. Supplementation of the diet with increasing doses of DHA induced significant changes in plasma lipids. Interestingly, a low supplement of DHA (200

mg/day for 15 days) induced a small but significant increase of DHA in both plasma phospholipids (16%) and cholesteryl esters (20%) which was dose-dependent increase. This result agrees with the report of Sun et al. (40) which indicates a strong correlation between DHA in plasma and its intake. A high DHA content (increased by 219%) in plasma phospholipids versus baseline occurred after the highest supplement of DHA (1600 mg/day) for 15 days and such an increase was already found by Conquer and Holub (41) after 3 week supplementation (1.6 g/day DHA). In contrast, a decrease of 22:5n-3 was noted as already reported (16,41). A possible competition at the level of fatty acid esterification into the corresponding phospholipid or a modification of PUFAs metabolism have been suggested (42).

Following the pattern in plasma lipids, a rise of DHA was observed after supplementation with DHA in platelet phosphatidylethanolamine as well as phosphatidylcholine. Consistently with our previous report (19), a low supplementation with DHA for 15 days (200 mg/day DHA) induced a small but significant incorporation of DHA in platelet phospholipids. Our results suggest that the exchange of fatty acids from plasma to platelets is fast as already reported (43). Accordingly with plasma changes, a significant decrease of 22:5n-3 was observed in platelet phospholipids, in particular in phosphatidylethanolamine. In the latter compartment, DHA increase was accompanied by an increase of EPA after the daily intake of 1600 mg, an increase which was also observed in plasma cholesteryl esters. Since the dietary supplement was free of EPA, DHA was likely retroconverted as reported (26,41). Finally, a 8-week washout period was sufficient to return the level of DHA to baseline in plasma lipids and platelet phosphatidylethanolamine. It can be noted that a 4-week washout period was found sufficient when DHA was measured in total lipids from platelets (44).

Platelets are thought to play a central role in the pathogenesis of thromboembolic disorder and in the initiation of atherogenic process. Platelets are activated by physiological substances (thrombin, collagen,...) through their action on platelet receptors after binding and stimulation of the physiological platelet response. Some reports have described the antithrombotic effects of marine oil and several of these involved high-dose supplementation (45). One purpose of the present study was to evaluate the effects of increasing doses of DHA on platelet aggregation. Previously, high intake of DHA has been shown to decrease collagen-induced aggregation (16,46) but our results show that aggregation induced by collagen was already lowered from 400 mg/d DHA in healthy subjects. In addition and in agreement with our data on platelet aggregation, we show for the first time that the conversion of exogenous arachidonic acid into thromboxane B₂, the stable thromboxane A₂ catabolite, was also decreased after the 400 mg and 800 mg daily intakes. Corey et al. (47) have shown that DHA is a potent competitive inhibitor of cyclooxygenase activity, which could be an explanation for the decreased formation of cyclooxygenase products in presence of exogenous arachidonic acid, after low intake of DHA. However, the decreased cyclooxygenase products (both TxB₂ and HHT) was not observed any more after 1600 mg DHA daily intake. This fits quite well with the notion that a putative oxidative stress at this high level intake (see the discussion below) may activate the formation of cyclooxygenase-derived metabolites of AA, then compensating for their decrease by competition with DHA.

Noteworthy, platelet p38 MAPK phosphorylation decreased after the daily supplementation with 200 mg DHA. Interestingly, decreased phosphorylation and therefore activation of p38 MAPK after low consumption of DHA is in favor of a decreased platelet activation (30). Several studies have reported the effect of DHA on p38 MAPK in different cells except platelets but the results are inconsistent. Indeed, p38 MAPK was found not altered (48), decreased (49) or increased (50) in presence of DHA in vitro, but these

contradictory results could be due to the DHA concentration used. Our results, reporting a decreased p38 MAPK activation and an increased vitamin E concentration in platelets after 200 mg DHA, are consistent with those of Gresle et al. (51) showing an inhibition of platelet p38MAPK phosphorylation by an antioxidant (resveratrol). In the same way, a significant decrease of urine 8-isoprostane level was observed after the lowest intake of DHA (200 mg). Although 8-isoprostane level does not provide direct information about the peroxidation of DHA, this marker is accepted as a stable and reliable index of overall lipid peroxidation (52). In contrast, a significant increase of urine excretion of 8-isoprostane was detected after the highest intake of DHA. Several studies report decreases of plasma (53,54) or urinary isoprostanes (55) after supplementation with high doses of n-3 fatty acids (3.5g/day of n-3 fatty acids or 4 g DHA) but when plasma F2-isoprostane concentrations were normalized to the plasma concentration of its precursor, arachidonic acid, the decreases were not any more observed (53). In our study, the decreased 8-iso-PGF_{2α} concentration did not relate to arachidonic acid level. In addition and interestingly, the decreased urinary isoprostane and the increased platelet vitamin E concentrations observed in volunteers supplemented with 200 mg/day DHA are in favor of an antioxidant effect of low DHA doses, as partly reported in platelets (18,19,20) or in brain (56).

In conclusion, our results show for the first time that low supplementation with DHA (400-800 mg /day) reduced platelet function in healthy men. In addition, the most striking data are the significant increase of vitamin E and in parallel a decreased MAPK activation in platelets after 200 mg/day DHA for 15 days, and also a decreased urinary concentration of 8-isoprostane. Thus, these results reinforce the antioxidant potential of DHA at low doses.

Acknowledgments

We thank the participants for their contribution. We also thank the staff at the CRNH for help with data collection and some analyses. The authors gratefully thank Maud Tournoud for statistical advice and Martine Carreras for her technical assistance.

The authors' responsibilities were as follows _ M. Laville was the and the promotor and investigator, E.V. and M. Lagarde designed and assisted the study, assisted the carrying out of the protocol and the submission for ethical approval; N.G., E.C., C.C., E.V. performed experiments; E.V. wrote the draft manuscript, CC and M Lagarde revised the manuscript. None of the authors had any conflicts of interest.

References

1. Kromhout D, Bosschieter EB, de Lezenne Coulander C. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med*. 1985;312:1205-9.
2. Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, Elwood PC, Deadman NM. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 1989;2:757-61.
3. GISSI-Prevenzione Investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction : results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* 1999;354: 447-55.
4. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002;106:2747-57.
5. Hirafuji M, Machida T, Hamaue N, Minami M. Cardiovascular protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids with special emphasis on docosahexaenoic acid. *J Pharmacol Sci*, 2003;2:308-16.
6. Sacks FM, Stone PH, Gibson CM, Silverman DI, Rosner B, Pasternak RC. Controlled trial of fish oil for regression of human coronary atherosclerosis. HARP Research Group. *J Am Coll Cardiol* 1995;25:1492-8.
7. Wagner BA, Buettner GR, Burns CP. Free-radical mediated lipid peroxidation in cells ; oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry* 1994;33: 4449-53.
8. Yagi K. Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys Lipids* 1987;45:337-51.
9. Steinberg D, Parthasarathy MD, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modification of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-24.
10. Brown JE, Wahle KW. Effect of fish-oil and vitamin E supplementation on lipid peroxidation and whole-blood aggregation in man. *Clin Chim Acta* 1990;193:147-56.
11. Meydani M, Natiello F, Goldin B, Free N, Woods M, Schaefer E, Blumberg JB, Gorbach SL. Effect of long-term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women. *J Nutr* 1991;121:484-91.
12. Allard JP, Kurian R, Aghdass E, Muggli R, Royall D. Lipid peroxidation during n-3 fatty acid and vitamin E supplementation in humans. *Lipids* 1997;32:535-41.
13. Véricel E, Januel C, Carreras M, Moulin P, Lagarde M. Diabetic patients without vascular complications display enhanced basal platelet activation and decreased antioxidant status. *Diabetes* 2004;53:1046-51.

14. Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002;196:887-96.
15. Dyerberg J, Bang HO. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet* 1979;2:433-5.
16. von Schacky C, Weber PC. Metabolism and effects on platelet function of the purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in humans. *J Clin Invest* 1985;76:2446-50.
17. Demaison L, Moreau D. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease-related mortality : a possible mechanism of action. *Cell Mol Life Sci* 2002;9:463-77.
18. Croset M, Véricel E, Rigaud M, Hanss M, Courpron Ph, Dechavanne M, Lagarde M. Functions and tocopherol content of blood platelets from elderly people after low intake of purified eicosapentaenoic acid. *Thromb Res* 1990;57:1-12.
19. Véricel E, Calzada C, Chapuy P, Lagarde M. The influence of low intake of n-3 fatty acids on platelets in elderly people. *Atherosclerosis* 1999;147:187-92.
20. Véricel E, Polette A, Bacot S, Calzada C, Lagarde M. Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets. *J Thromb Haemost* 2003;1:566-72.
21. Kramer RM, Roberts EF, Manetta JV, Hyslop PA, Jakubowski JA. Thrombin-induced phosphorylation and activation of Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A2 in human platelets. *J Biol Chem* 1993;268:26796-804.
22. Bryant RW, Bailey JM. Altered lipoxygenase metabolism and decreased glutathione peroxidase activity in platelets from selenium-deficient rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;92 :268-76.
23. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes : a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975 ;72:2994-8.
24. Lagarde M, Bryon PA, Guichardant M, Dechavanne M. A simple and efficient method for platelet isolation from their plasma. *Thromb Res* 1980,17:581-8.
25. Bowyer DE, Leat WN, Howard AN, Greshon GA. The determination of the fatty acid composition of serum lipids separated by thin layer chromatography and comparison with column chromatography. *Biochim Biophys Acta* 1963;70:423-31.
26. Brossard N, Croset M, Pachaiaudi C, Riou JP, Tayot JL, Lagarde M. Retroconversion and metabolism of [¹³C]22:6n-3 in humans and rats after intake of a single dose of [¹³C]22:6n-3-tracylglycerols. *Am J Clin Nutr* 1996;64:577-86.7.
27. Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962 ;194: 927-9.

28. Boukchache D, Lagarde M. Interactions between prostaglandin precursors during the oxygenation by human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1982;713:386-92.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54
30. Coulon L, Calzada C, Moulin Ph, Véricel E, Lagarde M. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase/cytosolic phospholipase A2 cascade in hydroperoxide-stressed platelets. *Free Radic Biol Med* 2003;35:616-25.
31. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
32. Chaudière J, Gérard D. Dosage de l'activité glutathion peroxydase. In : Douste-Blazy L, Mendy F, editors. *Biologie des Lipides chez l'homme*. Paris : Editions Internationales, 1988:257-89.
33. Knapp HR, Fitzgerald GA. The antihypertensive effects of fish oil. A controlled study of polyunsaturated fatty acid supplements in essential hypertension. *N Engl J Med* 1989;320:1037-43.
34. Morris MC, Sacks F, Rosner B. Does fish oil lower blood pressure ? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation* 1993;8:523-33.
35. Kelley DS, Siegel D, Vemuri M, Mackey BE. Docosahexaenoic acid supplementation improves fasting and postprandial lipid profiles in hypertriglyceridemic men. *Am J Clin Nutr* 2007;86:324-33.
36. Harris WS, Rothrock DW, Fanning A, Inkeles SB, Goodnight SH Jr, Illingworth DR, Connor WE. Fish oils in hypertriglyceridemia : a dose-response study. *Am J Clin Nutr* 1990;51:399-406.
37. Hamazaki T, Sawazaki S, Asaoka E, Itomura M, Mizushima Y, Yazawa K, Kuwamori T, Kobayashi M. Docosahexaenoic acid-rich fish oil does not affect serum lipid concentrations of normolipidemic young adults. *J Nutr* 1996;126:2784-9.
38. Theobald HE, Chowienczyk PJ, Whittall R, Humphries SE, Sanders TAB. LDL cholesterol-raising effect of low-dose docosahexaenoic acid in middle-aged men and women. *Am J Clin Nutr* 2004;79:558-63.
39. Milte CM, Coates AM, Buckley JD, Hill AMI, Howe PR. Dose-dependent effects of docosahexaenoic acid-rich fish oil on erythrocyte docosahexaenoic acid and blood lipid levels. *Br J Nutr* 2008;99:1083-8.
40. Sun QI, Jing MA, Campos H, Hankinson SE, Hu FB. Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarkers of fatty acid intake in US women. *Am J Clin Nutr* 2007;86:74-81.

41. Conquer JA, Holub BJ. Supplementation with an algae source of docosahexaenoic acid increases (n-3) fatty acid status and alters selected risk factors for heart disease in vegetarian subjects. *J Nutr* 1996;126:3032-9.
42. Conquer JA, Holub BJ. Dietary docosahexaenoic acid as a source of eicosapentaenoic acid in vegetarians and omnivores. *Lipids* 1997;32:341-5.
43. Skeaff CM, Hodson L, McKenzie JE. Dietary-induced changes in fatty acid composition of human plasma, platelet, erythrocyte lipids follow a similar time course. *J Nutr* 2006;136:565-9.
44. Di Stasi D, Bernasconi R, Marchioli R, Marfisi RM, Rossi G, Tognoni G, Tacconi MT. Early modifications of fatty acid composition in plasma phospholipids, platelets and mononucleates of healthy volunteers after low doses of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;60:183-90.
45. Knapp HR. Dietary fatty acids in human thrombosis and hemostasis. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1687S-98S.
46. Breslow JL. n-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2006;83:1477S-82S.
47. Corey EJ, Shih C, Cashman JR. Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:3581-4.
48. Yusufi ANK, Cheng J, Thompson MA, Walker HJ, Gray CE, Warner GM, Grande JP. Differential effects of low-dose docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid on the regulation of mitogenic signaling pathways in mesangial cells. *J Lab Clin Med* 2003;141:318-20.
49. Serini S, Trombino S, Oliva F, et al. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in lung cancer cells by increasing MPK-1 and down-regulating p-ERK1/2 and p-p38 expression. *Apoptosis* 2008;13:1172-83.
50. Abedin M, Lim J, Tang TB, Park D, Demer LL, Tintut Y. N-3 fatty acids inhibit vascular calcification via the p38-mitogen-activated protein kinase and peroxisome proliferator-activated receptor- γ -pathways. *Circ Res* 2006; 98:727-9.
51. Gresle P, Pignatelli P, Guglielmini G et al. Resveratrol, at concentrations attainable with moderate wine consumption, stimulates human platelet nitric oxide production. *J Nutr* 2008;138:1602-8.
52. Morrow JD. The isoprostanes : their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. *Drug Metab Rev* 2000;32:377-85.
53. Higdon JV, Liu J, Du SH, Morrow JD, Ames BN, Wander RC. Supplementation of postmenopausal women with fish oil rich in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid is not associated with greater in vivo lipid peroxidation compared with oils rich in oleate and linoleate as assessed by plasma malondialdehyde and F2-isoprostanes. *Am J Clin Nutr* 2000;72:714-22.

54. Nälsen C, Vessby B, Berglund L, Uusitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese A, Storlien L, Erkkilä A, Ylä-Herttua S, Tapsell L, Basu S. Dietary (n-3) fatty acids reduce plasma F2-isoprostanes but not prostaglandin F_{2α} in healthy humans. *J Nutr* 2006;136:1222-6.
55. Mori TA, Woodman RJ, Burke V, Puddey IB, Croft KD, Beilin LJ. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. *Free Radic Biol Med* 2003;35:772-81.
56. Yavin E. Versatile roles of docosahexaenoic acid in the prenatal brain : from pro- and anti-oxidant features to regulation of gene expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006;75:203-11.

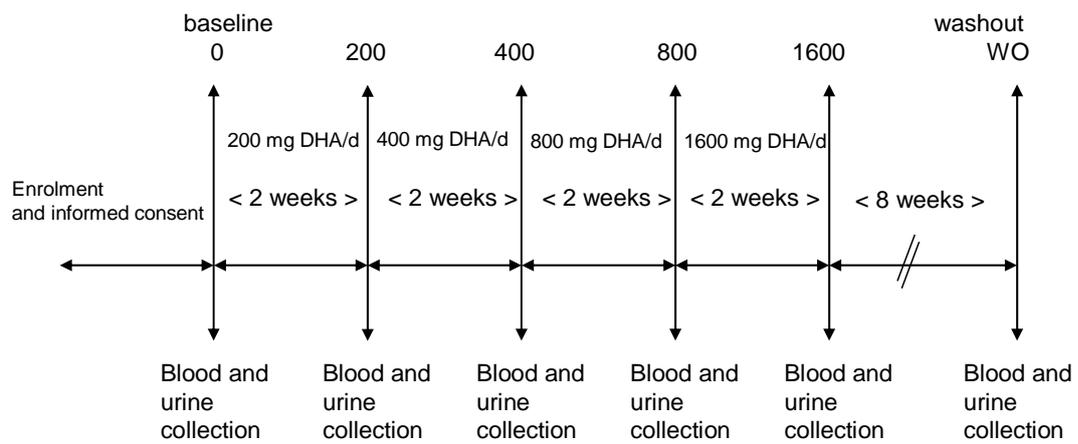


FIGURE 1. Study design. The effects of increasing DHA supplementation were studied during 2-wk interventions and after 8-wk post supplementation.

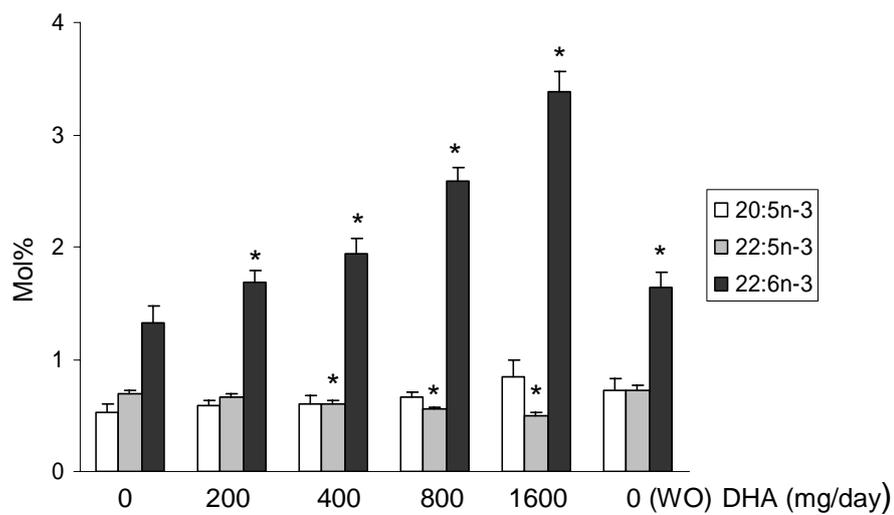


FIGURE 2. Effect of supplementation with increasing doses of DHA on n-3 fatty acids composition of platelet phosphatidylcholine. All values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$, n=12 except for the washout period (n=11). * P<0.05 different from baseline (0).

