



Rôle des lipides oxydés dans la régulation de l'activation plaquettaire par les lipoprotéines de haute densité (HDL) plasmatiques et implication dans le diabète de type 2

Quang Huy Lê

► To cite this version:

Quang Huy Lê. Rôle des lipides oxydés dans la régulation de l'activation plaquettaire par les lipoprotéines de haute densité (HDL) plasmatiques et implication dans le diabète de type 2. Biotechnologies. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10188 . tel-01226765

HAL Id: tel-01226765

<https://theses.hal.science/tel-01226765>

Submitted on 10 Nov 2015

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.

N° : 188 - 2015

THESE

présentée devant

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES SANTE (EDISS)

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR

Spécialité Biochimie

par

Quang Huy LÊ

**Rôle des lipides oxydés dans la régulation de l'activation plaquettaire par les lipoprotéines
de haute densité (HDL) plasmatiques et implication dans le diabète de type 2**

Soutenue le 20 octobre 2015

Directeurs de thèse : Pr. Philippe MOULIN / Dr. Catherine CALZADA

JURY :

Dr. Xavier COLLET	Rapporteur
Pr. Pierre-Emmanuel MORANGE	Rapporteur
Dr. Denis BLACHE	Examineur
Pr. Michel LAGARDE	Examineur
Pr. Philippe MOULIN	Directeur de thèse
Dr. Catherine CALZADA	Co-directrice de thèse

**Travail effectué au sein du laboratoire CarMeN (équipe INFOLIP), Inserm UMR 1060,
Hospices civils de Lyon, UMR 1397 INRA, Université de Lyon, IMBL, INSA-Lyon.**

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

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

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements au **Dr. Hubert Vidal**, au **Pr. Michel Lagarde**, au **Pr. Philippe Moulin** et surtout **Dr. Catherine Calzada** pour m'avoir donné l'opportunité et les meilleures conditions, il y a cela 4 ans, d'effectuer mon stage de Master et ma thèse au sein du laboratoire.

Je remercie **Dr. Xavier COLLET** et **Pr. Pierre MORANGE** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs et jury de thèse, d'avoir pris de votre temps pour lire et corriger mon mémoire.

Je remercie sincèrement le **Dr. Denis BLACHE**, qui a suivi ma thèse en tant que président de mon comité de suivi de thèse et être jury de ma thèse. Merci pour votre esprit critique pour notre thématique et votre gentillesse.

Je remercie le **Pr. Philippe Moulin**, mon directeur de thèse. En attendant que Catherine obtienne son HDR, vous êtes devenu mon encadrant. A part l'enjeu de chef d'équipe 4, vous m'avez donné beaucoup de soutien pour mes travaux de recherche surtout pour le côté clinique, ce qui donne toute la valeur à mes travaux. Mais aussi vos perspectives scientifiques, votre connaissance scientifique, votre esprit critique et votre optimisme qui m'ont donné 4 années de travail inoubliable. Je suis toujours très enthousiaste et à l'aise pour discuter avec vous chaque fois.

Je remercie beaucoup mon directeur de thèse **Dr. Catherine Calzada**, qui m'a encadré durant ces longues années. Merci Catherine pour ton courage de prendre un étranger en thèse, je comprends le challenge que tu as rencontré, je me suis dit grâce à dieu je t'ai rencontré. Je suis toujours fier de ma super gentille encadrante, super compatissante, drôle, patiente, consciencieuse, la personne à qui je peux faire confiance et tout raconter non seulement le côté professionnel, scientifique mais aussi ma vie (je suis un peu trop bavard avec vous, non ?). Tu m'as donné toute l'autonomie pour mes travaux, une liberté totale de réfléchir, un support extraordinaire de conseils et de matériels, toujours près de moi pour m'aider, et presque jamais ou peu énervée face à moi. J'admire ta rigueur et ton sérieux scientifique, tes encouragements, tes conseils et ton sourire qui m'ont permis de finir ma thèse.

Je tiens à remercier le **Pr. Michel Lagarde**. Le premier cours que j'ai eu avec vous dans le cadre de mon Master 1 était sur le mécanisme moléculaire et fonctionnel de la lipase. J'étais tellement intéressé que j'ai appris tout par cœur avec enthousiasme, malheureusement ce n'était pas le sujet de l'examen de cette année. J'admire beaucoup votre esprit critique, les propositions et remarques scientifiques pertinentes et votre connaissance biochimique impressionnante surtout sur les lipides. Sans oublier un sourire agréable et votre façon de parler très humoriste et attirante. Je suis inspiré par vous, par votre passion pour une vie active et les activités en dehors du travail.

Je remercie sincèrement le **Dr. Evelyne Véricel** qui m'a beaucoup aidé tout au long de ces années, vous serez toujours un de mes directeurs officiels. J'ai beaucoup de chance d'avoir autant de directeurs de thèse !!! Je vous remercie notamment d'avoir corrigé mon manuscrit mais surtout de m'avoir apporté un soutien moral, des conseils et des remarques scientifiques et de français, votre gentillesse, votre sourire... Comme vous le savez, vous faites partie de « ma famille » de France depuis longtemps. Enfin, j'avoue que j'étais quand même un peu paniqué à l'idée de recevoir votre appel téléphonique.

Je remercie beaucoup **Pr. Michel Guichardant**. Je vous remercie pour votre support technique durant ma thèse, vos conseils scientifiques et votre sympathie, c'est très agréable de discuter avec vous, **Alain**, le meilleur souvenir de vous était de vous saluer chaque jour et vos questions sur l'avancement de ma thèse. **Françoise** une brise qui souffle du Japon vers Lyon, merci pour ta gentillesse et les cadeaux « made in Japan » que j'apprécie tellement, **Christophe** tu es toujours très accueillant et gentil avec moi, merci beaucoup pour ça. **Nicolas** pour les conseils scientifiques que tu m'as apporté, **Marie-Caroline** toujours optimiste, prête à donner un coup de main, **Nathalie** merci pour nos courtes discussions mais toujours très intéressantes, **Céline**, **Isabelle** pour le temps où nous avons travaillé ensemble pendant ma thèse et votre gentillesse.

Je tiens à remercier **Baptiste**, un vrai sportif très gentil et drôle à chaque fois qu'on faisait les manip ensemble surtout HPLC et FPLC, je te souhaite le meilleur pour ta vie de jeune couple dans ton nouvel appartement. **Patrick** un vrai cycliste de haut niveau avec ton fameux vélo, merci pour ton aide pour mes manip et d'être toujours prêt à me donner un coup de main avec un grand plaisir, **Patricia** pour ta gentillesse et j'ai toujours hâte de parler avec toi, **Romain** toujours souriant chaque fois qu'on se voit, merci d'avoir apprécié mon style, **Gaëlle** ton sourire et ta gentillesse m'impressionneront toujours, je suis désolé pour toutes les souffrances que tu as supporté à partager le même bureau, c'est toujours très agréable de parler avec toi. Merci beaucoup à ma co-bureau, **Sarah** (ma petite sœur en France), tu as le même âge que ma petite sœur au Vietnam, cela m'a donné un coup de cœur pour toi, y compris bien sûr ta gentillesse, je te souhaite plein de bonheur pour la suite et de devenir professeur, **Mayssa** une grande sœur, toujours super gentille et agréable je te souhaite un grand succès et la meilleure santé pour tes enfants, **Bérengère** malgré que tu ne sois plus là depuis longtemps, ta présence ne semble jamais disparaître de notre bureau, bonne chance pour ton avenir scientifique avec les saumons norvégiens... et ta nouvelle famille =), **Manon** quoi dire !!! J'ai beaucoup et toujours aimé ton sourire, une fille toujours prête à donner ton cœur à ton entourage, j'aime bien parler avec toi, bon courage pour ta thèse, je n'oublie pas ta proposition de venir visiter la Réunion, un jour si je débarque sur ton île natale, je penserai à toi, **Charlotte** une fille à fort caractère, très active, méga-gentille et super généreuse, s'il te plaît ne perds jamais ton sourire, je te souhaite plein de succès pour ta thèse. **Maud**, on se connaît depuis une demie-décennie tu es toujours souriante et gentille avec moi, merci pour tout, je te souhaite une fin de thèse pleine de réussite, et une famille remplie de sourires, de joie et de santé et fais un bisou à **Zoé** de ma part s'il te plaît, **Miao**, une de mes compatriotes lointaines, on partage les mêmes points vus de la vie, tu es très sympathique, tu ne peux pas imaginer comment tu me manques depuis que tu as quitté le laboratoire, je te souhaite plein de succès et plein de bonheur pour ta vie et dans ton couple, **Yinan**, malgré le fait qu'on ne se voit pas très souvent, je profite pour te souhaiter une bonne continuation, **Carine** une demi-compatriote, merci de m'avoir aidé pendant ma thèse, je suis super content de te revoir à chaque fois, à plus Carine ! **Samia**, le monde est petit, on se connaissait indirectement par **Fatima**, j'ai partagé des très bons moments chez toi avec ta grande famille, tu dois entretenir bien notre jardin et les rosiers s'il te plaît, enfin **mon petit Monsieur Jérémie**, je ne peux pas imaginer comment ma vie au laboratoire aurait été ennuyeuse sans toi, on a fait plein de conneries avec nos idées hors normes et pour moi ce sont des souvenirs inoubliables, tu m'as toujours beaucoup aidé, tout le temps, j'avoue que tu es mon meilleur ami français et celui qui me connaît très bien, dis bonjour à ta femme de ma part, si tu penses à moi, mon projet d'ouvrir un restaurant ensemble est toujours valable.

Con cảm ơn gia đình mình, các Cô nhất là Coco, nhờ mọi người mà con có được ngày hôm nay.

AVANT-PROPOS

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

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

- **Lê QH**, El Alaoui M, Véricel E, Ségrestin B, Soullère L, Guichardant M, Lagarde M, Moulin P, Calzada C.
Glycooxidized HDL, HDL enriched with oxidized phospholipids and HDL from diabetic patients inhibit platelet function.
J Clin Endocrinol Metab 2015;100(5):2006-14.
- Véricel E, Colas R, Calzada C, **Lê QH**, Feugier N, Cugnet C, Vidal H, Laville M, Moulin P, Lagarde M.
Moderate oral supplementation with docosahexaenoic acid improves platelet function and oxidative stress in type 2 diabetic patients.
Thromb Haemost 2015;114(2):289-96.

PUBLICATION en préparation

- **Lê QH**, Scott C, Véricel E, Di Filippo M, Langrand C, Lagarde M, Moulin P, Calzada C.
Oxidized HDL2 are more effective than oxidized HDL3 in inhibiting platelet aggregation in type 2 diabetes.

COMMUNICATIONS ORALES

- **Lê QH**, Véricel E, Lagarde M, Moulin P, Calzada C.
Les HDL glycoxydées ou enrichies en phospholipides oxydés inhibent l'agrégation des plaquettes sanguines humaines.
19^{ème} journée scientifique de l'EDISS, 19 octobre 2014, Villeurbanne.
- **Lê QH**, Véricel E, Lagarde M, Moulin P, Calzada C.
Les HDL glycoxydées ou enrichies en phospholipides oxydés inhibent l'agrégation des plaquettes sanguines humaines.
15^{ème} journée du Groupement d'Intérêt Scientifique- Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (GIS-IMBL), 27 avril 2015, Marseille.

COMMUNICATION AFFICHEE COMMENTEE

- **Lê QH**, Véricel E, Lagarde M, Moulin P, Calzada C.
Glycoxidized HDL or HDL enriched with oxidized phospholipids inhibit human platelet aggregation.
83rd European Atherosclerosis Society (EAS) Congress, 22-25 March 2015, Glasgow, U.K.
Young investigator fellowship.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

- **Lê QH**, Véricel E, Lagarde M, Moulin P, Calzada C.
Oxidized HDL inhibit human platelet aggregation.
81st EAS Congress, 2-5 Juin 2013, Lyon.
- **Lê QH**, Liu M, Véricel E, Lagarde M, Moulin P, Calzada C.
Effects of glycoxidized high-density lipoproteins (HDL) on human blood platelets. 13^{ème} journée IMBL, 7 juin 2013, Dijon.
- **Lê QH**, Véricel E, Lagarde M, Moulin P, Calzada C.
Effets of high-density lipoproteins on human blood platelets.
18^{ème} journée scientifique de l'EDISS, 6 septembre 2013, Villeurbanne.
- **Lê QH**, El Alaoui M, Soulère L, Véricel E, Lagarde M, Moulin P, Calzada C.
Glycoxidized HDL inhibit human platelet aggregation via oxidized phospholipids. 14^{ème} journée IMBL, 11 juin 2014, Lyon.

Co-encadrement de Carolyn Scott, Master of Science (Molecular and Cellular Biochemistry)
Oxford University, UK, étudiante d'échange Erasmus, septembre-décembre 2014.

RESUME

Le diabète de type 2 (DT2) est associé à un risque athéro-thrombotique élevé, en partie dû à l'hyperactivation plaquettaire et aux dyslipoprotéinémies. Les lipoprotéines de haute densité (HDL) possèdent des propriétés anti-athérogènes et subissent des modifications glycoxydatives lors du DT2. Notre objectif a été de déterminer les effets d'HDL glycoxydées *in vitro* ou de DT2 sur les plaquettes sanguines humaines et de déterminer leur contenu en lipides oxydés.

Les HDL glycoxydées possèdent des proportions moindres d'acides linoléique et arachidonique dans les phospholipides (PL) et esters de cholestérol, des concentrations plus élevées de dialdéhyde malonique et des principaux acides gras hydroxylés (AGOH) dont les 9-HODE, 13-HODE et 15-HETE dans toutes les classes lipidiques, en particulier dans les PL ainsi que des concentrations très faibles de vitamine E comparativement aux HDL contrôles. Les HDL glycoxydées *in vitro* et de patients DT2 inhibent de façon dose-dépendante l'agrégation plaquettaire induite par le collagène *via* le récepteur SR-BI. Ces HDL glycoxydées diminuent la phosphorylation des p38 MAPK et cPLA₂ plaquettaires. D'autre part, des HDL contrôles enrichies avec le PC(16:0/13-HODE) inhibent fortement l'agrégation comparativement aux HDL contrôles. De plus, les effets des sous-classes d'HDL, HDL 2 & 3, de DT2 et de témoins ont été testés sur l'agrégation plaquettaire. Les HDL2 de DT2 possèdent des concentrations d'AGOH plus élevées que les HDL3 de DT2 et tendent à inhiber plus l'agrégation plaquettaire.

En conclusion, nos résultats montrent que les HDL glycoxydées de patients diabétiques ne perdent pas leurs propriétés anti-agrégantes, qui pourraient être médiées par certaines PL oxydés.

Mots clés : diabète de type 2, HDL glycoxydées, agrégation plaquettaire, acides gras hydroxylés, phospholipides oxydés, sous-classes d'HDL.

Role of oxidized lipids in the regulation of platelet activation by plasma high-density lipoproteins (HDL) and involvement in type 2 diabetes

ABSTRACT

Type 2 diabetes (T2D) is associated with a high athero-thrombotic risk, partly due to platelet hyperactivation and dyslipoproteinemia. High-density lipoproteins (HDL) possess anti-atherogenic properties and undergo glycoxidation changes in T2D. Our objective was to determine the effects of glycoxidized HDL *in vitro* or from T2D patients on human blood platelets and to identify their oxidized lipid species.

Compared to control HDL, glycoxidized HDL have lower proportions of linoleic and arachidonic acids in phospholipids (PL) and cholesteryl esters, higher concentrations of malondialdehyde and main hydroxylated fatty acid (HOFA) including 9-HODE, 13-HODE and 15-HETE in all lipid classes, especially in PL, and very low concentrations of vitamin E. *In vitro* glycoxidized and T2D HDL dose-dependently inhibit platelet aggregation induced by collagen *via* the SR-BI receptor. Glycoxidized HDL decrease the phosphorylation of platelet p38 MAPK and cPLA₂. On the other hand, control HDL enriched with oxidized phospholipids i.e. PC(16:0/13-HODE) strongly inhibit platelet aggregation compared to controls. Moreover, the effects of HDL subclasses, HDL 2 & 3, from T2D patients and healthy controls were tested on platelet aggregation. T2D HDL2 have higher concentrations of HOFA than T2D HDL3 and tend to inhibit platelet aggregation to a greater extent.

In conclusion, our results show that T2D glycoxidized HDL do not lose their anti-aggregating properties and are even more effective than control HDL. These anti-aggregatory effects could be partly due to some oxidized PL species.

Keywords: type 2 diabetes, glycoxidized HDL, platelet aggregation, hydroxylated fatty acids, oxidized phospholipids, HDL subclasses.

Travail effectué au sein du laboratoire CarMeN (équipe INFOLIP), Inserm UMR 1060, Hospices civils de Lyon, UMR 1397 INRA, Université de Lyon, IMBL, INSA-Lyon, 20 avenue Albert Einstein, 69621 Villeurbanne, France.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
AVANT-PROPOS	6
RESUME	7
ABSTRACT	8
SOMMAIRE	9
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	15
ABREVIATIONS	17
INTRODUCTION	20
BIBLIOGRAPHIE	22
 Plaquettes sanguines	 23
I. Structure et fonctions :	23
I.1. Introduction :	23
I.2. Structure :	23
I.2.a. Membrane plaquettaire :	24
I.2.b. Cytosquelette :	25
I.2.c. Cytoplasme :	25
I.3. Fonctions :	25
II. Adhésion :	26
III. Activation :	27
III.1. Les agonistes :	27
III.2. Adénosine diphosphate:	28
III.3. Collagène :	28
III.4. Thrombine:	29
III.5. Facteur Von Willebrand :	30
IV. Agrégation :	30
V. Voies de signalisation plaquettaires :	31
V.1. Phospholipase C :	31
V.2. Libération de calcium par IP3 :	32
V.3. Activation de la protéine kinase C par DAG :	32
V.4. Les p38 MAPK :	33
V.5. La phospholipase A ₂ cytosolique :	34
V.6. La cascade de l'acide arachidonique :	34
V.6.a. Prostaglandine G/H synthase :	35
V.6.b. 12-lipoxygénase :	36
VI. Les récepteurs plaquettaires des lipoprotéines :	36
VI.1. « Scavenger receptor B I » :	36
VI.1.a. Structure :	36
VI.1.b. Ligands :	38
VI.1.c. Fonctions :	38
VI.1.d. SR-BI et plaquettes :	38

VI.1.e. Impact du diabète de type 2 sur l'expression de SR-BI :.....	39
VI.2. CD-36 :	40
VI.2.a. Structure :	40
VI.2.b. Ligands :	40
VI.2.c. Fonctions :	41
VI.2.d. Rôle de CD-36 dans les plaquettes :	42
VI.2.e. HDL oxydées et CD-36 :	42
Lipoprotéines	43
I. Généralités :	43
II. Classes de lipoprotéines hormis les HDL :	43
II.1. Chylomicrons (CM) :	43
II.2. Lipoprotéines de très basse densité (VLDL) :	44
II.3. Lipoprotéines de basse densité (LDL) :	44
III. Lipoprotéines de haute densité (HDL) :	45
III.1. Biosynthèse des HDL :	45
III.2. Classification des HDL :	46
III.3. Structure des HDL :	48
III.3.a. Généralités sur les acides gras :	48
III.3.b. Lipidomique des HDL :	50
III.3.b.1. Lipides neutres :	50
III.3.b.1.a. Esters de cholestérol :	50
III.3.b.1.b. Stérols :	51
III.3.b.1.c. Triacylglycérols :	51
III.3.b.1.d. Diacylglycérols :	51
III.3.b.2. Phospholipides :	51
III.3.b.2.a. Phosphatidylcholines :	51
III.3.b.2.b. Phosphatidyléthanolamines :	52
III.3.b.2.c. Lysophosphatidylcholines :	53
III.3.b.2.d. Autres phospholipides :	53
III.3.b.2.e. Sphingolipides :	53
III.3.b.3. Les antioxydants :	54
III.3.c. Protéomique des HDL :	54
III.3.c.1. Apolipoprotéine A-I (apoA-I) :	55
III.3.c.2. Apolipoprotéine A-II (apoA-II) :	56
III.3.c.3. Autres apolipoprotéines mineures :	57
III.3.c.3.a. Apolipoprotéine A-IV :	57
III.3.c.3.b. Apolipoprotéine E :	57
III.3.c.3.c. Apolipoprotéine D :	57
III.3.c.3.d. Apolipoprotéine C-I :	57
III.3.c.4. « Lécithine Cholestérol Acyl Transférase » (LCAT) :	58

III.3.c.5. Paraoxonases (PON) :.....	59
III.3.c.6. « Platelet-activating factor-acetyl hydrolase » (PAF-AH) :.....	59
III.3.c.7. Glutathion-peroxydase 3 (GPx-3) :	60
III.3.c.8. « PhosphoLipid Transfer Protein » (PLTP) :	60
III.3.c.9. « Cholesteryl Ester Transfer Protein » (CETP) :.....	61
III.3.d. Le remodelage d'HDL :.....	62
III.4. Fonctions des HDL :	63
III.4.a. Transport inverse du cholestérol :	64
III.4.b. Propriétés anti-inflammatoires :	65
III.4.c. Propriétés anti-thrombotiques :	65
III.4. d. Propriétés anti-oxydantes :	68
III.5. Quantité d'HDL-cholestérol et qualité des HDL :.....	69
III.5.a. Quantité d'HDL-cholestérol :.....	69
III.5. b. Qualité des HDL :	69
Stress oxydant	71
I. Radicaux libres :	71
II. Formation et fonctions des espèces réactives de l'oxygène :.....	71
III. Cycle de peroxydation lipidique :	72
III.1. Initiation par déshydrogénation :	73
III.2. Propagation :	74
III.3. Terminaison :	74
IV. Produits de peroxydation lipidique :.....	75
IV.1. Phospholipides oxydés :.....	75
IV.2. Produits d'oxydation du cholestérol :.....	76
V. Défenses antioxydantes:	77
V.1. Défenses antioxydantes non enzymatiques :.....	77
V.1.a. Antioxydants liposolubles :	77
V.1.a.1. Tocophérols et tocotriénols (vitamine E) :.....	77
V.1.a.2. Ubidécaquinone (Coenzyme Q10) :.....	78
V.1.b. Antioxydants hydrosolubles:	78
V.1.b.1. Vitamine C :.....	78
V.1.b.2. Glutathion :	79
V.1.b.3. Albumine :	79
V.2. Antioxydants enzymatiques :	80
V.2.a. Superoxydes dismutases (SOD) :	80
V.2.b. Catalase :	80
V.2.c. Glutathion peroxydases & glutathion réductase :.....	80
VI. Oxydation des HDL:	81
VI.1. Oxydation du compartiment lipidique :.....	81
VI.2. Oxydation du compartiment protéique:.....	82

VI.3. Effet de l'oxydation des HDL sur les fonctions plaquettaires :.....	83
Diabète	85
I. Introduction :	85
II. Diabète de type 1 :.....	85
III. Diabète de type 2 :	86
III.1. Diabète de type 2 et activation plaquettaire :.....	86
III.2. Glycation :	87
III.2.a. Mécanisme :.....	87
III.2.b. Glycation des HDL :.....	88
III.2.c. Impact de la glycation des HDL sur leur fonctionnalité :.....	89
III.2.d. Glycoxydation des HDL :	90
MATERIELS ET METHODES :.....	92
Matériels :.....	93
I. Réactifs et petits matériels :	93
II. Appareils :.....	94
Méthodes :.....	95
I. Méthodes relatives aux HDL :.....	95
I.1. Isolement des HDL :	95
I.2. Ultracentrifugation séquentielle à temps courts :	95
I.3. Modification des HDL <i>in vitro</i> :	96
I.4. Dosage des protéines :	97
I.5. Dosage du cholestérol total :	97
I.6. Dosage des triacylglycérols :	98
I.7. Dosage de l'apoA-I :	99
I.8. Composition en acides gras des classes lipidiques des HDL :.....	99
I.8.a. Extraction lipidique :.....	99
I.8.b. Séparation des classes lipidiques par chromatographie sur couche mince (CCM) :.....	100
I.8.c. Transméthylation des acides gras :.....	100
I.8.d. Analyse par chromatographie en phase gazeuse :	101
I.9. Dosage de la vitamine E :	102
I.10. Dosage du dialdéhyde malonique (MDA) :	103
I.11. Synthèse de 1-palmitoyl,2-(15(S)-hydroxy-eicosadiénoyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine :	105
I.12. Quantification des acides gras monohydroxylés totaux :.....	106
I.13. Analyse des énantiomères d'acides gras hydroxylés par HPLC chirale :.....	107
I.13.a. Préparation du diazométhane :	108
I.13.b. Méthylation des acides monohydroxylés :	108
I.13.c. Analyse des isomères stéréospécifiques des AGOH par chromatographie chirale :.....	109
I.14. Synthèse de 1-palmitoyl,2-(13(S)-hydroperoxy-octadécadiénoyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine et 1-palmitoyl,2-(13(S)-hydroxy-octadécadiénoyl)-sn-glycéro-3-	109

phosphocholine.....	
I.15. Enrichissement des HDL avec des phospholipides oxydés ou non :.....	109
I.16. Fast-protein liquid chromatography (FPLC) :.....	110
I.17. Mesure de la taille des particules d'HDL par électrophorèse en conditions natives :.....	111
II. Méthodes relatives aux plaquettes :.....	111
II.1. Isolement des plaquettes sanguines :.....	111
II.2. Mesure de l'agrégation plaquettaire :.....	112
II.3. Dosage des protéines plaquettaires :	112
II.4. Analyse par immunoblot (western-blotting) des p38 MAPK et phospholipase A ₂ cytosolique phosphorylées:	113
II.5. Mesure de la concentration de calcium intra-plaquettaire :	114
III. Analyse statistique :	114
RESULTATS ET DISCUSSIONS :.....	115
A. Effets des HDL modifiées par glycation et /ou oxydation sur les plaquettes :.....	116
I. Caractérisation des HDL modifiées par glycation et/ou oxydation :.....	117
I.1. Composition en acides gras des principales classes lipidiques dans les HDL modifiées <i>versus</i> HDL contrôles :.....	117
I.1.a. Composition en acides gras des esters de cholestérol :.....	117
I.1.b. Composition en acides gras des phospholipides :.....	119
I.2. Statut redox des HDL :.....	121
I.2.a. Dialdéhyde malonique (MDA) :.....	121
I.2.b. Vitamine E :.....	122
I.2.c. Acides gras hydroxylés dans les classes lipidiques des HDL contrôles et glycoxydées :.....	123
I.3. Electrophorèse des HDL sur gel de polyacrylamide :.....	125
II. Effets des HDL sur l'activation plaquettaire :.....	126
II.1. Effets des HDL modifiées par glycation et /ou oxydation sur l'agrégation plaquettaire :.....	126
II.2. Effets de concentrations croissantes d'HDL contrôles et glycoxydées sur l'agrégation plaquettaire :	128
II.3. Effets des HDL contrôles et glycoxydées sur les p38MAPK et cPLA ₂ plaquettaires :.....	130
II.4. Effets des HDL contrôles et glycoxydées sur la concentration calcique plaquettaire :.....	132
III. Effets des HDL enrichies avec du 1-palmitoyl, 2- (13(S)-hydroxy-octadécadiénol) -sn-glycéro-3-phosphocholine (PC (16:0/13(S)-HODE)) sur l'agrégation plaquettaire :.....	133
IV. Acides gras hydroxylés dans les HDL de patients diabétiques de type 2 et effets des HDL de patients diabétiques de type 2 sur l'agrégation plaquettaire :.....	135
IV.1. Acides gras hydroxylés dans les phospholipides et esters de cholestérol des HDL de patients diabétiques de type 2:.....	136
IV.2. Stéréoisomères des acides gras hydroxylés des HDL de patients diabétiques de type 2 :	137
IV.3. Effets des HDL de patients diabétiques de type 2 sur l'agrégation	138

plaquettaire :.....	
V. Schéma récapitulatif :.....	141
VI. Effets du mélange (LDL + HDL) sur l'agrégation plaquettaire :.....	142
VII. Discussion :.....	143
B. Effets des sous-classes d'HDL sur l'agrégation plaquettaire :.....	147
I. Effets des HDL2 et HDL3 oxydées <i>in vitro</i> sur l'agrégation plaquettaire :.....	147
I.1. Composition en acides gras des principales classes lipidiques dans les sous-classes d'HDL oxydées <i>versus</i> HDL contrôles :.....	147
I.1.a. Composition en acides gras des esters de cholestérol :.....	147
I.1.b. Composition en acides gras des phospholipides :.....	148
I.1.c. Agrégation plaquettaire :.....	140
II. Effets des HDL2 et HDL3 de patients diabétiques de type 2 sur l'agrégation plaquettaire :.....	151
II.1. Acides gras hydroxylés :.....	151
II.2. Agrégation plaquettaire :.....	153
II.2.a. HDL ajoutées aux plaquettes par rapport à la concentration de protéines :.....	155
II.2.b. HDL ajoutées aux plaquettes par rapport à la concentration d'apoA-I :.....	155
II.2.c. HDL ajoutées aux plaquettes par rapport au nombre de particules :.....	156
III. Discussion :.....	157
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES :... ..	159
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :.....	163
ANNEXES :.....	199