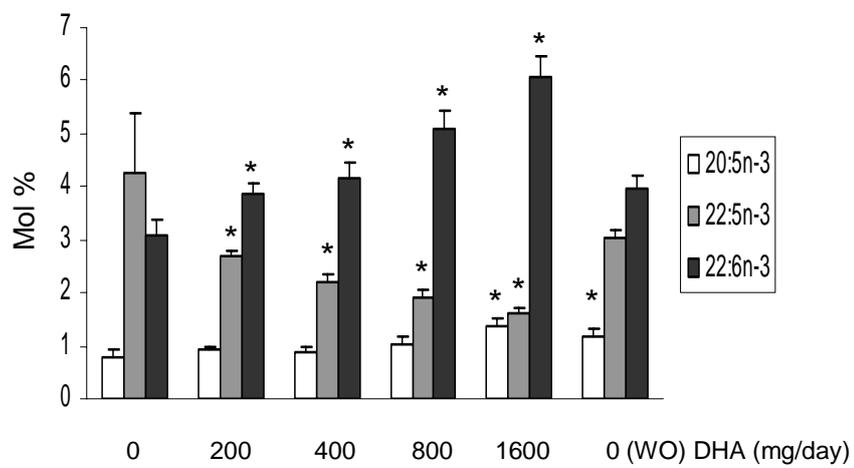


FIGURE 3. Effect of supplementation with increasing doses of DHA on n-3 fatty acids composition of platelet phosphatidylethanolamine. All values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$, n=12 except for the washout period (n=11). * p<0.05 different from baseline (0).

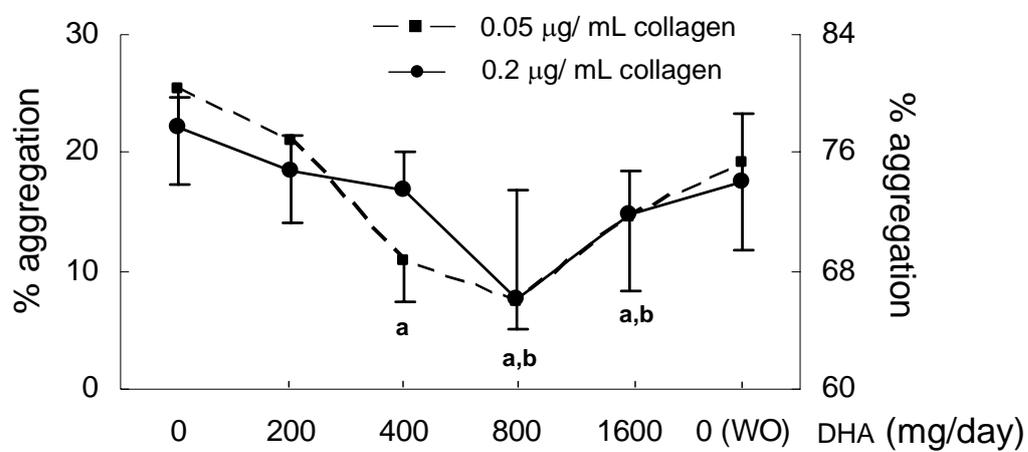


FIGURE 4. Influence of DHA consumption on platelet aggregation induced by 0.05 µg/ mL collagen (left y axis) and 0.2 µg/mL collagen (right y axis). All values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$, n=12, except for the wash out period (n=11).

a : significantly different from baseline (0) for 0.05 µg/ mL collagen, P<0.05.

b: significantly different from baseline (0) for 0.2 µg/ mL collagen, P<0.05.

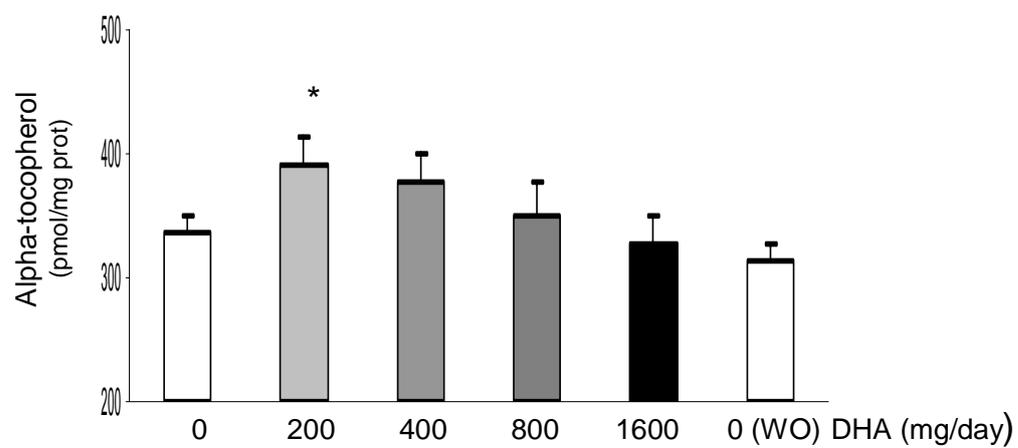


FIGURE 5. Effect of DHA supplementation on platelet vitamin E (α -tocopherol) level at baseline, after increasing DHA supplementation and after 8 weeks washout period. All values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n=12$, except for the washout period ($n=11$), $P<0.05$.

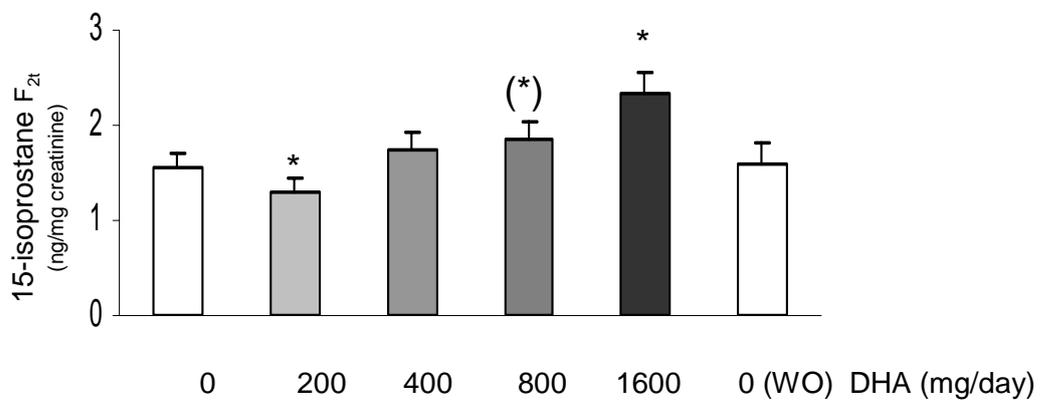


FIGURE 6. Effect of DHA on urinary isoprostane formation. All values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n=8$, $P<0.05$ different from baseline (0).

TABLE 1

Characteristics of the subjects before and during the nutritional supplementation.

DHA (period) Variables	0 0 d	200 mg/day (2 weeks) 14 d	400 mg/day (2 weeks) 28 d	800 mg/day (2 weeks) 42 d	1600 mg/day (2 weeks) 56 d
Weight (kg) (=8)	83.3 ± 3.4	83.7 ± 3.3	83.7 ± 3.3	84.2 ± 3.3	84.2 ± 3.3
Diastolic blood pressure (mm Hg)	82 ± 2.1	82 ± 2.5	79 ± 3	80 ± 2.6	82 ± 2.7
Systolic blood pressure (mm Hg)	131 ± 3.5	130 ± 3.4	129 ± 3.6	127 ± 4.4	129 ± 4.0
Triglycerides (mmol/L)	1.76 ± 0.4	1.74 ± 0.32	1.72 ± 0.34	1.53 ± 0.22	1.29 ± 0.16
Total cholesterol (mmol/L)	5.53 ± 0.22	5.51 ± 0.18	5.64 ± 0.23	5.75 ± 0.21	5.76 ± 0.17
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.43 ± 0.09	1.47 ± 0.1	1.47 ± 0.1	1.54 ± 0.11 (p=0.08)	1.60 ± 0.12*
LDL-cholesterol (mmol/L)	3.23 ± 0.24	3.27 ± 0.23	3.44 ± 0.27	3.46 ± 0.26	3.56 ± 0.27
HDL/LDL cholesterol	0.44	0.45	0.42	0.43	0.45

All values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$, n=12, except for the weight (n=8).

* significantly different from baseline, p<0.05

TABLE 2

Fatty acid composition of plasma phospholipids at baseline (0), after supplementation with increasing doses of DHA and after a washout (WO) period in healthy men.

DHA (mg/d) fatty acids (mol %)	0	200	400	800	1600	0 (WO)
16:0	31.0 ± 0.4	31.1 ± 0.3	31.0 ± 0.3	31.8 ± 0.4	32.0 ± 0.5	31.6 ± 0.4
18:0	13.4 ± 0.2	13.5 ± 0.2	13.4 ± 0.1	13.3 ± 0.2	13.5 ± 0.2	13.32 ± 0.2
18:1n-9	9.6 ± 0.3	9.5 ± 0.4	9.4 ± 0.4	9.3 ± 0.3	9.1 ± 0.5	10.22 ± 0.5
18:2n-6	20.6 ± 0.5	20.7 ± 0.5	20.8 ± 0.7	19.3 ± 0.6	19.3 ± 0.9	20.0 ± 0.7
20:3n-6	2.7 ± 0.1	2.4 ± 0.1*	2.3 ± 0.1*	2.2 ± 0.1*	1.8 ± 0.1*	2.4 ± 0.1
20:4n-6	8.4 ± 0.4	8.1 ± 0.3*	7.8 ± 0.4*	7.4 ± 0.3*	6.8 ± 0.3*	8.0 ± 0.3
20:5n-3	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.1
22:5n-3	0.78 ± 0.02	0.70 ± 0.02*	0.65 ± 0.04*	0.60 ± 0.03*	0.51 ± 0.03*	0.78 ± 0.04
22:6n-3	3.1 ± 0.2	3.6 ± 0.1*	4.5 ± 0.3*	5.7 ± 0.3*	6.8 ± 0.3*	3.6 ± 0.3

All values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$, n=12, except for the washout period (n=11).

* significantly different from baseline, P<0.05

TABLE 3

Fatty acid composition of plasma cholesteryl esters at baseline (0), after supplementation with increasing doses of DHA and after a washout period in healthy men.

DHA (mg/d) fatty acids (mol %)	0	200	400	800	1600	0 (WO)
16:0	12.6 ± 0.5	12.1 ± 0.2	12.1 ± 0.3	12.1 ± 0.3	12.3 ± 0.2	12.3 ± 0.2
18:1n-9	21.0 ± 0.7	20.2 ± 0.7	20.2 ± 0.5	20.2 ± 0.5	20.6 ± 0.9	21.1 ± 0.9
18:2n-6	49.7 ± 1.6	51.2 ± 1.3	51.5 ± 1.3	50.6 ± 1.1	50.3 ± 1.8	49.4 ± 2.1
20:3n-6	0.67 ± 0.02	0.62 ± 0.02*	0.62 ± 0.02*	0.57 ± 0.01*	0.48 ± 0.02*	0.59 ± 0.04
20:4n-6	5.9 ± 0.3	5.9 ± 0.3	5.9 ± 0.3	5.8 ± 0.3	5.5 ± 0.2*	6.0 ± 0.3
20:5n-3	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.07	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.2*	1.0 ± 0.1
22:5n-3	0.04 ± 0.004	0.02 ± 0.002*	0.03 ± 0.003	0.03 ± 0.003*	0.03 ± 0.003*	0.04 ± 0.005
22:6n-3	0.5 ± 0.05	0.6 ± 0.05*	0.8 ± 0.07*	1.1 ± 0.08*	1.41 ± 0.09*	0.63 ± 0.09

All values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$, n=12 except for the washout period (n=11).

* significantly different from baseline, P<0.05.

TABLE 4

Effect of DHA on cyclooxygenase and lipoxygenase main end-products.

DHA (mg/day)	0	200	400	800	1600	0 (WO)
TxB ₂ pmol/mg prot	281 ± 54	253 ± 62	253 ± 45 *	190 ± 37 *	243 ± 42	256 ± 46
HHT pmol/mg prot	363 ± 76	361 ± 86	313 ± 57	275 ± 69 *	311 ± 46	347 ± 73
12-HETE pmol/mg prot	253 ± 34	249 ± 42	233 ± 43	178 ± 28 *	185 ± 29 *	221 ± 39

Platelets were incubated with 2.2 μ M of [¹⁴C]AA for 4 min at 37°C. Platelet lipids were extracted, separated by TLC and metabolites of [¹⁴C]AA were quantified by radiochromatography (see Methods).

All values are $\bar{x} \pm$ SEM, n=9 .

* significantly different from baseline, P<0.05.

CONCLUSION

Le rôle bénéfique des acides gras n-3 est, d'après les nombreuses données de la littérature, bien établi dans les pathologies cardiovasculaires. Cependant, la quantité optimale d'AGPI n-3, en particulier de DHA, à ingérer n'est pas établie or une utilisation trop importante peut entraîner des effets délétères masquant les effets bénéfiques. La pertinence de cette étude est de mettre en évidence pour la première fois les effets de différentes doses de DHA chez l'homme sain sur la fonction des plaquettes et leur état redox. Les principaux résultats de cette étude sont repris dans le *tableau A page 133*.

Un certain nombre de données indique un rôle hypotenseur des AGPI n-3 (Knapp & FitzGerald, 1989). Plus précisément une étude de notre équipe montrait chez des personnes hypertendues un effet antihypertension du DHA (Croset *et al.*, 1990). L'étude DOCOREDOR avec les doses de DHA utilisées n'a pas permis de révéler d'effet similaire chez les personnes recrutées qui étaient normotendues. Par ailleurs, les différentes doses de DHA n'induisent pas dans cette étude d'effets hypotriglycéridémiant.

Nous avons observé dans cette étude une modification de la composition des lipides plasmatiques. Ainsi dès 200 mg de DHA/j/14j nous constatons une augmentation du taux de cet acide gras à la fois dans les phospholipides totaux et les esters de cholestérol. Des résultats similaires ont été obtenu par Sun *et al.* qui démontrent une corrélation entre la quantité de DHA ingéré et la quantité de DHA plasmatique (Sun *et al.*, 2007). L'augmentation obtenue au cours de cette étude après au moins 1600 mg de DHA/j/14j dans les phospholipides plasmatiques est similaire à celle obtenue par les travaux de Conquer *et al.* suite à une supplémentation de 1600 mg de DHA pendant 3 semaines (Conquer & Holub, 1997).

Une augmentation du taux de DHA dans les deux classes majoritaires de phospholipides plaquettaires a été observée dès 200 mg de DHA/j/14j. Cette augmentation est d'autant plus importante que la dose de DHA ingérée est forte. Ceci indique une relation entre la quantité de DHA plasmatique et la quantité de DHA plaquettaire comme cela a été suggéré par Skeaff *et al.* (Skeaff *et al.*, 2006). La plus forte dose de DHA utilisée dans notre expérience induit une augmentation du taux d'EPA. Ceci suggère une rétroconversion du DHA en EPA puisque le triglycéride contenant le DHA utilisé dans notre étude ne contient pas d'autre acide gras n-3 que le DHA.

Enfin concernant les effets du DHA sur la fonction plaquettaire, nous avons observé une diminution de la réponse des plaquettes au collagène. Ces effets sont liés à une prise d'au moins 400 mg de DHA/j/14j. Une réponse similaire est observée lorsque la thrombine et l'acide arachidonique sont utilisés (après 800 et 1600 mgDHA/j/14j) (les données ne sont pas présentées dans cet article). Aucun effet sur l'état redox des plaquettes à ces mêmes doses de DHA n'a été relevé. Parallèlement nous avons noté une diminution du métabolisme de l'acide arachidonique, en particulier une diminution de la formation de TxB₂, ce qui conforte les données de Corey *et al.* qui avaient démontré le potentiel inhibiteur du DHA sur la PGH synthase (activité cyclooxygénase plus précisément) (Corey *et al.*, 1983).

Ainsi des doses de 400 à 1600 mg de DHA/j/14j réduisent l'activité des plaquettes chez l'homme sain sans affecter, d'après nos mesures, l'état redox de ces cellules. Ces effets sont associés à une modification significative du profil lipidique de la membrane plasmique plaquettaire.

DHA (mg/j/14j)		0	200	400	800	1600	WO
Incorporation de DHA dans les plaquettes	Phosphatidylcholines & phosphatidyléthanolamines		+	++	+++	++++	
	Agrégation (collagène)			-	-	-	
Fonction plaquettaire	TxB ₂ basal			-		-	
	Activités PGH synthase & 12 lipoxygénase			-	-	-	
	Vitamine E		+				
Etat redox	Isoprostane urinaire		-			+	

Tableau A reprenant les principaux résultats de l'étude DOCOREDOX obtenus principalement au niveau des plaquettes sanguines en fonction de la dose de DHA ingérée. Nous constatons une diminution significative de l'activité plaquettaire après 400 et jusqu'à 1600 mg DHA ingérés/j/14j chez des sujets sains d'âge moyen. Un effet anti-oxydant à très faible dose de DHA est également observé. Enfin dès l'ingestion de 200 mg DHA/j/14j nous constatons un enrichissement en DHA dans les phospholipides membranaires plaquettaires.

2^{ème} PARTIE

**Effets de l'acide docosahexaénoïque sur l'expression de gènes mégacaryocytaires
impliqués dans la synthèse des prostanoides**

Nicolas GUILLOT, Cyrille DEBARD, Catherine CALZADA, Hubert VIDAL, Michel
LAGARDE & Evelyne VERICEL.

Laboratoire Régulations Métaboliques Nutrition et Diabète
Unibversité de Lyon, INSERM U870, INSA de Lyon, INRA 1235, HCL
Villeurbanne, France.

Biochemical, Biophysical Research Communication, 2008, Vol. 372, 924-928.

INTRODUCTION

Le rôle bénéfique des acides gras polyinsaturés n-3 dans les maladies cardiovasculaires est connu depuis un certain nombre d'années (Dyerberg & Bang, 1979; Burr *et al.*, 1989; GISSI-Prevenzione-Investigators, 1999). L'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahéxaénoïque (DHA) sont les principaux AGPI n-3. Les différentes études épidémiologiques d'observation et d'intervention montrent une relation inverse entre la consommation ou l'apport d'AGPI n-3 et la mortalité cardiovasculaire. Ces effets sont d'autant plus pertinents dans le cadre de prévention secondaire de personnes atteintes de pathologies cardiovasculaires. Cependant quelques études d'observation ne montrent pas de diminution de la mortalité cardiovasculaire associée aux AGPI n-3 (Albert *et al.*, 1998). L'une des raisons qui pourraient expliquer l'effet contradictoire de ces acides gras au niveau des maladies cardiovasculaires est leur degré d'insaturation. Le DHA est un acide gras comportant 6 insaturations le rendant ainsi extrêmement susceptible aux attaques des radicaux libres. Ce processus d'oxydation aboutit à la formation de métabolites souvent toxiques pour les cellules de l'organisme (Yagi, 1987).

L'hémostase, réponse physiologique à une lésion vasculaire, requiert entre autre les plaquettes sanguines. Elles sont à la base de l'hémostase primaire et permettent dans un premier temps de colmater la brèche vasculaire. Elles permettent également aux protéines de la coagulation de fonctionner. L'activation et l'agrégation des plaquettes sont finement régulée ; tout déséquilibre participe à l'aggravation de l'athérosclérose, entraîne une thrombose provoquant embolie pulmonaire et accident vasculaire cérébral ou au contraire peut induire un processus hémorragique (Davi & Patrono, 2007). L'équilibre entre les espèces pro-oxydantes et anti-oxydantes qui définit l'état redox est un élément de contrôle de la fonction plaquettaire (Loscalzo, 2003).

Les travaux antérieurs de notre équipe ont montré une diminution du stress oxydant dans les plaquettes de sujets âgés après l'ingestion de DHA (Véricel *et al.*, 1999). De plus l'étude DOCOREDOX a permis de mettre en évidence l'importance des doses de DHA sur l'état redox et la fonction plaquettaire. Plus précisément, l'ingestion de faibles doses de DHA augmente la teneur en vitamine E dans les plaquettes de sujets sains. Cette propriété anti-oxydante du DHA avait été démontrée *in vitro* sur les plaquettes sanguines (Véricel *et al.*, 2003). Les plaquettes ne possèdent pas d'ADN génomique et par conséquent n'ont pas d'activité transcriptionnelle (Macaulay *et al.*, 2005). Or l'un des mécanismes d'action du DHA pourrait intervenir via une régulation génique. Il a été démontré que les acides gras en particulier polyinsaturés comme le DHA, peuvent avoir une action transcriptionnelle. Ceci se

feraient via l'interaction acide gras-facteurs de transcription par exemple de type PPAR (peroxysome proliferator-activating receptors) (Jump, 2002). De ce fait une partie des effets observés sur les plaquettes, dans les conditions d'ingestion de cet acide gras, pourrait avoir pour origine une modification qualitative des plaquettes.

Notre hypothèse dans ce travail a donc été de rechercher si le DHA pouvait modifier l'expression de protéines plaquettaires au niveau des mégacaryocytes. En effet la synthèse la majorité des protéines impliquées dans la structure et la fonction plaquettaire se produit au niveau de ces cellules hématopoïétiques. Pour cela nous avons utilisé un modèle de mégacaryocytes humains, la lignée MEG-01. Nous avons déterminé les effets de différentes doses de DHA sur l'expression d'un certain nombre de gènes codant pour des protéines impliquées dans la fonction plaquettaire notamment dans la formation de thromboxane A_2 et dans la régulation de l'état redox. Parallèlement nous avons mesurés d'une part la composition en acides gras des principaux phospholipides de ces cellules et d'autre part la distribution du DHA dans les différentes classes de phospholipides.



Effects of docosahexaenoic acid on some megakaryocytic cell gene expression of some enzymes controlling prostanoid synthesis

Nicolas Guillot, Cyrille Debard, Catherine Calzada, Hubert Vidal, Michel Lagarde, Evelyne Véricel *

Université de Lyon, INSERM, U.870, INSA-Lyon, (RMND-IMBL), Univ-Lyon 1, Bât Louis Pasteur, 20 Ave. A. Einstein, F-69621 Villeurbanne Cedex, France
INRA, UMR 1235, F-69600 Oullins, France

article info

Article history:

Received 28 May 2008

Available online 6 June 2008

Keywords:

Docosahexaenoic acid

Gene expression

Megakaryocyte

Glutathione peroxidase

Catalase

Oxidative stress

Antioxidant

Thromboxane synthase

Phospholipids

abstract

Beneficial effects of docosahexaenoic acid (DHA) intake in the prevention of cardiovascular diseases are known, and platelets play a crucial role in cardiovascular complications. However, high doses of DHA may increase lipid peroxidation and induce deleterious effects, notably in platelets. This led us to investigate the effect of DHA on gene expression of some enzymes controlling redox status and prostanoid formation in human megakaryoblastic cells (MEG-01 cell line). MEG-01 cells were incubated in presence of DHA (10 and 100 μ mol/L) for 6 h. DHA enrichment up-regulated glutathione peroxidase-1 and thromboxane synthase mRNA. DHA increased gene catalase expression and up-regulated PPAR β /d and PPAR γ c mRNA in presence of high concentration of DHA. In conclusion, our results support an antioxidant mechanism of DHA. The effects of DHA on cellular redox status could, with others, provide an explanation for the beneficial influence of low consumption of DHA on cardiovascular events.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

It is now well established that dietary marine n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), especially docosahexaenoic acid (DHA) can reduce morbidity and mortality from cardiovascular diseases [1,2]. However some studies failed to report a beneficial association between n-3 fatty acid consumption and cardiovascular events [3,4].

DHA is highly oxidizable owing to the presence of its six double bonds in the 22-carbon fatty acyl chain and the peroxidation process provides a variety of lipid peroxides, including malondialdehyde (MDA), which have been implicated in the etiology of cardiovascular diseases [5]. In agreement with these observations, several studies have reported higher peroxidation index and oxidative stress in some dietary interventions with high doses of n-3 PUFA [6,7].

Because circulating blood platelets are known to play a crucial role in the regulation of haemostasis, thrombosis, and the initiation of atherosclerosis [8,9], some studies have focused on the effects of n-3 PUFA on platelet function. Previously, we have shown that small intake of n-3 PUFA decreased oxidative stress in platelets from elderly people [10,11]. Thus, DHA can

exert opposite activities and we have found these different effects on human blood platelet redox status depending on the dose [12].

The role of PUFA in the regulation of gene transcription has been well documented [13] and PUFA regulate the activity and/or abundance of at least four transcription factor families including peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). However, data concerning DHA effects on redox status genes are less numerous. As platelets are produced from megakaryocytes as cytoplasmic fragments without genomic DNA, platelets are thought to have no synthetic capacity for transcription of nuclear material. Thus, the regulation of gene expression must occur during megakaryocytopoiesis. To study DHA-induced regulation of gene expression, we have chosen the immortalized human megakaryoblastic cell line (MEG-01 cells) as a model of megakaryocytes [14].

The present study was undertaken to mainly investigate the effects of different concentrations of DHA on some enzymes controlling the redox status and prostanoid formation in a well established megakaryocyte cell model.

Materials and methods

Materials. All chemicals and reagents were purchased from Sigma–Aldrich (St. Quentin Fallavier, France), unless otherwise specified. All tissue culture reagents were obtained from Fisher Bioblock Scientific (Illkirch, France).

* Corresponding author. Address: Université de Lyon, INSERM, U.870, INSA-Lyon, (RMND-IMBL), Univ-Lyon 1, Bât Louis Pasteur, 20 Ave. A. Einstein, F-69621 Villeurbanne Cedex, France. Fax: +33 4 72 43 85 24.

E-mail address: evelyne.vericel@insa-lyon.fr (E. Véricel).

Cell culture. MEG-01 cells (American Type Culture Collection) were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) containing 10% fetal bovine serum at 37 °C and in a 5% CO₂ atmosphere.

DHA supplementation. Ethanolic DHA solutions or ethanol were dried and incubated overnight under nitrogen at 37 °C with complete IMDM containing human albumin (fatty acid free). Cells were incubated with medium supplemented or not with 10 and 100 μM DHA (molar ratio of albumin 0.1 and 1, respectively) for 6 h.

Reverse transcriptase and real-time PCR. Total RNA was isolated from MEG-01 cells using a previously described method with Trizol Reagent according to the manufacturer's protocol [15]. After quantification, 1 μg of total RNA was reverse transcribed into cDNA in presence of 100 U Superscript II (Invitrogen, Eragny, France) using both random hexamers and oligo(dT). Real-time PCR was performed with Fast Start DNA Master SYBR Green kit using a Light-Cycler. Primers sequences are available on request (evelyne.vericel@insa-lyon.fr). The results were normalized to hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 mRNA level. Data were analyzed using Light-Cycler software (Roche Diagnosis).

Malondialdehyde (MDA) determination. The overall lipid peroxidation was evaluated by measuring MDA according to the HPLC method of Therasse and Lemonnier [16] with fluorometric detection (λ excitation 515 nm, λ emission 553 nm).

Arachidonic acid cyclooxygenation in MEG-01 cells. The oxygenation of exogenous arachidonic acid (AA) through the cyclooxygenase pathway was determined by incubating 10 μM [1-¹⁴C] AA with MEG-01 cells for 5 min at 37°C. After lipid extraction, the oxygenated end-products were separated by thin-layer chromatography (TLC), and quantified with a Berthold TLC linear analyzer (Berthold Technologies LB511, Germany) [17].

Fatty acid composition of phospholipid. After total lipid extraction, phospholipids were separated from neutral lipids by TLC and phospholipid classes were then resolved in a second step by the eluent system chloroform/methanol/methylamine (60:25:5, v/v/v) [18]. The phospholipids were transmethylated [19] and the resulting fatty acid methyl esters and fatty aldehyde dimethyl acetals (DMA) were analyzed by gas-liquid chromatography (GC) using BPx70 SGE column (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm).

Statistical analysis. Statistical analysis of differences was carried out by analysis of variance (ANOVA) test using StatView (version 5.0). A p value of less than 0.05 (Fisher's PLSD test) was considered significant.

Results

Regulation of redox enzyme expressions in response to DHA

The MEG-01 cell line was used to determine whether DHA altered the expression pattern of a number of key genes involved in oxidative stress, including antioxidant enzymes and enzymes known to produce reactive oxygen species (ROS) such as NADPH oxidase. The mRNA levels of glutathione peroxidase-1 (UniGene Access No. Hs.76686, GPx-1) significantly increased after 6-h DHA incubation with 10 μM (1.5-fold) or 100 μM (2.5-fold) DHA. The mRNA of GPx-4 (Hs.433951) also significantly increased but only with the highest DHA concentration (Fig. 1). Copper-zinc containing superoxide dismutase (Cu-Zn SOD, Hs.443914) mRNA expression was neither modified by DHA concentration compared to mRNA expression in control untreated cells (Fig. 1). Catalase

(Hs.502302) mRNA slightly but significantly increased above control levels in cells incubated with 100 μM DHA. Finally, as shown in Fig. 1, p22^{phox} (Hs.513803) mRNA level expression was not significantly modified by DHA compared to mRNA expression in control cells.

Regulation of PGH synthase and Tx synthase expressions in response to DHA

The enzyme prostaglandin endoperoxide H synthase (PGH synthase) catalyzes the conversion of AA to prostaglandin endoperoxide H₂ (PGH₂). PGH₂ is further converted into prostaglandins (PGs) and mainly into thromboxane A₂, one of the most potent platelet aggregatory and vasoconstricting substances, by thromboxane synthase (Hs.520757, Tx synthase). The levels of PGH synthase-1 (Hs.201978) did not change compared to mRNA levels in control cells (Fig. 2). Tx synthase mRNA increased with 10 μM (1.4-fold) and 100 μM (2.2-fold) DHA (Fig. 2).

Regulation of PPAR β/d and PPAR γ expressions in response to DHA

As fatty acids, including DHA, are known as natural ligands of PPARs, mRNA levels of PPAR β/d (Hs.696032) and PPAR γ (Hs.162646) were measured after incubation with DHA on MEG-01 cells. Both PPAR β/d and PPAR γ mRNA expressions were significantly increased with the highest DHA concentration compared to control cells: PPAR β/d mRNA expression by 99% and PPAR γ mRNA by 88% compared with control cells (Fig. 3).

Effects of DHA on MEG-01 MDA levels

In order to determine whether the incubations of MEG-01 cells with DHA affected the overall lipid peroxidation, basal levels of MDA were measured after 6 h incubation in the presence or absence of DHA. As shown in Table 1, 10 μM DHA did not induce any significant changes of MDA concentrations compared to control cells. Significant increase (51%) of MDA was observed with the highest concentration of DHA compared to controls.

Effect of DHA on arachidonic acid cyclooxygenation in MEG-01 cells

The conversion of exogenous AA into its main cyclooxygenase products (thromboxane B₂, PGE₂, and PGA₂/B₂) was measured. The corresponding results, given in Fig. 4, indicate that the formation of PGs was not altered by DHA, but a significant decrease of Tx B₂ was observed in cells incubated with 100 μM DHA (Fig. 4).

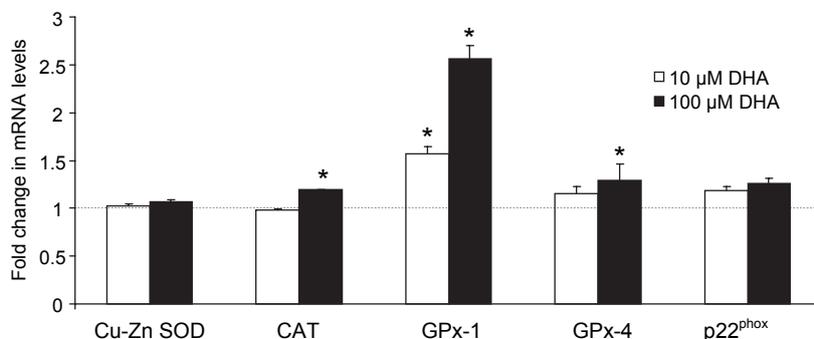


Fig. 1. Effect of DHA on the mRNA level of redox enzymes in MEG-01 cells. Cells were incubated in the absence (vehicle alone, human albumin) or presence of 10 and 100 μM DHA for 6 h (corresponding to DHA/human albumin ratio 0.1 and 1, respectively). The mRNA levels were determined by quantitative real-time PCR. Data are expressed as fold change compared with the control and are means ± SEM, for four to five independent experiments; * indicates significant difference vs. control cells (*p < 0.05). Cu-Zn SOD, copper-zinc containing superoxide dismutase 1; CAT, catalase; GPx-1, glutathione peroxidase-1; GPx-4, glutathione peroxidase 4; p22^{phox}, component of NADH/NADPH oxidase.

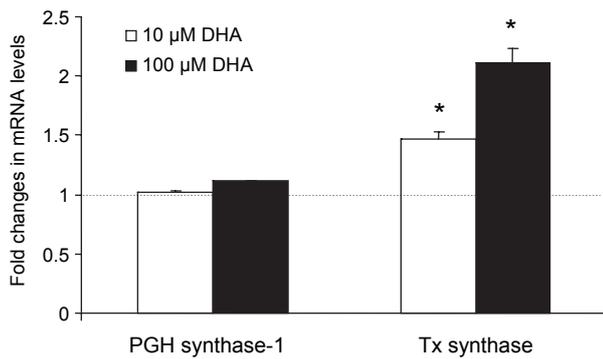


Fig. 2. Effect of DHA on the mRNA level of arachidonic acid metabolism enzymes in MEG-01 cells. Cells were treated as described in the legend of Fig. 1. Data are means \pm SEM ($n = 4-5$), and are expressed as fold change compared to untreated cells; * indicates significant difference vs. control cells ($*p < 0.05$). PGH synthase-1, prostaglandin endoperoxide synthase-1; Tx synthase, thromboxane A synthase-1.

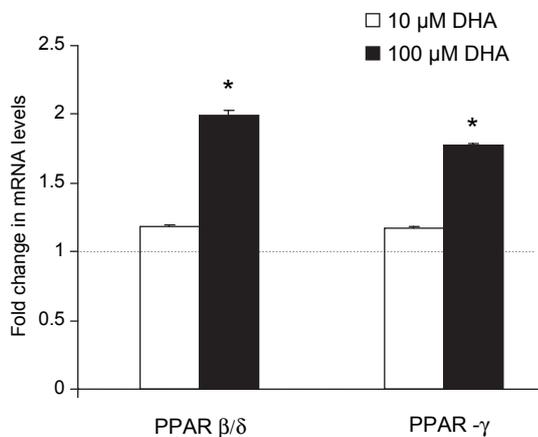


Fig. 3. Effect of DHA on the mRNA level of peroxisome proliferator-activated receptors in MEG-01 cells. Cells were treated as described in the legend of Fig. 1. Data are means \pm SEM ($n = 4$) and are expressed as fold change in mRNA levels compared to untreated cells; * indicates significant difference vs. control cells ($*p < 0.05$). PPAR β/δ, peroxisome proliferator-activated receptor delta; PPAR γ, peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

Table 1
Effect of DHA on MDA production in MEG-01 cells

MDA (pmol/ l g protein)		
Control	10 l M DHA	100 l M DHA
7.81 \pm 0.44	8.08 \pm 0.26	11.83 \pm 1.19*

Cells were cultured as described above. MDA production was determined by HPLC analysis. Data, expressed as pmol/ l g protein, are means \pm SEM ($n = 4-5$) experiments.

* Indicates significant difference vs. control cells ($*p < 0.05$).

Effect of DHA on fatty acid composition of phospholipids

Incorporation and distribution of DHA within MEG-01 phospholipids were determined, especially in the most important ones regarding n-3 PUFA esterification, namely phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC). Table 2 shows the fatty acid composition of MEG-01 cell PE (% of main fatty acids are only reported). DHA percentage was 2.1-fold higher than controls in MEG-01 cells incubated with 10 l M DHA. This percentage of DHA was more elevated in cells incubated with 100 l M DHA (3.6-fold increase). We can notice a significant increase of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) with the highest

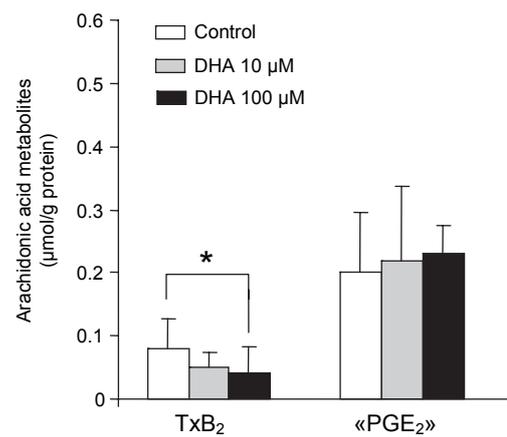


Fig. 4. Effect of DHA on cyclooxygenase activity in MEG-01 cells. Cells were treated as described in the legend of Fig. 1. Data are means \pm SD ($n = 3$); * indicates significant difference vs. control cells ($*p < 0.05$). TxB₂, thromboxane B₂; PGE₂, PGE₂ and its metabolites PGA₂/PGB₂.