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 :	<i>Micrographie électronique de plaquettes au repos et activées.</i>	24
Figure 2 :	<i>Etapas conduisant à l'adhésion plaquettaire suite à une lésion de l'endothélium en conditions de forces de cisaillement élevées.</i>	27
Figure 3 :	<i>Structure de l'acide 5, 8, 11, 14 eicosatétraénoïque (20:4n-6, acide arachidonique).</i>	34
Figure 4 :	<i>Séquence de PDZK1 du récepteur SR-BI.</i>	37
Figure 5 :	<i>Biosynthèse des HDL.</i>	46
Figure 6 :	<i>Représentation schématique d'une HDL.</i>	48
Figure 7 :	<i>Structure de différents PC oxydés dérivés de PAPC</i>	52
Figure 8 :	<i>Localisation des sphingomyélines à la surface des particules d'HDL.</i>	54
Figure 9 :	<i>Modélisation de l'arrangement moléculaire de l'apoA-I sur une particule d'HDL. (A) Modèle de « double ceinture », (B) modèle de « trèfle ». Chaque hélice est représentée par une couleur différente.</i>	56
Figure 10:	<i>Réaction catalysée par la LCAT. Insertion des EC dans le cœur hydrophobe des HDL et formation des HDL sphériques à partir des HDL discoïdales.</i>	58
Figure 11 :	<i>Fonction de la PLTP permettant la fusion des petites particules d'HDL pour former des particules plus grandes.</i>	61
Figure 12 :	<i>Echanges des EC et TAG entre lipoprotéines via la CETP.</i>	62
Figure 13 :	<i>Principales fonctions des HDL.</i>	63
Figure 14 :	<i>Transport inverse du cholestérol, formation et maturation des particules d'HDL et récepteurs spécifiques.</i>	64
Figure 15 :	<i>Principales activités anti-thrombotiques des HDL.</i>	67
Figure 16 :	<i>Concepts sur la quantité versus la qualité des HDL.</i>	70
Figure 17 :	<i>Cycle de peroxydation lipidique non enzymatique d'un AGPI.</i>	73
Figure 18 :	<i>Réaction d'un radical libre avec la vitamine E.</i>	75
Figure 19 :	<i>Réactions chimiques des phospholipides oxydés contenant des groupes aldéhydes π-terminaux avec des groupes amino et sulfhydryle de protéines, et formation de bases de Schiff et adduits de Michael.</i>	76
Figure 20 :	<i>Structure tridimensionnelle de l'albumine et principaux sites de l'albumine impliqués dans son activité antioxydante.</i>	79
Figure 21 :	<i>Principales étapes de la réaction de Maillard conduisant à la formation de produits avancés de glycation (AGE).</i>	88
Figure 22 :	<i>Schéma décrivant les étapes d'isolement et de modifications in vitro des HDL.</i>	97
Figure 23 :	<i>Chromatogramme typique obtenu après séparation par chromatographie en phase gazeuse (GC) des esters méthyliques d'acides gras des phospholipides.</i>	102
Figure 24 :	<i>Chromatogramme typique obtenu après séparation des isomères du tocophérol contenus dans les HDL par HPLC couplée à un détecteur fluorimétrique (λ excitation=295nm; λ émission=340nm). Le tocol est le standard interne.</i>	103
Figure 25 :	<i>Chromatogramme de l'adduit du MDA avec 2 molécules de TBA obtenu après séparation par HPLC couplée à un détecteur fluorimétrique.</i>	104
Figure 26 :	<i>Profil chromatographique d'acides gras hydroxylés après séparation par HPLC et détection UV à 234 nm.</i>	107
Figure 27 :	<i>Profil de FPLC typique d'HDL isolées par ultracentrifugation et enrichies avec des phospholipides oxydés.</i>	110

Figure 28 :	<i>Concentrations de MDA dans les HDL contrôles et modifiées par glycation et/ou oxydation.</i>	121
Figure 29 :	<i>Concentrations en acides gras hydroxylés dans les classes lipidiques d'HDL contrôles incubées et glycoxydées mesurées par HPLC.</i>	124
Figure 30 :	<i>Electrophorèse des particules d'HDL sur gel de polyacrylamide en conditions natives.</i>	125
Figure 31 :	<i>Agrégation plaquettaire induite par le collagène en absence ou en présence des HDL contrôles ou modifiées par glycation et/ou oxydation.</i>	126
Figure 32 :	<i>Effets des HDL contrôles et glycoxydées sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène.</i>	128
Figure 33 :	<i>Effets des HDL glycoxydées sur les quantités de p38 MAPK et cPLA₂ phosphorylées.</i>	131
Figure 34 :	<i>Concentration du calcium cytosolique dans les plaquettes activées par le collagène en présence ou en absence d'HDL contrôles ou glycoxydées.</i>	132
Figure 35 :	<i>Effets des HDL enrichies avec du 1-palmitoyl, 2-(13-hydroxy-octadécadiénoyl) -sn-glycéro-3-phosphocholine (PC (16 :0/13(S)-HODE) sur l'agrégation plaquettaire.</i>	134
Figure 36 :	<i>Concentrations des acides gras hydroxylés dans les phospholipides et esters de cholestérol d'HDL de sujets sains et de patients DT2.</i>	136
Figure 37 :	<i>Pourcentages des énantiomères d'acides gras hydroxylés des HDL de DT2 et de témoins.</i>	137
Figure 38 :	<i>Effets des HDL de patients DT2 sur l'agrégation plaquettaire.</i>	138
Figure 39 :	<i>Effets des HDL enrichies in vitro avec du PC(16:0/13(S)-HODE) sur l'agrégation plaquettaire.</i>	140
Figure 40 :	<i>Schéma illustrant les effets des HDL sur les voies de signalisation plaquettaire.</i>	141
Figure 41 :	<i>Effets du mélange (LDL + HDL) de DT2 sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène.</i>	142
Figure 42 :	<i>Proportions d'acides linoléique et arachidonique dans les esters de cholestérol des HDL2 et HDL3 contrôles et oxydées.</i>	148
Figure 43 :	<i>Proportions d'acides linoléique et arachidonique dans les phospholipides des HDL2 et HDL3 contrôles et oxydées.</i>	149
Figure 44 :	<i>Effets des HDL2 et HDL3, contrôles et oxydées, sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène.</i>	150
Figure 45 :	<i>Concentrations d'acides gras hydroxylés dans les lipides totaux des HDL 2 et HDL3 de témoins et de patients DT2.</i>	152
Figure 46 :	<i>Effets des sous-classes d'HDL de témoins et de patients DT2 sur l'agrégation plaquettaire.</i>	154
Tableau 1 :	<i>Principales étapes d'activation plaquettaire.</i>	31
Tableau 2 :	<i>Caractéristiques des lipoprotéines plasmatiques humaines.</i>	45
Tableau 3 :	<i>Classification des HDL selon différentes techniques de séparation et d'isolement.</i>	47
Tableau 4 :	<i>Classification des principaux acides gras.</i>	49
Tableau 5 :	<i>Composition en acides gras des esters de cholestérol dans les HDL contrôles et modifiées par glycation et / ou oxydation.</i>	118
Tableau 6 :	<i>Composition en acides gras des phospholipides dans les HDL contrôles et modifiées par glycation et / ou oxydation.</i>	119
Tableau 7 :	<i>Concentrations d'α-tocophérol et de γ-tocophérol dans les HDL modifiées par glycation et/ou oxydation.</i>	122

ABBREVIATIONS

8-iso-PGF ₂ α	8-iso-prostaglandine F ₂ α
AA	Acide arachidonique
ABCA1	« ATP-binding cassette transporter A1 »
ABCG1	« ATP-binding cassette transporter G1 »
ADP	Adénosine diphosphate
AG	Acide gras
AGE	« Advanced Glycation End-products »
AGL	Acide gras libre
APC	« Activated protein C »
AGOH	Acide gras monohydroxylé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AOPPs	« Advanced oxidation protein products »
Apo	Apolipoprotéine
ATP	Adénosine triphosphate
BHT	Butyl-Hydroxy-Toluène
BSA	« Bovine Serum Albumin » (albumine bovine sérique)
CETP	« Cholesteryl Ester Transfer Protein »
COX	Cyclooxygénase
CRP	« C-Reactive Protein »
DAG	Diacylglycérol
DDL	Détecteur à Diffusion de Lumière
DMA	Diméthylacétal
DT2	Diabète de type 2
EC	Esters de cholestérol
EDTA	« Ethylenediamine tetraacetic acid »
ERO	Espèces Réactives Oxygénées
FPLC	« Fast performance Liquid Chromatography »
GC	« Gas Chromatography » (Chromatographie en phase gazeuse)
GC/MS	« Gas Chromatography-Mass Spectrometry » (Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse)
GPx	Glutathion Peroxydase
GSH/GSSG	Glutathion réduit/oxydé
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HDDE	Hydroxydodécadiénal
HDL	« High Density Lipoproteins » (lipoprotéines de haute densité)

HETE	Acide hydroxy-eicosatétraénoïque
HHE	Hydroxyhexénal
HNE	Hydroxynonénal
HODE	Acide hydroxy-octadécadiénoïque
HpETE	Acide hydroperoxy-eicosatétraénoïque
HPLC	« High Performance Liquid Chromatography »
HpODE	Acide hydroperoxy-octadécadiénoïque
IDL	« Intermediary density lipoproteins » (lipoprotéines de densité intermédiaire)
LA	Acide linoléique
LCAT	« Lecithine Cholesterol Acyl Transferase »
LDL	« Low Density Lipoproteins » (lipoprotéines de basse densité)
LOX	Lipoxygénase
LOX-1	« Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 »
LPA	« Lysophosphatidic acid »
LPC	« Lysophosphatidylcholine »
MAPK	« Mitogen Activated Protein Kinase »
MCV	Maladies CardioVasculaires
MDA	« Malondialdehyde » (dialdéhyde malonique)
NO	« Nitrogen Oxide » (monoxyde d'azote)
p38 MAPK	« p38 Mitogen Activated Protein Kinase »
PAF	« Platelet Activating Factor »
PAI-I	« Plasminogen Activator Inhibitor-I »
PAR	« protease activated receptor »
PBS	« Phosphate Buffer Saline »
PC	Phosphatidylcholine
PDGF	« Platelet Derived Growth Factor »
PE	Phosphatidyléthanolamine
PECAM-1	« Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 »
PG	Prostaglandine
PGHS	Prostaglandine H synthase
PGPC	1-palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
PI	Phosphatidylinositol
PKC	Protéine kinase C
PL	Phospholipides
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
POVPC	1-palmitoyl-2-(5-oxovaléroyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine
PS	Phosphatidylsérine
PTK	Protéines Tyrosine Kinases

RAGE	« Receptor for Advanced Glycated End products » (récepteur aux AGE)
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RL	Radical libre
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SM	Sphingomyéline
SOD	Superoxyde dismutase
SR-BI	« Scavenger Receptor BI» (récepteur éboueur)
TAG	Triacylglycérols
TBA	« Thiobarbituric acid »
TBARS	« Thiobarbituric Acid Reactive Species »
TBS	« Tris Buffer Saline »
TBS-T	« Tris Buffer Saline-Tween »
TGF- β	« Transforming Growth Factor- β »
TNF- α	« Tumor Necrosis Factor- α »
TRPC	«transient receptor potential cation channels»
Tx	Thromboxane
VLDL	« Very Low Density Lipoproteins » (lipoprotéines de très basse densité)
vWF	« von Willebrand Factor » (facteur von Willebrand)

INTRODUCTION

Le diabète de type 2 (DT2) est considéré comme une pandémie mondiale et affecte en 2014 plus de 387 millions dans le monde entier. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) anticipe qu'en 2030, le diabète sera la septième cause de décès dans le monde. Il est associé à un risque accru de maladies cardiovasculaires.

Il est établi que le DT2 est associé à une hyperactivation plaquettaire [Véricel *et al.*, 2004], impliquée dans le processus d'athéromatose. Il est par ailleurs admis que le stress oxydant, résultant d'un déséquilibre entre la production d'espèces oxydantes et leur élimination par des systèmes de défense antioxydante, en faveur des espèces oxydantes, est impliqué dans le processus d'athéromatose et est accru dans le DT2. Dans le torrent circulatoire, les plaquettes sont en contact des lipoprotéines circulantes dont les lipoprotéines de haute densité (HDL), qui sont soumises à des modifications oxydatives dans le diabète [Ueda *et al.*, 2007 ; Sorrentino *et al.*, 2010]. De nombreuses études indiquent que les propriétés anti-athérogènes des HDL sont diminuées suite à leur oxydation et chez les patients souffrant de maladies métaboliques [Kontush et Chapman, 2006].

Les résultats publiés sur les effets des HDL oxydées sur les fonctions plaquettaires sont peu nombreux et divergents. Alors que plusieurs études indiquent que les HDL oxydées potentialisent l'agrégation plaquettaire [Nofer *et al.*, 2010], une étude a montré que les HDL oxydées *in vitro* inhibent l'agrégation plaquettaire [Valiyaveetil *et al.*, 2008]. En accord avec ces résultats inattendus, notre équipe a montré que les HDL de patientes abéta-lipoprotéïnémiques (donc dépourvues de lipoprotéines riches en apoB) sont fortement oxydées et inhibent pourtant l'agrégation plaquettaire [Calzada *et al.*, 2013].

L'objectif principal de mon travail de doctorat a été de clarifier le rôle des HDL oxydées dans le contexte du DT2. Nous faisons l'hypothèse que les lipides et peroxydes lipidiques constitutifs des HDL pourraient jouer un rôle important dans leurs propriétés fonctionnelles, notamment dans le DT2. D'une part, nous avons modifié *in vitro* des HDL par glycation et/ou oxydation, de façon à mimer les HDL de DT2, et les avons comparées à des HDL non modifiées. D'autre part, des HDL de patients DT2 ont été comparées à celles de volontaires sains. La composition en acides

gras dans les phospholipides et esters de cholestérol des différentes préparations d'HDL et leur statut redox ont été déterminés. Parallèlement, leurs effets sur l'agrégation plaquettaire et la voie de signalisation conduisant à l'activation des p38 MAPK et phospholipase A₂ cytosolique (cPLA₂) ont été étudiés. L'éventuelle implication de certains lipides oxydés, présents dans les HDL modifiées oxydativement, dans les effets observés sur les plaquettes, a été déterminée par enrichissement des HDL avec des phospholipides oxydés synthétisés enzymatiquement.

Un objectif corollaire de mon travail de doctorat a été d'étudier de façon plus fine la contribution de chaque sous-classe d'HDL, HDL2 et HDL3, dans les effets observés sur l'agrégation plaquettaire. En effet, les particules d'HDL, dont celles de patients DT2 [Gowri *et al.*, 1999], sont très hétérogènes du fait de leurs différences de taille et composition, ce qui impacte leur fonctionnalité. Nous avons étudié les effets d'HDL2 et HDL3, oxydées *in vitro*, ou isolées de patients DT2, sur l'agrégation plaquettaire, en regard de leur état d'oxydation.

Ce mémoire comporte quatre sections :

- une première partie bibliographique focalisée sur les plaquettes sanguines, les HDL, le stress oxydant et le diabète.
- une seconde partie décrivant les matériels et méthodes utilisés lors du travail expérimental.
- une troisième partie exposant les résultats et discussions. Les résultats sont divisés en deux parties, une partie sur les effets des HDL modifiées *in vitro* par glycoxydation, enrichies en phospholipides oxydés, et de patients DT2 sur l'activation plaquettaire, et une seconde partie sur les résultats préliminaires concernant les effets des sous-classes d'HDL, oxydées *in vitro* et de DT2, sur l'agrégation plaquettaire.
- une quatrième et dernière partie de conclusions ouvrant sur les perspectives.

BIBLIOGRAPHIE

Plaquettes sanguines

I. Structure et fonctions :

I.1. Introduction :

Les plaquettes, également nommées thrombocytes, sont de petites cellules anucléées de forme discoïde (2 à 3 μm de diamètre, 1 μm d'épaisseur, pour un volume moyen de l'ordre de 6 à 8 μm^3) circulant dans le sang et jouant un rôle primordial dans l'hémostase primaire et dans le processus de coagulation (figure 1).

Elles se forment dans la moelle osseuse par fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes [Behnke et Forer, 1998]. Le nombre de plaquettes varie entre 150000 et 400000 par μL de sang. Leur durée de vie est de 7 à 12 jours. Les plaquettes en fin de vie sont phagocytées par les macrophages du système réticulo-histiocytaire de la moelle osseuse, de la rate et du foie.

Elles sont dépourvues d'ADN mais contiennent des ARNm provenant des mégacaryocytes [Newman *et al.*, 1988] ainsi que la machinerie nécessaire à la traduction [Kieffer *et al.*, 1987].

Une diminution du nombre de plaquettes (appelée thrombopénie) entraîne un risque hémorragique important.

Une augmentation du nombre de plaquettes (appelée thrombocytose) provoque un risque de thrombose par formation d'agrégats plaquettaires provoquant une obstruction vasculaire, veineuse ou artérielle.

I.2. Structure :

I.2.a. Membrane plaquettaire :

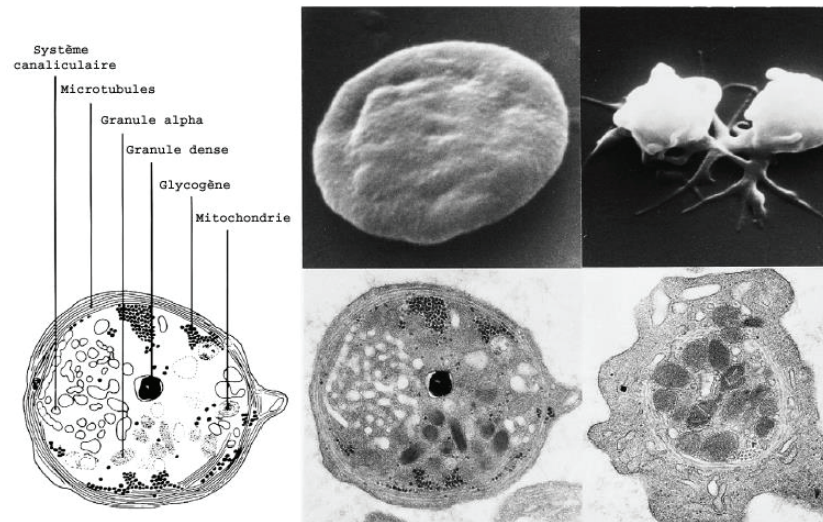


Figure 1 : *Micrographie électronique de plaquettes au repos et activées.*

D'après [George et al., 2000].

La membrane plasmique plaquettaire est asymétrique et très riche en phospholipides (PL) de 60 à 80 %. Les phosphatidylcholine (PC) et sphingomyéline (SM) sont majoritairement situées dans le feuillet externe, tandis que les PL dont la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI) sont majoritaires dans le feuillet interne, où ils servent de substrat des phospholipases. Au cours de l'activation plaquettaire, les PL chargés négativement migrent vers le feuillet externe, étape importante qui va promouvoir la coagulation en accélérant l'activation des facteurs de coagulation et la formation de thrombine.

De plus, la membrane comporte, insérés dans la bicouche lipidique, les récepteurs de la thrombine, de l'ADP, du thromboxane A_2 (TxA_2) entre autres ainsi que différentes glycoprotéines.

I.2.b. Cytosquelette :

Le cytosquelette est très développé et formé de microtubules et de microfilaments à base d'actine et de myosine. Un faisceau de 8 à 24 microtubules, formés de tubuline, en périphérie interne de la membrane plaquettaire, permet de maintenir la structure discoïde des plaquettes au repos. Un réseau de microfilaments d'actine, à la fois cytoplasmique et relié à la membrane, intervient dans la contraction, la dégranulation, la rétraction du caillot et l'émission de pseudopodes. Durant l'activation, la polymérisation de l'actine et de la myosine induit un changement de forme (aspect sphérique, émission de pseudopodes), une redistribution des granules plaquettaires et permet leur liaison avec des glycoprotéines membranaires faisant intervenir également la spectrine et l'actinine.

I.2.c. Cytoplasme :

Le cytoplasme contient les granules α , les granules denses, les mitochondries, les particules de glycogène, des lysosomes et des peroxysomes. Les granules α contiennent de nombreuses molécules : GPIIb-IIIa, P-sélectine, PECAM-1. La P-sélectine va se transloquer à la membrane externe de la plaquette lors de l'activation (la mise en évidence de P-sélectine à la surface plaquettaire est un bon témoin de l'activation plaquettaire).

Les granules denses contiennent les nucléotides dont l'adénosine 5'-diphosphate (ADP), l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) ainsi que ions calciques. Ces derniers sont libérés lors de l'activation, l'hydrolyse de l'ATP permettant la polymérisation de l'actine.

I.3. Fonctions :

Leur fonction majeure est d'arrêter immédiatement le saignement de la lésion vasculaire. Elles sont aussi impliquées dans la thrombose, la rétraction du caillot, l'angiogenèse, l'inflammation, le développement des lésions d'athérosclérose, l'infection, les défenses immunes et la dissémination tumorale.

L'hémostase primaire est l'ensemble des phénomènes physiologiques qui conduisent à l'arrêt du saignement suite à l'incision ou au dommage d'un vaisseau sanguin et à la formation d'un thrombus constitué par un agrégat. Elle comprend l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium, l'activation des plaquettes au cours de laquelle elles changent de forme et libèrent le contenu de leurs granules et l'agrégation des plaquettes entre elles (Tableau 1).

II. Adhésion.

L'étape d'adhésion est régulée finement par de nombreuses interactions ligands-récepteurs.

Lors d'une brèche vasculaire, l'endothélium est lésé et les plaquettes adhèrent au sous-endothélium. Différents composants de la matrice vasculaire (collagènes I, III, IV, V, VI, VIII, XII, XIII et XIV [Barnes et Farndale, 1999], vWF, fibronectine, laminine, fibuline et thrombospondine) sont exposés au flux sanguin et favorisent les interactions entre plaquettes et paroi vasculaire.

Dans des conditions de forces de cisaillement élevées (présentes dans les petites artères, les artérioles et les artères sténosées), le vWF circulant est essentiel à l'étape d'adhésion. Sa liaison au collagène exposé entraîne un changement conformationnel qui lui permet, entre autres, d'interagir avec le récepteur plaquettaire GPIb α (ou GPIb/V/IX) (signalisation « outside-in ») [Ruggeri *et al.*, 2000]. Cependant, cette interaction active le récepteur intégrine GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) et permet à la glycoprotéine GPVI de se lier au collagène. La glycoprotéine GPVI joue un rôle central dans l'adhésion des plaquettes au collagène et leur activation (signalisation « outside-in ») [Nieswandt *et al.*, 2001]. Elle initie la cascade de signalisation conduisant à la libération d'ADP et de TxA₂ et active *via* des signalisations « inside-out » le récepteur glycoprotéique GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$). Cette glycoprotéine lie, entre autres, le fibrinogène et le vWF, stabilisant l'adhésion des plaquettes à l'endothélium. Ensuite, les plaquettes s'étalent pour renforcer leur adhérence avec le substrat [Kuwahara *et al.*, 2002] (figure 2).

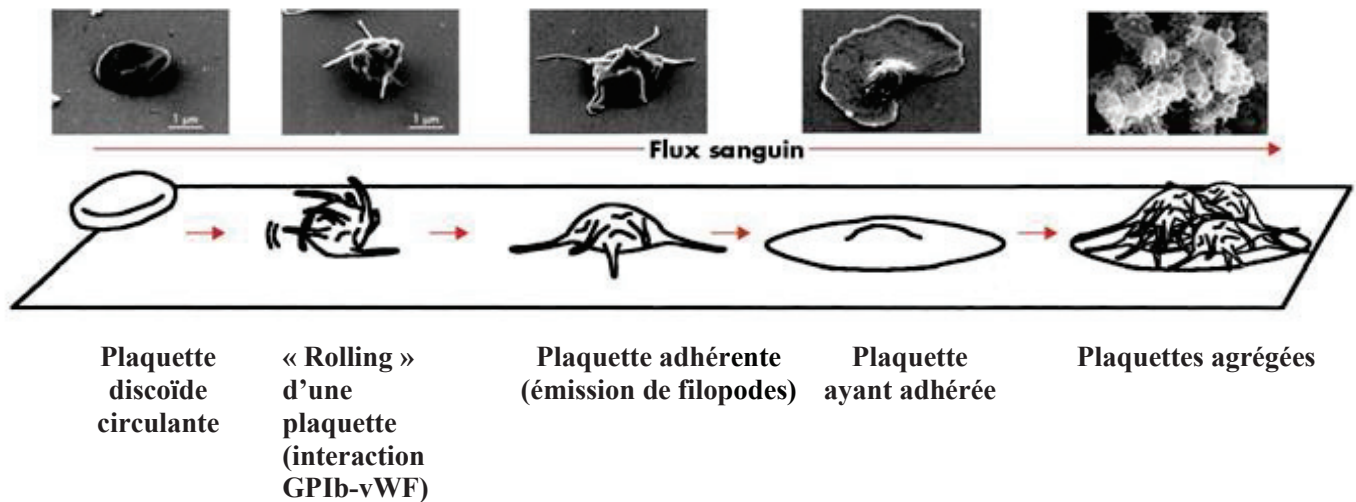


Figure 2 : *Etapes conduisant à l'adhésion plaquettaire suite à une lésion de l'endothélium en conditions de forces de cisaillement élevées.*
D'après [Kuwahara et al., 2002] .