Table 2
Effect of DHA on the fatty acid composition of phosphatidylethanolamine in MEG-01 cells

Major fatty acids (mol%)	Control	10 l M DHA	100 l M DHA
16:0-DMA	8.9 \pm 1.8	8.7 \pm 1.9	8.6 \pm 1.4
18:0-DMA	12.0 \pm 3.1	11.4 \pm 2.9	11.6 \pm 2.5
16:0	4.5 \pm 0.3	4.3 \pm 0.3	4.5 \pm 0.7
18:0	10.9 \pm 0.1	10.5 \pm 0.7	11.6 \pm 0.7
18:1 n-9	31.8 \pm 1.5	30.9 \pm 2.6	27.4 \pm 0.8*
18:2 n-6	3.6 \pm 0.7	3.9 \pm 1.2	2.9 \pm 1.0
20:4 n-6	6.5 \pm 0.6	5.5 \pm 0.7	5.2 \pm 0.1*
20:5 n-3	1.7 \pm 0.3	1.6 \pm 0.4	2.7 \pm 0.1*
22:5 n-3	2.5 \pm 0.2	2.0 \pm 0.2	1.9 \pm 0.1*
22:6 n-3	3.2 \pm 0.4	6.8 \pm 1.1*	11.8 \pm 0.7*

Cells were incubated as described above. Fatty acid composition was determined by GC analysis. Data, expressed as mole percent, are means \pm SEM off our experiments. Minor fatty acids are included for calculation but not tabulated. DMA, dimethyl acetals.

* Indicates significant difference vs. control cells ($*p < 0.05$).

tested concentration of DHA. A concomitant significant decrease of 18:1n-9 and 20:4n-6 was found. Similar results were observed for the main fatty acids in PC with a significant higher enrichment of EPA and DHA than in PE from cells incubated with 10 and 100 l M DHA (Table 3).

Discussion

Evidence to explain the positive association between cardiovascular health and intake of n-3 PUFA in epidemiologic studies

Table 3
Effect of DHA on the fatty acid composition of phosphatidylcholine in MEG-01 cells

Major fatty acids (mol%)	Control	10 l M DHA	100 l M DHA
16:0	20.16 \pm 0.43	21.03 \pm 1.27	22.36 \pm 0.57
18:0	10.16 \pm 0.54	10.24 \pm 0.31	8.48 \pm 0.25*
18:1 n-9	47.12 \pm 0.34	46.74 \pm 0.53	39.01 \pm 0.6*
18:2 n-6	2.97 \pm 0.21	2.57 \pm 0.17	2.93 \pm 0.41
20:4 n-6	1.56 \pm 0.27	1.53 \pm 0.43	1.79 \pm 0.12
20:5 n-3	0.38 \pm 0.09	0.43 \pm 0.15	1.18 \pm 0.10*
22:5 n-3	0.71 \pm 0.13	0.64 \pm 0.22	0.74 \pm 0.08
22:6 n-3	0.94 \pm 0.17	2.32 \pm 0.74*	9.38 \pm 0.49*

Cells were incubated as described above. Fatty acid composition was determined by GC analysis. Data, expressed as mole percent, are means \pm SEM off our experiments. Minor fatty acids are included for calculation but not tabulated.

* Indicates significant difference vs. control cells ($*p < 0.05$).

[20] has accumulated since Dyerberg and Bang [21] reported the decreased platelet function in Inuits. In the present study, we investigated the expression of glutathione peroxidases, catalase, and superoxide dismutase in MEG-01 cells, a cell line known to express characteristic features of platelet precursor cells, in presence of DHA. Our results show that DHA failed to induce Cu–Zn SOD expression but up-regulated GPx-1 gene expression in a dose-dependent manner. Incubation with DHA led to similar results on GPx-4 mRNA, however to much lesser extent. These findings are in agreement with a previous study [22] showing a modest but significant increase of mRNA GPx-4 by DHA. To explain the up-regulation of GPx, several mechanisms can be considered. First, PUFA gene control involves PPAR dependent pathway [23], and DHA is a ligand of the all three PPAR subtypes. In agreement with these findings, we found an increase in both PPAR α and γ mRNA expression in presence of DHA mainly with a high concentration of the fatty acid. Second, GPx-1, one of the major detoxification enzymes, catalyzes the degradation of hydroperoxides to the corresponding alcohols [24]. GPx-4 has the important property of directly reducing lipid hydroperoxides in membranes. GPx-1 and GPx-4 are present in platelets [25,26]. These enzymes play a key role in the protection of cells from oxidative damage and also regulate the formation of eicosanoids, since their formation depends on the cell peroxide tone. Our results are consistent with those of Schonberg et al. [27] which found that GPx mRNA was increased in a human cancer line in response to DHA that induced lipid peroxidation. The up-regulations of GPx-1 and 4 expressions can play an important role in the protection against DHA-induced cytotoxicity. DHA-derived hydroperoxides, being substrates for these enzymes, are among the likely candidates for mediating cytotoxic effect. In addition, it is admitted that cellular stress leads to transcriptional activation of enzymes known to be involved in the primary antioxidant defence. In a recent study, it has also been shown that oxidative stress induced the expression of GPx but failed to induce the expression of Cu–Zn SOD [28] in agreement with our findings.

Because platelets are anucleated cells, PGH synthase-1 content is a consequence of gene expression in megakaryocytes, so the effect of DHA on PGH-synthase-1 expression was investigated. DHA failed to induce PGH synthase-1 mRNA expression. Few and conflicting reports are available showing either inhibition [29] or enhancement [30] of PGH-synthase-1 by DHA. By contrast, our data are the first to show up-regulation of thromboxane synthase. This enzyme catalyzes the conversion of prostaglandin H₂ to thromboxane A₂ (TxA₂), a potent vasoconstrictor and proaggregatory substance but also of prostaglandin H₃ to thromboxane A₃ from EPA which has considerably less activity than TxA₂ [31]. This TxA₃ could be synthesized even in presence of DHA since DHA can be retroconverted to EPA in many cells and our results show such a retroconversion in MEG-01 cells. Interestingly, the effect of DHA on thromboxane synthase was concentration-dependent. Moreover, the highest concentration of DHA induced an increased formation of MDA [12] and the oxidative stress induced by DHA might also up-regulate the expression of thromboxane synthase. Although DHA failed to affect PGH synthase-1 mRNA, it is known that DHA is a potent inhibitor of PGH synthase [32]. In agreement, cyclooxygenase activity, measured in presence of exogenous AA, was reduced after DHA treatment, and this resulted in a decreased thromboxane formation, despite the increased expression of thromboxane synthase.

Last, DHA is highly incorporated in platelet PC and PE [33] which reflects its endogenous distribution, and we found a similar pattern for megakaryocyte in PC and PE. This means that the alterations caused in megakaryocytes by DHA enrichment may be representative of those observed in platelets.

In summary, our findings indicate that DHA up-regulates GPx-1 gene expression in a megakaryocyte cell line. Since the beneficial effects of DHA can no longer be doubted, numerous studies suggest several cellular mechanisms. In the present study, we cannot conclude whether the action on GPx expression was due to esterified DHA in phospholipids, unesterified DHA or its metabolites. Nevertheless this work supports an additional antioxidant mechanism of this fatty acid in a human megakaryocyte cell line. Such an antioxidant mechanism could, together with other effects, be an explanation for the beneficial influence of low consumption of n-3 PUFA in cardiovascular events.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM. We thank Dr. F. Morlé for his helpful technical advice. N. Guillot is a recipient of doctoral fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References

- [1] J. Dyerberg, H.O. Bang, E. Stoffersen, S. Moncada, J.R. Vane, Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?, *Lancet* 2 (1978) 117–119.
- [2] P.M. Kris-Etherton, W.S. Harris, L.J. Appel, Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease, *Circulation* 106 (2002) 2747–2757.
- [3] F.M. Sacks, P.H. Stone, C.M. Gibson, D.I. Silverman, B. Rosner, R.C. Pasternak, Controlled trial of fish oil for regression of human coronary atherosclerosis. HARP Research Group, *J. Am. Coll. Cardiol.* 25 (1995) 1492–1498.
- [4] C.M. Albert, C.H. Hennekens, C.J. O'Donnell, U.A. Ajani, V.J. Carey, W.C. Willett, J.N. Ruskin, J.E. Manson, Fish consumption and risk of sudden cardiac death, *JAMA* 279 (1998) 23–28.
- [5] K. Yagi, Lipid peroxides and human diseases, *Chem. Phys. Lipids* 45 (1987) 337–351.
- [6] J.E. Brown, K.W. Wahle, Effect of fish-oil and vitamin E supplementation on lipid peroxidation and whole-blood aggregation in man, *Clin. Chim. Acta* 193 (1990) 147–156.
- [7] J.P. Allard, R. Kurian, E. Aghdassi, R. Muggli, D. Royall, Lipid peroxidation during n-3 fatty acid and vitamin E supplementation in humans, *Lipids* 32 (1997) 535–541.
- [8] S. Massberg, K. Brand, S. Gruner, S. Page, E. Muller, I. Muller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt, M. Gawaz, A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 887–896.
- [9] E. Vericel, C. Januel, M. Carreras, P. Moulin, M. Lagarde, Diabetic patients without vascular complications display enhanced basal platelet activation and decreased antioxidant status, *Diabetes* 53 (2004) 1046–1051.
- [10] M. Croset, E. Vericel, M. Rigaud, M. Hanss, P. Courpron, M. Dechavanne, M. Lagarde, Functions and tocopherol content of blood platelets from elderly people after low intake of purified eicosapentaenoic acid, *Thromb. Res.* 57 (1990) 1–12.
- [11] E. Vericel, C. Calzada, P. Chapuy, M. Lagarde, The influence of low intake of n-3 fatty acids on platelets in elderly people, *Atherosclerosis* 147 (1999) 187–192.
- [12] E. Vericel, A. Polette, S. Bacot, C. Calzada, M. Lagarde, Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets, *J. Thromb. Haemost.* 1 (2003) 566–572.
- [13] D.B. Jump, Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription, *Curr. Opin. Lipidol.* 13 (2002) 155–164.
- [14] M. Ogura, Y. Morishima, R. Ohno, Y. Kato, N. Hirabayashi, H. Nagura, H. Saito, Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive Philadelphia chromosome, *Blood* 66 (1985) 1384–1392.
- [15] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156–159.
- [16] J. Therasse, F. Lemonnier, Determination of plasma lipoperoxides by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 413 (1987) 237–241.
- [17] D. Boukhchache, M. Lagarde, Interactions between prostaglandin precursors during their oxygenation by human platelets, *Biochim. Biophys. Acta* 713 (1982) 386–392.
- [18] N. Brossard, M. Croset, C. Pachiardi, J.P. Riou, J.L. Tayot, M. Lagarde, Retroconversion and metabolism of [13C]22:6n-3 in humans and rats after intake of a single dose of [13C]22:6n-3-triacylglycerols, *Am. J. Clin. Nutr.* 64 (1996) 577–586.
- [19] D.E. Bowyer, W.M. Leat, A.N. Howard, G.A. Gresham, The determination of the fatty acid composition of serum lipids separated by thin-layer chromatography; and a comparison with column chromatography, *Biochim. Biophys. Acta* 70 (1963) 423–431.
- [20] Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo

- Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* 354 (1999) 447–455.
- [21] J. Dyerberg, H.O. Bang, Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos, *Lancet* 2 (1979) 433–435.
- [22] A.A. Sneddon, H.C. Wu, A. Farquharson, I. Grant, J.R. Arthur, D. Rotondo, S.N. Choe, K.W. Wahle, Regulation of selenoprotein GPx4 expression and activity in human endothelial cells by fatty acids, cytokines and antioxidants, *Atherosclerosis* 171 (2003) 57–65.
- [23] S.A. Kliewer, S.S. Sundseth, S.A. Jones, P.J. Brown, G.B. Wisely, C.S. Koble, P. Devchand, W. Wahli, T.M. Willson, J.M. Lenhard, J.M. Lehmann, Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 4318–4323.
- [24] L. Flohe, Glutathione peroxidase, *Basic Life Sci.* 49 (1988) 663–668.
- [25] R. Brigelius-Flohe, Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 951–965.
- [26] C. Januel, F.Z. El Hentati, M. Carreras, J.R. Arthur, C. Calzada, M. Lagarde, E. Vericel, Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx-4) localization in resting platelets, and compartmental change during platelet activation, *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (2006) 1228–1234.
- [27] S.A. Schonberg, P.K. Rudra, R. Noding, F. Skorpen, K.S. Bjerve, H.E. Krokan, Evidence that changes in Se-glutathione peroxidase levels affect the sensitivity of human tumour cell lines to n-3 fatty acids, *Carcinogenesis* 18 (1997) 1897–1904.
- [28] S. Sharma, O. Dewald, J. Adroque, R.L. Salazar, P. Razeghi, J.D. Crapo, R.P. Bowler, M.L. Entman, H. Taegtmeyer, Induction of antioxidant gene expression in a mouse model of ischemic cardiomyopathy is dependent on reactive oxygen species, *Free Radic. Biol. Med.* 40 (2006) 2223–2231.
- [29] F. Achard, M. Gilbert, C. Benistant, S. Ben Slama, D.L. DeWitt, W.L. Smith, M. Lagarde, Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids reduce PGH synthase 1 expression in bovine aortic endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241 (1997) 513–518.
- [30] D. Sankaran, J. Lu, M.R. Ogborn, H.M. Aukema, COX-2 expression in cystic kidneys is dependent on dietary n-3 fatty acid composition, *J. Nutr. Biochem.* 18 (2007) 806–812.
- [31] S. Fischer, P.C. Weber, Thromboxane A3 (TXA3) is formed in human platelets after dietary eicosapentaenoic acid (C20:5 omega 3), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116 (1983) 1091–1099.
- [32] E.J. Corey, C. Shih, J.R. Cashman, Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 3581–3584.
- [33] M. Croset, Y. Bayon, M. Lagarde, Incorporation and turnover of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in human blood platelets in vitro, *Biochem. J.* 281 (Pt 2) (1992) 309–316.

CONCLUSION

Les données de la littérature concernant les effets bénéfiques des AGPI n-3 sont nombreuses et parfois contradictoires. Les plaquettes sanguines sont particulièrement impliquées à la fois dans la réponse à une lésion de l'endothélium vasculaire mais également dans l'étiologie de nombreuses pathologies cardiovasculaires. La régulation de l'activation (et/ou l'agrégation) des plaquettes est primordiale afin d'éviter toutes complications dangereuses. L'état redox des plaquettes constitue l'un des paramètres participant à cette régulation (Freedman, 2008). Nos travaux précédents ainsi que l'étude DOCOREDOX ont montré que le DHA agit à la fois sur l'état redox et la fonction plaquettaire. La détermination des mécanismes sous jacents ont alors été recherché. L'ensemble des protéines impliquées dans la fonction et l'état redox des plaquettes sont produites par les mégacaryocytes. Nous avons donc dans ce travail recherché les effets de différentes doses de DHA apporté par l'albumine sur un modèle de mégacaryocytes, la lignée MEG-01.

Nos résultats montrent que le DHA augmente l'expression des gènes codants pour deux enzymes antioxydantes majeures impliquées dans le processus de peroxydation lipidique : les glutathion peroxydases 1 et 4 (GPx-1 et 4). Dans une moindre mesure il augmente l'expression du gène de la catalase. Ces résultats sont concordants avec les études de Sneddon *et al.* réalisées avec un autre type cellulaire (Sneddon *et al.*, 2003). En effet ces derniers montrent une augmentation de l'expression du gène de la GPx-4 suite à un traitement par le DHA ; l'utilisation d'acide arachidonique n'induit pas un tel effet. L'augmentation de l'expression des gènes de GPx que nous avons montré pourrait être une réponse cellulaire face aux effets pro-oxydants du DHA. En effet nous observons lors de la plus forte augmentation de l'expression des gènes de GPx une augmentation significative (+51%) du taux de dialdéhyde malonique. Ce dernier est issu principalement de la peroxydation des AGPI comme le DHA. L'augmentation du taux de cet aldéhyde implique l'existence d'un stress oxydant au niveau des lipides. L'augmentation de l'expression des gènes codants des enzymes anti-oxydantes pourraient être le signe d'une réponse face à ce stress oxydant. Enfin, l'interaction du DHA sur un facteur de transcription de type PPAR pourrait être à l'origine de ses effets transcriptionnels (Kliwer *et al.*, 1997). Or notre expérience montre une augmentation significative de l'expression de deux isoformes de PPAR (PPAR γ et β) sous traitement par le DHA.

Le métabolisme de l'acide arachidonique contrôle une partie de l'activation des plaquettes, nous avons donc étudié l'effet du DHA sur les enzymes impliquées dans ce

métabolisme. Nous avons montré dans cette expérience que la PGH synthase 1 et la thromboxane synthase ne sont pas régulées de la même façon par le DHA. En effet nous observons une augmentation significative de l'expression du gène de la thromboxane synthase uniquement. Cependant cette augmentation transcriptionnelle ne s'accompagne pas d'une augmentation de la production de thromboxane B₂. Pour cela nous pouvons émettre plusieurs hypothèses : le DHA peut avoir un effet au niveau de la traduction de la protéine, diminuer l'activité de la thromboxane synthase, ou diminuer l'activité de la PGH synthase (ce qui réduit la biodisponibilité du substrat pour la thromboxane synthase) comme l'a montré Corey *et al.* (Corey *et al.*, 1983). Cependant nous n'observons pas de modification de la production de prostaglandine E₂ ce qui suggérerait une réponse au niveau de la thromboxane synthase. La diminution de la traduction du message de la thromboxane synthase induite par le DHA pourrait engendrer par la cellule une augmentation de l'expression du gène de cette enzyme.

Nous avons analysé la distribution du DHA dans les principales classes de phospholipides. L'incorporation du DHA est significative dès la première concentration d'acide gras utilisée dans les deux classes majoritaires de phospholipides : les phosphatidylcholines et les phosphatidyléthanolamines. L'incorporation de DHA dans les phospholipides membranaires peut être à l'origine de certains effets. Ainsi, les travaux de Akbar *et al.* montrent, que l'accumulation de DHA dans les phospholipides de neurones en culture favorise l'activation de la protéine Akt et accroît la survie cellulaire. Au cours de notre étude, l'incubation des cellules MEG-01 avec la plus forte concentration de DHA induit une augmentation de l'EPA dans les phospholipides membranaires. Cette augmentation d'EPA se fait probablement par un mécanisme de rétroconversion du DHA. L'EPA peut être métabolisé par la PGH synthase et la thromboxane synthase pour former le thromboxane A₃ moins pro-agrégant que le thromboxane A₂ issu de l'acide arachidonique. Nous avons trouvé une diminution de la quantité d'acide arachidonique uniquement dans les phosphatidyléthanolamines après 100 µM de DHA. Par conséquent nous pouvons émettre l'hypothèse d'une action du DHA à travers son incorporation dans les phospholipides des cellules MEG-01 sur les effets observés par un ou des mécanisme(s) qui reste(nt) à déterminer (Akbar *et al.*, 2005).

En résumé, nos travaux ont montré d'une part que le DHA augmente l'expression de protéines antioxydantes impliquées dans la dégradation des hydroperoxydes lipidiques,

d'autre part qu'il amplifie l'expression de facteur de transcription de type PPAR. Parallèlement il induit un stress oxydant modéré et s'incorpore significativement dans les deux classes majoritaires des phospholipides des mégacaryocytes MEG-01. La détermination de la forme active du DHA (estérifiée, non estérifiée ou l'un de ses métabolites) reste à déterminer. Néanmoins ces résultats peuvent fournir un début d'explication du rôle de cet acide gras au niveau des plaquettes sanguines et plus généralement des maladies cardiovasculaires.

DISCUSSION GENERALE

Les plaquettes sanguines sont les éléments essentiels à l'hémostase et plus précisément à l'hémostase primaire. La lésion d'un vaisseau entraîne d'une part une perte de sang et d'autre part l'exposition aux éléments figurés du sang des protéines de la matrice sous endothéliale. Parmi les principales protéines exposées on trouve le collagène (type 1 et 3 principalement). La réponse physiologique à une rupture de l'intégrité d'un endothélium vasculaire consiste notamment en une activation et une agrégation localisée et rapide des plaquettes. Celles-ci vont permettre de colmater la brèche vasculaire, réaction qui peut être suffisante dans les cas de faibles forces de cisaillements. Dans le cas contraire d'autres éléments interviennent dont les facteurs de coagulation. Le contrôle de la fonction plaquettaire est un élément important. En effet une hyperactivité plaquettaire peut provoquer une thrombose qui peut engendrer des complications de type embolie pulmonaire, accident cardiaque et accident vasculaire cérébral. De plus l'hyperactivité plaquettaire est associée à des pathologies comme l'athérosclérose et le diabète (Véricel *et al.*, 2004; Davi & Patrono, 2007). A l'inverse, l'absence d'agrégation des plaquettes peut rallonger le temps de saignement et induire un risque d'hémorragie.

La réponse plaquettaire se fait en trois étapes : adhésion, activation et agrégation. Au cours de cette réponse, un certain nombre de modifications morphologiques et biochimiques se met en place notamment la formation de thromboxane A₂ (TxA₂). Ce prostanoloïde, puissant agent pro-agrégant, est issu du métabolisme de l'acide arachidonique. Le TxA₂ et d'autres facteurs (thrombine, collagène) stimulent l'agrégation des plaquettes. Le contrôle de la formation de TxA₂ est un moyen de moduler la réponse plaquettaire. L'état redox des plaquettes, c'est-à-dire l'équilibre entre des espèces anti-oxydantes (dont le taux de vitamine E) et pro-oxydantes comme les hydroperoxydes d'acides gras et les aldéhydes, contrôle également l'activation et l'agrégation des plaquettes (Loscalzo, 2003). Ainsi au moins deux éléments peuvent influencer la réponse des plaquettes ; l'un est le métabolisme de l'acide arachidonique et l'autre l'état redox. Les AGPI n-3 comme le DHA sont intimement impliqués dans ces deux fonctions.

Les acides gras polyinsaturés n-3 et notamment le DHA sont connus pour leur rôle d'une part contre les maladies cardiovasculaires et d'autre part comme anti-agrégant plaquettaire (Dyerberg & Bang, 1979; von Schacky & Weber, 1985). Cependant des doses importantes de DHA pourraient contrebalancer ses effets bénéfiques. En effet la structure du DHA le rend particulièrement sensible aux attaques des dérivés oxygénés (Wagner *et al.*,

1994). L'accumulation des produits d'oxydations du DHA pourrait à terme être toxique pour les cellules et engendrer des effets inverses à ceux escomptés. La mise en évidence des effets de différentes doses de DHA sur les plaquettes d'homme sain ainsi que la détermination des mécanismes sous jacents a constitué le but de ce travail.

Nous avons mis en évidence les effets, chez l'homme, de l'ingestion de doses croissantes de DHA sur la fonction des plaquettes sanguines ainsi que sur leur état redox. Cette caractérisation a été déterminée au cours de l'étude DOCOREDOR. Le protocole de notre étude consistait en une ingestion de doses croissantes (200 mg puis 400, 800 et 1600 mg) de DHA/j pendant 14 jours par des hommes indemnes de toutes affections cardiovasculaires. Avant et à chaque changement de doses et en moyenne 8 semaines après la fin du dernier traitement, le sang était prélevé et les plaquettes analysées. DOCOREDOR est une étude longitudinale où chaque sujet est son propre témoin. Différents protocoles expérimentaux ont été mis en œuvre pour l'analyse des plaquettes. L'étude s'est déroulée en 3 séries de recrutement et d'analyse (3 fois 4 sujets, avec 2 sujets par semaine) de manière à assurer une démarche de qualité et de validation des mesures. Afin que les témoins recrutés puissent conserver une alimentation stable pendant toute la durée de l'étude, toutes les périodes de mesure ont été planifiées en dehors de périodes festives.

La grande majorité des protéines impliquées dans la structure et la fonction plaquettaire est synthétisée au niveau des mégacaryocytes. Ces cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse produisent des plaquettes fonctionnelles. Le but de ce travail a été de déterminer si le DHA peut modifier l'expression de protéines plaquettaires au niveau des mégacaryocytes. Les mégacaryocytes de la lignée MEG-01 étaient incubés avec 10 et 100 μM de DHA pendant 6 heures et 48 heures. Nos résultats présentés ne concernent que les effets transcriptionnels directs du DHA (6 heures de traitement) car nous avons constaté qu'un traitement plus long sur ces cellules n'apporte pas de modifications transcriptionnelles supplémentaires. L'utilisation des mégacaryocytes de la lignée MEG-01 offre une alternative à l'utilisation de mégacaryocytes humains en culture primaire. En effet cette lignée d'origine humaine, exprime l'ensemble des marqueurs spécifiques des mégacaryocytes et présente l'avantage d'être mis en culture sans facteurs de croissance. Néanmoins afin de valider nos résultats, nous avons tenté d'isoler des mégacaryocytes à partir de moelle osseuse de rat soumis à un régime riche en DHA. Cependant pour des raisons techniques,

vraisemblablement de conservation de moelle et de mise en culture des cellules, cette démarche n'a pas abouti.

Le DHA modifie la composition en acide gras des phospholipides plaquettaires et des cellules MEG-01.

La membrane plasmique est un système fluide et asymétrique caractérisé par la qualité et la quantité des acides gras qui le composent (Stillwell & Wassall, 2003). Les caractéristiques de la membrane peuvent avoir des conséquences sur la fonction des cellules en particulier sur les plaquettes et les mégacaryocytes. En effet, parmi les aspects fondamentaux lors de la réponse plaquettaire, on peut noter le changement de forme et l'exposition d'une surface pro-coagulante par flip-flop des phosphatidylsérines. Le changement de forme intervient au niveau des mégacaryocytes lors de la formation des proplaquettes. Au cours de l'étude DOCOREDOX, nous avons mesuré une incorporation significative de DHA, dès la plus faible dose d'AG ingérée, à la fois dans les PC et les PE des membranes plaquettaires. Nous avons également observé au niveau des mégacaryocytes, une incorporation significative de DHA dans les deux principales classes de phospholipides (PC et PE). Cette présence de DHA suggère l'hypothèse d'une plus grande fluidité des membranes. De plus, des phosphatidylcholines (PC) membranaires enrichies en DHA auraient une capacité plus importante à faire des flips-flops par rapport à des PC enrichies en acide arachidonique. Enfin, le DHA augmenterait la perméabilité cellulaire (Stillwell & Wassall, 2003). Ainsi un effet structural spécifique du DHA pourrait modifier des mécanismes membranaires.

La membrane plasmique est également constituée d'un certain nombre de protéines essentiellement des récepteurs. Comme nous l'avons mentionné, les plaquettes et les mégacaryocytes expriment une grande variété de récepteurs couplés aux protéines G ou de type intégrines. L'activité de ces récepteurs et celle des cascades de signalisation sous-jacentes pourraient être influencées par le DHA membranaire. Nous savons que le DHA inhibe la liaison du thromboxane A₂ sur son récepteur (Swann *et al.*, 1990). La diminution de l'agrégation plaquettaire observée au cours de l'étude DOCOREDOX pourrait avoir pour origine une action du DHA sur ce type de récepteur. Au moins trois niveaux de mécanismes peuvent intervenir : une altération de la liaison ligand récepteur, une modification de

l'expression du récepteur ou un bouleversement dans la cascade de signalisation. L'implication de ces effets au niveau des plaquettes pourrait contribuer à la mise en évidence du rôle du DHA dans la fonction plaquettaire. L'incorporation de DHA dans les membranes peut s'accompagner d'une diminution de la quantité de cholestérol présent dans les microdomaines lipidiques membranaires (ou raft). Cette diminution s'accompagne de la perte de protéines associées aux rafts notamment les kinases de la famille Src (Fyn et c-Yes) et d'une altération de l'interaction de la protéine Erk 1/2 avec la membrane plasmique (Jump *et al.*, 2008). Enfin certains travaux montrent que la capacité de translocation des protéines kinases C de type nouvelle et atypique est facilitée par la présence de DHA dans les phosphatidylcholines. Par contre un enrichissement en DHA dans les phosphatidylsérines aurait tendance à inhiber cette translocation (Das, 2006).

L'incorporation du DHA dans les membranes plaquettaires s'accompagne d'une diminution du pourcentage molaire d'acide arachidonique dans les phosphatidylcholines seulement après la plus forte dose de DHA ingérée. Parallèlement à cette diminution, nous observons une augmentation du pourcentage molaire d'EPA dans les phosphatidyléthanolamines. Ceci suggère une rétroconversion du DHA en EPA car les gélules ingérées ne contiennent pas d'EPA ni d'autres acides gras n-3 autres que le DHA. L'augmentation du taux d'EPA pourrait contribuer aux effets anti-agrégants du DHA puisque l'EPA en raison de son homologie structurale avec l'acide arachidonique peut être substrat de la PGH synthase et donner lieu à la formation de TxA_3 , celui-ci ayant une très faible action pro-agrégante.

Enfin l'analyse, au cours de l'étude DOCOREDOR, de l'incorporation du DHA dans les différentes classes de phospholipides nous apporte des informations supplémentaires. Nous avons constaté une accumulation régulière (coefficient de détermination, $R^2=0,97$ dans les PE et 0,96 pour les PC) de cet acide gras dans les phospholipides des plaquettes chez l'ensemble des personnes recrutées. Ceci confirme que les recommandations de cette étude en particulier la non modification du régime alimentaire ont été suivies par ces témoins durant toute la longue période de test (2 mois).

Le DHA à très faibles doses est un « anti-oxydant » plaquettaire

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'équilibre entre les taux d'espèces pro-oxydantes et anti-oxydantes contribue au contrôle de l'activité plaquettaire. Toute accumulation d'espèces pro-oxydantes concourt à un état pro-agrégant par exemple via la séquestration du NO anti-agrégant majeur (Loscalzo, 2003). L'étude DOCOREDOX montre que de faibles doses de DHA ont des effets anti-oxydants. En effet, une faible mais significative augmentation du taux de vitamine E est observée après 200 mg de DHA/j/14j. L'origine de cette augmentation peut être multiple : le DHA peut faciliter l'absorption intestinale de la vitamine E et/ou empêcher sa dégradation au niveau des plaquettes. La première hypothèse suggérerait une augmentation du taux plasmatique de vitamine E (les données obtenues par le Dr Calzada montrent une augmentation du taux de vitamine E dans les lipoprotéines de basse densité, LDL, au moins jusqu'à 800 mgDHA/j/14j) et la seconde une diminution de la formation d'espèces pro-oxydantes intra-plaquettaires. Enfin il est envisageable que les plaquettes contiennent davantage d'espèces anti-oxydantes ce qui épargnerait la dégradation de la vitamine E. Cette hypothèse pourrait s'étayer sur l'effet transcriptionnel du DHA sur l'expression des gènes des glutathion peroxydases 1 et 4 observée au niveau des cellules MEG-01. Cependant les mesures des activités des GPx 1 et 4 tant sur les plaquettes que sur les cellules MEG-01 n'indiquent aucune variation significative quelle que soit les concentrations de DHA utilisées. Ainsi les causes de l'augmentation du taux de vitamine E plaquettaire après 200 mg de DHA/j/14j restent complexes. Par ailleurs, les plus fortes doses de DHA utilisées dans l'étude DOCOREDOX (400, 800 et 1600 mg DHA/j/14j) n'entraînent dans les plaquettes ni d'effets pro-oxydants ni d'effets anti-oxydants détectables. Plus précisément, les principales mesures de l'état redox des plaquettes (taux de vitamine E, de MDA) n'indiquent aucune variation due à l'ingestion d'au moins 400 mg DHA/j/14j ; nous pouvons seulement noter une augmentation du taux d'isoprostane urinaire après 1600 mg DHA/j/14j. Ainsi, la fonction du DHA dans la régulation de l'état redox des plaquettes et des mégacaryocytes reste complexe et liée vraisemblablement à plusieurs paramètres dont sa concentration et sa forme active.

Nous pouvons émettre l'hypothèse d'une dichotomie entre les effets anti- ou pro-oxydant du DHA et son action sur la fonction plaquettaire. Une étude plus précise notamment sur les produits de peroxydation spécifique du DHA comme les neuroprostanes et neurofuranes et la mesure du rapport glutathion réduit et oxydé pourrait étayer l'implication de cet acide gras dans la régulation de l'état redox (Song *et al.*, 2008). Bien que le rôle du

DHA dans la gestion de l'état redox plaquettaire reste complexe, l'état redox est un élément majeur dans la régulation de la fonction plaquettaire (Bakdash & Williams, 2008; Schildknecht *et al.*, 2008).

De faibles doses de DHA diminuent l'agrégation plaquettaire

La fonction des plaquettes est de colmater les lésions vasculaires. Cette fonction est dépendante de trois processus : l'adhésion, l'activation et l'agrégation. Notre étude montre que l'ingestion de faibles doses de DHA (400 mg – 1600 mg) pendant deux semaines permet une diminution significative de la réponse plaquettaire à différents agonistes de l'agrégation (collagène, thrombine et acide arachidonique). Il se produit parallèlement une diminution de la production basale de thromboxane B₂, analogue stable du TxA₂, et une diminution de l'activité enzymatique de la PGH synthase, de la thromboxane synthase et de la 12-lipoxygénase. Ainsi des doses comprises entre 400 et 1600 mg de DHA/j/14 j induisent chez l'homme sain âgé de 55 à 65 ans une diminution de l'activité plaquettaire.

Les plaquettes ont une durée de vie de l'ordre de 10 jours. La probabilité d'analyser des plaquettes ayant reçues deux doses de DHA est donc faible. Cependant nous ne pouvons pas exclure une mise en réserve par le tissu adipeux du DHA ingéré : celui-ci pourrait libérer progressivement dans le sang le DHA incorporé. Par conséquent une sous-estimation de la dose de DHA biologiquement active au niveau des plaquettes n'est pas à exclure. L'activation et l'agrégation des plaquettes impliquent comme nous l'avons vu plusieurs mécanismes comme le métabolisme de l'acide arachidonique mais également les changements morphologiques et l'activation du récepteur α IIb β 3. L'exposition à la surface des membranes de protéines spécifiques constitue l'un des moyens de déterminer l'état d'activation des plaquettes. La détection par cytométrie en flux de l'exposition à la surface des plaquettes de l'intégrine α IIb β 3 activée a été entreprise au cours de l'étude DOCOREDOR. L'analyse des plaquettes par cytométrie en flux offre plusieurs avantages. En effet le premier est de permettre dans notre cas une analyse pertinente des plaquettes c'est-à-dire en sang total et en évitant une procédure d'isolement des plaquettes potentiellement activatrice (notamment au cours des différentes centrifugations). D'autre part cela permet d'obtenir simultanément des informations concernant l'expression de protéines membranaires, la taille et la granulosité des cellules. Enfin, ce protocole complète l'étude de l'agrégation des plaquettes car la détection de l'intégrine α IIb β 3 activé nous renseigne sur le degré d'activation des plaquettes. Ainsi nous

caractérisons les deux derniers états des plaquettes : activation et agrégation. Cependant en raison de la mise au point technique de l'appareil (le seuil de détection des plaquettes correspond au seuil minimal de l'appareil) les mesures n'ont pas pu être appliquées à l'ensemble des témoins.

Les acides gras à longue chaîne sont impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions comme la régulation de l'acylation et l'adressage des protéines, l'activité enzymatique et de l'expression génique. De plus ils ont un rôle énergétique important et un haut pouvoir calorique. Nous avons observé une diminution de l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique tant au niveau des plaquettes qu'au niveau des mégacaryocytes MEG-01. Ceci est en accord avec les résultats de Corey *et al.* qui indiquent que le DHA est un inhibiteur compétitif de la PGH synthase (Corey *et al.*, 1983). Ce mécanisme d'action pourrait expliquer en partie l'effet anti-agrégant du DHA observé au niveau des plaquettes. Néanmoins les effets du DHA sont complexes étant donné son rôle dans l'augmentation de l'expression du gène de la thromboxane synthase que nous avons observé dans les mégacaryocytes MEG-01. Cette augmentation suggérerait une capacité plus grande à former du TxA₂. Le gène codant cette enzyme contient des éléments de réponse aux facteurs de transcription p45-NFE2 et NRF2. Récemment Gao *et al.* ont démontré que les produits d'oxydation de l'EPA et du DHA sont capable d'activer le facteur de transcription NRF2 (Gao *et al.*, 2007). Par ailleurs, le facteur de transcription NRF2 semble impliqué dans l'expression de gènes codant des protéines anti-oxydantes (Kwak *et al.*, 2003). Une étude plus précise sur le lien DHA-NRF2 au niveau des mégacaryocytes pourrait préciser les mécanismes d'action de cet acide gras.

Le DHA augmente l'expression des gènes codants pour PPAR β et γ au niveau des mégacaryocytes MEG-01.

Les acides gras non estérifiés ou sous leur forme acyl-CoA semblent être les principaux métabolites intracellulaires responsables de l'effet transcriptionnel des acides gras. L'effet des acides gras peut être soit directe en interagissant directement avec les récepteurs nucléaires de type PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), LXR (Liver X Receptor) et HNF4 α (Hepatic Nuclear Factor 4), soit indirecte via des changements dans l'abondance de facteur de transcription régulateur de gènes (par exemple SREBP, Sterol Regulatory Element Binding Protein) (Das, 2006; Jump *et al.*, 2008). Nous avons montré que

le DHA augmente l'expression de deux isoformes de PPAR (β et γ) dans les mégacaryocytes MEG-01. Or il apparaît que ces PPAR sont d'une part des facteurs de transcription activés par des acides gras comme le DHA mais également des éléments impliqués dans le contrôle de la fonction plaquettaire. En effet, les données de la littérature indiquent que PPAR β et γ sont impliqués dans l'inhibition de l'agrégation des plaquettes. Plus précisément, un agoniste de PPAR β , le GW0742, inhibe l'agrégation plaquettaire en diminuant la libération de calcium mobilisée par l'ADP, le collagène et la thrombine. PPAR β est également impliqué dans l'effet anti-agrégant de la prostacycline et agit en synergie avec le NO (Ali *et al.*, 2005).