Dans des conditions de forces de cisaillement plus faibles (présentes dans les veines et les grosses artères), l'adhésion plaquettaire au collagène se déroule principalement *via* le récepteur GPIa-IIa ($\alpha_2\beta_1$) [Saelman *et al.*, 1994].

Les plaquettes ayant adhéré recrutent à leur tour (par leurs sécrétions, leurs molécules d'adhérence...) d'autres plaquettes circulantes qui libèrent de nombreux médiateurs autocrines et paracrines, subissent un changement conformationnel, libèrent leur calcium et s'agrègent entre elles pour former un clou hémostatique initiant la formation du thrombus.

III. Activation :

III.1. Les agonistes :

De nombreux agonistes solubles sont susceptibles d'activer les plaquettes sanguines dont les plus importants sont l'ADP [Dangelmaier *et al.*, 2000], le TxA_2 [Saklatvala *et al.*, 1996], la thrombine, la collagène et la sérotonine. Ces médiateurs aux effets autocrines et paracrines agissent par

l'intermédiaire d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG). On compte près de 1000 à 2000 copies de ces récepteurs par plaquette, qu'il s'agisse des récepteurs du TxA₂, de la thrombine ou de la sérotonine. Les récepteurs de l'ADP sont moins nombreux.

III.2. Adénosine diphosphate :

L'ADP, stocké dans les granules denses, est sécrété dans le milieu extracellulaire lors de l'activation plaquettaire et potentialise l'agrégation induite par différents agonistes [Hechler *et al.*, 1998 ; Jin *et al.*, 1998a; Jin *et al.*, 1998b]. À la surface des plaquettes, l'ADP se lie aux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), P2Y₁ et P2Y₁₂ [Kunapuli *et al.*, 2003].

Le récepteur P2Y₁ est couplé à la protéine Gα_q, responsable du changement de forme des plaquettes et de l'activation de la phospholipase C (PLC) β [Jin *et al.*, 1998] qui résulte en une formation de diacylglycérol (DAG) induisant une libération des ions calcium du système tubulaire dense et activant la protéine kinase C ε (PKC) [Paul *et al.*, 1999]. La PKC ε régule négativement les réponses fonctionnelles induites par l'ADP, dont la mobilisation du calcium, l'activation des MAP kinases et de la cPLA₂, la formation du TxA₂ [Bynagari-Settipalli *et al.*, 2012]. En outre, [Leon *et al.*, 1999] ont montré que des souris invalidées pour le P2Y₁ n'agrègent plus en réponse à l'ADP et sont résistantes à un thrombo-embolisme induit par injection intraveineuse d'ADP ou de collagène et d'adrénaline.

Le récepteur P2Y₁₂ est couplé à la protéine Gα_{i2} qui active la voie des phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et inhibe l'adénylate cyclase et par conséquent diminue l'AMP cyclique (AMPc) ce qui favorise l'activation plaquettaire.

III.3. Collagène :

Le collagène est une protéine adhésive de la matrice extracellulaire. Les collagènes fibrillaires de type I et III sont les plus abondants au niveau de la paroi vasculaire. Les plaquettes expriment plusieurs récepteurs au collagène dont les principaux sont l'intégrine α₂β₁ (GPIa-IIa) et la glycoprotéine VI [Watson *et al.*, 1998]. L'intégrine α₂β₁ joue un rôle essentiel dans l'adhésion des plaquettes au collagène et augmente les interactions de la GPVI avec le collagène [Saelman *et al.*, 1994].

La GPVI est une protéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobines, associée au fragment FcR γ . Elle joue un rôle central dans l'adhésion des plaquettes au collagène fibrillaire et active fortement la signalisation intracellulaire [Nieswandt *et al.*, 2001]. La liaison du collagène à GPVI déclenche une cascade de signalisation conduisant à l'activation de l'intégrine α IIb β 3 (ou GPIIb/IIIa), le récepteur d'adhésion majoritaire des plaquettes (80000 copies par plaquette). La fixation du fibrinogène ou du facteur de von Willebrand Factor (vWF) sur la α IIb β 3, stabilisant l'adhésion des plaquettes à l'endothélium, conduit à une signalisation « outside-in » augmentant l'affinité de α 2 β 1 (ou GPIa-IIa) pour le collagène (2000 à 4000 copies/plaquette) [Nieswandt et Watson, 2003].

III.4. Thrombine :

La thrombine appartient à la superfamille des protéases à sérine. Elle transforme le fibrinogène soluble en fibrine insoluble, étape clé de la coagulation. C'est aussi un puissant agoniste plaquettaire. Les plaquettes humaines possèdent 500 sites de haute affinité pour la thrombine, et près de 50 000 sites de faible affinité [Tollefsen *et al.*, 1974]. Les récepteurs de la thrombine exprimés par les plaquettes sanguines humaines sont PAR-1 (« protease activated receptor ») et PAR-4 [Kahn *et al.*, 1999] couplés aux protéines G12/13 [Offermanns *et al.*, 1994] et Gq. PAR-1 est aussi couplé à Gi. PAR-1 induit l'activation en réponse à de faibles concentrations de thrombine alors que PAR-4 l'induit en réponse à de fortes concentrations de thrombine. La thrombine interagit aussi avec GPIb [Lova *et al.*, 2004].

La thrombine a de nombreux effets plaquettaires. Elle induit le changement de forme, la sécrétion, la génération de TxA₂, la mobilisation du Ca²⁺, l'activation de la PLC β , la phosphorylation des protéines MAP kinases et l'agrégation.

III.5. Facteur Von Willebrand:

Le vWF est une protéine multimérique de haute masse moléculaire synthétisée majoritairement par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Il est stocké dans les granules alpha et

sécrété suite à l'activation des plaquettes par divers agonistes. Dans des conditions de forces de cisaillement élevées, présentes dans les artères de faible diamètre, artérioles et en amont des sténoses artérielles, le vWF se lie au collagène exposé de la matrice sous-endothéliale et change de conformation. Il interagit avec le complexe GPIb/V/IX (25000 copies/plaquette) ce qui permet l'adhésion transitoire des plaquettes à la surface du sous-endothélium et conduit à l'activation et à la sécrétion du contenu des granules plaquettaires ainsi qu'à l'activation de différentes intégrines dont l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ [Ruggeri *et al.*, 2000].

L'interaction entre le vWF et la GPIb-IX induit une augmentation de la concentration en cGMP intracellulaire et entraîne l'activation séquentielle des protéines kinases dépendantes de cGMP (PKG), des p38 MAPK et des ERK. La voie de signalisation cGMP est activée en aval par la cascade Lyn / PI3K / Akt qui est connue pour activer la NO synthase (NOS).

IV. Agrégation :

L'agrégation est l'étape qui conduit à l'accumulation de plaquettes formant le thrombus blanc. Cette accumulation est basée sur de multiples interactions plaquettes/plaquettes et est médiée par des substrats d'adhésion liés aux membranes des plaquettes. Il existe plusieurs mécanismes distincts pouvant initier l'agrégation plaquettaire en fonction des conditions de vitesses de cisaillement. A des taux de cisaillement inférieurs à 1000 s^{-1} , le fibrinogène engagé à la surface des plaquettes adhérentes interagit avec le récepteur GPIIb/IIIa des plaquettes circulantes pour former des ponts interplaquettaires. Les agonistes solubles produits permettent un changement de forme et une augmentation de l'activation de GPIIb/IIIa qui stabilise ainsi le thrombus. L'agrégation plaquettaire est régulée dans sa phase finale par l'activation du récepteur GPIIb/IIIa quel que soit l'élément déclencheur (ADP, thrombine, collagène ou vWF).

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

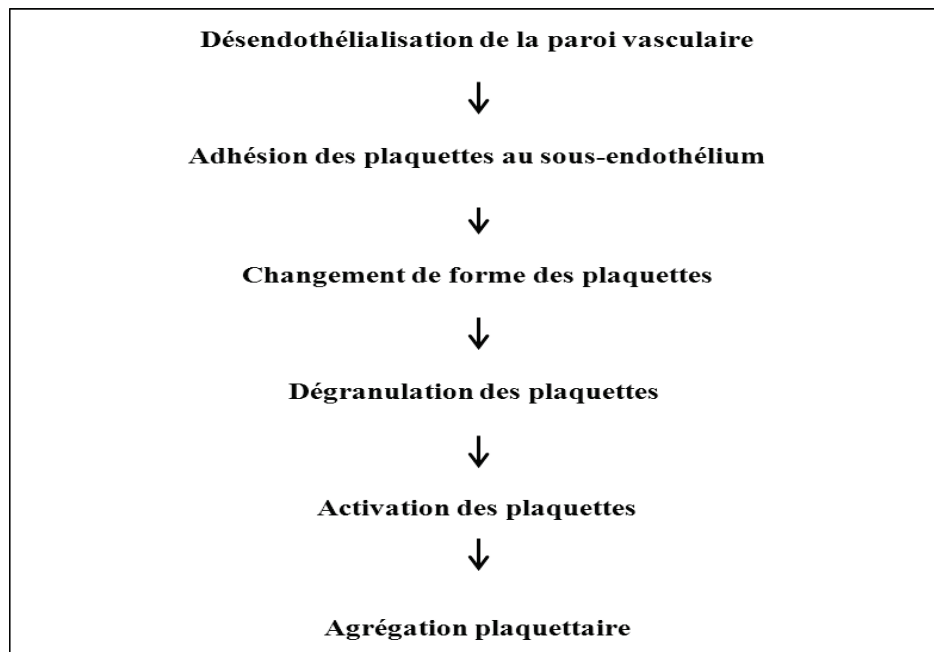


Tableau 1 : Principales étapes d'activation plaquettaire.

V. Voies de signalisation plaquettaires :

V.1. Phospholipase C :

Bien que les voies de signalisation activées par les différents récepteurs plaquettaires soient différentes, les voies de signalisation intracellulaire en aval sont communes. En particulier, presque tous les agonistes induisent une activation de PLC [Brass *et al.*, 1987].

Les plaquettes contiennent 3 isoformes de PLC (β , γ et δ), qui sont régulées par différents mécanismes connexes impliquant des protéines G hétérotrimériques et des protéines tyrosine kinases (PTK). Sept isoformes sont présentes dans les plaquettes et dans l'ordre décroissant suivant $\gamma 2 > \beta 2 > \beta 3 > \beta 1 > \gamma 1 > \delta 1 > \beta 4$ [Lee *et al.*, 1996].

Les PLC sont des enzymes spécifiques des phosphoinositides (phosphatidylinositol (PI), phosphatidylinositol phosphate (PIP), phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂)) qu'elles convertissent en inositol phosphates (respectivement inositol phosphate (IP), inositol

bisphosphate (IP2) et inositol trisphosphate (IP3)) et en diacylglycérol (DAG). Selon les récepteurs impliqués, différentes isoformes de PLC sont activées selon des mécanismes spécifiques. Le collagène conduit à la phosphorylation des résidus Tyrosine de la tyrosine kinase Syk [Blake *et al.*, 1994] et de la PLC γ 2 [Mangin *et al.*, 2003]. La PLC γ 2 doit être relocalisée aux membranes, près de son substrat PIP2, via le PIP3 (produit de la PI3K) pour induire la génération des seconds messagers IP3 et DAG.

V.2. Libération de calcium par IP3 :

Le rôle du calcium cytosolique dans l'activation plaquettaire est essentiel. L'IP3 se lie à ses récepteurs du système tubulaire dense, conduisant à la libération du calcium et à l'augmentation de la concentration cytosolique du calcium [Irvine, 1990], passant de 100nM à 1 μ M suite à une stimulation par l'agoniste. Il se produit aussi un influx de calcium extracellulaire *via* les canaux TRPC «transient receptor potential cation channels» et les CRAC (Ca²⁺ Release-Activated Calcium Channels).

L'élévation du calcium cytosolique induit l'interaction entre l'actine et la myosine, active la PKC, la calmoduline, la NOS et des protéases. L'élévation de calcium stimule différentes voies de signalisation dont les SFKs (Src family kinases) et la voie PI3K /Akt [Xiang *et al.*, 2012].

V.3. Activation de la protéine kinase C par le DAG :

Le DAG est, quant à lui, responsable de la translocation membranaire et de l'activation de la PKC qui va contribuer à l'activation d' α IIB β 3 [Shattil et Brass, 1987] et à la libération d'acide arachidonique (AA) [Halenda et Rehm, 1987] *via* la cascade p38MAPK et cPLA₂.

Les plaquettes expriment plusieurs isoformes de la famille PKC, y compris les isoformes conventionnelles dépendantes du calcium et du DAG, que sont les PKC α , β et γ , les nouvelles isoformes PKC (δ , θ , et η) dépendantes de DAG et indépendantes du calcium et l'isoforme atypique zêta ζ indépendante du calcium et du DAG. Leur localisation peut être cytosolique ou membranaire [Cockcroft et Thomas, 1992].

Les PKC classiques, en particulier la PKC α , jouent un rôle critique dans l'agrégation plaquettaire. La PKC- δ est nécessaire pour l'activation d' α IIb β 3 et l'agrégation induite par le collagène. Les PKC δ et θ sont impliquées dans la sécrétion du contenu des granules denses en réponse à la thrombine. Les PKC δ potentialisent l'activation des voies ERK et p38 « Mitogen Activated Protein Kinase » (MAPK) [Yacoub *et al.*, 2006] et la libération de thromboxane A₂.

V.4. Les p38 MAPK :

Les p38 MAPK (α , β , γ et δ ou SAPK2a/2b/3/4 respectivement) font partie de la superfamille des sérine/thréonine protéines kinases [Pearson *et al.*, 2001]. Les p38 MAPK sont activées par une variété de stress environnementaux comme les radiations ionisantes, les UV, les protéines de choc thermique, le choc osmotique, le stress oxydant ainsi que par les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF α).

Les signaux déclenchés sont transmis par des cascades de signalisation qui conduisent à l'activation de petites GTPases de la famille Rho (Rac, Cdc42). Ce processus va activer une MAP3K, typiquement une MEKK ou une kinase de lignée mixte (MLCK). La MAP3K phosphorylée active les MAPKK, les MEK3 et MEK 6, qui activent la p38MAPK, laquelle phosphoryle les résidus Ser et Thr de nombreux substrats.

Les plaquettes sanguines contiennent les MAPK suivantes : ERK1/2 (ou p42/p44MAPK) [Papkoff *et al.*, 1994], JNK1 [Bugaud *et al.*, 1999] et les p38 MAPK α , β , γ et δ [Börsch-Haubold *et al.*, 1999]. Ces dernières sont activées par phosphorylations de la Thr180 et de la Tyr182 en réponse à de nombreux stimuli de stress endogènes et exogènes.

Dans les plaquettes, le collagène, la thrombine et le vWF stimulent la phosphorylation rapide des p38 MAPK. La p38MAPK est essentielle à l'activation de la cPLA₂ [Börsch-Haubold *et al.*, 1998] puisque la phosphorylation de la cPLA₂ induite par le collagène ou la thrombine est diminuée suite à l'inhibition de la p38MAPK, conduisant à une diminution de la libération d'AA et de la synthèse du TxA₂.

V.5. La phospholipase A₂ cytosolique :

La cPLA₂ (PLA₂ IV A) fait partie de la superfamille des phospholipases A₂ (PLA₂) comprenant en outre les PLA₂ sécrétées (sPLA₂), les PLA₂ indépendantes du Ca²⁺, les iPLA₂, les « platelet activating factor » (PAF)-acétylhydrolases (PAF-AH) et les PLA₂ lysosomales [Burke et Dennis, 2009]. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse spécifique de la liaison ester en position sn-2 des PL pour donner un acide gras libre et un lysophospholipide.

La cPLA₂ de 85 kDa joue un rôle central dans la libération de l'AA qui se produit dans plusieurs types de cellules en réponse à une grande variété de stimuli [Clark *et al.*, 1991]. La cPLA₂ possède une dyade catalytique Ser/Asp et nécessite des concentrations submicromolaires de Ca²⁺ pour son activité. Son interaction avec un domaine de liaison aux lipides CaLB (Calcium/lipid-binding domain, CaLB) et la présence de Ca²⁺ permettent à la cPLA₂ de se transloquer du cytoplasme à la membrane [Evans *et al.*, 2001] et d'accéder à son substrat préférentiel, les PL contenant l'AA [Clark *et al.*, 1991]. Cependant, sa liaison avec des messagers lipidiques secondaires comme le PIP₂ (4,5) ou le céramide 1-phosphate augmentent son activité catalytique indépendamment du Ca²⁺ [Mosior *et al.*, 1998] et son temps de résidence à la membrane [Subramanian *et al.*, 2007]. La phosphorylation des Ser-505 et Ser-727 par la p38 MAPK est le deuxième facteur essentiel à l'activation de la cPLA₂ [Börsch-Haubold *et al.*, 1998]. Une fois transloquée et activée par phosphorylation, la cPLA₂ libère l'AA des PL membranaires.

V.6. La cascade de l'acide arachidonique :

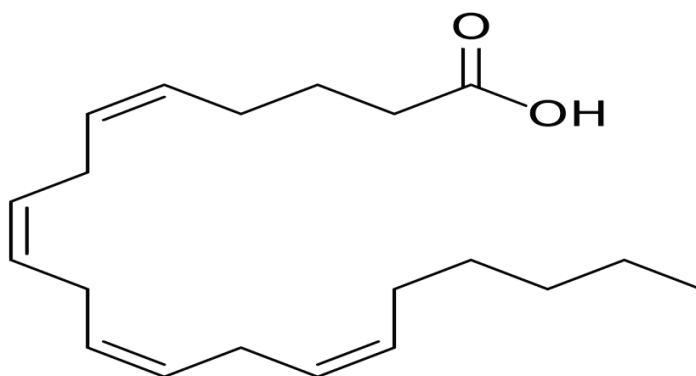


Figure 3 : Structure de l'acide 5, 8, 11, 14 eicosatétraénoïque (20:4n-6, acide arachidonique).

L'AA est un AGPI constitué de 20 carbones et de 4 liaisons éthylènes (4 insaturations : carbones 5, 8, 11 et 14). Il représente 20% de l'ensemble des AG membranaires plaquettaires [Marcus *et al.*, 1969] est estérifié en position sn-2 des PL, et représente l'un des substrats les plus importants dans la synthèse de médiateurs biologiques (figure 3).

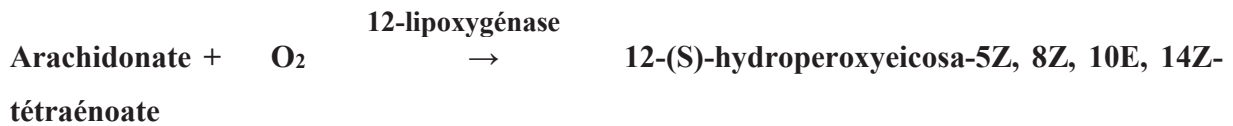
V.6.a. Prostaglandine G/H synthase :

La PGHS est une enzyme bifonctionnelle possédant une activité cyclooxygénase (COX) et une activité hydroperoxydase. Elle reconnaît spécifiquement des AG à 20 carbones possédant 3 doubles liaisons en 8, 11 et 14 (tels l'AA, l'acide dihomog- γ -linolénique et l'acide eicosapentaénoïque) et permet la production de différentes prostaglandines (PG) [Smith *et al.*, 1991].

La PGHS convertit l'AA de manière régio- et stéréo spécifique [Schneider *et al.*, 2007], en PGG₂ (activité COX) puis en PGH₂ (activité hydroperoxydase) qui est le précurseur de tous les prostanoides synthétisés en aval par différentes voies enzymatiques comme la thromboxane synthase, la prostacycline synthase et plusieurs prostaglandine-isomérases ou réductases. Il existe trois isoformes de COX: la COX-1 constitutive, la COX-2 inducible et la COX-3 [Chandrasekharan *et al.*, 2002]. Les plaquettes n'expriment néanmoins que la COX-1 [Vane *et al.*, 1998, Patrignani *et al.*, 1999]. Dans les plaquettes, la PGH₂ est convertie en TxA₂ (proagrégant) par la thromboxane synthase [Needleman *et al.*, 1976]. En même temps, l'enzyme catalyse la production d'un acide gras hydroxylé (AGOH), l'acide 12-hydroxy-5,8,10-heptadécatriénoïque (HHT) et du dialdéhyde malonique (MDA) par coupure du cyclopentane de la PGH₂ [Haurand et Ullrich, 1985]. Contrairement au TxA₂, les MDA et HHT peuvent également être produits non enzymatiquement par peroxydation des AGPI. L'activité des prostanoides est très variable. Le TxA₂ diffuse ensuite à travers la membrane plasmique pour agir de manière autocrine ou paracrine sur les plaquettes à proximité via les récepteurs du thromboxane (prostanoid TP receptor). En outre, il induit diverses réactions physiopathologiques dont l'activation, le changement de forme, l'agrégation et la sécrétion plaquettaires et finalement promeut la formation du thrombus. Par contre, le TxA₂ ayant une demi-vie d'environ 30 secondes, est rapidement hydrolysé en TxB₂ inactif [Hamberg et Samuelsson, 1974]. Par contre, HHT a un effet inhibiteur sur l'agrégation plaquettaire induite par les analogues de PGH₂ [Croset et Lagarde, 1983]. La PGH₂ peut également être prise en charge par diverses prostaglandines

synthèses pour former les prostaglandines primaires PGE₂ (Prostaglandine E₂), PGD₂ (Prostaglandine D₂) et PGF₂α (Prostaglandine F₂α).

V.6.b. 12-lipoxygénase :



Dans les plaquettes sanguines, la 12-lipoxygénase (12-LOX) [Hamberg et Samuelsson, 1974] est une dioxygénase présente dans le cytoplasme puis transloquée à la membrane suite à l'activation [Ozeki *et al.*, 1999]. Elle catalyse l'addition d'une molécule d'oxygène sur le carbone 12 de l'AA pour donner l'acide 12(S)-hydroperoxy-5,8,10,14-eicosatétraénoïque (12(S)-HpETE). Ce dernier est réduit en acide 12(S)-hydroxy-5,8,10,14-eicosatétraénoïque (12(S)-HETE) par la glutathion peroxydase cytosolique. La 12-LOX peut aussi métaboliser le LA. A fortes concentrations, le 12-HpETE (5μM) inhibe la COX [Siegel *et al.*, 1979] tandis qu'à de faibles concentrations, il l'active (100nM) [Calzada *et al.*, 1997]. De plus, le 12-HpETE active sa propre synthèse en augmentant l'activité de la 12-LOX plaquettaire humaine [Croset et Lagarde, 1985].

VI. Les récepteurs plaquettaires des lipoprotéines :

VI.1. « Scavenger receptor B I » :

VI.1.a. Structure :

Le récepteur éboueur ou « scavenger » de type I de classe B (SR-BI) a été découvert en 1993 [Calvo et Vega, 1993] dans les hépatocytes et fait partie de la grande famille des CD-36. Ils partagent de 20 à 30 % d'homologie au niveau des résidus acides aminés. Le récepteur SR-BI est une glycoprotéine membranaire de 509 acides aminés et de masse moléculaire 82 kDa, constituée d'un grand domaine extracellulaire riche en résidus de cystéine et de 11 sites de N-glycosylation, de deux domaines transmembranaires et de deux domaines cytoplasmiques (côté

N-terminal et C-terminal). Sur les 11 sites glycosylés, toutefois la perturbation de seulement deux sites (Asn-108 et Asn-173) par mutation dirigée induit des impacts conséquents sur la fonction et l'expression de SR-BI. Bien que les faibles niveaux de mutants 108 et 173 exprimés sur la surface cellulaire aient montré une réduction marquée de leur capacité à transférer des lipides des HDL vers les cellules, ils n'altèrent pas leur capacité à lier des HDL. La N-glycosylation peut influencer à la fois le transport intracellulaire et l'activité de transport des lipides de SR-BI [Viñals *et al.*, 2003].

Du côté C-terminal cytoplasmique de SR-BI se lie la protéine PDZK1 adaptateur cytosolique multimérique de 70kDa. PDZK1 possède 4 domaines d'interaction protéiques PDZ dans sa séquence primaire (figure 4). PDZK1 est essentielle pour assurer la stabilité de SR-BI dans les hépatocytes [Yesilaltay *et al.*, 2006, Kocher *et al.*, 2009] et pour la signalisation médiée par les HDL *via* SR-BI dans les cellules endothéliales [Li *et al.*, 2002 ; Yuhanna *et al.*, 2001 ; Mineo *et al.*, 2006, 2007].

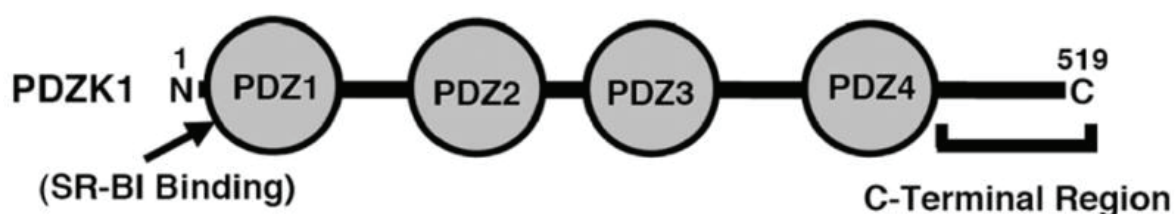


Figure 4 : Séquence de PDZK1 du récepteur SR-BI.

D'après [Kocher et Krieger, 2009].

Le récepteur SR-BI est exprimé dans de nombreux tissus et cellules, et notamment dans les tissus impliqués dans la captation des EC par le foie et les tissus stéroïdogéniques mais aussi dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les macrophages et les plaquettes. SR-BI a été initialement identifié comme un récepteur spécifique des HDL par le groupe d'Acton en 1996 [Acton *et al.*, 1996].

VI.1.b. Ligands :

Il lie une grande variété de ligands, incluant les HDL (natives ou oxydées) [Valiyaveetil *et al.*, 2008], les LDL (natives, acétylées ou oxydées) [Krieger *et al.*, 2001], les VLDL et les PL anioniques ou oxydés, les EC, les apolipoprotéines (apoA-I, apoA-II), la lipoprotéine(a) [Acton *et al.*, 1996, Yang *et al.*, 2013; Krieger, 2001] , les cellules apoptotiques [Li *et al.*, 2005], les AGE (advanced glycation end products) [Cai *et al.*, 2005; Ohgami *et al.*, 2003], le peptide β -amyloïde, l'apoE dépourvue en lipides, la glycoprotéine E₂ de l'enveloppe du virus de l'hépatite C.