La rosiglitazone, agoniste de PPAR γ , diminue l'agrégation des plaquettes de diabétiques de type 2 en réponse à l'ADP et également celle de personnes atteintes de pathologies cardiovasculaires non diabétiques (Sidhu *et al.*, 2004; Khanolkar *et al.*, 2008). De plus, les plaquettes incubées avec un agoniste de PPAR γ ou l'un de ses ligands comme la 15d- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ inhibe la libération de CD40 ligand (marqueur de l'activation des plaquettes) et de TxA₂ induite par la thrombine ou l'ADP (Akbiyik *et al.*, 2004). Ceci pourrait donc contribuer aux effets anti-agrégants observés du DHA. L'expression du récepteur au TxA₂ est inhibée par le complexe PPAR γ -RXR (retinoid X receptor) (Coyle *et al.*, 2005). Cet hétérodimère, dont l'existence a été démontrée dans les plaquettes, pourrait être un moyen d'action du DHA. En effet le DHA est un ligand de PPAR γ et de RXR (De Urquiza *et al.*, 2000; Ray *et al.*, 2008). De plus il a été démontré que les ligands de RXR inhibent l'agrégation des plaquettes en réponse à l'ADP et à l'analogue stable du TxA₂. RXR, en se liant spécifiquement à la sous unité G α q des RCPG, inhibe l'augmentation de calcium intracellulaire (Moraes *et al.*, 2007).

Les facteurs de transcription PPAR β et γ et RXR présentent d'après les données de la littérature une action anti-agrégante au niveau des plaquettes. Ceci pourrait donc contribuer aux effets anti-agrégants du DHA que nous avons mesuré au cours de l'étude DOCOREDOR. Une étude plus précise de ces facteurs de transcription à la fois sur les mégacaryocytes et les plaquettes permettrait de mieux définir leurs mécanismes d'action et la place du DHA.

En conclusion, nos résultats montrent clairement que des doses (400 à 1600 mg/j/14j) (faibles par rapport aux données de la littérature) de DHA induisent chez l'homme sain de plus de 50 ans, une diminution de la réactivité des plaquettes. La plus faible dose utilisée dans cette étude (200 mg/j/14j) provoque une augmentation significative du taux de vitamine E plaquettaire esquissant ainsi un effet « anti-oxydant » de cet acide gras confirmé au niveau

transcriptionnel sur les mégacaryocytes. Les données de la littérature et nos résultats montrent que les effets du DHA, acide gras polyinsaturé n-3, sont multiples et complexes et les mécanismes d'action sous jacents sont vraisemblablement liée aux doses et à la forme active du DHA.

PERSPECTIVES

Les principaux éléments de ce travail montrent que l'ingestion de doses de 400 à 1600 mg de DHA/j/14j diminue l'agrégation plaquettaire chez l'homme sain. Par ailleurs le DHA modifie l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'état redox et le métabolisme de l'acide arachidonique au niveau des cellules précurseurs des plaquettes. Nous avons soulignés précédemment quelques points à étudier en outre ces résultats amènent un certain nombre d'interrogations qui pourront faire l'objet d'investigations supplémentaires :

L'hyperactivité plaquettaire est associée à des événements pathologiques de type diabète et athérosclérose. Le DHA pourrait-il induire une diminution de cette hyperactivité dans ces situations ?

Les mégacaryocytes sont à l'origine de plaquettes directement fonctionnelles. Le DHA peut-il influencer de manière profonde la mégacaryocytopoïèse et la thrombopoïèse ? L'expression de protéines clés de la fonction plaquettaire serait elle modifiée par le DHA ?

L'état redox est un élément important dans la fonction plaquettaire. Nos résultats *ex vivo* montre l'importance de la dose de DHA utilisée. Seule la plus faible dose (200 mg/j/14j) de DHA a un rôle « anti-oxydant » mais des doses plus importantes (1600 mg) n'induisent pas de stress oxydant significatif. Les résultats au niveau des mégacaryocytes indiquent une modification de l'expression de protéines impliquées dans la régulation de l'état redox. La relation stress oxydant DHA au niveau des plaquettes serait-elle impliquée dans les effets de l'acide gras sur la fonction plaquettaire ? Quels est la forme active du DHA : estérifiée, l'un des ces métabolites ?

Enfin des effets non géniques et anti-agrégant de facteurs de transcription de type PPAR ont été décrits au niveau des plaquettes. D'un autre côté nous avons observé que le DHA augmente au niveau des mégacaryocytes l'expression de ces facteurs. Un travail plus précis au niveau des plaquettes sur le lien DHA/facteur de transcription serait un point important dans la compréhension des effets observés au cours des différentes études épidémiologiques portant sur la relation des acides gras n-3 et la fonction plaquettaire construites depuis les travaux de Dyerberg *et al.* (Dyerberg & Bang, 1979).

BIBLIOGRAPHIE

- Achard, F., Gilbert, M., Benistant, C., Ben Slama, S., DeWitt, D.L., Smith, W.L. & Lagarde, M. (1997) Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids reduce PGH synthase 1 expression in bovine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **241**, 513-518.
- Akbar, M., Calderon, F., Wen, Z. & Kim, H.Y. (2005) Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10858-10863.
- Akbiyik, F., Ray, D.M., Gettings, K.F., Blumberg, N., Francis, C.W. & Phipps, R.P. (2004) Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPAR $\{\gamma\}$, and PPAR $\{\gamma\}$ agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. *Blood*, **104**, 1361-1368.
- Akiba, S., Nagatomo, R., Hayama, M. & Sato, T. (1997) Lipid peroxide overcomes the inability of platelet secretory phospholipase A2 to hydrolyze membrane phospholipids in rabbit platelets. *J Biochem*, **122**, 859-864.
- Albert, C.M., Hennekens, C.H., O'Donnell, C.J., Ajani, U.A., Carey, V.J., Willett, W.C., Ruskin, J.N. & Manson, J.E. (1998) Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *Jama*, **279**, 23-28.
- Ali, F.Y., Davidson, S.J., Moraes, L.A., Traves, S.L., Paul-Clark, M., Bishop-Bailey, D., Warner, T.D. & Mitchell, J.A. (2005) Role of nuclear receptor signaling in platelets: antithrombotic effects of PPAR β . *Faseb J*, **20**, 326-328.
- Allard, J.P., Kurian, R., Aghdassi, E., Muggli, R. & Royall, D. (1997) Lipid peroxidation during n-3 fatty acid and vitamin E supplementation in humans. *Lipids*, **32**, 535-541.
- Andre, P., Delaney, S.M., LaRocca, T., Vincent, D., DeGuzman, F., Jurek, M., Koller, B., Phillips, D.R. & Conley, P.B. (2003) P2Y₁₂ regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest*, **112**, 398-406.
- Anthonsen, M.W., Solhaug, A. & Johansen, B. (2001) Functional coupling between secretory and cytosolic phospholipase A2 modulates tumor necrosis factor- α - and interleukin-1 β -induced NF- κ B activation. *J Biol Chem*, **276**, 30527-30536.
- Arakawa, T., Nakamura, M., Yoshimoto, T. & Yamamoto, S. (1995) The transcriptional regulation of human arachidonate 12-lipoxygenase gene by NF κ B/Rel. *FEBS Lett*, **363**, 105-110.
- Arthur, J.F., Gardiner, E.E., Kenny, D., Andrews, R.K. & Berndt, M.C. (2008) Platelet receptor redox regulation. *Platelets*, **19**, 1-8.
- Ascenzi, P., Marino, M. & Menegatti, E. (2006) CO₂ impairs peroxynitrite-mediated inhibition of human caspase-3. *Biochem Biophys Res Commun*, **349**, 367-371.

- Athanasiou, M., Mavrothalassitis, G., Sun-Hoffman, L. & Blair, D.G. (2000) FLI-1 is a suppressor of erythroid differentiation in human hematopoietic cells. *Leukemia*, **14**, 439-445.
- Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D.K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T.E., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Witte, L., Hicklin, D.J., Bohlen, P., Eaton, D., Lyden, D., de Sauvage, F. & Rafii, S. (2004) Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*, **10**, 64-71.
- Baccini, V., Roy, L., Vitrat, N., Chagraoui, H., Sabri, S., Le Couedic, J.P., Debili, N., Wendling, F. & Vainchenker, W. (2001) Role of p21(Cip1/Waf1) in cell-cycle exit of endomitotic megakaryocytes. *Blood*, **98**, 3274-3282.
- Baer, A.N., Costello, P.B. & Green, F.A. (1991) Stereospecificity of the hydroxyeicosatetraenoic and hydroxyoctadecadienoic acids produced by cultured bovine endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, **1085**, 45-52.
- Bakdash, N. & Williams, M.S. (2008) Spatially distinct production of reactive oxygen species regulates platelet activation. *Free Radic Biol Med*, **45**, 158-166.
- Bang, H.O. & Dyerberg, J. (1980) The bleeding tendency in Greenland Eskimos. *Dan Med Bull*, **27**, 202-205.
- Barcelo-Coblijn, G., Hogyes, E., Kitajka, K., Puskas, L.G., Zvara, A., Hackler, L., Jr., Nyakas, C., Penke, Z. & Farkas, T. (2003) Modification by docosahexaenoic acid of age-induced alterations in gene expression and molecular composition of rat brain phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 11321-11326.
- Begonja, A.J., Gambaryan, S., Geiger, J., Aktas, B., Pozgajova, M., Nieswandt, B. & Walter, U. (2005) Platelet NAD(P)H-oxidase-generated ROS production regulates alphaIIb beta3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway. *Blood*, **106**, 2757-2760.
- Bennett, J.S. (2005) Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3. *J Clin Invest*, **115**, 3363-3369.
- Bhattacharyya, D.K., Lecomte, M., Dunn, J., Morgans, D.J. & Smith, W.L. (1995) Selective inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (cyclooxygenase-1) by valerylsalicylic acid. *Arch Biochem Biophys*, **317**, 19-24.
- Blache, D. (1992) Structure and function of blood platelets. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*, **100**, A17-24.
- Blankenberg, S., Rupprecht, H.J., Bickel, C., Torzewski, M., Hafner, G., Tiret, L., Smieja, M., Cambien, F., Meyer, J. & Lackner, K.J. (2003) Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*, **349**, 1605-1613.

- Born, G.V. (1962) Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, **194**, 927-929.
- Bouchard, B.A. & Tracy, P.B. (2001) Platelets, leukocytes, and coagulation. *Curr Opin Hematol*, **8**, 263-269.
- Bouilloux, F., Juban, G., Cohet, N., Buet, D., Guyot, B., Vainchenker, W., Louache, F. & Morle, F. (2008) EKLF restricts megakaryocytic differentiation at the benefit of erythrocytic differentiation. *Blood*, **112**, 576-584.
- Bressler, N.M., Broekman, M.J. & Marcus, A.J. (1979) Concurrent studies of oxygen consumption and aggregation in stimulated human platelets. *Blood*, **53**, 167-178.
- Briddell, R.A., Brandt, J.E., Straneva, J.E., Srour, E.F. & Hoffman, R. (1989) Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood*, **74**, 145-151.
- Brigelius-Flohe, R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*, **27**, 951-965.
- Bryder, D., Rossi, D.J. & Weissman, I.L. (2006) Hematopoietic Stem Cells: The Paradigmatic Tissue-Specific Stem Cell. *Am J Pathol*, **169**, 338-346.
- Burch, J.W. & Burch, P.T. (1990) Glutathione disulfide production during arachidonic acid oxygenation in human platelets. *Prostaglandins*, **39**, 123-134.
- Burr, M.L., Fehily, A.M., Gilbert, J.F., Rogers, S., Holliday, R.M., Sweetnam, P.M., Elwood, P.C. & Deadman, N.M. (1989) Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet*, **2**, 757-761.
- Calder, P.C. (2004) n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond)*, **107**, 1-11.
- Calderon, F. & Kim, H.Y. (2004) Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J Neurochem*, **90**, 979-988.
- Calzada, C., Vericel, E. & Lagarde, M. (1991) Decrease in platelet reduced glutathione increases lipoxygenase activity and decreases vitamin E. *Lipids*, **26**, 696-699.
- Calzada, C., Vericel, E. & Lagarde, M. (1997) Low concentrations of lipid hydroperoxides prime human platelet aggregation specifically via cyclo-oxygenase activation. *Biochem J*, **325 (Pt 2)**, 495-500.
- Cane, A., Breton, M., Koumanov, K., Bereziat, G. & Colard, O. (1998) Oxidant-induced arachidonic acid release and impairment of fatty acid acylation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, **274**, C1040-1046.
- Capdevila, J.H., Morrow, J.D., Belosludtsev, Y.Y., Beauchamp, D.R., DuBois, R.N. & Falck, J.R. (1995) The catalytic outcomes of the constitutive and the mitogen inducible

- isoforms of prostaglandin H2 synthase are markedly affected by glutathione and glutathione peroxidase(s). *Biochemistry*, **34**, 3325-3337.
- Chan, A.C., Tran, K., Raynor, T., Ganz, P.R. & Chow, C.K. (1991) Regeneration of vitamin E in human platelets. *J Biol Chem*, **266**, 17290-17295.
- Chan, A.C., Wagner, M., Kennedy, C., Chen, E., Lanuville, O., Mezl, V.A., Tran, K. & Choy, P.C. (1998) Vitamin E up-regulates arachidonic acid release and phospholipase A2 in megakaryocytes. *Mol Cell Biochem*, **189**, 153-159.
- Cheng, Y., Austin, S.C., Rocca, B., Koller, B.H., Coffman, T.M., Grosser, T., Lawson, J.A. & FitzGerald, G.A. (2002) Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science*, **296**, 539-541.
- Choi, E.S., Nichol, J.L., Hokom, M.M., Hornkohl, A.C. & Hunt, P. (1995) Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood*, **85**, 402-413.
- Choi, K. (1998) Hemangioblast development and regulation. *Biochem Cell Biol*, **76**, 947-956.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Cifuni, S.M., Wagner, D.D. & Bergmeier, W. (2008) CalDAG-GEFI and protein kinase C (PKC) represent alternative pathways leading to activation of integrin alpha IIb beta 3 in platelets. *Blood*, **112**, 1696-1703.
- Clapham, D.E. & Neer, E.J. (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **37**, 167-203.
- Clemetson, K.J. & Clemetson, J.M. (2001) Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost*, **86**, 189-197.
- Clutton, P., Miermont, A. & Freedman, J.E. (2004) Regulation of endogenous reactive oxygen species in platelets can reverse aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 187-192.
- Conquer, J.A. & Holub, B.J. (1997) Dietary docosahexaenoic acid as a source of eicosapentaenoic acid in vegetarians and omnivores. *Lipids*, **32**, 341-345.
- Corey, E.J., Shih, C. & Cashman, J.R. (1983) Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 3581-3584.
- Coughlin, S.R. (2005) Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*, **3**, 1800-1814.
- Coyle, A.T., O'Keeffe, M.B. & Kinsella, B.T. (2005) 15-Deoxy delta 12,14-prostaglandin J2 suppresses transcription by promoter 3 of the human thromboxane A2 receptor gene

- through peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human erythroleukemia cells. *FEBS Journal*, **272**, 4754-4773.
- Cramer, E.M., Norol, F., Guichard, J., Breton-Gorius, J., Vainchenker, W., Masse, J.M. & Debili, N. (1997) Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood*, **89**, 2336-2346.
- Crittenden, J.R., Bergmeier, W., Zhang, Y., Piffath, C.L., Liang, Y., Wagner, D.D., Housman, D.E. & Graybiel, A.M. (2004) CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nat Med*, **10**, 982-986.
- Croset, M. & Lagarde, M. (1983) Stereospecific inhibition of PGH₂-induced platelet aggregation by lipoxygenase products of icosanoic acids. *Biochem Biophys Res Commun*, **112**, 878-883.
- Croset, M., Vericel, E., Rigaud, M., Hanss, M., Courpron, P., Dechavanne, M. & Lagarde, M. (1990) Functions and tocopherol content of blood platelets from elderly people after low intake of purified eicosapentaenoic acid. *Thromb Res*, **57**, 1-12.
- Das, U.N. (2006) Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol J*, **1**, 420-439.
- Davi, G. & Patrono, C. (2007) Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*, **357**, 2482-2494.
- Daviglus, M.L., Stamler, J., Orenca, A.J., Dyer, A.R., Liu, K., Greenland, P., Walsh, M.K., Morris, D. & Shekelle, R.B. (1997) Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *N Engl J Med*, **336**, 1046-1053.
- De Botton, S., Sabri, S., Daugas, E., Zermati, Y., Guidotti, J.E., Hermine, O., Kroemer, G., Vainchenker, W. & Debili, N. (2002) Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*, **100**, 1310-1317.
- De Caterina, R., Cybulsky, M.I., Clinton, S.K., Gimbrone, M.A., Jr. & Libby, P. (1994) The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb*, **14**, 1829-1836.
- De Urquiza, A.M., Liu, S., Sjoberg, M., Zetterstrom, R.H., Griffiths, W., Sjovall, J. & Perlmann, T. (2000) Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science*, **290**, 2140-2144.
- Debili, N., Coulombel, L., Croisille, L., Katz, A., Guichard, J., Breton-Gorius, J. & Vainchenker, W. (1996) Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood*, **88**, 1284-1296.
- Debili, N., Issaad, C., Masse, J.M., Guichard, J., Katz, A., Breton-Gorius, J. & Vainchenker, W. (1992) Expression of CD34 and platelet glycoproteins during human megakaryocytic differentiation. *Blood*, **80**, 3022-3035.

- Delton-Vandenbroucke, I., Vericel, E., Januel, C., Carreras, M., Lecomte, M. & Lagarde, M. (2001) Dual regulation of glutathione peroxidase by docosahexaenoic acid in endothelial cells depending on concentration and vascular bed origin. *Free Radic Biol Med*, **30**, 895-904.
- Deutsch, V.R. & Tomer, A. (2006) Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol*, **134**, 453-466.
- Deveaux, S., Cohen-Kaminsky, S., Shivdasani, R.A., Andrews, N.C., Filipe, A., Kuzniak, I., Orkin, S.H., Romeo, P.H. & Mignotte, V. (1997) p45 NF-E2 regulates expression of thromboxane synthase in megakaryocytes. *Embo J*, **16**, 5654-5661.
- Diczfalusy, U., Falardeau, P. & Hammarstrom, S. (1977) Conversion of prostaglandin endoperoxides to C17-hydroxy acids catalyzed by human platelet thromboxane synthase. *FEBS Lett*, **84**, 271-274.
- Drachman, J.G., Millett, K.M. & Kaushansky, K. (1999) Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *J Biol Chem*, **274**, 13480-13484.
- Drachman, J.G., Sabath, D.F., Fox, N.E. & Kaushansky, K. (1997) Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes. *Blood*, **89**, 483-492.
- Dyerberg, J. & Bang, H.O. (1979) Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet*, **2**, 433-435.
- Dyerberg, J., Bang, H.O., Stoffersen, E., Moncada, S. & Vane, J.R. (1978) Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet*, **2**, 117-119.
- Fabre, J.E., Nguyen, M., Latour, A., Keifer, J.A., Audoly, L.P., Coffman, T.M. & Koller, B.H. (1999) Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat Med*, **5**, 1199-1202.
- Falet, H., Hoffmeister, K.M., Neujahr, R., Italiano, J.E.J., Stossel, T.P., Southwick, F.S. & Hartwig, J.H. (2002) Importance of free actin filament barbed ends for Arp2/3 complex function in platelets and fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16782-16787.
- Faraci, F.M. & Didion, S.P. (2004) Vascular Protection: Superoxide Dismutase Isoforms in the Vessel Wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 1367-1373.
- Flaumenhaft, R. (2003) Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 1152-1160.
- Freedman, J.E. (2008) Oxidative stress and platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **28**, s11-16.
- Freedman, J.E., Frei, B., Welch, G.N. & Loscalzo, J. (1995) Glutathione peroxidase potentiates the inhibition of platelet function by S-nitrosothiols. *J Clin Invest*, **96**, 394-400.

- Freedman, J.E. & Keane, J.F., Jr. (2001) Vitamin E inhibition of platelet aggregation is independent of antioxidant activity. *J Nutr*, **131**, 374S-377S.
- Freedman, J.E. & Loscalzo, J. (2003) Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders. *J Thromb Haemost*, **1**, 1183-1188.
- Fukuhara, S., Chikumi, H. & Gutkind, J.S. (2001) RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene*, **20**, 1661-1668.
- Funk, C.D., Funk, L.B., Kennedy, M.E., Pong, A.S. & Fitzgerald, G.A. (1991) Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *Faseb J*, **5**, 2304-2312.
- Gachet, C. (2006) Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **46**, 277-300.
- Gaines, P., Geiger, J.N., Knudsen, G., Seshasayee, D. & Wojchowski, D.M. (2000) GATA-1- and FOG-dependent activation of megakaryocytic alpha IIB gene expression. *J Biol Chem*, **275**, 34114-34121.
- Gao, L., Wang, J., Sekhar, K.R., Yin, H., Yared, N.F., Schneider, S.N., Sasi, S., Dalton, T.P., Anderson, M.E., Chan, J.Y., Morrow, J.D. & Freeman, M.L. (2007) Novel n-3 Fatty Acid Oxidation Products Activate Nrf2 by Destabilizing the Association between Keap1 and Cullin3. *J Biol Chem*, **282**, 2529-2537.
- Geddis, A.E., Fox, N.E. & Kaushansky, K. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase is necessary but not sufficient for thrombopoietin-induced proliferation in engineered Mpl-bearing cell lines as well as in primary megakaryocytic progenitors. *J Biol Chem*, **276**, 34473-34479.
- Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J.E., Bhattacharya, S., Rideout, W.M., Bronson, R.T., Gardner, H. & Sicinski, P. (2003) Cyclin E ablation in the mouse. *Cell*, **114**, 431-443.
- George, J.N. (2000) Platelets. *Lancet*, **355**, 1531-1539.
- Gewirtz, A.M., Calabretta, B., Rucinski, B., Niewiarowski, S. & Xu, W.Y. (1989) Inhibition of human megakaryocytopoiesis in vitro by platelet factor 4 (PF4) and a synthetic COOH-terminal PF4 peptide. *J Clin Invest*, **83**, 1477-1486.
- Gilbert, M., Dalloz, S., Maclouf, J. & Lagarde, M. (1999) Differential effects of long chain n-3 fatty acids on the expression of PGH synthase isoforms in bovine aortic endothelial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **60**, 363-365.
- Gilles, L., Guieze, R., Bluteau, D., Cordette-Lagarde, V., Lacout, C., Favier, R., Larbret, F., Debili, N., Vainchenker, W. & Raslova, H. (2008) P19INK4D links endomitotic arrest and megakaryocyte maturation and is regulated by AML-1. *Blood*, **111**, 4081-4091.
- GISSI-Prevenzione-Investigators (1999) Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione

- trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*, **354**, 447-455.
- Gnatenko, D.V., Dunn, J.J., McCorkle, S.R., Weissmann, D., Perrotta, P.L. & Bahou, W.F. (2003) Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. *Blood*, **101**, 2285-2293.
- Goodnight, S.H., Jr., Harris, W.S. & Connor, W.E. (1981) The effects of dietary omega 3 fatty acids on platelet composition and function in man: a prospective, controlled study. *Blood*, **58**, 880-885.
- Guichardant, M. & Lagarde, M. (1983) Phospholipid analysis and fatty acid content in platelets by the combination of high-performance liquid chromatography and glass capillary gas-liquid chromatography. *J Chromatogr*, **275**, 400-406.
- Hagve, T.A. & Christophersen, B.O. (1986) Evidence for peroxisomal retroconversion of adrenic acid (22:4(n-6)) and docosahexaenoic acids (22:6(n-3)) in isolated liver cells. *Biochim Biophys Acta*, **875**, 165-173.
- Han, W.K., Sapirstein, A., Hung, C.C., Alessandrini, A. & Bonventre, J.V. (2003) Cross-talk between cytosolic phospholipase A2 alpha (cPLA2 alpha) and secretory phospholipase A2 (sPLA2) in hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in murine mesangial cells: sPLA2 regulates cPLA2 alpha activity that is responsible for arachidonic acid release. *J Biol Chem*, **278**, 24153-24163.
- Hart, M.J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W.D., Gilman, A.G., Sternweis, P.C. & Bollag, G. (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science*, **280**, 2112-2114.
- Hartwig, J. & Italiano, J., Jr. (2003) The birth of the platelet. *J Thromb Haemost*, **1**, 1580-1586.
- Hartwig, J.H. & DeSisto, M. (1991) The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J Cell Biol*, **112**, 407-425.
- Hechler, B., Lenain, N., Marchese, P., Vial, C., Heim, V., Freund, M., Cazenave, J.P., Cattaneo, M., Ruggeri, Z.M., Evans, R. & Gachet, C. (2003) A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. *J Exp Med*, **198**, 661-667.
- Heemskerk, J.W., Bevers, E.M. & Lindhout, T. (2002) Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*, **88**, 186-193.
- Hibbeln, J.R., Nieminen, L.R.G., Blasbalg, T.L., Riggs, J.A. & Lands, W.E.M. (2006) Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. *Am J Clin Nut*, **83**, S1483-1493.
- Hla, T. & Neilson, K. (1992) Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7384-7388.

- Huang, H.S., Chen, C.J., Suzuki, H., Yamamoto, S. & Chang, W.C. (1999) Inhibitory effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase on the activity of lipoxygenases and cyclooxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **58**, 65-75.
- Huwiler, A., Staudt, G., Kramer, R.M. & Pfeilschifter, J. (1997) Cross-talk between secretory phospholipase A2 and cytosolic phospholipase A2 in rat renal mesangial cells. *Biochim Biophys Acta*, **1348**, 257-272.
- Ikeda, Y., Sugawara, A., Taniyama, Y., Uruno, A., Igarashi, K., Arima, S., Ito, S. & Takeuchi, K. (2000) Suppression of rat thromboxane synthase gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in macrophages via an interaction with NRF2. *J Biol Chem*, **275**, 33142-33150.
- Italiano, J.E., Jr., Lecine, P., Shivdasani, R.A. & Hartwig, J.H. (1999) Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol*, **147**, 1299-1312.
- Italiano, J.E., Jr. & Shivdasani, R.A. (2003) Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost*, **1**, 1174-1182.
- Jackson, S.P. (2007) The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*, **109**, 5087-5095.
- Jandrot-Perrus, M., Lagrue, A.H., Okuma, M. & Bon, C. (1997) Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin alpha2beta1. *J Biol Chem*, **272**, 27035-27041.
- Januel, C., El Hentati, F.Z., Carreras, M., Arthur, J.R., Calzada, C., Lagarde, M. & Vericel, E. (2006) Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx-4) localization in resting platelets, and compartmental change during platelet activation. *Biochim Biophys Acta*, **1761**, 1228-1234.
- Jin, J. & Kunapuli, S.P. (1998) Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8070-8074.
- Johnson, G.J., Leis, L.A. & Dunlop, P.C. (1996) Specificity of G alpha q and G alpha 11 gene expression in platelets and erythrocytes. Expressions of cellular differentiation and species differences. *Biochem J*, **318** 1023-1031.
- Jones, D.A., Carlton, D.P., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A. & Prescott, S.M. (1993) Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem*, **268**, 9049-9054.
- Jump, D.B. (2002) Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol*, **13**, 155-164.
- Jump, D.B., Botolin, D., Wang, Y., Xu, J., Demeure, O. & Christian, B. (2008) Docosahexaenoic acid (DHA) and hepatic gene transcription. *Chem Phys Lipids*, **153**, 3-13.

- Kahn, M.L., Nakanishi-Matsui, M., Shapiro, M.J., Ishihara, H. & Coughlin, S.R. (1999) Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest*, **103**, 879-887.
- Kaushansky, K. (2005) The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest*, **115**, 3339-3347.
- Kennedy, E.P. & Weiss, S.B. (1956) The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem*, **222**, 193-214.
- Khanolkar, M.P., Morris, R.H., Thomas, A.W., Bolusani, H., Roberts, A.W., Geen, J., Jackson, S.K. & Evans, L.M. (2008) Rosiglitazone produces a greater reduction in circulating platelet activity compared with gliclazide in patients with type 2 diabetes mellitus--an effect probably mediated by direct platelet PPARgamma activation. *Atherosclerosis*, **197**, 718-724.
- Kirito, K., Fox, N. & Kaushansky, K. (2003) Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. *Blood*, **102**, 3172-3178.
- Kirito, K. & Kaushansky, K. (2006) Transcriptional regulation of megakaryopoiesis: thrombopoietin signaling and nuclear factors. *Curr Opin Hematol*, **13**, 151-156.
- Kirshenbaum, A.S., Akin, C., Goff, J.P. & Metcalfe, D.D. (2005) Thrombopoietin alone or in the presence of stem cell factor supports the growth of KIT(CD117)low/MPL(CD110)+ human mast cells from hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*, **33**, 413-421.
- Kliwer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M. & Lehmann, J.M. (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4318-4323.
- Knapp, H.R. (1997) Dietary fatty acids in human thrombosis and hemostasis. *Am J Clin Nutr*, **65**, 1687S-1698S.
- Knapp, H.R. & FitzGerald, G.A. (1989) The antihypertensive effects of fish oil. A controlled study of polyunsaturated fatty acid supplements in essential hypertension. *N Engl J Med*, **320**, 1037-1043.
- Kobayashi, T., Tahara, Y., Matsumoto, M., Iguchi, M., Sano, H., Murayama, T., Arai, H., Oida, H., Yurugi-Kobayashi, T., Yamashita, J.K., Katagiri, H., Majima, M., Yokode, M., Kita, T. & Narumiya, S. (2004) Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*, **114**, 784-794.
- Koshkin, V. & Dunford, H.B. (1999) Coupling of the peroxidase and cyclooxygenase reactions of prostaglandin H synthase. *Biochim Biophys Acta*, **1430**, 341-348.

- Kramer, R.M. & Deykin, D. (1983) Arachidonoyl transacylase in human platelets. Coenzyme A-independent transfer of arachidonate from phosphatidylcholine to lysoplasmeneylethanolamine. *J Biol Chem*, **258**, 13806-13811.
- Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S. & Appel, L.J. (2002) Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, **106**, 2747-2757.
- Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Appel, L.J. & for the Nutrition, C. (2003) Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, e20-30.
- Kromhout, D., Bosschieter, E.B. & de Lezenne Coulander, C. (1985) The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med*, **312**, 1205-1209.
- Kudo, I. & Murakami, M. (2002) Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins & Other Lipid Mediat*, **68-69**, 3-58.
- Kulmacz, R.J. & Wang, L.H. (1995) Comparison of hydroperoxide initiator requirements for the cyclooxygenase activities of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem*, **270**, 24019-24023.
- Kuter, D.J., Gminski, D.M. & Rosenberg, R.D. (1992) Transforming growth factor beta inhibits megakaryocyte growth and endomitosis. *Blood*, **79**, 619-626.
- Kuter, D.J. & Rosenberg, R.D. (1995) The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood*, **85**, 2720-2730.
- Kuwata, H., Yamamoto, S., Miyazaki, Y., Shimbara, S., Nakatani, Y., Suzuki, H., Ueda, N., Yamamoto, S., Murakami, M. & Kudo, I. (2000) Studies on a mechanism by which cytosolic phospholipase A2 regulates the expression and function of type IIA secretory phospholipase A2. *J Immunol*, **165**, 4024-4031.
- Kwak, M.-K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M. & Kensler, T.W. (2003) Modulation of Gene Expression by Cancer Chemopreventive Dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 Pathway. IDENTIFICATION OF NOVEL GENE CLUSTERS FOR CELL SURVIVAL. *J Biol Chem*, **278**, 8135-8145.
- Lands, W.E. & Merkl, I. (1963) Metabolism of glycerolipids. III. Reactivity of various acyl esters of coenzyme A with alpha'-acylglycerophosphorylcholine, and positional specificities in lecithin synthesis. *J Biol Chem*, **238**, 898-904.
- Larson, M.K. & Watson, S.P. (2006a) A product of their environment: do megakaryocytes rely on extracellular cues for proplatelet formation? *Platelets*, **17**, 435-440.
- Larson, M.K. & Watson, S.P. (2006b) Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin alpha IIb beta3. *Blood*, **108**, 1509-1514.

- Leaf, A. & Weber, P.C. (1988) Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. *N Engl J Med*, **318**, 549-557.
- Lecine, P., Italiano, J.E., Jr., Kim, S.W., Villeval, J.L. & Shivdasani, R.A. (2000) Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood*, **96**, 1366-1373.
- Lemaitre, D., Vericel, E., Polette, A. & Lagarde, M. (1997) Effects of fatty acids on human platelet glutathione peroxidase: possible role of oxidative stress. *Biochem Pharmacol*, **53**, 479-486.
- Lemarchandel, V., Ghysdael, J., Mignotte, V., Rahuel, C. & Romeo, P.H. (1993) GATA and Ets cis-acting sequences mediate megakaryocyte-specific expression. *Mol Cell Biol*, **13**, 668-676.
- Leon, C., Ravanat, C., Freund, M., Cazenave, J.P. & Gachet, C. (2003) Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 1941-1947.
- Lichtenstein, A.H., Appel, L.J., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., Franch, H.A., Franklin, B., Kris-Etherton, P., Harris, W.S., Howard, B., Karanja, N., Lefevre, M., Rudel, L., Sacks, F., Van Horn, L., Winston, M. & Wylie-Rosett, J. (2006) Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006: A Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee, pp. 82-96.
- Lopez, J.J., Salido, G.M., Gomez-Arteta, E., Rosado, J.A. & Pariente, J.A. (2007) Thrombin induces apoptotic events through the generation of reactive oxygen species in human platelets. *J Thromb Haemost*, **5**, 1283-1291.
- Loscalzo, J. (2003) Oxidant stress: a key determinant of atherothrombosis. *Biochem Soc Trans*, **31**, 1059-1061.
- Macaulay, I.C., Carr, P., Gusnanto, A., Ouwehand, W.H., Fitzgerald, D. & Watkins, N.A. (2005) Platelet genomics and proteomics in human health and disease. *J Clin Invest*, **115**, 3370-3377.
- Marcus, A.J., Broekman, M.J., Drosopoulos, J.H., Olson, K.E., Islam, N., Pinsky, D.J. & Levi, R. (2005) Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, **31**, 234-246.
- Martin, F., Prandini, M.H., Thevenon, D., Marguerie, G. & Uzan, G. (1993) The transcription factor GATA-1 regulates the promoter activity of the platelet glycoprotein IIb gene. *J Biol Chem*, **268**, 21606-21612.
- McCann, J.C. & Ames, B.N. (2005) Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *Am J Clin Nutr*, **82**, 281-295.

- McNamara, R.K. & Carlson, S.E. (2006) Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **75**, 329-349.
- Mehta, J.L., Chen, L.Y., Kone, B.C., Mehta, P. & Turner, P. (1995) Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med*, **125**, 370-377.
- Miyata, A., Yokoyama, C., Ihara, H., Bandoh, S., Takeda, O., Takahashi, E. & Tanabe, T. (1994) Characterization of the human gene (TBXAS1) encoding thromboxane synthase. *Eur J Biochem*, **224**, 273-279.
- Moers, A., Nieswandt, B., Massberg, S., Wettschureck, N., Gruner, S., Konrad, I., Schulte, V., Aktas, B., Gratacap, M.P., Simon, M.I., Gawaz, M. & Offermanns, S. (2003) G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Nat Med*, **9**, 1418-1422.
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. & Vane, J.R. (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, **263**, 663-665.
- Moraes, L.A., Swales, K.E., Wray, J.A., Damazo, A., Gibbins, J.M., Warner, T.D. & Bishop-Bailey, D. (2007) Nongenomic signaling of the retinoid X receptor through binding and inhibiting Gq in human platelets. *Blood*, **109**, 3741-3744.
- Murakami, M., Kudo, I. & Inoue, K. (1993) Molecular nature of phospholipases A2 involved in prostaglandin I2 synthesis in human umbilical vein endothelial cells. Possible participation of cytosolic and extracellular type II phospholipases A2. *J Biol Chem*, **268**, 839-844.
- Murugappa, S. & Kunapuli, S.P. (2006) The role of ADP receptors in platelet function. *Front Biosci*, **11**, 1977-1986.
- Mustacich, D.J., Bruno, R.S., Traber, M.G. & Gerald, L. (2007) Vitamin E *Vitamins & Hormones*. Academic Press, pp. 1-21.
- Nachmias, V.T., Kavalier, J. & Jacobowitz, S. (1985) Reversible association of myosin with the platelet cytoskeleton. *Nature*, **313**, 70-72.
- Nagata, Y., Muro, Y. & Todokoro, K. (1997) Thrombopoietin-induced Polyploidization of Bone Marrow Megakaryocytes Is Due to a Unique Regulatory Mechanism in Late Mitosis. *J Biol Chem*, **139**, 449-457.
- Needleman, P., Moncada, S., Bunting, S., Vane, J.R., Hamberg, M. & Samuelsson, B. (1976) Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A2 from prostaglandin endoperoxides. *Nature*, **261**, 558-560.
- Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J.W., Zirngibl, H. & Fassler, R. (2001) Glycoprotein VI but

- not $\alpha_2\beta_1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. *Embo J*, **20**, 2120-2130.
- Nigam, S. & Schewe, T. (2000) Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*, **1488**, 167-181.
- Nurden, A.T. (2005) Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes. *J Thromb Haemost*, **3**, 1773-1782.
- Obergfell, A., Eto, K., Mocsai, A., Buensuceso, C., Moores, S.L., Brugge, J.S., Lowell, C.A. & Shattil, S.J. (2002) Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $[\alpha]_{IIb}[\beta]_3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol*, **157**, 265-275.
- Oda, M., Kurasawa, Y., Todokoro, K. & Nagata, Y. (2003) Thrombopoietin-induced CXC chemokines, NAP-2 and PF4, suppress polyploidization and proplatelet formation during megakaryocyte maturation. *Genes Cells*, **8**, 9-15.
- Offermanns, S. (2006) Activation of Platelet Function Through G Protein-Coupled Receptors. *Circ Res*, **99**, 1293-1304.
- Offermanns, S., Laugwitz, K.L., Spicher, K. & Schultz, G. (1994) G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 504-508.
- Offermanns, S., Toombs, C.F., Hu, Y.H. & Simon, M.I. (1997) Defective platelet activation in G $\alpha(q)$ -deficient mice. *Nature*, **389**, 183-186.
- Oomen, C.M., Feskens, E.J., Rasanen, L., Fidanza, F., Nissinen, A.M., Menotti, A., Kok, F.J. & Kromhout, D. (2000) Fish consumption and coronary heart disease mortality in Finland, Italy, and The Netherlands. *Am J Epidemiol*, **151**, 999-1006.
- Ozeki, Y., Nagamura, Y., Ito, H., Unemi, F., Kimura, Y., Igawa, T., Kambayashi, J., Takahashi, Y. & Yoshimoto, T. (1999) An anti-platelet agent, OPC-29030, inhibits translocation of 12-lipoxygenase and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid production in human platelets. *Br J Pharmacol*, **128**, 1699-1704.
- Pang, L., Weiss, M.J. & Poncz, M. (2005) Megakaryocyte biology and related disorders. *J Clin Invest*, **115**, 3332-3338.
- Parent, C.A., Lagarde, M., Venton, D.L. & Le Breton, G.C. (1992) Selective modulation of the human platelet thromboxane A2/prostaglandin H2 receptor by eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in intact platelets and solubilized platelet membranes. *J Biol Chem*, **267**, 6541-6547.
- Patel, S.R., Hartwig, J.H. & Italiano, J.E., Jr. (2005) The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J. Clin. Invest.*, **115**, 3348-3354.