VI.1.c. Fonctions :

Le rôle le plus important de SR-BI est d'être le récepteur majeur des HDL, et de médier le transport sélectif des EC des HDL vers les cellules et de participer à l'efflux du cholestérol cellulaire vers les HDL matures. Le récepteur SR-BI stimule également le flux bidirectionnel de cholestérol entre les lipoprotéines et les cellules [Ji *et al.*, 1997 ; Stangl *et al.*, 1999 ; Yancey *et al.*, 2003 ; Phillips, 2014 ; Rigotti *et al.*, 2000]. Les souris SR-BI $-/-$ & apoE $-/-$ ont un phénotype lipoprotéique anormal, développent des maladies artérielles occlusives et meurent prématurément d'infarctus du myocarde [Braun *et al.*, 2002].

Il a été démontré que le récepteur SR-BI lie les HDL natives, des HDL reconstituées en forme de disque contenant l'ApoA-I ou l'apoE. L'affinité entre les sous-classes d'HDL et SR-BI dépend principalement de la conformation d'apoA-I, et de la structure des HDL. Plus la taille de la particule est importante, plus l'affinité de SR-BI pour les HDL est élevée [de Beer *et al.*, 2001, Liadaki *et al.*, 2000].

VI.1.d. SR-BI et plaquettes :

Les plaquettes humaines expriment aussi le récepteur SR-BI [Imachi *et al.*, 2003]. Outre son rôle dans le métabolisme du cholestérol, le SR-BI joue un rôle important dans la régulation de l'agrégation plaquettaire et de la thrombose, notamment dans des conditions hyperlipidémiques [Dole *et al.*, 2008 ; Ma *et al.*, 2010]. SR-BI a été identifié comme le récepteur plaquettaire des

HDL3 et serait le récepteur-clé de l'inhibition de l'agrégation plaquettaire médiée par HDL3 [Nofer *et al.*, 1998]. L'expression réduite du SR-BI plaquettaire chez des patients diabétiques souffrant d'athérosclérose a été associée à une augmentation de l'agrégation plaquettaire [Imachi *et al.*, 2014]. La présence de phospholipides chargés négativement (PS, PI) ainsi que l'enrichissement des HDL3 en PS potentialiseraient l'effet antiagrégant des HDL3 [Brodde *et al.*, 2011].

D'autre part, l'équipe de Podrez a été la première à montrer que les HDL modérément oxydées *in vitro* par le cuivre inhibent l'activation des plaquettes induite par les agonistes *via* le récepteur SR-BI et non *via* CD-36, ayant été montré être un récepteur des HDL oxydées et participant à leur captation par les macrophages [Thorne *et al.*, 2007].

L'activité anti-agrégante des HDL oxydées pourrait être attribuable à la présence des PL oxydés qui augmenteraient la charge négative des particules et leur affinité pour SR-BI. La même équipe a également démontré que des PL oxydés ne se lient pas spécifiquement à SR-BI [Ashraf *et al.*, 2008]. A l'inverse, les HDL fortement oxydées modifieraient la structure des HDL et lieraient CD-36.

VI.1.e. Impact du diabète de type 2 sur l'expression de SR-BI :

L'expression de SR-BI, récepteur des HDL exprimé dans les plaquettes, est inversement associée au pourcentage d'agrégation plaquettaire chez des patients DT2 [Imachi *et al.*, 2014]. De plus, les HDL de DT2 diminuent l'expression de SR-BI dans les cellules endothéliales (HUVEC) [Pan *et al.*, 2012] et diminuent la capacité des HDL à stimuler la prolifération et la migration des cellules endothéliales.

Le diabète stimule l'expression de SR-BI dans les macrophages de souris diabétiques traitées par la streptozotocine conduisant à une réduction de l'efflux de cholestérol médié par les HDL et à une augmentation du cholestérol intracellulaire [Gantman *et al.*, 2010]. Ces résultats suggèrent que lors du diabète, SR-BI peut induire une captation d'EC des HDL par les macrophages et augmenter la formation de cellules spumeuses.

Les protéines modifiées par les AGE, ligands de SR-BI, inhibent à la fois la captation sélective d'EC médiée par SR-BI et l'efflux de cholestérol des cellules périphériques vers les HDL [Ohgami *et al.*, 2003].

En outre, il a été récemment montré que l'affinité de protéines modifiées par les AGE à SR-BI dépend du degré de modification induit par les AGE [Nagai *et al.*, 2007]. Seul le complexe AGE-albumine fortement modifié pourrait être significativement reconnu par SR-BI, tandis que le complexe AGE-albumine modifié légèrement ou physiologiquement n'aurait aucun effet sur SR-BI. Par contre, les produits d'oxydation protéiques avancés (AOPPs) transportés par les protéines plasmatiques oxydées, en particulier l'albumine, s'accumulent chez les patients atteints d'une insuffisance rénale, de maladie artérielle ou coronarienne, ou de DT2.

VI.2. CD-36 :

VI.2.a. Structure :

Le récepteur CD36 est une glycoprotéine transmembranaire de 88 kDa. Le gène codant CD36, qui est situé sur le chromosome 7 (7q11. 2), se compose de 15 exons [Calvo *et al.*, 1995 ; Febbraio *et al.*, 2001].

La protéine CD36 se compose de 472 acides aminés et d'une seule chaîne peptidique en forme d'épingle à cheveux, organisée en deux domaines transmembranaires, un grand domaine extracellulaire fortement glycosylé [Hoosdally *et al.*, 2009] et deux extrémités cytoplasmiques très courtes.

Le récepteur CD-36 est exprimé dans divers types cellulaires, y compris les monocytes, macrophages, plaquettes, cellules endothéliales microvasculaires, adipocytes, cellules épithéliales du rein et myocytes [Asch *et al.*, 1987; Febbraio *et al.*, 2001].

VI.2.b. Ligands :

Le récepteur CD36 reconnaît de nombreux ligands, dont la thrombospondine-1 [Asch *et al.*, 1992], le collagène [Tandon *et al.*, 1989], les AG à longue chaîne, les DAG microbiens, certains PL oxydés, les

lipoprotéines natives ou oxydées, le peptide β -amyloïde. La diversité des ligands explique les nombreuses fonctions de CD-36. Le CD36 a un rôle physiologique important dans la captation d'AG libres à longue chaîne [Dawson *et al.*, 1997], dans les myocytes, utilisées pour la bêta-oxydation lors de la contraction musculaire et le stockage des lipides dans les adipocytes [Abumrad *et al.*, 1993]. Dans les macrophages, les LDL glyquées sont également reconnues par CD36 et SR-A [Brown *et al.*, 2007]. L'activation combinée de CD36 et SR-A conduit à l'activation de la p38 MAPK plaquettaire par les LDL oxydées [Korporaal *et al.*, 2007].

Les ligands de CD36 transportés par les LDL oxydées ne sont pas totalement caractérisés mais sont d'origine lipidique. En effet, les LDL oxydées délipidées ne sont pas reconnues par CD36 alors que des liposomes de PL anioniques se lient au CD36 [Nicholson *et al.*, 1995; Rigotti *et al.*, 1995; Ryeom *et al.*, 1996]. Il a été montré que des PC oxydées [Podrez *et al.*, 2002] se lient au CD36 et induisent l'activation plaquettaire.

VI.2.c. Fonctions :

CD-36 a des effets pléiotropiques en fonction des cellules où il est exprimé. Dans les macrophages, il promeut l'endocytose. Le CD36 se lie à plusieurs ligands et sert de médiateur à différents processus biologiques. Des études récentes ont démontré que le CD36 est impliqué dans la progression de l'athérosclérose et que la délétion génétique de CD36 ou un blocage de la cascade de signalisation induite par CD36 réduit la formation de lésions d'athérosclérose. Le site de liaison pour les oxPL est situé dans les résidus 157 à 171, et le site de liaison pour les LDL oxydées est à proximité des résidus de 155 à 183 [Puente Navazo *et al.*, 1996]. Il joue un rôle important dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques tels que le métabolisme lipidique (transport d'AG), les réponses immunitaires innées, l'angiogenèse, l'athérogenèse, le diabète [Febbraio *et al.*, 2001] et l'activation plaquettaire [Aiken *et al.*, 1990] par les LDL oxydées [Chen *et al.*, 2008] et le flux de cholestérol .

VI.2.d. Rôle de CD-36 dans les plaquettes :

Les plaquettes expriment CD-36 qui possèdent en moyenne 12000 récepteurs par plaquette [Aiken *et al.*, 1990]. Il interagit avec le collagène et la thrombospondine notamment et régule l'activation plaquettaire. Podrez *et al.*, (2007) ont montré que les LDL oxydées se lient à CD36 et activent les plaquettes via l'expression de la P-sélectine et l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Le groupe de Silverstein a confirmé que les LDL oxydées se lient à CD36 ce qui conduit à la phosphorylation des Vav et de Jun kinase (JNK) via la phosphorylation des kinases de la famille Src (Fyn et Lyn) promouvant la formation de thrombus chez la souris [Chen *et al.*, 2008 ; 2011].

Certains PL oxydés possédant une forte affinité pour CD-36, nommés oxPL_{CD-36}, activent les plaquettes en se fixant sur CD-36 et *via* la cascade de signalisation Src, Syk et phospholipase C- γ [Zimman *et al.*, 2014]. Une étude récente de [Badrnya *et al.*, 2013] renforce cette observation en élucidant le rôle de CD36 dans ce processus. Les plaquettes interagissent avec les LDL oxydées et libèrent des chemokines qui favorisent l'athéroclérose [Siegel-Axel *et al.*, 2008].

VI.2.e. HDL oxydées et CD-36 :

Les HDL fortement oxydées par l'hypochlorite (généré par la myéloperoxydase) se lient spécifiquement à CD-36, potentialisent l'agrégation plaquettaire et induisent l'externalisation de la PS sur le feuillet externe des membranes et la libération du contenu des granules α . CD-36 lie aussi les HDL3 natives et médient leur effets inhibiteurs sur l'agrégation plaquettaire [Brodde *et al.*, 2011].

Dans les macrophages, la captation des HDL oxydées par CD-36 accélère la formation des cellules spumeuses. Par contre, les HDL oxydées peuvent réguler négativement l'expression à la fois de l'ARNm et de la protéine CD36.

L'inhibition de l'expression de CD-36 se produit via une phosphorylation de PPAR γ par la p38 MAPK, ce qui peut inhiber la captation des HDL oxydées par les macrophages.

Lipoprotéines

I. Généralités :

Les lipides exogènes apportés par l'alimentation et les lipides endogènes synthétisés par le foie sont transportés entre les tissus périphériques, les organes et les cellules par les lipoprotéines. Les lipoprotéines sont des macromolécules sphériques et hydrosolubles dont la densité, la taille, la composition en lipides et protéines, et les fonctions varient. Elles constituent une entité dynamique puisqu'elles subissent de nombreux remaniements au cours de leur circulation sous l'action d'enzymes lipolytiques et des protéines de transfert de lipides. Toutes sont cependant constituées d'un cœur hydrophobe qui comprend des lipides apolaires EC et TAG et d'une enveloppe périphérique amphiphile constituée d'une monocouche de PL polaires dans laquelle sont insérées des molécules de cholestérol non estérifié et différentes apolipoprotéines liées de façon non covalente aux lipides.

Cinq classes sont classiquement identifiées en fonction de leur densité par ultracentrifugation, méthode de référence pour leur séparation : les chylomicrons (CM), les lipoprotéines de très basse densité (ou VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (ou IDL), les lipoprotéines de basse densité (ou LDL) et les lipoprotéines de haute densité (ou HDL) (tableau 2).

II. Classes de lipoprotéines hormis les HDL :

II.1. Chylomicrons (CM) :

Les CM sont synthétisés au niveau des entérocytes sous forme de CM natifs qui sont libérés dans la circulation lymphatique mésentérique puis dans la circulation sanguine. Ce sont les particules lipoprotéiques ayant la plus faible densité ($< 0,93$ g/mL), la demi-vie la plus brève (quelques minutes) mais étant par contre les plus grosses en taille (100-500 nm de diamètre). Les CM contiennent essentiellement des TAG (85-92%), de 6 à 12% de PL, de 1 à 3% de cholestérol et de 1 à 2% de protéines dont principalement l'apo B-48. Ils assurent le transport des TAG alimentaires vers le muscle et le tissu adipeux et celui du cholestérol alimentaire vers le foie. Une fois dans la circulation sanguine, les TAG des CM sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) plasmatique, activée par l'apo CII, en glycérol et en AG. Les particules résiduelles de CM en résultant (ou

«remnants» de CM), de plus petite taille, sont captées par le foie grâce à la liaison de l'apo E à des récepteurs spécifiques. La lipolyse des CM et VLDL conduit aussi au transfert des composés de surface (PL, cholestérol et certaines apolipoprotéines) vers les HDL.

II.2. Lipoprotéines de très basse densité (VLDL) :

Le foie produit et sécrète les VLDL, particules de taille hétérogène (de 30 nm à 80 nm) composées principalement d'apoB-100 et d'autres apolipoprotéines (apo E, apo C) ainsi que de quantités variables de TAG, EC, PL et cholestérol.

Suite à l'hydrolyse des TAG des VLDL par la LPL, une partie des particules résiduelles de VLDL est recaptée par les hépatocytes *via* la liaison de l'apoE au LDL-R.

Une autre partie des VLDL circulantes est convertie en IDL suite à l'hydrolyse de leurs TAG par la LPL. Les IDL, appauvries en TAG et enrichies en EC, sont transformées en LDL par la lipase hépatique.

II.3. Lipoprotéines de basse densité (LDL) :

Les LDL sont des particules de petite taille (de 18 à 25 nm) contenant une molécule d'apoB-100 par particule et sont les plus riches en EC parmi les différentes classes lipoprotéiques. Les LDL se fixent par l'intermédiaire de l'apo B-100 sur leur récepteur membranaire LDL-R, découvert par Brown et Goldstein [Brown et Goldstein, 1986]. Les complexes LDL/LDL-R sont internalisés par endocytose dans les tissus périphériques ou le foie. Alors que les récepteurs des LDL sont recyclés vers la membrane cellulaire, les apolipoprotéines et les EC des LDL sont catabolisés par les enzymes lysosomales en acides aminés, AG et cholestérol non estérifié, respectivement. Les LDL transportent environ 2/3 du cholestérol circulant.

Lipoprotéines	Chylomicrons	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3
Densité (g/mL)	< 0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,125	1,125-1,21
Taille (nm)	100-500	30-80	25-35	18-25	8,8-12,9	7,2-8,8
Mobilité électrophoretique	origine	pré-β	β	β	α	
Protéines (%)	2	8	14	22	35-45	55-65
Lipides (%)	98	92	86	78	65-55	45-35
Principales apolipoprotéines	B-48, C-I, II et III, E	B-100, C-I, II et III, E	B-100, E	B-100	A-I, II et IV, C-I, II et III, E, D	
Principaux lipides	TAG	TAG	TAG	EC	PL/EC	PL/EC
Temps de demi-vie	6 minutes	4-6 heures	2 minutes	2-3 jours	4 jours	7 jours

Tableau 2 : *Caractéristiques des lipoprotéines plasmatiques humaines.*

III. Lipoprotéines de haute densité (HDL) :

Les HDL sont les lipoprotéines ayant la plus haute densité et la plus petite taille.

III.1. Biosynthèse des HDL :

Les HDL ont 3 origines. Elles sont principalement synthétisées par le foie [Zannis *et al.*, 1982], mais aussi par l'intestin [Brunham *et al.*, 2006] et sont aussi produites *via* le métabolisme des CM et des VLDL.

Les HDL naissantes sont constituées de l'assemblage d'apolipoprotéines dont principalement l'apoA-I, l'apoA-II et l'apoC-II (apo E pour celles d'origine hépatique) et de PL. Puis elles s'enrichissent en EC, cholestérol non estérifié, TAG, antioxydants, peptides et micro-ARN (miRNA) [Yetukuri *et al.*, 2010 ; Shah *et al.*, 2013 ; Rezaee *et al.*, 2006]. Les HDL naissantes ont une structure discoïdale composée d'une couche unique de PL repliée sur elle-même, et de cholestérol non estérifié et d'apolipoprotéines. La « Lecithin Cholesterol Acyl Transferase » (LCAT) permet l'estérification du cholestérol transformant les HDL naissantes en HDL3 matures (figure 5). En s'enrichissant en EC, les HDL3 deviennent des HDL2, plus larges et moins denses. Ces dernières sont captées par les hépatocytes grâce aux récepteurs reconnaissant l'apoA-I. Le cholestérol transporté au foie est éliminé dans la bile.

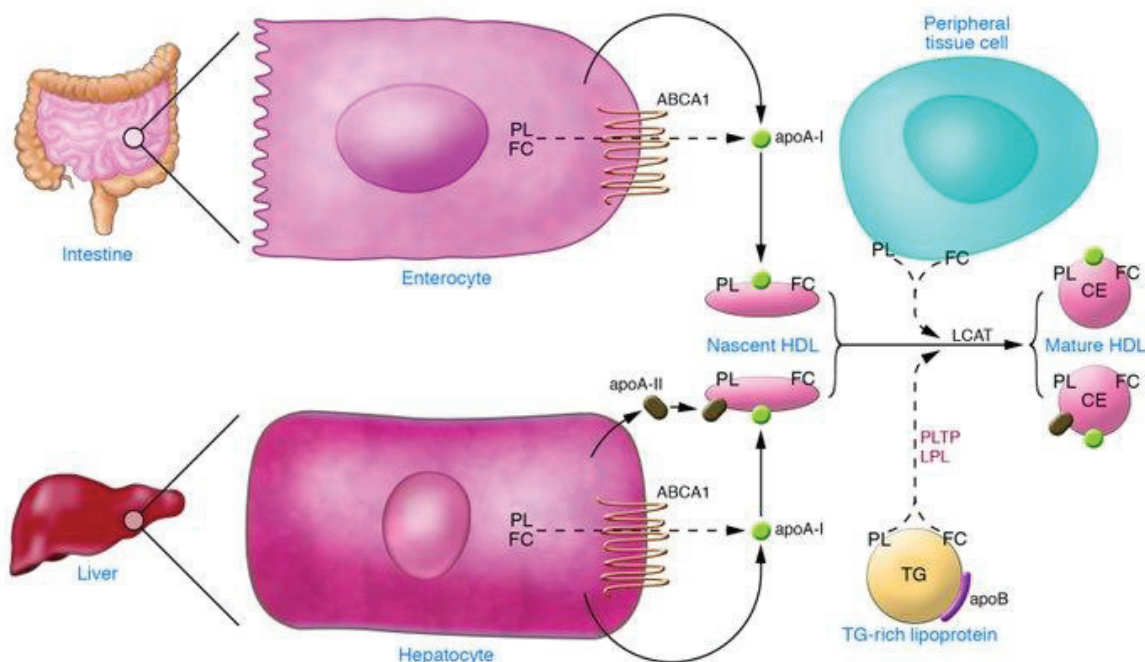


Figure 5: Biosynthèse des HDL.

D'après [Rader, 2006].

III.2. Classification des HDL :

Dès les années 1950, De Lalla et Gofman utilisent l'ultracentrifugation, pour séparer des lipoprotéines selon leur différence de densité. La densité des HDL se situe entre 1,063 et 1,21 g/mL en raison de leur teneur élevée en protéines (45% en poids) par rapport aux autres classes de lipoprotéines. Les HDL plasmatiques sont des particules hétérogènes différant selon leurs densités, tailles, formes, charges, compositions lipidique et protéique. Les HDL sont souvent sub-divisées en HDL3 (petites et denses de 1,125 à 1,21 g/mL) et HDL2 (larges et légères de 1,063 à 1,125 g/mL). En utilisant des techniques d'électrophorèse non-dénaturante en gel à gradient de polyacrylamide (ou d'agarose) ou des techniques d'ultracentrifugation en gradient de densité, elles peuvent être sub-divisées en cinq sous-fractions (très petites, petites, moyennes, larges, et très larges) avec les dénominations suivantes (HDL3c; HDL3b; HDL3a; HDL2a; et HDL2b) (voir tableau 3).

Densité (ultracentrifugation)
HDL2 (1,063–1,125 g/mL)
HDL3 (1,125–1,21 g/mL)
Taille (électrophorèse sur gel en gradient)
HDL2b (9,7–12,0 nm)
HDL2a (8,8–9,7 nm)
HDL3a (8,2–8,8 nm)
HDL3b (7,8–8,2 nm)
HDL3c (7,2–7,8 nm)
Taille (RMN)
« Large » HDL (8,8–13,0 nm)
« Medium » HDL (8,2–8,8 nm)
« Small » HDL (7,3–8,2 nm)
Forme et charge (gel d'agarose)
α -HDL (sphérique)
Pré β -HDL (discoïdale)
Charge et taille (électrophorèse 2D)
Pre β -HDL (pre β 1 and pre β 2)
α -HDL (α 1, α 2, α 3 and α 4)
Pre α -HDL (pre α 1, pre α 2, pre α 3)
Composition en protéines (électro-immuno-diffusion)
LpA-I
LpA-I:A-II

Tableau 3: Classification des HDL selon différentes techniques de séparation et d'isolement.

III.3. Structure des HDL :

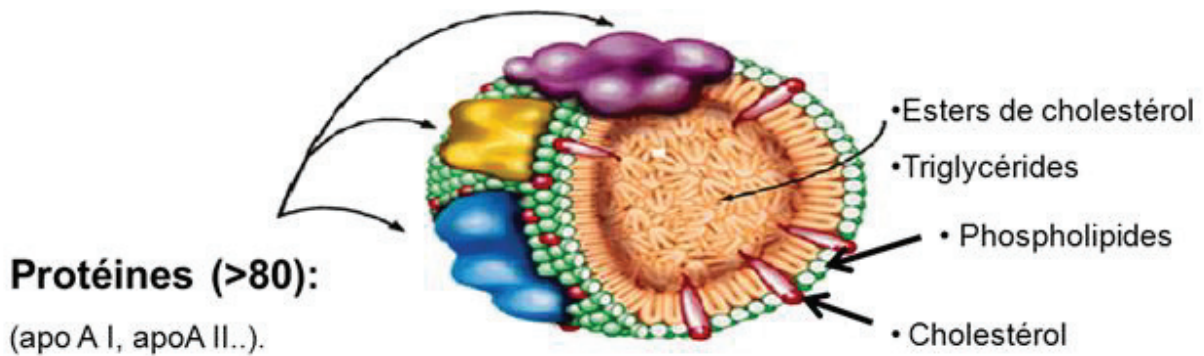


Figure 6 : Représentation schématique d'une HDL.

Plus de 200 espèces moléculaires lipidiques ont été identifiées dans les HDL à ce jour. Leur cœur hydrophobe est composé d'EC (30 à 40% des lipides totaux) et de TAG (3%), et leur enveloppe de PL (37 à 50%) amphiphiles et de cholestérol (9 à 13 %) [Kontush *et al.*, 2013] (figure 6), comme cela a été montré dans des HDL isolées par ultracentrifugation. Les proportions en principales classes lipidiques sont similaires dans des HDL isolées par ultracentrifugation ou FPLC [Wiesner *et al.*, 2009].

III.3.a. Généralités sur les acides gras :

Les acides gras sont des acides carboxyliques ($R-COOH$) formés d'une chaîne aliphatique hydrocarbonée. La grande majorité des acides gras naturels ont une chaîne linéaire avec un nombre pair de carbones.

Il existe trois types d'acides gras qui se différencient par leur degré d'insaturation : (tableau 4)

- les acides gras saturés (AGS).
- les acides gras monoinsaturés (AGMI, la chaîne carbonée contient une double liaison).
- les acides gras polyinsaturés (AGPI, contenant plusieurs doubles liaisons).

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

Tableau 4 : *Classification des principaux acides gras.*

L'acide linoléique (LA, 18:2 n-6) et l'acide α -linolénique (LNA, 18:3 n-3) sont des AG indispensables car les Mammifères sont incapables de les synthétiser, et ils doivent être apportés par l'alimentation. Ces deux AG sont les précurseurs des deux principales familles d'AG, les familles n-6 (ou ω 6) et n-3 (ou ω 3) respectivement, n (ou ω) désignant la position de la première

double liaison à partir du groupement méthyle terminal. Les AG de ces deux familles ne sont pas interconvertibles.

Les AG servent de substrats énergétiques, stockés sous forme de TAG. Ils sont présents dans les PL, les constituants majeurs de la bicouche lipidique des membranes biologiques et de la monocouche des lipoprotéines, et dans les EC.

Outre leur rôle de lipides de structure, les AGPI sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques. Certains AGPI sont notamment des précurseurs de nombreux composés oxygénés biologiquement actifs. Parmi ces AGPIs, l'acide arachidonique (AA, 20:4 n-6) synthétisé par une série d'élongations et de désaturations à partir du LA, est métabolisé en divers médiateurs lipidiques (détaillés dans la partie métabolisme de l'AA page 34).

L'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3) sont des acides gras polyinsaturés n-3 (ou ω 3) à longue chaîne, synthétisés à partir du LNA. Ils sont synthétisés par les phytoplanctons et sont présents dans les produits marins (poissons gras des mers froides). L'EPA et le DHA ont des propriétés anti-inflammatoires et cardioprotectrices. Par ailleurs, ils stimulent le développement cérébral du bébé. Chez l'enfant, ils optimisent, au cours de sa croissance, l'acuité visuelle et l'intelligence. Une consommation de quantités « convenables » permet de protéger contre les maladies cardiovasculaires (MCV), de ralentir le vieillissement cérébral et la maladie d'Alzheimer et de diminuer l'inflammation.

III.3.b. Lipidomique des HDL :

III.3.b.1. Lipides neutres :

III.3.b.1.a. Esters de cholestérol:

Les EC des HDL sont issus de la réaction de trans-estérification entre les PL et le cholestérol, catalysée par la LCAT. Fortement hydrophobes, ils sont localisés dans le cœur des particules d'HDL. Le pourcentage d'EC (et de TAG) est corrélé à la taille des HDL [Hayek *et al.*, 1993; Razavi *et al.*, 2012], et inversement à leur densité.

L'acide linoléique représente plus de 50 % des AG constitutifs, les acides oléique, palmitique et AA étant présents en moindre proportion.

III.3.b.1.b. Stérols :

Le cholestérol libre (non estérifié) est localisé dans la monocouche de PL et participe à la régulation de la fluidité des particules. Le contenu en cholestérol varie de 9 à 13% et dépend de la taille des lipoprotéines, les HDL2b étant 2 fois plus riche en cholestérol que les HDL3b [Shiflett *et al.*, 2005]. D'autres stérols sont présents à des niveaux beaucoup plus faibles tels que les oxystérols, les phytostérols (β -sitostérol, campesterol), les œstrogènes, le lathostérol et l'ergostérol [Kontush *et al.*, 2015].