- Pignatelli, P., Pulcinelli, F.M., Lenti, L., Gazzaniga, P.P. & Violi, F. (1999) Vitamin E inhibits collagen-induced platelet activation by blunting hydrogen peroxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**, 2542-2547.
- Polette, A., Lemaitre, D., Lagarde, M. & Vericel, E. (1996) N-3 fatty acid-induced lipid peroxidation in human platelets is prevented by catechins. *Thromb Haemost*, **75**, 945-949.
- Poujol, C., Tronik-Le Roux, D., Tropel, P., Roullot, V., Nurden, A., Marguerie, G. & Nurden, P. (1998) Ultrastructural analysis of bone marrow hematopoiesis in mice transgenic for the thymidine kinase gene driven by the alpha IIb promoter. *Blood*, **92**, 2012-2023.
- Racine, R.A. & Deckelbaum, R.J. (2007) Sources of the very-long-chain unsaturated omega-3 fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **10**, 123-128.
- Rao, G.H.R., Radha, E. & White, J.G. (1983) Effect of docosahexaenoic acid (DHA) on arachidonic acid metabolism and platelet function. *Biochem Biophys Res Commun*, **117**, 549-555.
- Raslova, H., Kauffmann, A., Sekkai, D., Ripoche, H., Larbret, F., Robert, T., Le Roux, D.T., Kroemer, G., Debili, N., Dessen, P., Lazar, V. & Vainchenker, W. (2007) Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach. *Blood*, **109**, 3225-3234.
- Raslova, H., Roy, L., Vourc'h, C., Le Couedic, J.P., Brison, O., Metivier, D., Feunteun, J., Kroemer, G., Debili, N. & Vainchenker, W. (2003) Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood*, **101**, 541-544.
- Ravid, K., Doi, T., Beeler, D.L., Kuter, D.J. & Rosenberg, R.D. (1991) Transcriptional regulation of the rat platelet factor 4 gene: interaction between an enhancer/silencer domain and the GATA site. *Mol Cell Biol*, **11**, 6116-6127.
- Ravid, K., Lu, J., Zimmet, J.M. & Jones, M.R. (2002) Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol*, **190**, 7-20.
- Ray, D.M., Spinelli, S.L., Pollock, S.J., Murant, T.I., O'Brien, J.J., Blumberg, N., Francis, C.W., Taubman, M.B. & Phipps, R.P. (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor transcription factors are released from activated human platelets and shed in microparticles. *Thromb Haemost*, **99**, 86-95.
- Reed, G.L., Fitzgerald, M.L. & Polgar, J. (2000) Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood*, **96**, 3334-3342.
- Rey, C., Vericel, E., Nemoz, G., Chen, W., Chapuy, P. & Lagarde, M. (1994) Purification and characterization of glutathione peroxidase from human blood platelets. Age-related changes in the enzyme. *Biochim Biophys Acta*, **1226**, 219-224.
- Ricetti, M.M., Guidi, G.C., Bellisola, G., Marrocchella, R., Rigo, A. & Perona, G. (1994) Selenium enhances glutathione peroxidase activity and prostacyclin release in cultured

- human endothelial cells. Concurrent effects on mRNA levels. *Biol Trace Elem Res*, **46**, 113-123.
- Riviere, C., Subra, F., Cohen-Solal, K., Cordette-Lagarde, V., Letestu, R., Auclair, C., Vainchenker, W. & Louache, F. (1999) Phenotypic and functional evidence for the expression of CXCR4 receptor during megakaryocytopoiesis. *Blood*, **93**, 1511-1523.
- Rocca, B., Secchiero, P., Ciabattini, G., Ranelletti, F.O., Catani, L., Guidotti, L., Melloni, E., Maggiano, N., Zauli, G. & Patrono, C. (2002) Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7634-7639.
- Rojnuckarin, P., Drachman, J.G. & Kaushansky, K. (1999) Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis. *Blood*, **94**, 1273-1282.
- Rojnuckarin, P., Miyakawa, Y., Fox, N.E., Deou, J., Daum, G. & Kaushansky, K. (2001) The roles of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C ζ for thrombopoietin-induced mitogen-activated protein kinase activation in primary murine megakaryocytes. *J Biol Chem*, **276**, 41014-41022.
- Roy, L., Coullin, P., Vitrat, N., Hellio, R., Debili, N., Weinstein, J., Bernheim, A. & Vainchenker, W. (2001) Asymmetrical segregation of chromosomes with a normal metaphase/anaphase checkpoint in polyploid megakaryocytes. *Blood*, **97**, 2238-2247.
- Sabri, S., Jandrot-Perrus, M., Bertoglio, J., Farndale, R.W., Mas, V.M., Debili, N. & Vainchenker, W. (2004) Differential regulation of actin stress fiber assembly and proplatelet formation by α 2 β 1 integrin and GPVI in human megakaryocytes. *Blood*, **104**, 3117-3125.
- Sampath, H. & Ntambi, J.M. (2005) Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annual Review of Nutrition*, **25**, 317-340.
- Sanders, T.A. & Hinds, A. (1992) The influence of a fish oil high in docosahexaenoic acid on plasma lipoprotein and vitamin E concentrations and haemostatic function in healthy male volunteers. *Br J Nutr*, **68**, 163-173.
- Savage, B., Almus-Jacobs, F. & Ruggeri, Z.M. (1998) Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*, **94**, 657-666.
- Scheurlen, M., Kirchner, M., Clemens, M.R. & Jaschonek, K. (1993) Fish oil preparations rich in docosahexaenoic acid modify platelet responsiveness to prostaglandin-endoperoxide/thromboxane A₂ receptor agonists. *Biochem Pharmacol*, **46**, 245-249.
- Schildknecht, S., van der Loo, B., Weber, K., Tiefenthaler, K., Daiber, A. & Bachschmid, M.M. (2008) Endogenous peroxynitrite modulates PGHS-1-dependent thromboxane A₂ formation and aggregation in human platelets. *Free Radic Biol Med*, **45**, 512-520.
- Schulze, H., Korpál, M., Bergmeier, W., Italiano, J.E., Jr., Wahl, S.M. & Shivdasani, R.A. (2004) Interactions between the megakaryocyte/platelet-specific β 1 tubulin and the

- secretory leukocyte protease inhibitor SLPI suggest a role for regulated proteolysis in platelet functions. *Blood*, **104**, 3949-3957.
- Schwer, H.D., Lecine, P., Tiwari, S., Italiano, J.E., Jr., Hartwig, J.H. & Shivdasani, R.A. (2001) A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol*, **11**, 579-586.
- Selheim, F., Holmsen, H. & Vassbotn, F.S. (2000) PI 3-kinase signalling in platelets: the significance of synergistic, autocrine stimulation. *Platelets*, **11**, 69-82.
- Sen, C.K., Khanna, S., Rink, C., Roy, S. & Gerald, L. (2007) Tocotrienols: The Emerging Face of Natural Vitamin E *Vitamins & Hormones*. Academic Press, pp. 203-261.
- Seno, T., Inoue, N., Gao, D., Okuda, M., Sumi, Y., Matsui, K., Yamada, S., Hirata, K.I., Kawashima, S., Tawa, R., Imajoh-Ohmi, S., Sakurai, H. & Yokoyama, M. (2001) Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production. *Thromb Res*, **103**, 399-409.
- Sidhu, J.S., Cowan, D., Tooze, J.A. & Kaski, J.C. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reduces circulating platelet activity in patients without diabetes mellitus who have coronary artery disease. *Am Heart J*, **147**, e25.
- Skeaff, C.M., Hodson, L. & McKenzie, J.E. (2006) Dietary-induced changes in fatty acid composition of human plasma, platelet, and erythrocyte lipids follow a similar time course. *J Nutr*, **136**, 565-569.
- Small, J.V., Stradal, T., Vignal, E. & Rottner, K. (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol*, **12**, 112-120.
- Smith, W.L. & Dewitt, D.L. (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol*, **62**, 167-215.
- Smith, W.L. & Song, I. (2002) The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **68-69**, 115-128.
- Sneddon, A.A., Wu, H.C., Farquharson, A., Grant, I., Arthur, J.R., Rotondo, D., Choe, S.N. & Wahle, K.W. (2003) Regulation of selenoprotein GPx4 expression and activity in human endothelial cells by fatty acids, cytokines and antioxidants. *Atherosclerosis*, **171**, 57-65.
- Song, W.L., Lawson, J.A., Reilly, D., Rokach, J., Chang, C.T., Giasson, B. & FitzGerald, G.A. (2008) Neurofurans, novel indices of oxidant stress derived from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem*, **283**, 6-16.
- Sporn, P.H., Marshall, T.M. & Peters-Golden, M. (1992) Hydrogen peroxide increases the availability of arachidonic acid for oxidative metabolism by inhibiting acylation into phospholipids in the alveolar macrophage. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **7**, 307-316.
- Sprecher, H. (1981) Biochemistry of essential fatty acids. *Prog Lipid Res*, **20**, 13-22.

- Stillwell, W. & Wassall, S.R. (2003) Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids*, **126**, 1-27.
- Sun, D. & Funk, C.D. (1996) Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem*, **271**, 24055-24062.
- Sun, Q., Ma, J., Campos, H., Hankinson, S.E. & Hu, F.B. (2007) Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarkers of fatty acid intake in US women. *Am J Clin Nutr*, **86**, 74-81.
- Sun, S., Zimmet, J.M., Toselli, P., Thompson, A., Jackson, C.W. & Ravid, K. (2001) Overexpression of cyclin D1 moderately increases ploidy in megakaryocytes. *Haematologica*, **86**, 17-23.
- Sutherland, M., Shankaranarayanan, P., Schewe, T. & Nigam, S. (2001) Evidence for the presence of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human platelets: implications for its involvement in the regulatory network of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism. *Biochem J*, **353**, 91-100.
- Swann, P.G., Parent, C.A., Croset, M., Fonlupt, P., Lagarde, M., Venton, D.L. & Le Breton, G.C. (1990) Enrichment of platelet phospholipids with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibits thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor binding and function. *J Biol Chem*, **265**, 21692-21697.
- Szalai, G., LaRue, A.C. & Watson, D.K. (2006) Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 2460-2476.
- Tablin, F., Castro, M. & Leven, R.M. (1990) Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J Cell Sci*, **97 (Pt 1)**, 59-70.
- Tanabe, T. & Tohnai, N. (2002) Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins & other lipid mediators*, **68-69**, 95-114.
- Tay, A., Squire, J.A., Goldberg, H. & Skorecki, K. (1994) Assignment of the human prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene to 1q25 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, **23**, 718-719.
- Thies, F., Miles, E.A., Nebe-von-Caron, G., Powell, J.R., Hurst, T.L., Newsholme, E.A. & Calder, P.C. (2001) Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids*, **36**, 1183-1193.
- Till, J.E. & McCulloch, E. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, **14**, 213-222.
- Tiwari, S., Italiano, J.E., Jr., Barral, D.C., Mules, E.H., Novak, E.K., Swank, R.T., Seabra, M.C. & Shivdasani, R.A. (2003) A role for Rab27b in NF-E2-dependent pathways of platelet formation. *Blood*, **102**, 3970-3979.

- Tomer, A. (2004) Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes. *Blood*, **104**, 2722-2727.
- Tomer, A., Friese, P., Conklin, R., Bales, W., Archer, L., Harker, L.A. & Burstein, S.A. (1989) Flow cytometric analysis of megakaryocytes from patients with abnormal platelet counts. *Blood*, **74**, 594-601.
- Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.J., Crossley, M. & Orkin, S.H. (1997) FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*, **90**, 109-119.
- Van der Flier, A. & Sonnenberg, A. (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*, **305**, 285-298.
- Van Horn, L., McCoin, M., Kris-Etherton, P.M., Burke, F., Carson, J.A., Champagne, C.M., Karmally, W. & Sikand, G. (2008) The evidence for dietary prevention and treatment of cardiovascular disease. *J Am Diet Assoc*, **108**, 287-331.
- Vance, J.E. & Vance, D.E. (2004) Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem Cell Biol*, **82**, 113-128.
- Véricel, E., Calzada, C., Chapuy, P. & Lagarde, M. (1999) The influence of low intake of n-3 fatty acids on platelets in elderly people. *Atherosclerosis*, **147**, 187-192.
- Véricel, E., Januel, C., Carreras, M., Moulin, P. & Lagarde, M. (2004) Diabetic Patients Without Vascular Complications Display Enhanced Basal Platelet Activation and Decreased Antioxidant Status. *Diabetes*, **53**, 1046-1051.
- Véricel, E., Lagarde, M., Dechavanne, M. & Courpron, P. (1985) Increased lipid peroxidation in platelets from elderly people. *Thromb Haemost*, **54**, 553.
- Véricel, E., Polette, A., Bacot, S., Calzada, C. & Lagarde, M. (2003) Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets. *J Thromb Haemost*, **1**, 566-572.
- Véricel, E., Rey, C., Calzada, C., Haond, P., Chapuy, P.H. & Lagarde, M. (1992) Age-related changes in arachidonic acid peroxidation and glutathione-peroxidase activity in human platelets. *Prostaglandins*, **43**, 75-85.
- Vitrat, N., Letestu, R., Masse, A., Lazar, V., Vainchenker, W. & Debili, N. (2000) Thromboxane synthase has the same pattern of expression as platelet specific glycoproteins during human megakaryocyte differentiation. *Thromb Haemost*, **83**, 759-768.
- von Schacky, C. (2003) The role of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep*, **5**, 139-145.

- von Schacky, C. (2006) A review of omega-3 ethyl esters for cardiovascular prevention and treatment of increased blood triglyceride levels. *Vasc Health Risk Manag*, **2**, 251-262.
- von Schacky, C. & Weber, P.C. (1985) Metabolism and effects on platelet function of the purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in humans. *J Clin Invest*, **76**, 2446-2450.
- Voss, A., Reinhart, M., Sankarappa, S. & Sprecher, H. (1991) The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J Biol Chem*, **266**, 19995-20000.
- Wagner, B.A., Buettner, G.R. & Burns, C.P. (1994) Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry*, **33**, 4449-4453.
- Wang, X., Crispino, J.D., Letting, D.L., Nakazawa, M., Poncz, M. & Blobel, G.A. (2002) Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA-1 and FOG-1: role of Ets transcription factors. *Embo J*, **21**, 5225-5234.
- Wang, Z., Zhang, Y., Kamen, D., Lees, E. & Ravid, K. (1995) Cyclin D3 is essential for megakaryocytopoiesis. *Blood*, **86**, 3783-3788.
- Watson, S.P., Asazuma, N., Atkinson, B., Berlanga, O., Best, D., Bobe, R., Jarvis, G., Marshall, S., Snell, D., Stafford, M., Tulasne, D., Wilde, J., Wonerow, P. & Frampton, J. (2001) The role of ITAM- and ITIM-coupled receptors in platelet activation by collagen. *Thromb Haemost*, **86**, 276-288.
- Wettschureck, N. & Offermanns, S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*, **85**, 1159-1204.
- Woodman, R.J., Mori, T.A., Burke, V., Puddey, I.B., Barden, A., Watts, G.F. & Beilin, L.J. (2003) Effects of purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on platelet, fibrinolytic and vascular function in hypertensive type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis*, **166**, 85-93.
- Woulfe, D.S. (2005) Platelet G protein-coupled receptors in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost*, **3**, 2193-2200.
- Yagi, K. (1987) Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys Lipids*, **45**, 337-351.
- Yamaji-Hasegawa, A. & Tsujimoto, M. (2006) Asymmetric Distribution of Phospholipids in Biomembranes. *Biol Pharm Bull*, **29**, 1547-1553.
- Yamanaka, W.K., Clemans, G.W. & Hutchinson, M.L. (1980) Essential fatty acids deficiency in humans. *Prog Lipid Res*, **19**, 187-215.
- Yokoyama, C., Miyata, A., Ihara, H., Ullrich, V. & Tanabe, T. (1991) Molecular cloning of human platelet thromboxane A synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, **178**, 1479-1484.

Yoshimoto, T., Arakawa, T., Hada, T., Yamamoto, S. & Takahashi, E. (1992) Structure and chromosomal localization of human arachidonate 12-lipoxygenase gene. *J Biol Chem*, **267**, 24805-24809.

Zauli, G., Vitale, M., Falcieri, E., Gibellini, D., Bassini, A., Celeghini, C., Columbaro, M. & Capitani, S. (1997) In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. *Blood*, **90**, 2234-2243.