III.3.b.1.c. Triacylglycérols :

Les TAG présents dans les HDL proviennent des VLDL, lipoprotéines riches en apoB, via les transferts bidirectionnels de lipides neutres entre fractions lipoprotéiques catalysés par la CETP « Cholesteryl Ester Transfer Protein ». Ils contiennent essentiellement des acides oléique, palmitique et linoléique [Kontush *et al.*, 2015]. Il n'y a pas de différence de profil en espèces moléculaires de TAG entre les HDL2 et les HDL3.

III.3.b.1.d. Diacylglycérols :

La présence de DAG a été démontrée dans les HDL [Vieu *et al.*, 1996; Kuksis *et al.*, 1981]. Leurs espèces moléculaires principales sont les 16:0/18:2, 18:0/18:2 et 16:0/18:1.

III.3.b.2. Phospholipides :

Ces lipides amphiphiles formant la monocouche représentent de 37 à 50% des lipides totaux [Kontush *et al.*, 2013] et sont la classe la plus riche en PL de toutes les classes de lipoprotéines.

III.3.b.2.a. Phosphatidylcholines :

Les phosphatidylcholines (PC) sont les principaux phospholipides des HDL, représentant en % molaire de 32 à 35 % des lipides totaux des HDL [Wiesner *et al.*, 2009]. Les PE, PI, PS, SM et LPC sont aussi présentes dans les HDL en moindre proportion.

La répartition de la PC est équivalente entre les sous-classes de HDL. Les principales espèces moléculaires des PC sont les 16:0/18:2, 18:0/18:2 et 16:0/20:4 [Kontush *et al.*, 2013]. Les HDL contiennent aussi des PC estérifiées avec des AGPI oxydés (les acides gras hydroxylés) ou

fragmentés comme POVPC (1-palmitoyl-2-(5-oxovaléroyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine), PGPC (1-palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine) en position sn-2 du glycérophospholipide (figure 7). Parmi les sous-classes de PC, les 1-alkényl-2-acyl-glycérophosphocholines ou plasmalogènes à phosphocholine, phospholipides mineurs possédant une liaison éther vinylique, sont parmi les plasmalogènes les plus présents (de 2,2 à 3,5 mol % des lipides totaux) mais représentent moins de 10% des PC totaux.

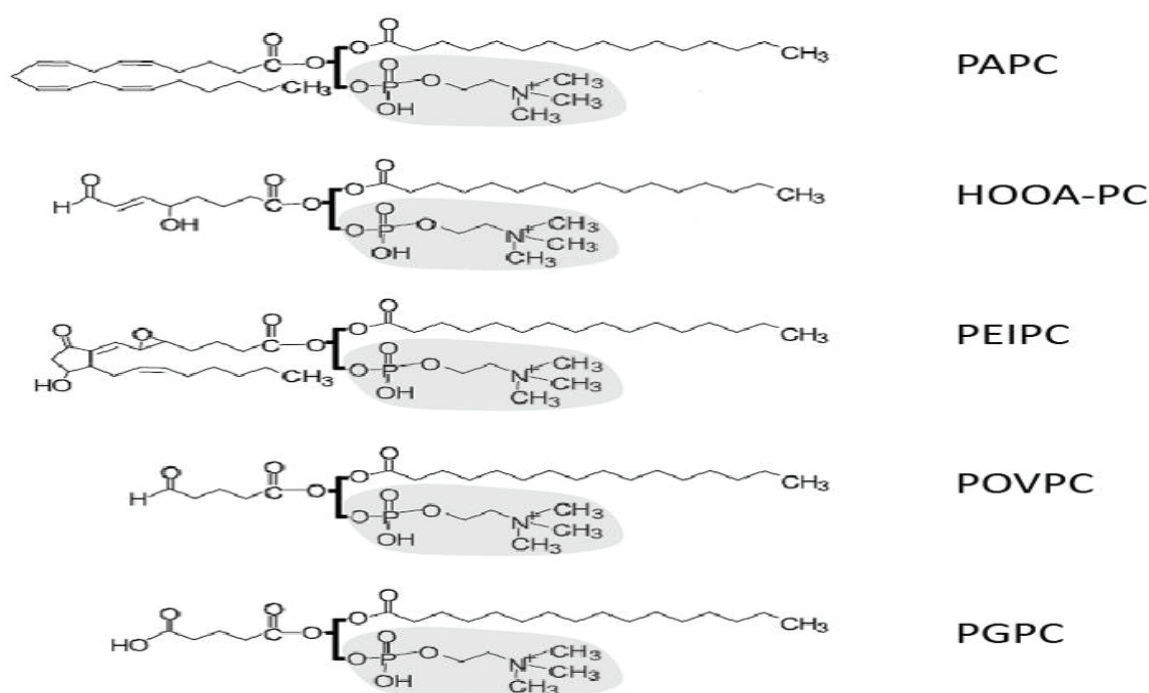


Figure 7: Structure de différents PC oxydés dérivés de PAPC.

D'après [Philippova *et al.*, 2014].

III.3.b.2.b. Phosphatidyléthanolamines :

Les PE ne représentent que 0,7 à 0,9 mol % des lipides totaux. La sous-classe des 1-alkényl-2-acyl-glycérophosphoéthanolamines ou plasmalogènes à phosphoéthanolamine, constituées des espèces moléculaires 18:0/20:4 and 16:0/20:4 [Wiesner *et al.*, 2009] représente la moitié des PE présentes.

III.3.b.2.c. Lysophosphatidylcholines :

Les lysophosphatidylcholines (LPC), PC dont l'un des résidus d'AG est hydrolysé, représente de 1,04 à 8,1 % des lipides totaux des HDL. C'est la fraction lipoprotéique en contenant le plus, bien qu'une éventuelle contribution des LPC associées à l'albumine ne peut pas être exclue. Parmi les sous-classes d'HDL, elles sont plus présentes dans les HDL3 que dans les HDL2 [Camont *et al.*, 2013].

Elles sont dérivées de l'hydrolyse des PC par des phospholipases, dont la LCAT, enzyme préférentiellement associée aux HDL et aux HDL petites et denses [Kontush *et al.*, 2007]. Les LPC sont également produites suite à l'hydrolyse des PC oxydées par la Lp-PLA₂ « Lipoprotein-associated phospholipase A₂ » ou par la PLA₂ sécrétée dans des conditions pro-athérogènes, telles que le stress oxydant et l'inflammation. La composition des LPC en AG comprend suivant les études, soit préférentiellement des AGS 16:0 et 18:0, soit des 20:4n-6 et 22:6n-3 [Serna *et al.*, 2015]. Fait intéressant, les 16:0 LPC sont présentes en majorité dans les HDL, tandis que les 18:0 LPC sont principalement associées aux VLDL et LDL.

III.3.b.2.d. Autres phospholipides :

Les phosphatidylinositol (PI), phosphatidylsérine (PS), cardiolipines, phosphatidylglycérol (PG) et acide phosphatidique (PA) sont des phospholipides chargés négativement, présents de façon décroissante dans les HDL et à de très faibles quantités. Cependant, ces lipides ont un impact significatif sur la charge de surface des HDL et peuvent moduler les interactions des HDL avec les lipases, les protéines de transfert de lipides, la matrice extracellulaire et les récepteurs comme SR-BI [Brodde *et al.*, 2011]. La PS, bien que mineure, augmente de façon progressive avec la densité des HDL, étant surtout présente dans les HDL3b et HDL3c. Il en est de même pour les PC, PA et LPC.

III.3.b.2.e. Sphingolipides :

Les sphingomyélines (SM) (6% des lipides totaux des HDL) sont la deuxième sous-classe des PL dans les HDL. Les HDL2 sont plus riches en SM que les HDL3 [Hammad *et al.*, 2010, Martínez-Beamonte *et al.*, 2013]. Dans les HDL, les SM se situent à proximité du cholestérol

non estérifié (figure 8). Les SM des HDL stimulent l'efflux de cholestérol *via* ABCA1 [Takahashi *et al.*, 2006] mais inhibent l'influx d'EC, et le transport inverse de cholestérol *via* SR-BI. La sphingosine-1-phosphate (S1P) est un lipide bioactif, préférentiellement associé aux HDL petites et denses [Sattler et Levkau, 2009], ayant des propriétés athéroprotectrices.

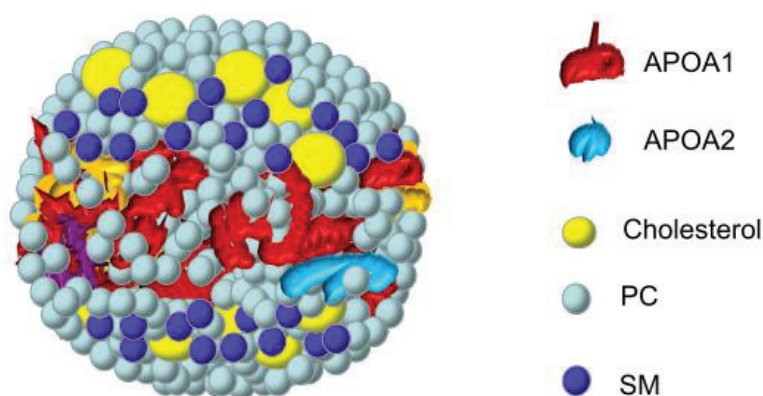


Figure 8: Localisation des sphingomyélines à la surface des particules d'HDL.

D'après [Martínez-Beamonte *et al.*, 2013].

III.3.b.3. Antioxydants :

Les HDL contiennent dans leur monocouche lipidique de la vitamine E comme antioxydant majeur, l' α -tocophérol étant majoritaire et le γ -tocophérol mineur. Elles contiennent aussi de l'ubiquinone-10, du lycopène et du β -carotène. Ces molécules protègent les HDL contre les radicaux libres.

III.3.c. Protéomique des HDL :

Les HDL possèdent un grand nombre de protéines comparativement aux autres classes de lipoprotéines [Rezaee *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2013]. Plus de 80 protéines ont été identifiées à ce jour dont en majorité des apolipoprotéines, des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides, des protéines de transfert de lipides, des protéines de phase aiguë, des inhibiteurs de protéases et d'autres composants protéiques mineurs.

III.3.c.1. Apolipoprotéine A-I (apoA-I) :

L'apoA-I est la principale apolipoprotéine des HDL et représente en moyenne 70% des protéines. Certaines particules d'HDL contiennent à la fois des apo A-I et A-II comme apolipoprotéines majeures (LpA-I/A-II) alors que certaines particules ne contiennent que l'apoA-I (LpA-I) [Cheung *et al.*, 1984] (tableau 3).

Concernant les sous-classes d'HDL, les HDL2 contiennent de 4-5 molécules d'apoA-I par particule alors que les HDL3 en contiennent 2-3 [Kontush et Chapman, 2006]. L'apoA-I est produite par le foie (70%) et l'intestin grêle (30%) [Eggerman *et al.*, 1991]. Elle est principalement associée aux HDL et régule la distribution des tailles de ces particules. Elle est également associée aux CM et VLDL mais rapidement transférée vers les HDL. C'est une protéine de 28,3 kDa. Le gène codant pour l'apoAI se situe sur le chromosome 11.

L'organisation structurelle de l'apoA-I consiste en 10 hélices α amphipathiques. Chaque hélice interagit avec les PL *via* leur face hydrophobe et avec la phase aqueuse plasmatique *via* leur face riche en acides aminés chargés négativement. L'assemblage de l'apoA-I dans les particules d'HDL est très dynamique. Différents modèles, dont les modèles de clôture ou de ceinture (figure 9), ont été décrits pour expliquer l'interaction de l'apoA-I avec les PL lors de la formation des HDL discoïdales [Frank et Marcel, 2000]. Plus récemment, un modèle en « trèfle » a été proposé pour les HDL sphériques (figure 9). Dans le domaine central, les résidus 100 à 121 de l'hélice sont très importants pour la liaison des lipides et la formation des HDL matures. Le domaine d'activation de la LCAT a maintenant été clairement attribué à l'hélice 143 à 164 tandis que l'hélice 144 à 186 est importante pour le déplacement de la LCAT vers ses substrats lipidiques. En revanche, les hélices C-terminales sont importantes pour la liaison lipidique et le maintien des HDL dans la circulation.

L'apoA-I est fonctionnellement importante. L'apoA-I interagit avec le récepteur ABCA1 (ATP-binding cassette transporter 1) [Eggerman *et al.*, 1991], qui permet l'assemblage des PL et du cholestérol libre avec l'apo-AI délipidée et résulte en la formation des pré β -HDL ou HDL naissantes. Les mutations silencieuses du gène codant pour l'ABCA1 sont la cause de la maladie de Tangier

[Rust *et al.*, 1999], qui est caractérisée par des concentrations extrêmement basses d'apoA-I et d'HDL-cholestérol et est associée à une diminution de l'efflux de cholestérol des macrophages. L'apoA-I interagit aussi avec le récepteur SR-BI pour la liaison des HDL et l'efflux de cholestérol [Liu *et al.*, 2002].

Outre l'activation de la LCAT, l'apoA-I active la CETP et la PLTP. Elle est impliquée dans l'efflux de PL et de cholestérol des cellules périphériques et stabilise la structure et la fonction des PON et PAF-AH. L'apoA-I des HDL est décrite pour avoir des effets anti-athérogènes.

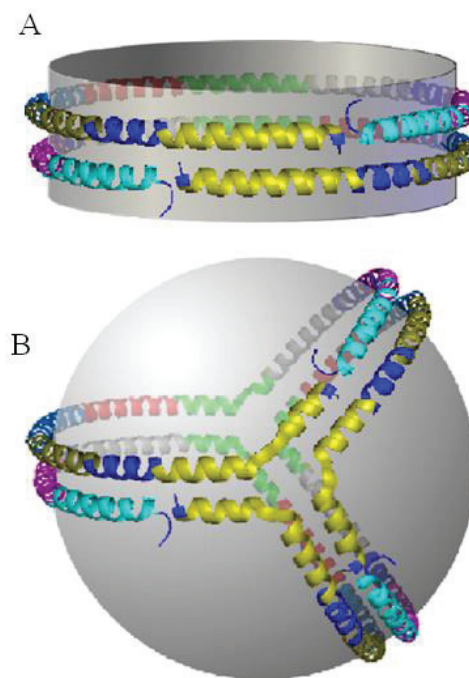


Figure 9: Modélisation de l'arrangement moléculaire de l'apoA-I sur une particule d'HDL. (A) Modèle de « double ceinture », (B) modèle de « trèfle ». Chaque hélice est représentée par une couleur différente.

D'après [Silva *et al.*, 2008].

III.3.c.2. Apolipoprotéine A-II (apoA-II) :

L'apo A-II, de masse moléculaire de 17 kDa, est la deuxième apolipoprotéine majeure des HDL (20%). L'apoA-II est présente dans la plupart des particules d'HDL. Chez les humains, le gène

qui code pour l'apo A-II est localisé sur le chromosome 1 [Brewer *et al.*, 1986; Lackner *et al.*, 1984]. La structure de l'apoA-II est similaire à l'apoA-I, comportant des α -hélices amphiphiles. Elle est principalement synthétisée dans le foie [Eggerman *et al.*, 1991] suite à plusieurs clivages post-traductionnels, et elle est présente dans le plasma sous forme active de dimère avec deux chaînes de 77 résidus amino-acides liés par un pont disulfure [Brewer *et al.*, 1986]. Son expression est régulée à la hausse par les récepteurs nucléaires tels que le rétinol X Receptor (RXR), le PPAR-alpha [Vu-Dac *et al.*, 1995 et 1996] et SREBP-2 [Kan *et al.*, 1999]. L'apoA-II joue un rôle important dans le transport inverse du cholestérol en régulant l'activité de la LCAT et en modulant l'afflux de cholestérol.

III.3.c.3. Autres apolipoprotéines mineures :

III.3.c.3.a. Apolipoprotéine A-IV :

L'apoA-IV est une apolipoprotéine synthétisée par l'intestin et le foie, associée aux CM. Suite à la lipolyse des CM [Mahley *et al.*, 1984], l'apoA-IV s'associe aux HDL, majoritairement aux HDL3. L'apoA-IV s'associe dans une moindre mesure avec les PL comparativement à l'apoA-I et serait moins anti-athérogène et plus sensible à la glycation [Yoo *et al.*, 2015]. Elle active la LCAT et la PLTP.

III.3.c.3.b. Apolipoprotéine E:

L'apo E est présente dans les CM, VLDL et HDL. Elle est importante pour le métabolisme des lipides dans le cerveau et d'autres tissus. [Kothapalli *et al.*, 2012]. C'est un ligand spécifique des LDLR (« LDL receptor »), LRP (« low-density lipoprotein receptor-related protein-1 ») et SR-BI des hépatocytes et des cellules périphériques.

III.3.c.3.c. Apolipoprotéine D:

L'apo-D est principalement présente dans les HDL et dans une moindre mesure dans les LDL. Elle appartient à la famille des lipoprotéines qui transportent de petites molécules hydrophobes comme l'AA, des hormones stéroïdiennes et le cholestérol.

III.3.c.3.d. Apolipoprotéine C-I:

L'apoC-I est majoritairement associée aux HDL mais aussi aux VLDL et CM chez l'Homme. L'apoC-I est un inhibiteur de la CETP en diminuant l'électronégativité des HDL, *via* en partie sa charge positive, et en diminuant la liaison des HDL avec la CETP et de fait son activité. L'apo C-I a un effet inhibiteur sur SR-BI en diminuant la liaison des EC des HDL à SR-BI. Elle active la LCAT dans une moindre mesure que l'apoA-I.

III.3.c.4. «Lécithine Cholestérol Acyl Transférase» (LCAT) :

La LCAT est synthétisée dans le foie et fortement N-glycosylée. La LCAT est une acyltransférase qui catalyse l'estérification du cholestérol libre en transférant l'acide gras en position sn-2 de la lécithine vers le groupement 3-hydroxyle du cholestérol libre (figure 10), localisé à la surface des particules. Il s'ensuit la migration des molécules d'EC vers le coeur plus hydrophobe des particules et la conversion des HDL naissantes discoïdales (préβ-HDL) en HDL matures sphériques, HDL3 puis en HDL2. L'apoA-I est le principal activateur de la LCAT. Environ 75% de l'activité de la LCAT plasmatique est associée aux HDL, davantage aux HDL3 qu'aux HDL2, mais est également présente dans les LDL.

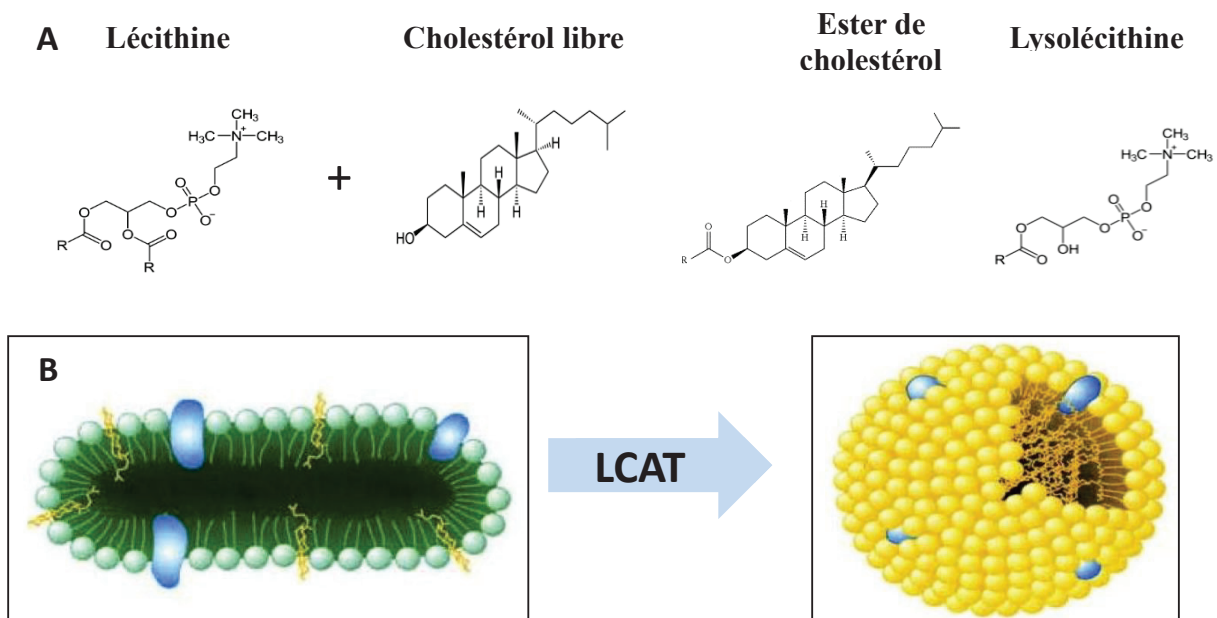


Figure 10: Réaction catalysée par la LCAT. Migration des EC dans le cœur hydrophobe des HDL et formation des HDL sphériques à partir des HDL discoïdales.

III.3.c.5. Paraoxonases (PON) :

Les PON (PON1, PON2, PON3) constituent une famille d'enzymes dépendantes du calcium, synthétisées principalement dans le foie mais aussi dans les reins. Seules les PON1 et PON3 sont présentes dans les HDL, la PON2 étant une protéine intracellulaire (qui ne serait pas associée aux lipoprotéines). La PON1 est l'isoforme la plus présente à la surface des HDL où elle est étroitement associée à l'apoA-I. C'est une glycoprotéine de 354 acides aminés et de masse moléculaire de 43 kDa. Elle a initialement été décrite comme une estérase capable d'hydrolyser des substrats organophosphorés, dont le paraoxon, substrat utilisé habituellement pour mesurer son activité sérique et dont elle tire son nom. La PON1 possède également des propriétés anti-oxydantes vis-à-vis de l'oxydation des LDL *in vitro*. Elle hydrolyse une grande variété de substrats oxydatifs endogènes ou exogènes [Biggadike *et al.*, 2000 ; Billecke *et al.*, 2000], tels que le peroxyde d'hydrogène, les phospholipides oxydés dérivés de l'AA, les hydroperoxydes de cholestéryl linoléate présents dans les LDL oxydées et dans les lésions d'athérosclérose ainsi que des lactones (tels que les glucocorticoïdes, gamma-lactones et statines). L'activité de la PON1 est diminuée dans les maladies associées à un stress oxydatif élevé telles que le diabète [Durrington *et al.*, 2001], les MCV [Mackness *et al.*, 2003], les dyslipoprotéïnémies [Paragh *et al.*, 1998]. Comme la PON1, la PON3 est associée aux HDL et protège les LDL contre l'oxydation.

III.3.c.6. «Platelet-activating factor-acetyl hydrolase» (PAF-AH):

La PAF-AH est également appelée phospholipase A₂ associée aux lipoprotéines (« lipoprotein-phospholipase A₂ », LpPLA₂). Les macrophages et les plaquettes synthétisent cette enzyme et la sécrètent dans le milieu extracellulaire [McIntyre *et al.*, 2009]. La PAF-AH plasmatique circulante est majoritairement associée aux LDL (60-80%) et aux HDL [Tselepis *et al.*, 1995]. Dans les macrophages, elle est fortement N-glycosylée ce qui détermine sa faible association avec les HDL

d'origine humaine. La PAF-AH est une phospholipase A₂ indépendante du calcium qui dégrade le PAF pro-inflammatoire en hydrolysant le groupement acétyl en position sn-2 du glycérol pour produire du lyso-PAF inactif et un acétate [Mallat *et al.*, 2010]. L'enzyme clive aussi les PL oxydés contenant une chaîne courte en position sn-2 en lysophospholipides. Le site de la PAF-AH est proche de la surface des lipoprotéines et accessible aux PL oxydés présents à la surface des HDL.

III.3.c.7. Glutathion-peroxydase 3 (GPx-3) :

La GPx-3 ou glutathion-peroxydase plasmatique est une isozyme de la famille des glutathion-peroxydases, enzymes anti-oxydantes catalysant la réduction des hydroperoxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène en dérivés alcool et eau respectivement, en présence de glutathion. Elle est synthétisée dans les poumons, le cœur, les seins, le foie, les reins, le poumon et le placenta. La GPx-3 est présente dans le plasma, étant exclusivement associée aux HDL [Chen *et al.*, 2000]. C'est un homotétramère dont chaque sous-unité de 22 kDa contient un résidu sélénocystéine. La GPx-3 réduit différents hydroperoxydes d'AG mais aussi les hydroperoxydes de PL et le peroxyde d'hydrogène [Yamamoto et Takabashi, 1993]. Outre le glutathion, la thiorédoxine et la glutarédoxine peuvent être des co-substrats réducteurs de la GPx-3.

III.4.c.8. « PhosphoLipid Transfer Protein » (PLTP) :

La « PhosphoLipid Transfer Protein » (PLTP) appartient à la superfamille des protéines de transfert de lipides. Cette glycoprotéine est synthétisée dans le placenta, le pancréas, le poumon, le rein, le cœur, le foie, le muscle squelettique et le cerveau. Dans la circulation, la PLTP est principalement associée aux HDL et induit la fusion de 2 particules d'HDL3, ce qui conduit à la formation d'une particule d'HDL2 plus large et à la libération d'une apoA-1 « pauvrement lipidée » [Lusa *et al.*, 1996, Rye *et al.*, 2009] (figure 11). En général, la PLTP permet les échanges de PL mais aussi d'alpha-tocophérol, de cholestérol non estérifié et de LPS « Lipopolysaccharides », des lipoprotéines riches en TG (VLDL/LDL) vers les HDL.

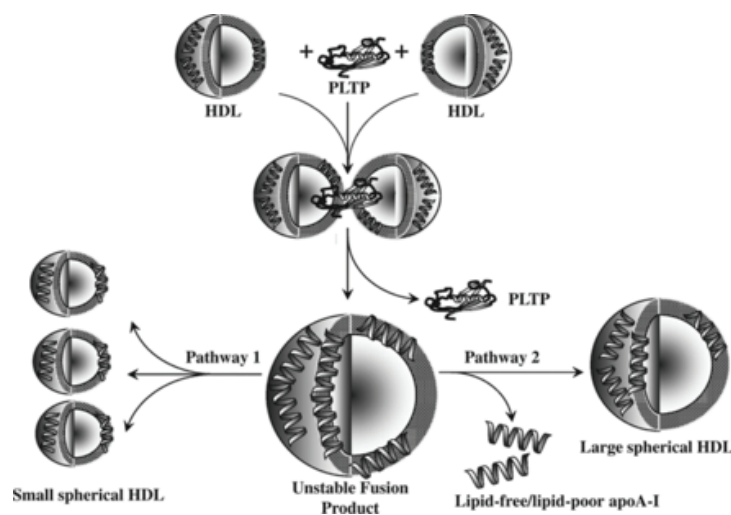


Figure 11: Fonction de la PLTP permettant la fusion des petites particules d'HDL pour former des particules plus grandes.

D'après [Lusa *et al.*, 1996].

III.4.c.9. « Cholesteryl Ester Transfer Protein » (CETP) :

La CETP fait partie de la famille des protéines de transfert des lipides, permettant l'échange bidirectionnel de lipides neutres et de PL entre les classes de lipoprotéines [Von Eckardstein *et al.*, 2001; Charles *et al.*, 2012]. C'est une glycoprotéine hydrophobe qui est sécrétée par le foie et le tissu adipeux et qui circule dans le plasma, principalement liée aux HDL et de façon moindre aux LDL et VLDL. [Zhang *et al.*, 2015] viennent de montrer que la CETP se lie aux HDL *via* une interaction hydrophobique avec la monocouche de PL plutôt que *via* une interaction protéine-protéine. La CETP assure le transfert d'EC des lipoprotéines qui en sont riches (HDL) vers les lipoprotéines riches en TAG (VLDL) et inversement le transfert des TAG des VLDL vers les LDL/HDL (figure 12) [Von Eckardstein et Assmann, 2001]. Une conséquence de ces transferts d'EC des HDL vers les VLDL,

médiés par la CETP, est une diminution de la teneur en cholestérol et de la taille des particules d'HDL. Lors du DT2, l'augmentation des lipoprotéines riches en TAG favorise le transfert *via* la CETP de TAG vers les HDL.

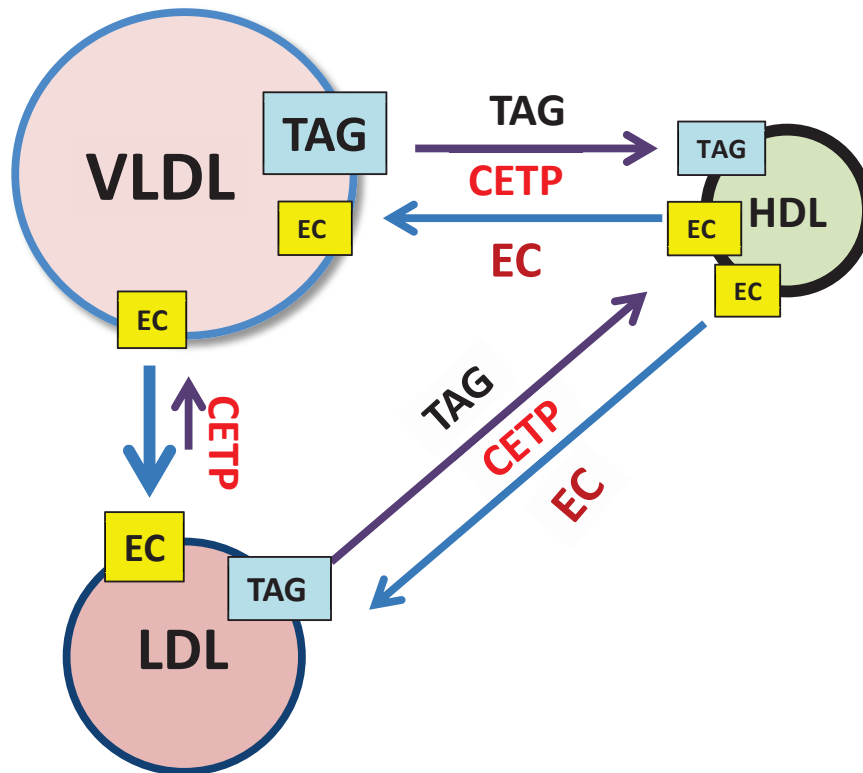


Figure 12: Echanges des EC et TAG entre lipoprotéines via la CETP.

III.3.d. Remodelage des HDL :

Les HDL sont remodelées en continu par des enzymes comme la LCAT, la CETP, la PLTP, la lipase hépatique et endothéliale [Nijstad *et al.*, 2009]. Comme décrit dans les pages 60 et 61, la CETP et la PLTP participent au remodelage des particules d'HDL en permettant l'échange bidirectionnel de lipides entre les classes de lipoprotéines. De plus, la PLTP catalyse la fusion de deux particules d'HDL3 entre elles [Lusa *et al.*, 1996, Rye *et al.*, 2009].

En outre, les HDL sont remodelées *via* les récepteurs tels que SR-BI, ABCA1, et ABCG1 [Murakami *et al.*, 1995; Korhonen *et al.*, 1998; Webb *et al.*, 2004] dans un processus appelé « afflux de cholestérol », les grosses particules de HDL (HDL2) étant mieux reconnues par les

récepteurs que les petites particules de HDL (HDL3) [Rothblat et Phillips, 2010, de Beer *et al.*, 2001]. Il a été démontré que les HDL se lient directement à ABCG1 *via* l'apoA-I [Kobayashi *et al.*, 2006; Sankaranarayanan *et al.*, 2009] ce qui favorise la translocation des phospholipides des HDL3 les cellules cibles [Baez *et al.*, 2002].

Des modifications par oxydation ou glycoxydation des HDL induisent aussi différents remodelages de ces particules [Gao *et al.*, 2008]. Une faible oxydation des HDL accélère la dissociation des apolipoprotéines et la fusion des HDL entre elles tandis qu'une forte oxydation inhibe ces phénomènes. Cette inhibition est corrélée à une réticulation massive des protéines et à la lipolyse [Gao *et al.*, 2008].

Ces remodelages des HDL provoquent un changement de leur taille, forme et composition. Ils impactent aussi la fonctionnalité des HDL notamment dans des situations pathologiques comme le DT2 et les MCV [Borja *et al.*, 2013]. Ils pourraient expliquer en partie certains résultats contradictoires sur les fonctions des HDL modifiées.

III.4. Fonctions des HDL :

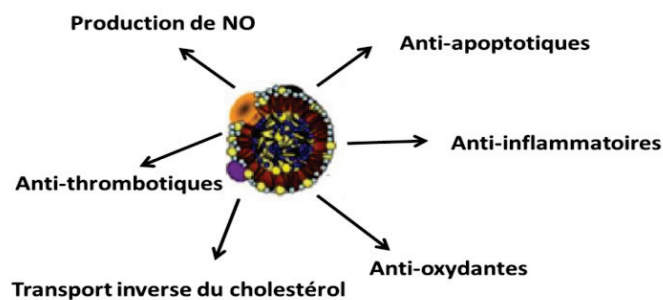


Figure 13: *Principales fonctions des HDL.*

Les HDL possèdent plusieurs propriétés athéroprotectrices, incluant leur rôle dans le transport inverse du cholestérol, leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-oxydantes, anti-apoptotiques (figure 13).

III.4.a. Transport inverse du cholestérol :

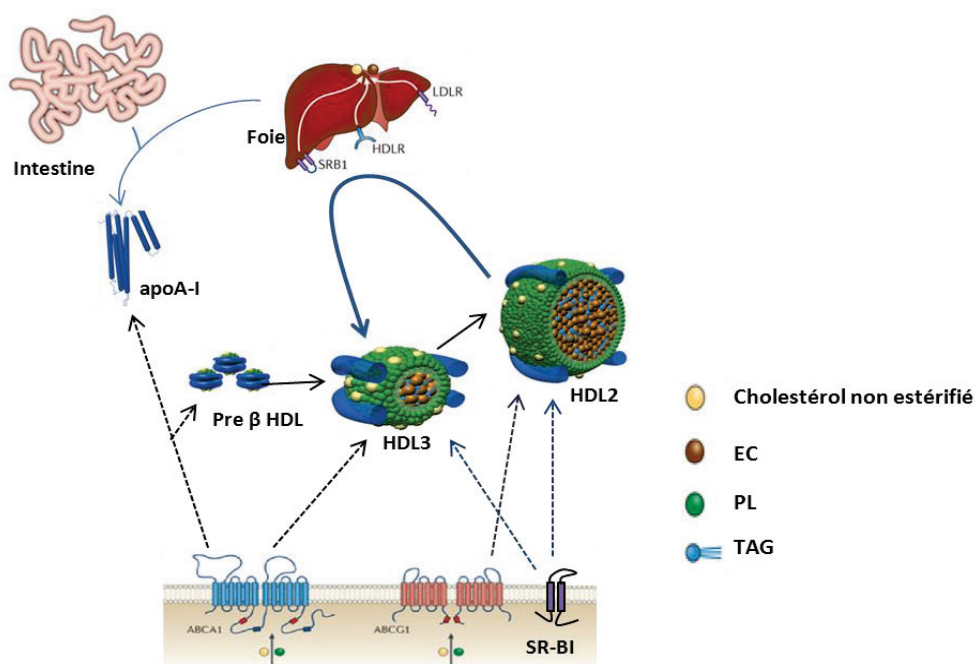


Figure 14 : Transport inverse du cholestérol, formation et maturation des particules d'HDL et récepteurs spécifiques.

Adapté de Kingwell *et al.*, (2014).

La fonction anti-athérogène la plus décrite des particules d'HDL concerne leur capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol des macrophages, des tissus périphériques et des cellules sumeuses vers le foie où il pourra être éliminé dans la bile ou recyclé.

Différentes protéines transmembranaires jouent un rôle majeur dans la captation du cholestérol excédentaire des cellules périphériques par les HDL. Le transporteur ABCA1 (ATP-binding cassette A1) participe à l'efflux de PL et de cholestérol cellulaire vers les préβ-HDL (et les HDL3) et le transporteur ABCG1 vers les HDL lipidées (dont les HDL2) (figure 14).

Le récepteur SR-BI capte sélectivement les EC au niveau du foie et des tissus stéroïdogéniques [von Eckardstein *et al.*, 2001] (figure 14).

L'efflux de cholestérol peut se produire par différents mécanismes, y compris la diffusion passive du cholestérol libre ou sous forme estérifiée *via* la LCAT.

III.4.b. Propriétés anti-inflammatoires :

Les HDL inhibent l'adhésion des monocytes à l'endothélium [Barter *et al.*, 2004] induite par les LDL oxydées [Navab *et al.*, 2007], diminuent l'activation des neutrophiles et inhibent l'infiltration des neutrophiles dans la paroi artérielle [Nicholls *et al.*, 2005]. Les HDL sont capables de diminuer l'expression endothéliale des molécules d'adhésion telles que la « vascular cell adhesion molecule » (VCAM-1), la molécule d'adhésion cellulaire « Intercellular Adhesion Molecule 1 » ICAM-1 et la E-sélectine, induite par différents agents tels que les LDL oxydées, le TNF- α , l'interleukine 1 (IL-1) et les endotoxines [Cockerill *et al.*, 2001 ; Ashby *et al.*, 1998]. Les HDL activent l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) résultant en une production accrue de monoxyde d'azote (NO) [Mineo *et al.*, 2003, 2006] (figure 15), et stimulent la production de prostacycline (PGI₂) [Fleisher *et al.*, 1982 ; Calabresi *et al.*, 2003]. *In vivo*, la perfusion intra-veineuse d'HDL reconstituées à des souris apoE (-/-) diminue l'expression des molécules d'adhésion endothéliales dont VCAM-1 [Dimaguya *et al.*, 1999] et diminue la taille des lésions d'athérosclérose chez le lapin [Nicholls *et al.*, 2005].

Les mécanismes par lesquels les HDL sont anti-inflammatoires sont liés à la présence de certains PL dont la S1P, à l'apoA-I et à l'hydrolyse des lipides oxydés par les PON-1 et la PAF-AH [Nofer et Assmann, 2005].

III.4.c. Propriétés anti-thrombotiques :

Les HDL possèdent des propriétés anti-thrombotiques en diminuant l'activation plaquettaire et la formation de thrombi veineux et artériels [Aviram *et al.*, 1987].

Le groupe de Nofer a démontré en 1998 [Nofer *et al.*, 1998] que les HDL3, apportées à des concentrations de 0,6-1,2 mg protéines/mL, inhibent l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine en diminuant la formation de 1,2-DAG et d'IP₃ et la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire. Les HDL3 inhibent aussi la liaison du fibrinogène en réponse à la thrombine. La

liaison des HDL3 au récepteur SR-BI et le contenu en PL chargés négativement (PS et PI) contribueraient à l'effet anti-agrégant des HDL3 [Brodde *et al.*, 2011]. Par contre, les HDL2 (1 mg/mL) n'inhibent pas l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine et la mobilisation du calcium [Brodde *et al.*, 2011]. Les effets respectifs des HDL2 et HDL3 sur l'agrégation plaquettaire sont cependant controversés. D'autres études ont montré que les HDL riches en apo E et les HDL2, plus riches en apoE que les HDL3, inhiberaient davantage l'agrégation plaquettaire que les HDL pauvres en apoE et les HDL3 [Desai *et al.*, 1989 ; Higashihara *et al.*, 1991]. Des études antérieures avaient montré que les HDL inhibent la formation de TxB₂ dans des plaquettes humaines ou de lapins alors qu'elles augmentent la formation de 6-keto-PGF_{1α}, produit d'hydrolyse de la PGI₂ anti-agrégante (figure 15), dans des aortes de lapin [Beitz *et al.*, 1992]. Les HDL inhibent également la formation de 12-HETE dans des plaquettes de lapin [Fujimoto *et al.*, 1994].

Les effets anti-thrombotiques directs des HDL sont aussi démontrés dans des modèles animaux. L'infusion d'apoA-I Milano recombinée à des rats inhibe l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, retarde la formation et le poids du thrombus induit par injection de chlorure de fer dans l'aorte de rat [Li *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2001].

Chez l'Homme, des études cliniques ont montré que les concentrations plasmatiques d'HDL-cholestérol sont inversement corrélées à l'expression de la P-sélectine plaquettaire (figure 15) [Naqvi *et al.*, 1999] et à la formation de thrombine ainsi qu'au risque de thrombose artérielle [van der Stoep *et al.*, 2014] et veineuse [Doggen *et al.*, 2004].

L'injection d'HDL reconstituées à des volontaires sains diminue l'agrégation plaquettaire induite par le collagène et l'activation de la coagulation induite par le lipopolysaccharide, en diminuant les concentrations plasmatiques du fragment F1 + 2 de la pro-thrombine, marqueur de la génération de thrombine, et de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), enzyme protéolytique initiant la fibrinolyse [Pajkrt *et al.*, 1997]. Plus récemment, [Calkin *et al.*, 2009] ont montré que la perfusion intraveineuse d'HDL reconstituées à des diabétiques de type 2 augmente de 40% la concentration plasmatique en HDL-cholestérol, diminue de plus de 50% l'agrégation plaquettaire en PRP induite par l'ADP et le collagène, et diminue la liaison des plaquettes au fibrinogène et la taille des thrombi. Le mécanisme d'action est lié à une diminution du cholestérol dans les rafts lipidiques et au contenu en PL mais est indépendant de l'apo-AI et de SR-BI.

Les HDL peuvent agir de façon indirecte sur les plaquettes en stimulant la synthèse de molécules anti-agrégantes dans les cellules endothéliales. En effet, *in vitro*, les HDL induisent la synthèse de PGI₂ et de NO (figure 15), molécules vasodilatatrices et anti-agrégantes dans les cellules endothéliales *via* l'expression de la COX-2. De plus, les HDL3 stimulent plus fortement la sécrétion de 6-keto-PGF1 α , produit d'hydrolyse de la PGI₂, que les HDL2 alors que les HDL2 diminuent la production du TxA₂ par les cellules endothéliales [Oravec *et al.*, 1998].

Les HDL inhibent aussi l'expression de facteurs impliqués dans la coagulation (facteur tissulaire, facteurs X, Va et VIIIa). Par exemple, les HDL reconstituées inhibent l'expression du facteur tissulaire induite par la thrombine dans des cellules endothéliales. Les HDL augmentent les activités anti-coagulantes exercées par la protéine C activée (APC) et la protéine S, co-facteur non enzymatique de l'APC [Griffin *et al.*, 1999].

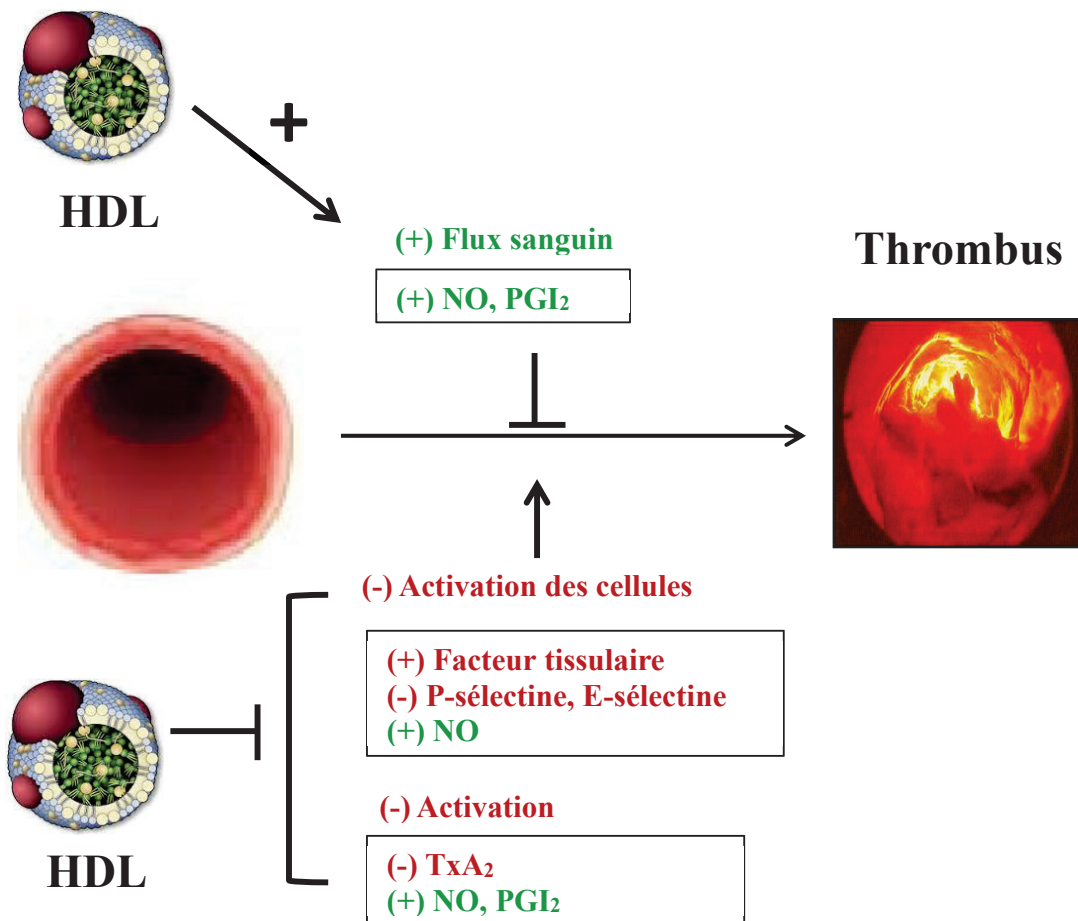


Figure 15: Principales activités anti-thrombotiques des HDL.

Adapté de Mineo *et al.*, (2006).

III.4.d. Propriétés anti-oxydantes :

Les propriétés anti-oxydantes des HDL ont été initialement démontrées par leur capacité à inhiber l'oxydation des LDL induite *in vitro* par le sulfate de cuivre [Navab *et al.*, 2000]. Les HDL préviennent l'accumulation de PL oxydés et soustraient des LDL des acides gras hydroxylés (AGOH) dérivés de LA (les acides hydroxy-octadécadiénoïques ou HODEs) et de l'AA (les acides hydroxy-eicosatétraénoïques ou HETEs) formés par les lipoxygénases [Navab *et al.*, 2000]. Les HDL sont aussi les principaux transporteurs des produits primaires et terminaux de la peroxydation lipidique non enzymatique, soient les hydroperoxydes lipidiques [Bowry *et al.*, 1992] et les isoprostanes [Proudfoot *et al.*, 2009] dans le plasma, les produits d'oxydation étant transférés des LDL vers les HDL.

Les propriétés anti-oxydantes des HDL sont liées à la présence d'apoA-I [Navab *et al.*, 2004 ; Kontush et Chapman, 2006] qui assurerait la réduction des hydroperoxydes lipidiques en hydroxyles, et d'enzymes anti-oxydantes présentes à la surface des lipoprotéines dont les PON 1 et 3, la PAF-AH, la GPx-3 et la LCAT qui permettraient l'hydrolyse des PL oxydés en lysophospholipides. Les résidus Met des HDL, en s'oxydant, jouent aussi un rôle dans la réduction des hydroperoxydes estérifiés dans les PL et EC associés aux HDL en dérivés hydroxyles moins toxiques [Garner *et al.*, 1998].

L'activité anti-oxydante des sous-classes d'HDL augmente avec l'augmentation de la densité comme suit: des HDL2b aux HDL3c. La plus grande présence d'apoA-I et d'enzymes anti-oxydantes (PON1, PAF-AH et LCAT) au sein des HDL 3 expliquerait en partie leurs propriétés anti-oxydantes supérieures aux HDL 2 [Kontush *et al.*, 2003].

III.5. Quantité d'HDL-cholestérol et qualité des HDL :

III.5.a. Quantité d'HDL-cholestérol :

De très nombreuses études épidémiologiques ont montré que de faibles concentrations plasmatiques d'HDL-cholestérol sont associées à un risque plus élevé de MCV chez des patients diabétiques [Karadag *et al.*, 2009] et atteints de cardiopathies ischémiques [Acharjee *et al.*, 2013], même lorsque les concentrations de LDL-cholestérol sont normales. D'autres études ont montré que l'augmentation des concentrations d'HDL étaient corrélés à une progression plus lente des lésions d'athérosclérose et à la stabilisation des plaques d'athérosclérose [Gordon *et al.*, 1989]. La stratégie a alors été d'augmenter le HDL-cholestérol pour protéger les sujets à risque contre les MCV. Plusieurs grands essais cliniques ont mis en œuvre des thérapies pour augmenter le HDL-cholestérol, par exemple avec des statines [Nicholls *et al.*, 2007; Ballantyne *et al.*, 2008], de la niacine [Boden *et al.*, 2011] ou des inhibiteurs de CETP [Barter *et al.*, 2007]. Mais ces derniers n'ont pas réduit la survenue d'événements cardiovasculaires et ont même augmenté le taux de mortalité, bien qu'ils aient augmenté la concentration d'HDL-cholestérol, notamment du HDL2-cholestérol. Plus récemment, une étude de randomisation mendélienne a montré que l'augmentation du HDL-cholestérol chez des patients porteurs de certains gènes n'est pas associé à un risque diminué d'infarctus du myocarde [Voight *et al.*, 2012]. Toutes ces études indiquent que la relation entre les HDL et le risque cardiovasculaire est plus compliquée qu'il n'y paraissait et qu'un taux élevé d'HDL-cholestérol n'est pas forcément associé à un risque cardiovasculaire moindre.

III.5.b. Qualité des HDL :

Depuis quelques années, les études se sont focalisées sur la « qualité » des HDL et non plus uniquement sur la quantité d'HDL-cholestérol. La qualité des HDL est définie par leur structure, leur composition lipidomique et protéomique et leur fonctionnalité [Rothblat *et al.*, 2010 ; Kontush et Chapman ; 2006] (figure 16).

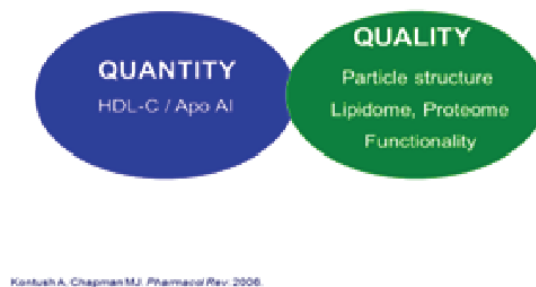


Figure 16 : Concepts sur la quantité versus la qualité des HDL.

D'après [Kontush et Chapman, 2006].

Certaines propriétés fonctionnelles des HDL, telles que le transport inverse du cholestérol, les propriétés anti-oxydantes et vasoprotectrices vis-à-vis de l'endothélium, sont décrites être altérées dans les maladies métaboliques. En effet, des patients atteints d'un DT2 ou d'un syndrome métabolique ont un risque cardio-vasculaire accru et des concentrations faibles d'HDL-cholestérol, mais aussi des HDL dysfonctionnelles [Kontush et Chapman, 2006]. Récemment, certaines larges études de population ont montré une corrélation entre le nombre de particules d'HDL, leur composition protéique et lipidique, et les risques de MCV [Mackey *et al.*, 2012].

Dans des modèles animaux, l'augmentation des concentrations d'HDL-cholestérol ne conduit pas toujours à une capacité accrue des HDL à promouvoir le transport inverse du cholestérol et à une athéroprotection. En effet, chez des souris SR-BI $-/- \times apoE -/-$, les concentrations plus élevées d'HDL-cholestérol sont associées à une incidence plus forte d'athérosclérose comparativement à des souris apoE $-/-$ [Trigatti *al.*, 1999]. De même, une surexpression de SR-BI protège des souris invalidées pour le LDL-R contre l'athérosclérose, en dépit d'une réduction significative du HDL-cholestérol [Kozarsky *et al.*, 2000].

Les HDL subissent des modifications oxydatives, notamment lors du diabète. Les notions de stress oxydant et de diabète sont développées dans les deux chapitres suivants.

Stress oxydant

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les défenses anti-oxydantes de l'organisme, en faveur des premières.

I. Radicaux libres :

Les radicaux libres (RL) se définissent comme toute espèce chimique instable contenant un ou plusieurs électrons non appariés, produite en très faible quantité et capable d'une existence indépendante. Les RL sont très réactifs, ont un temps de demi-vie très court et peuvent être délétères compte tenu de leur puissant pouvoir oxydant.

Toute réaction impliquant de l' O_2 et un système réducteur de transfert d'électrons est susceptible de libérer des ERO (qui peuvent être radicalaires ou pas). L'oxygène possède deux électrons célibataires. Ces derniers sont susceptibles de capter un électron pour donner le radical superoxyde $O_2^{\cdot -}$ (anion superoxyde) sous l'effet d'un rayonnement, de métaux de transition ou d'enzymes. L'anion superoxyde est un radical modérément réactif, produit par les organismes aérobies dans la mitochondrie. Ce radical est le substrat des superoxyde dismutases (SOD), enzymes qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En présence de métaux, tels que (Fe^{2+}/Fe^{3+} , Cu^+/Cu^{2+}), H_2O_2 peut se transformer par la réaction de Fenton en radical hydroxyle ($\cdot OH$), radical extrêmement réactif qui va oxyder très rapidement les molécules voisines, formant d'autres RL [Barouki, 2006]. Le radical hydroxyle $\cdot OH$ peut également être produit par la réaction d'Haber-Weiss catalysée par (Fe^{2+}/Fe^{3+} , Cu^+/Cu^{2+}).

Il existe également des espèces réactives nitrogénées (comme le monoxyde d'azote, le dioxyde de nitrogène ou le peroxydinitrite).

II. Formation et fonctions des espèces réactives de l'oxygène :

Toutes les cellules aérobies produisent en permanence des ERO au niveau de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie, de l'activation de la xanthine oxydase, de

l'oxydation de l'hémoglobine, de la libération de « fer libre », du métabolisme des PG, lors de l'activation des globules blancs et des cellules endothéliales ou lors de l'inflammation.

Les ERO ont aussi des fonctions biologiques importantes, en intervenant notamment dans la signalisation intracellulaire [Bae *et al.*, 1997], la différenciation cellulaire, l'arrêt de croissance, l'apoptose [Ghosh et Myers, 1998], l'immunité [Tohyama *et al.*, 2004] et la défense contre les microorganismes.

Lorsqu'ils sont en surnombre, ils deviennent un facteur d'inflammation et de mutagenèse, favorisant les maladies chroniques comme la cataracte, le cancer, les maladies coronariennes, le diabète, l'insuffisance rénale, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, l'arthrite rhumatoïde. Le mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense, alimentation) influe aussi sur la production des RL qui ont des effets délétères à long terme.

III. Cycle de peroxydation lipidique :

La peroxydation lipidique peut être enzymatique ou non enzymatique. De fait, les AGPI, dont les plus abondants sont le LA et l'AA, sont les cibles privilégiées de la peroxydation lipidique. La peroxydation lipidique enzymatique représente la peroxydation de certains AGPI catalysée par les enzymes PGHS et LOX conduisant à la génération de molécules bioactives. La peroxydation lipidique non enzymatique est un processus oxydatif d'altération des AGPI induit par les RL. Elle peut altérer la structure, la fluidité et la perméabilité des membranes. Elle cible aussi les lipoprotéines qui sont très riches en AGPI et en particulier les LDL leur conférant des propriétés pro-athérogènes et pro-inflammatoires ainsi que les HDL. Elle génère des produits potentiellement toxiques, mutagènes et carcinogènes [Niki *et al.*, 2009].

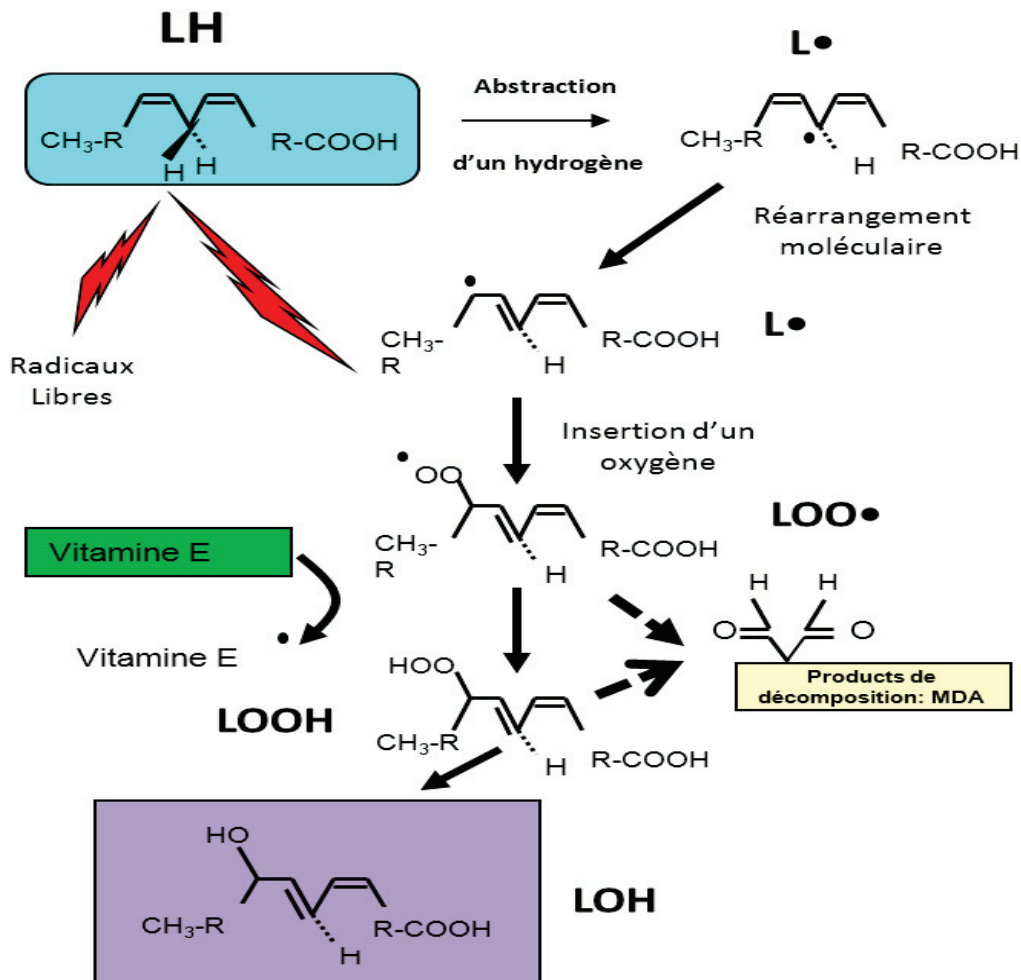


Figure 17 : Cycle de peroxydation lipidique non enzymatique d'un AGPI.

III.1. Initiation par déshydrogénation:

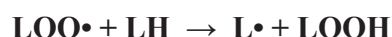
La peroxydation lipidique est initiée par l'abstraction d'un atome d'hydrogène à un groupement méthylène (-CH₂-) adjacent aux doubles liaisons d'une chaîne AGPI (LH) par un radical hydroxyle •OH ou HOO•. Un radical carbone (L•) est formé ainsi qu'une molécule d'eau (H₂O). Le L• se stabilise par remaniement électronique pour former 2 diènes conjugués (figure 17).

III.2. Propagation :

Le radical $L\bullet$ réagit avec une molécule de dioxygène (O_2) pour former un radical peroxy ($LOO\bullet$) :



Le $LOO\bullet$ va propager la réaction en chaîne avec une molécule LH voisine pour former un nouveau $L\bullet$ et un hydroperoxyde lipidique ($LOOH$). De cette manière, de nombreuses molécules d'hydroperoxydes lipidiques peuvent être formées à partir de chaque LH (figure 17).



Les hydroperoxydes $LOOH$ très instables sont immédiatement réduits en forme alcool correspondante LOH ou peuvent également devenir des radicaux alkoxy ($LO\bullet$) ou peroxy ($LOO\bullet$) (figure 17) en présence d'un métal de transition, comme le fer ou le cuivre :



Le cycle peut continuer suite à l'attaque d'un autre AGPI par ces radicaux.



III.3. Terminaison :

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



La réaction peut également être stoppée à l'aide d'antioxydants (figure 17, 18). Ces derniers donnent un hydrogène qui peut s'apparier avec l'électron non apparié des RL. Par exemple :

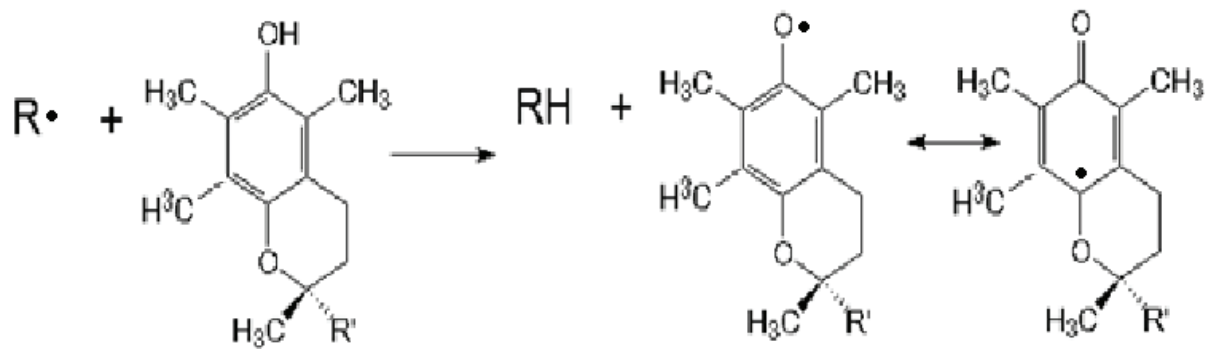


Figure 18 : Réaction d'un radical libre avec la vitamine E.

IV. Produits de peroxydation lipidique :

IV.1. Phospholipides oxydés :

L'oxydation des AGPI estérifiés majoritairement en position sn-2 des PL conduit à la formation d'un panel de molécules phospholipidiques oxydées porteuses d'acides gras hydroxylés ou de produits de cassure aldéhydiques et carboxyliques, et de lysoPL. Par exemple, l'oxydation du 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (PAPC) conduit entre autres à la formation de 1-palmitoyl-2-(5-oxovaléroyl)-sn-glycéro-3-phospholcholine (POVPC), de 1-palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (PGPC) et de 1-palmitoyl-2-(5,6-epoxyisoprostane E2)-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine (PEIPC) [Ashraf *et al.*, 2009] ((figure 7). Ces PL oxydés sont présents au sein des lipoprotéines de DT2 comme les LDL ou HDL, et sont généralement décrits pour avoir des actions pro-inflammatoires et pro-apoptotiques. [Fruhworth *et al.*, 2006 ; Leitinger, 2005 ; Kar *et al.*, 2012, Mastorikou *et al.*, 2006]. Ils sont considérés comme de bons marqueurs diagnostiques des MCV [Tsimikas *et al.*, 2006 ; Taleb *et al.*, 2011, Kiechl *et al.*, 2007].

Divers aldéhydes peuvent se former lors de la scission des hydroperoxydes estérifiés dans les PL. Le malondialdéhyde (MDA), marqueur classique de la peroxydation lipidique, est issu de la peroxydation des AGPI comportant 3 doubles liaisons. Le 4-hydroxynonénal (4-HNE) provient de la peroxydation des AGPI de la série n-6 alors que le 4-hydroxy-hexénal (4-HHE) provient de la peroxydation des AGPI de la série n-3. Ces hydroxy-alkénals sont très réactifs puisqu'ils réagissent avec les groupements aminés des protéines, des acides nucléiques, des PE et des PS pour donner des bases de Schiff ou des adduits de Michael [Bacot *et al.*, 2007] (figure 19).

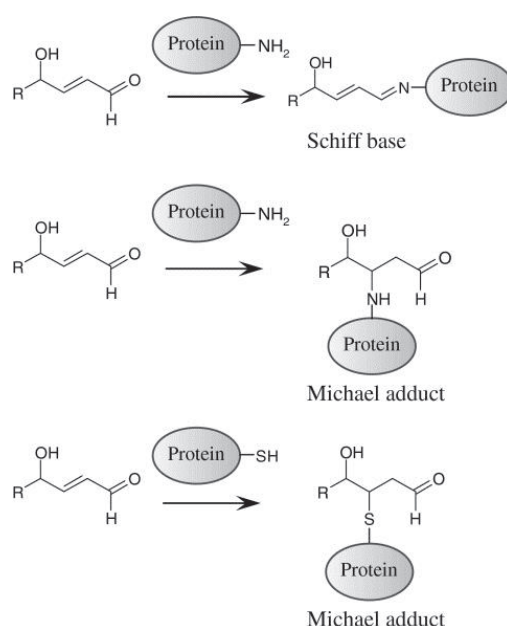


Figure 19: Réactions chimiques des phospholipides oxydés contenant des groupes aldéhydes π -terminaux avec des groupes amine et sulfhydryle de protéines, et formation de bases de Schiff et adduits de Michael.

D'après [Bochkov *et al.*, 2010].

IV.2. Produits d'oxydation du cholestérol :

Le cholestérol peut également subir une peroxydation lipidique par voie non enzymatique ou enzymatique [Murphy et Johnson, 2008]. Ses produits d'oxydation sont appelés les oxystérols. Les 7- α,β -hydroperoxycholestérol, 7- α,β -hydroxycholestérol, 7-oxocholestérol et 6-oxo-5 α -hydroxycholestérol sont les principaux oxystérols formés par auto-oxydation. Les 24-, 25- et 27-

hydroxycholestérol sont formés par voie enzymatique. Dans les esters de cholestérol, l'oxydation à la fois du cholestérol et des AGPI génère une quantité importante de produits d'oxydations. Ces oxystérols sont d'ailleurs présents au niveau plasmatique sous forme estérifiée dans les différentes classes lipoprotéiques mais aussi liés à l'albumine.

V. Défenses antioxydantes :

La production de RL est régulée en permanence et de façon très stricte par l'organisme. Pour maintenir un équilibre du statut redox, l'organisme possède son propre système de défense antioxydant incluant les molécules qui piègent les RL et les enzymes antioxydantes qui s'opposent à la propagation des RL. Les antioxydants dans les organismes sont d'origine endogène, exogène ou apportés par l'alimentation, et de nature différente, liposolubles ou hydrosolubles.

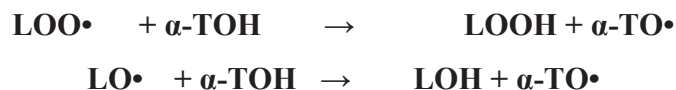
V.1. Défenses antioxydantes non enzymatiques :

V.1.a. Antioxydants liposolubles :

V.1.a.1. Tocophérols et tocotriénols (vitamine E) :

Il s'agit d'une famille de molécules comprenant les α -, β -, γ - et δ -tocophérols ainsi que les α -, β -, γ - et δ -tocotriénols. Ces molécules sont constituées d'un noyau 6-chromanol sur lequel est greffée une chaîne phytyle saturée (tocophérols) ou non (tocotriénols). Les isomères diffèrent selon le nombre et la place des résidus méthyles sur le noyau. Seuls les α - et le γ -tocophérol sont retrouvés en quantités significatives dans l'alimentation, dans les huiles végétales, dans le sang et les tissus. Étant liposoluble, la vitamine E est localisée dans les membranes et dans la monocouche lipidique des lipoprotéines. En outre, les HDL2 sont plus riches en isomères de la vitamine E que les HDL3 [Goulinet *et al.*, 1997].

Les tocophérols sont de très bons piègeurs des radicaux alkoxydes et peroxydes avec lesquels ils réagissent pour former des hydroperoxydes (LOOH) ou hydroxydes (LOH) lipidiques ainsi qu'un radical α -tocophéryle (α -TO•) stabilisé par résonance.



Ils interrompent ainsi la propagation de la réaction en chaîne de peroxydation lipidique. La vitamine E est régénérée par le glutathion, l'ubiquinol et la vitamine C [Packer *et al.*, 1979]. Par contre, à fortes concentrations, la vitamine E devient pro-oxydante.

V.1.a.2. Ubidécaquinone (Coenzyme Q10) :

Cette molécule appartient à une famille de composés liposolubles connus sous le nom d'ubiquinones essentielles à la respiration mitochondriale. Elles sont composées d'une structure benzoquinone et de 1 à 12 unités isoprènes. L'ubidécaquinone avec 10 unités isoprènes, est la forme prédominante dans les HDL humaines [Garner *et al.*, 1998]. C'est le deuxième antioxydant principal des lipoprotéines [Vincent *et al.*, 1992] et est présent également dans les membranes cellulaires. Elle existe sous 3 états d'oxydation ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, $\text{CoQ}_{10}\text{H}\bullet$, CoQ_{10}).

V.1.b. Antioxydants hydrosolubles :

V.1.b.1. Vitamine C :

L'Homme ne peut pas synthétiser l'ascorbate qui doit donc être apporté par son alimentation. La vitamine C ou acide ascorbique est un antioxydant puissant qui réagit avec les RL présents dans la phase aqueuse tels que les radicaux hydroxydes, l'anion superoxyde et l'acide hypochloreux. Le radical ascorbyle est ensuite réduit grâce aux systèmes enzymatiques dépendants du glutathion.

V.1.b.2. Glutathion :

Le glutathion est un tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine) synthétisé par les cellules. Il est présent à des concentrations millimolaires dans la plupart des cellules et à des concentrations micromolaires dans le plasma. Le glutathion piège notamment les radicaux hydroxyles, l'oxygène singulet, le peroxynitrite ONOO⁻ et détoxifie les métaux lourds. Le glutathion est également un cofacteur d'enzymes antioxydantes telles que les glutathion-peroxydase, glutathion-réductase et transférase. Lors d'un stress oxydant, l'oxydation du glutathion réduit (GSH) conduit à la formation de glutathion oxydé (GSSG).

V.1.b.3. Albumine :

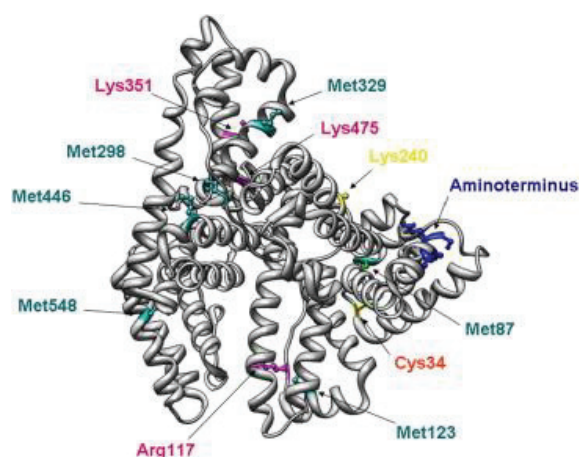


Figure 20: Structure tridimensionnelle de l'albumine et principaux sites de l'albumine impliqués dans son activité antioxydante.

D'après [Roche *et al.*, 2008].

L'albumine est la protéine la plus abondante dans le plasma, représentant environ 50 % des protéines totales (≈ 35 -50 g/l). Elle est synthétisée par le foie et possède une masse moléculaire de 66 kDa. Elle constitue dans la circulation le plus grand pourvoyeur de thiols, lui conférant des propriétés antioxydantes. En particulier, la présence d'un thiol au niveau du résidu cystéine 34

(figure 20) [Gutteridge *et al.*, 1986 ; Oettl *et al.*, 2007] est responsable de 80 % de l'activité antioxydante du plasma associée au piégeage des ERO telles que le radical hydroxyle, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, et à la liaison de radicaux libres dérivées de l'azote comme le peroxynitrite [Carballal *et al.*, 2003]. L'oxydation des résidus méthionine (au nombre de 6) (figure 20) en sulfoxydes de méthionine contribue aux défenses antioxydantes, en protégeant les protéines d'une modification oxydative et en chélatant les métaux [Bourdon *et al.*, 2005]. La portion N terminale composée de quatre acides aminés DAHK (Asp-Ala-His-Lysine) représente un site de liaison des métaux de transition comme le Cu, Fe, Co et Ni [Laussac *et al.*, 1984]. Le résidu lysine 240 permet la liaison de l'albumine à l'hème et à la bilirubine [Jacobsen, 1978].

V.2. Antioxydants enzymatiques :

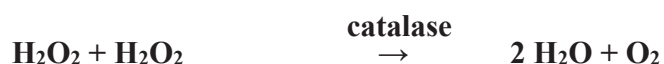
V.2.a. Superoxydes dismutases :

La SOD participe à la première ligne de défense contre les ERO. Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène.



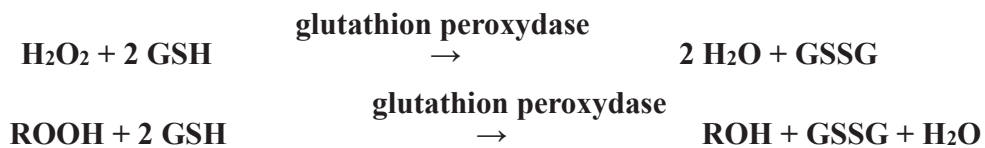
V.2.b. Catalase :

La catalase est localisée dans les peroxysomes où elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et eau selon l'équation bilan :



V.2.c. Glutathion peroxydases & glutathion réductase :

Certaines glutathion peroxydases ont au niveau de leur site catalytique une sélénocystéine. Elles ont la propriété de catalyser la réduction des hydroperoxydes d'acides gras ou H_2O_2 en leurs composés hydroxylés correspondants en utilisant le glutathion comme cosubstrat.



Ensuite, la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en forme GSH (réduit) est catalysée par la glutathion réductase en utilisant un NADPH.



VI. Oxydation des HDL:

Bien que certaines études aient suggéré que les HDL sont plus sensibles à l'oxydation que les LDL [Shao et Heinecke, 2009], d'autres ont montré que les HDL résistent mieux face à l'oxydation car elles ont des concentrations plus importantes d'antioxydants.

L'agent d'oxydation le plus utilisé pour les études *in vitro* est le cuivre (CuCl_2 ou CuSO_4).

Le mélange fer ferreux/peroxyde d'hydrogène ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$), la myéloperoxydase (MPO), l'acide hypochloreux (HOCl) et la 15-LOX sont également utilisés. Les métaux de transition comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} et la 15-LOX modifient les lipides tandis que HOCl cible surtout les apolipoprotéines.

VI.1. Oxydation du compartiment lipidique :

Les acides hydroperoxy-octadécadiénoïque (HpODE) et hydroperoxy-eicosatétraénoïque (HpETE) sont les deux hydroperoxydes majeurs et molécules primaires formés lors de la peroxydation non-enzymatique des HDL mais aussi des LDL. Ils sont rapidement réduits sous forme hydroxyle plus stable. Dans la circulation, les HDL sont considérées comme un accepteur majeur des hydroperoxydes lipidiques [Castilho *et al.*, 2001] tels que les HpETE et HpODE, qui

pourraient être produits par la 12/15-lipoxygénase dans les LDL [Navab *et al.*, 2000]. Les HDL sont aussi le transporteur des F2-isoprostanes plasmatiques, issues de la peroxydation non enzymatique de l'AA [Proudfoot *et al.*, 2009]. Différents aldéhydes, comme le MDA, 4-HHE, 4-HNE, et des produits avancés de peroxydation lipidique sont présents dans les lipoprotéines oxydées (dont les HDL) et reconnus comme des marqueurs de peroxydation lipidique [Hoff *et al.*, 1992 ; Sangvanich *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 1992; Palinski *et al.*, 1990]. Les oxystérols, dont les 7-oxo-cholestérol, 7- α -hydroxy-cholestérol, 7- β -hydroxy-cholestérol et 25-hydroxy-cholestérol sont également présents dans les HDL oxydées [Gesquière *et al.*, 1999].

VI.2. Oxydation du compartiment protéique:

L'apoA-I peut être modifiée oxydativement, des immuno-épitopes caractéristiques d'une oxydation ayant été identifiés dans les lésions d'athérosclérose et dans la circulation sanguine.

De plus, les taux circulants de l'apoA-I nitré sont élevés chez les diabétiques de type 2 [Hermo *et al.*, 2005]. L'oxydation de l'apoA-I cible les résidus d'acides aminés tels que les résidus méthionine et tyrosine, conduisant à la production de différents dérivés dont les sulfoxydes de méthionines (Met=O), les nitrotyrosines, les chlorotyrosines [Shao *et al.*, 2006]. Les résidus cystéine, lysine et tryptophane de l'apoA-I peuvent aussi être oxydés dans des situations de stress oxydant.

L'oxydation des HDL conduit à l'oxydation des résidus Met 86 et Met 112 de l'apoA-I et du résidu Met 26 de l'apoA-II et à la formation de sulfoxyde de méthionine [Garner *et al.*, 1998 ; Pankhurst *et al.*, 2003 ; Panzenböck et Stocker, 2005]. Ces modifications déstabilisent les lipoprotéines [Anantharamaiah *et al.*, 1988; Sigalov *et al.*, 2001], les sulfoxydes de méthionine étant plus polaires que les résidus méthionines ce qui contraint l'interaction hydrophobique entre les α -hélices amphiphiles de l'apolipoprotéine et les lipides [Anantharamaiah *et al.*, 1988].

L'oxydation par la MPO, oxydoréductase abondante dans les phagocytes et particulièrement dans les macrophages, produit l'acide hypochloreux (HOCl) qui modifie une grande variété de biomolécules par chloration et/ou oxydation, y compris les HDL [Bergt *et al.*, 2004]. Elle conduit à la nitration et à la chloration des résidus tyrosine de l'apo-AI, ciblant particulièrement les résidus Tyr 192, et produisant la nitro-tyrosine, la méta-tyrosine,

l'o,o'-dityrosine ou la chlorotyrosine [Shao *et al.*, 2006 ; Zheng *et al.*, 2004]. Elle conduit aussi à l'accumulation d'espèces réactives nitrogénées dans les lésions d'athérosclérose [Bergt *et al.*, 2004] et dans le plasma de patients atteints de maladies coronariennes [Pennathur *et al.*, 2004].

Certaines des modifications induites par l'HOCl produit par la MPO, telles que la formation de 3-chlorotyrosine, résultent en une diminution de l'efflux de cholestérol *via* la voie ABCA-I [Bergt *et al.*, 2004, Shao *et al.*, 2006, 2012]. La chlorination spécifique du résidu Tyr192 de l'apoA-I par la MPO conduit également à la modification oxydative de la Met 148 en sulfoxyde de méthionine, altère l'efflux de cholestérol des HDL [Shao *et al.*, 2006] et la capacité de l'apoA-I à activer la LCAT [Shao *et al.*, 2008 , 2012].

Lors d'une forte modification de l'apoA-I par la MPO, les résidus aromatiques Phe37, Phe73, et Trp de l'apoA-I situés dans les faces hélicoïdales lipidiques sont aussi ciblés [Peng *et al.*, 2005].

La modification des sous-classes d'HDL (HDL 2 & HDL3) par le méthylglyoxal ou ses métabolites dicarbonylés induit une glycation des résidus Arginine, diminue la taille et stabilité des HDL, accélère leur dégradation et diminue leur fonctionnalité [Godfrey *et al.*, 2014].

VI.3. Effet de l'oxydation des HDL sur les fonctions plaquettaires :

Les modifications oxydatives des HDL impactent les fonctions plaquettaires. Néanmoins, les effets des HDL oxydées sur les fonctions plaquettaires divergent selon les études.

Différentes études ont montré que les HDL fortement oxydées par le Cu²⁺ [Ardlie *et al.*, 1989, Takahashi *et al.*, 1996] ou par HOCl [Assinger *et al.*, 2008] peuvent induire directement l'agrégation plaquettaire sans agoniste ou la potentialiser en présence d'agoniste. De plus, les HDL modifiées par HOCl, généré par la MPO, se lient aux plaquettes *via* CD-36, induisent l'expression de la P-sélectine et de la PS à la surface des plaquettes, et augmentent la concentration de calcium cytosolique [Assinger *et al.*, 2008].

A l'inverse, le groupe de Podrez a montré que des HDL oxydées par le Cu²⁺ ou par la MPO inhibent l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine, le collagène ou l'ADP *via* SR-BI,

l'activation d' α IIb β 3 et l'expression de la P-sélectine à la surface des plaquettes [Valiyaveetil *et al.*, 2008].

Bien que les raisons sous-tendant les effets discordants des HDL oxydées sur l'agrégation plaquettaire en fonction des études ne soient pas entièrement élucidées, elles pourraient être liées aux degrés variables de modifications oxydatives et/ou à l'agent oxydant utilisé. En effet, l'oxydation modérée des HDL avec de faibles concentrations de Cu^{2+} pourrait conduire à la génération de PL oxydés dans les HDL qui augmentent la charge négative des particules HDL et de fait leur affinité pour SR-BI, inhibant l'activation plaquettaire. Inversement, une forte oxydation des HDL par l'hypochlorite ou la MPO modifie les apolipoprotéines des HDL qui se lient au CD36, activant les plaquettes [Van der Stoep *et al.*, 2014].

Diabète

I. Introduction :

Le diabète sucré est considéré comme une pandémie mondiale, qui affecte plus de 387 millions de personnes dans le monde entier, sans compter les 179 millions de personnes qui vivraient avec un diabète sans le savoir. En France, 9% (4,9 millions) de la population adulte est diabétique. Il est associé à un risque accru de maladies cardiovasculaires [Shaw *et al.*, 2010] dont 2 à 4 fois plus de risque de maladies vasculaires cérébrales, coronariennes et périphériques, constituant la principale cause de décès [Haffner *et al.*, 1998, Kannel *et al.*, 1990]. En 2014, le diabète a été la cause directe de 4,9 million de décès. Plus de 80% des décès par diabète se produisent dans des pays à revenu faible ou intermédiaire. Cette pandémie mondiale augmente sans cesse en raison de l'augmentation de l'obésité, de l'inactivité physique, du vieillissement, du surpoids, de l'urbanisation et de la pollution.

Le diabète est une maladie métabolique chronique qui apparaît lorsque l'organisme ne parvient plus à stocker et utiliser le glucose de façon convenable. Il est caractérisé par une hyperglycémie chronique avec une glycémie à jeun supérieure à 7mM. Il survient lorsque le pancréas ne produit plus assez ou plus du tout d'insuline (diabète de type 1, DT1) ou lorsque les cellules des tissus périphériques n'utilisent pas correctement l'insuline afin d'absorber le glucose (diabète de type 2, DT2).

II. Diabète de type 1 :

Le DT1 (aussi nommé diabète insulino-dépendant ou juvénile) représente 10% des diabètes dans le monde. Les individus qui en sont atteints produisent très peu ou pas du tout d'insuline en raison d'une réaction auto-immune qui détruit partiellement ou entièrement les cellules β de leur pancréas. Les symptômes sont les suivants: émission excessive d'urine (polyurie), sensation de soif (polydipsie), faim constante, perte de poids, altération de la vision et fatigue.

III. Diabète de type 2 :

Le DT2 (aussi appelé diabète non insulino-dépendant ou diabète "gras" ou diabète de la maturité) représente 90% des diabètes dans le monde. Il résulte d'une défaillance d'utilisation de l'insuline par l'organisme et les tissus périphériques. Il survient lorsque l'organisme développe une résistance à l'insuline au niveau des tissus périphériques après une longue période d'hyperinsulinémie pendant laquelle les cellules bêta pancréatiques produisent davantage d'insuline. Ces dernières finissent par s'épuiser et sécréter de moins en moins d'insuline jusqu'à ne plus en produire, conduisant à une production excessive de glucose hépatique.

Ses symptômes peuvent être les mêmes que ceux du DT1 mais sont souvent moins marqués. De ce fait, la maladie est parfois diagnostiquée plusieurs années après son apparition, une fois les complications déjà présentes. Bien qu'il survienne souvent chez des personnes d'âge mûr en surcharge pondérale et sédentaires, il atteint désormais aussi des sujets plus jeunes, y compris des enfants.

III.1. Diabète de type 2 et activation plaquettaire :

De nombreuses études montrent que les plaquettes de DT1 et DT2 sont hyperagrégables [Bensoussan *et al.*, 1975] même en l'absence de complications cardiovasculaires [Véricel *et al.*, 2004]. L'hyperactivation plaquettaire est associée à une augmentation du TxA₂ dans les plaquettes non stimulées de patients DT1 et DT2 [Véricel *et al.*, 2004]. De plus, les plaquettes de diabétiques expriment à leur surface plus de GPIb et GPIIb/IIIa [Tschoepe *et al.*, 1990], indiquant l'augmentation de la liaison des protéines d'adhésion (dont le vWF et le fibrinogène) à ces récepteurs.

L'hyperglycémie induit la glycation non enzymatique des protéines de surface, diminuant la fluidité de la membrane et augmentant l'activation plaquettaire [Winocour *et al.*, 1992]. Elle augmente aussi la production d'ERO dans les plaquettes, en particulier la production d'anion superoxyde, potentialisant l'agrégation plaquettaire et la libération de PDGF [Yamagishi *et al.*, 2001]. De façon cohérente, l'amélioration du contrôle glycémique de patients DT2 diminue la réactivité plaquettaire [Yngen *et al.*, 2006]. La résistance à l'insuline et la déficience en insuline

contribuent à augmenter la réactivité plaquettaire. En effet, l'insuline diminue l'agrégation des plaquettes induite par divers agonistes [Westerbacka *et al.*, 2002].

III.2. Glycation :

III.2.a. Mécanisme :

La glycation, ou réaction de Maillard, est une réaction chimique découverte en 1911 par le chimiste français Louis-Camille Maillard. Le glucose en solution existe sous deux formes en équilibre : sous forme de cycle pyranose stable (plus de 99 %) ou sous forme d'aldéhyde à chaîne ouverte, que l'on appelle aussi ose réducteur (moins de 0,25%). La glycation est une réaction qui se produit entre le groupement carbonyle (CHO) des oses réducteurs (sous forme linéaire), en général le glucose, et les groupements amines (NH₂) des protéines (lysines, arginines, hydroxy-lysine, histidine ou d'un acide aminé N-terminal), les lipides et les acides nucléiques. Les lysines sont les acides aminés les plus favorables à la réaction de Maillard. Cette réaction initiale, rapide et réversible, conduit à la formation d'une base de Schiff. Elle est suivie par des réarrangements connus sous le nom de réarrangements d'Amadori, donnant naissance à des produits d'Amadori puis à des céto-amines, bien plus stables. Enfin, les produits d'Amadori peuvent être modifiés (déshydratations, clivages...) ou se réarranger en composés dicarboxyles aboutissant à la production d'Advanced Glycated End products (AGE) ou PTG « Produits Terminaux de Glycation » tels que la carboxyméthyllysine (CML) (figure 21). Ces produits très réactifs augmentent au cours du diabète et sont responsables de nombreuses complications. Ils augmentent aussi dans le vieillissement, l'insuffisance rénale, la cataracte, les maladies cardiovasculaires et les accidents vasculaires cérébraux.

La vitesse de la réaction dépend de la nature des résidus aminés impliqués et de la concentration des deux espèces moléculaires. Cette réaction est particulièrement présente dans le diabète puisqu'elle est favorisée par une concentration élevée de glucose.

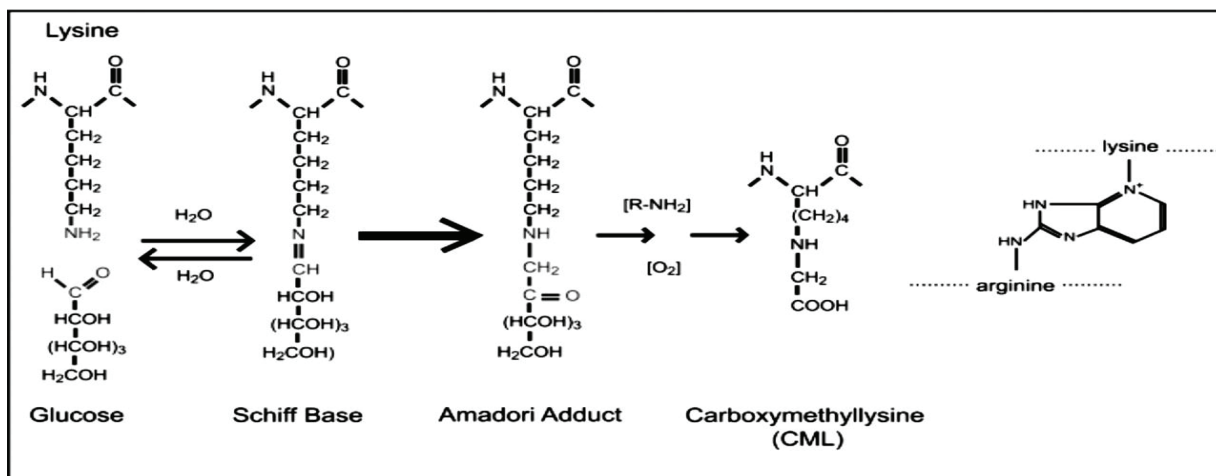


Figure 21: Principales étapes de la réaction de Maillard conduisant à la formation de produits avancés de glycation (AGE).

L'une des protéines dont la glycation a été particulièrement étudiée est l'hémoglobine, qui sous sa forme glyquée est appelée HbA1c. Cette protéine est glyquée même lorsque la glycémie est normale et son degré de glycation est positivement corrélé à la glycémie. Le taux normal d'HbA1c est de 4 à 6 %. Toute variation de 1 % de l'HbA1c correspond à une variation de 0,35 g/L ou 2 mmol/L de la glycémie moyenne. Ainsi, mesurer le taux de glycation de l'hémoglobine renseigne sur la glycémie moyenne des 2 à 3 mois précédant la mesure (la durée de vie des globules rouges qui contiennent l'hémoglobine étant de l'ordre de 4 mois). Le taux d'HbA1c est utilisé comme indice du contrôle métabolique de la glycémie [Koenig *et al.*, 1976].

III.2.b. Glycation des HDL :

Les protéines des lipoprotéines plasmatiques circulantes, notamment les LDL et HDL, sont sujettes à la glycation. D'ailleurs la glycation des LDL [Younis *et al.*, 2009] et des HDL est déjà présente chez des sujets non diabétiques et chez des patients hyperlipidémiques non diabétiques [Akanji *et al.*, 2002]. L'hyperglycémie conduit à une glycation accrue des LDL, en particulier de

l'apoB100, et de l'apoA-I des HDL. Le taux de glycation des lipoprotéines est corrélé positivement à celui de l'HbA1c. Le pourcentage d'apoB glyquée est augmenté (8% vs 4%) et corrélé au taux d'HbA1c chez des patients diabétiques [Tames *et al.* , 1992]

Au sein des HDL, toutes les apolipoprotéines sont sujettes à la glycation mais ce sont les apoA-I qui sont glyquées en majorité (80%) [Calvo *et al.*, 1988]. En particulier, les résidus Lys et Arg de l'apoA-1, exposés vers l'extérieur, ainsi que les PE sont considérés comme des cibles préférentielles de glycation. Les HDL glyquées *in vitro* ont une augmentation importante des produits de glycation suivants, fructose-lysine, AGE et CML [Hedrick *et al.*, 2000]. Une augmentation de 400 % des adduits de glycation a été trouvée dans les HDL de patients DT2 et DT1 comparés à ceux de sujets sains [Calvo *et al.*, 1988 ; 1993]. Les sous-classes HDL2 et HDL3 de patients DT2 ont des concentrations plus importantes de composés dicarbonyles [Godfrey *et al.*, 2014].

Il a été montré que des HDL reconstituées avec de l'apoA-I et des PL sont davantage glyquées que l'apoA-I seule, indiquant que la glycation des HDL est fortement dépendante des molécules environnantes dont les PL [Calvo *et al.*, 1988].

III.2.c. Impact de la glycation des HDL sur leur fonctionnalité :

La glycation des HDL *in vitro*, en réduisant les résidus Lys de 40 à 50%, diminue l'efflux de cholestérol des macrophages [Duell *et al.*, 1991] et la liaison des HDL glyquées aux fibroblastes [Duell *et al.*, 1990], bien que certaines études n'ont pas observé de tels effets [Rashduni *et al.* 1999]. L'hyperglycémie et les AGE altèrent l'efflux de cholestérol et diminuent l'expression d'ABCA-1 [Passarelli *et al.* , 2005] et de SR-BI [Ohgami *et al.*, 2001].

La glycation des HDL et de l'apoA-I est délétère sur l'activité des enzymes antioxydantes associées aux HDL. Elle diminue fortement l'activité de la PON1 *in vitro* [Hedrick *et al.*, 2000, Ferretti *et al.* , 2001]. De plus, l'activité de la PON1 est corrélée négativement avec les niveaux de produits de glycation avancés [Zhou *et al.* , 2008] et l'activité de la LCAT est associée négativement au taux d' HbA1c de patients DT2 [Nakhjavani *et al.* , 2008 ; Nobecourt *et al.* ,

2007]. La glycation de l'apoA-I inactiverait la LCAT en diminuant la capacité de l'apoA-I à se lier à la LCAT [Nobecourt *et al.*, 2007].

La glycation des HDL a également des effets délétères sur leur fonction anti-inflammatoire, puisque la perfusion d'apo-AI glyquée délipidée ne diminue pas l'expression des molécules d'adhésion après une lésion vasculaire, contrairement à une apoA-I native délipidée [Nobecourt *et al.*, 2010].

Les HDL glyquées *in vitro* perdraient leurs propriétés antiagrégantes et ne s'opposeraient plus à l'augmentation de la formation de TxA₂ induite par la thrombine [Takeda *et al.*, 1992].

III.2.d. Glycoxydation des HDL :

Bien qu'une étude ait montré que la glycation *in vitro* des HDL ne promeut pas leur oxydation [Rashduni *et al.*, 1999], la plupart des études *in vitro* ont montré que le processus de glycation des HDL est accompagné par l'oxydation de leurs lipides [Hedrick *et al.*, 2000, Ferretti *et al.*, 2001]. Les deux processus sont intimement liés, d'où le terme de glycoxydation [Baynes, 1991]. Ce terme est très utilisé pour décrire les modifications des protéines dont les lipoprotéines, l'albumine et le collagène chez les patients DT1 et DT2 [de Nigris *et al.*, 2003 ; Actis Dato et Rebolledo, 2000 ; Napoli *et al.*, 2002 ; Kalogerakis *et al.*, 2005, Thornalley *et al.*, 2014].

Il est bien connu que la glycation par elle-même génère des RL. Même en absence d'oxygène ou d'ERO, les protéines glyquées [Jiang *et al.*, 1990 ; Gillery *et al.*, 1988] ou les lipides glyqués (PE glyquée nommée Amadori-PE) deviennent des cibles d'oxydation avec production d'anions superoxyde [Oak *et al.*, 2000] et peroxydation accrue des AGPI des lipoprotéines. En outre, dans des conditions hyperglycémiques, le glucose peut produire des ERO par auto-oxydation [Wolff et Dean, 1987]. Des ERO sont donc générés à toutes les étapes de la glycation, à la fois au stade initial, intermédiaire et terminal, conduisant à la formation de différents aldéhydes réactifs tels que les glyoxal, méthylglyoxal, 2-oxo-aldéhydes et 3-désoxy-glucosone.

La glycation produit des composés communs avec ceux issus de la peroxydation lipidique [Fu *et al.*, 1996]. En effet, la CML est un AGE mais aussi un produit de lipoxydation avancé

puisqu'elle peut se former par oxydation pendant la peroxydation lipidique, sans glycation préalable. La CML présente d'ailleurs une forte similitude structurale avec la carboxyméthyléthanolamine (CME), produit d'oxydation des PE. En conclusion, la glycation favorise ou même amplifie l'oxydation, et ces deux phénomènes sont concomitants et indissociables chez les patients diabétiques.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS

I. Réactifs et petits matériels :

Tous les réactifs utilisés proviennent de Sigma-Aldrich à l'exception de ceux cités ci-dessous.

- Anticorps polyclonal anti-SR-BI, Novus Biologicals
- Anticorps polyclonaux anti-p38 MAPK, anti-phospho-p38 MAPK et anti-phospho-cPLA₂, anti- β -actin, Cell Signaling Technology
- Cartouches C18, Macherey-Nagel
- Collagène, Horm Nycomed
- Colonne chirale (ChiralCel® OD-H, 5 μ m, 4,6 x 250 mm), Daicel
- Colonne de silice greffée (X Bridge C18, 3,5 μ m, 4,6 x 150 mm), Waters
- Colonne Nucléosil C18 (5 μ m, 4,6 x 250 mm), colonne Nucléosil C18 (5 μ m, 4 x 150 mm), Macherey-Nagel
- << ECL Advance Western Blotting Detection Kit >>, GE Healthcare
- Gels d'électrophorèse Critérion XT MOPS 12% Bis-Tris, tampon de migration, Bio-Rad
- 15-HEDE, HETEs, HODEs, Cayman Chemicals
- Kit de dosage de l'apolipoprotéine A-I 9D92, Abbott Diagnostics
- Réactifs de dosage des protéines, Bio-Rad
- Kits de cholestérol RTU et triglycérides PAP 150, Biomérieux
- 15-lipoxygénase de soja (type V), Sigma
- PC (16:0/18:2), Avanti Polar Lipids
- Tampon de décrochage « stripping buffer », Gene Bio-Application Ltd

- Tubes « Ethylenediamine tetraacetic acid » (EDTA) 10 mL, BD Vacutainer

II. Appareils :

- Agrégomètre « Dual Aggro-Meter », Chrono-Log Coulter Margency
- Balances Mettler
- Centrifugeuse GR4.11 Jouan
- Centrifugeuse 4K15 Sigma
- Chromatographie en phase gazeuse série HP6890 modèle G1530 Hewlett Packard
- Détecteur fluorimétrique SFM Kontron
- HPLC 320 system Kontron
- HPLC 1100 Series Agilent
- Collecteur de fraction Model 2110 Bio-Rad
- pH-mètre Radiometer Tacussel
- Spectrophotomètre Kontron Instruments
- Système chromatographique FPLC Akta
- Système d'électrophorèse Mini-Protean II et d'électrotransfert Mini-Trans Blot, Bio-Rad
- Système d'imagerie ImageMaster VDS-CL (logiciel ImageQuant) Amersham Pharmacia
- Ultracentrifugeuse Optima, rotor 100.3 Beckman Coulter

METHODES

I. Méthodes relatives aux HDL:

Les échantillons de plasma, de lipoprotéines et d'extraits lipidiques sont préparés soigneusement de façon à éviter l'auto-oxydation. Lors de chaque étape requérant des temps d'attente, les échantillons ont été mis à l'abri du dioxygène de l'air en remplaçant ce dernier par de l'azote. De l'EDTA (1 mM), un chélateur d'ions divalent, a systématiquement été rajouté aux préparations d'HDL afin d'éviter leur oxydation par des ions divalents métalliques comme le Cu^{2+} ou le Fe^{2+} . Enfin, du butyl-hydroxy-toluène (BHT), antioxydant synthétique, a été ajouté afin de prévenir l'auto-oxydation des échantillons.

I.1 Isolement du plasma :

Le sang de donateurs de l'EFS est recueilli par ponction veineuse sur anticoagulant CPD (acide citrique 15,6 mM, citrate de sodium 89,4 mM, phosphate monosodique 16,1 mM, dextrose 128,7 mM, pH 5,6) à raison d'1 volume de CPD pour 7 volumes de sang.

Le sang des patients diabétiques est prélevé par une infirmière du service d'Endocrinologie-Diabétologie-Maladies métaboliques - Nutrition du Groupement Hospitalier Est des Hospices Civils de Lyon (dirigé par le Prof. P. Moulin) et recueilli dans des tubes contenant un anticoagulant sous forme lyophilisée (1,8 mg d'EDTA/tube).

Quelle que soit sa provenance, le sang est immédiatement centrifugé à 1800 g durant 10 minutes à 20°C afin d'obtenir du plasma auquel 1mM d'EDTA et 10 μM de BHT sont ajoutés. Le plasma est stocké sous azote à -80°C, et l'utilisation se fait dans un délai court.

I.2 Ultracentrifugation séquentielle à temps courts :

La séparation des lipoprotéines par ultracentrifugation à temps courts [Tong *et al.*, 1998] est basée sur leurs différences de densité. Leurs propriétés de flottaison sont différentes en fonction de la densité du milieu. La densité du plasma est ajustée à 1,063 g/mL par addition de bromure de potassium (KBr) solide. Ce plasma est ultra-centrifugé à 540 000 g (correspondant à 100 000

rpm) durant 5h à 4°C pour faire flotter un anneau, contenant les chylomicrons, VLDL, IDL et LDL qui ont une densité inférieure à la densité ajustée ($d < 1,063$). Après élimination de l'anneau, la phase aqueuse restante est prélevée en prenant soin d'éviter de prélever le culot. La densité de la solution est alors ajustée à 1,21 g/mL par addition de KBr solide. Une seconde centrifugation est réalisée à 540 000 g pendant 6h30 à 4°C afin de faire flotter l'anneau contenant les HDL.

Pour obtenir les sous-classes d'HDL (HDL2 & HDL3), la densité de la solution « plasma sans chylomicrons, VLDL et LDL » est d'abord ajustée à 1,125g/mL pour obtenir les HDL2 et centrifugée à 540 000 g pendant 6h30 à 4°C. Après prélèvement de l'anneau correspondant aux HDL2, la densité de la solution restante est ajustée à 1,21 g/mL et centrifugée à 540 000 g pendant 6h à 4°C pour obtenir les HDL3.

Les différentes solutions d'HDL sont dialysée 3 fois pendant 2h dans 2 L de PBS 1X (NaCl 136,8 mM ; KCl 2,6 mM ; KH_2PO_4 1,71 mM ; Na_2HPO_4 8 mM ; pH 7,2) contenant 1mM d'EDTA. Les HDL sont ensuite conservées à 4°C sous azote pendant 7 jours au maximum.

I.3 Modification des HDL *in vitro* :

Les HDL obtenues après dialyse sont incubées en absence ou en présence de glucose (50mM) pendant 5 jours à 37°C à une concentration de 3mg de protéines/mL. Une dialyse est réalisée pour éliminer l'excès de glucose, celui-ci empêchant l'oxydation par une réaction chimique de Fehling. En effet, en présence de glucose, le métal de transition Cu^{2+} est réduit en Cu_2O qui n'est plus capable d'induire la production de radicaux libres initiateurs de la peroxydation lipidique. Les HDL dialysées sont ensuite oxydées ou non pendant 1 jour à 37°C par le chlorure cuivrique CuCl_2 (5 μM). Enfin, une dernière dialyse est réalisée afin d'éliminer l'excès de Cu^{2+} qui pourrait interférer sur la fonction des plaquettes sanguines (figure 22). Les incubations des contrôles sont réalisées en présence d'EDTA (1mM) et de BHT (20 μM) afin de prévenir l'auto-oxydation. Toutes les préparations contiennent de l'azide de sodium (1mM).

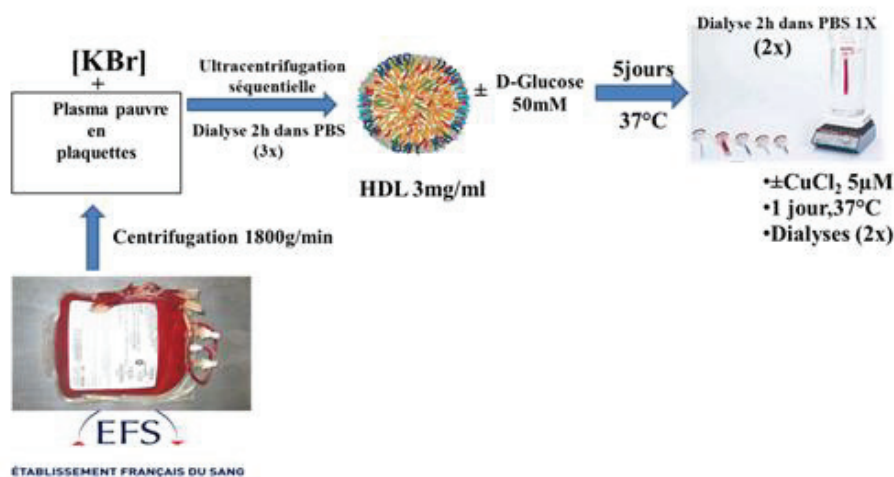


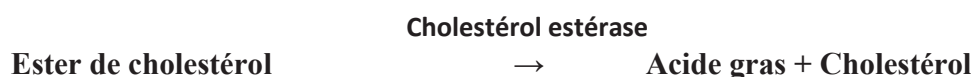
Figure 22 : Schéma décrivant les étapes d'isolement et de modifications in vitro des HDL.

I.4 Dosage des protéines:

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

I.5 Dosage du cholestérol total :

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



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



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



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

I.6. Dosage des triacylglycérols :

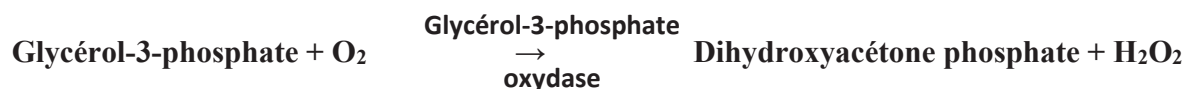
Le contenu en TAG des HDL est déterminé par une réaction enzymatique selon la méthode de Fossati [Fossati et Prencipe, 1982]. Celle-ci consiste à hydrolyser les TAG en glycérol et acides gras non estérifiés à l'aide d'une lipase.



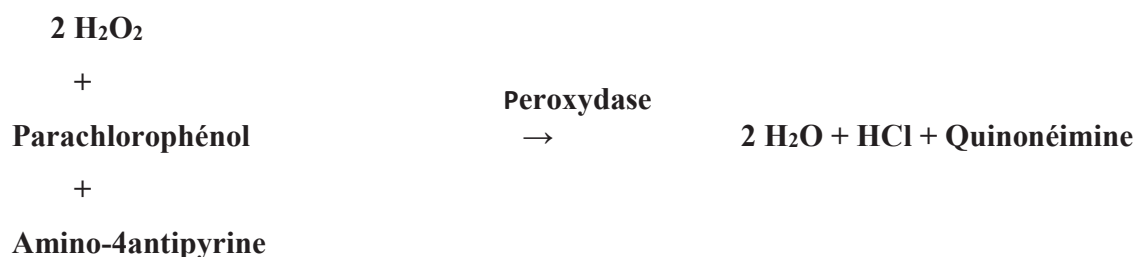
Le glycérol, en présence d'ATP, est phosphorylé par une glycérokinase pour donner du glycérol-3-phosphate.



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



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



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

I.7. Dosage de l'apoA-I :

Le dosage de l'apoA-I est réalisé par immuno-turbidimétrie avec l'automate ARCHITECT c16000 au Centre de Biologie et Pathologie Est (Dr. Mathilde Di Filippo). Cette méthode consiste à mesurer l'augmentation de la turbidimétrie dans un échantillon causée par la formation de complexes immuns insolubles entre l'anticorps anti-apoA-I et l'apo A-I des HDL [Brustolin *et al.*, 1991 ; Contois *et al.*, 1996].

I.8. Composition en acides gras des classes lipidiques des HDL :

I.8.a. Extraction lipidique :

La technique d'extraction liquide-liquide utilisée pour extraire les lipides totaux des HDL est basée sur le coefficient de partition entre la phase organique contenant les lipides (éthanol +

chloroforme) et la phase aqueuse (H₂O). Un ratio HDL : éthanol : chloroforme, (1:3:6, respectivement) est utilisé pour extraire les lipides totaux [Croset et Lagarde, 1985]. Sont également ajoutés 50 µM de BHT ainsi que deux standards internes: la diheptadécanyol-glycérophosphocholine et le cholestéryl-heptadécanoate. Le mélange est centrifugé à 600 g durant 10 minutes. La phase organique inférieure est prélevée, évaporée sous azote et conservée à -20°C. Une seconde extraction est effectuée sur la phase aqueuse restante et laissée à décanter pendant au moins 4h à 4°C. La seconde phase organique est poolée à la première, évaporée sous azote puis conservée à -20°C.

I.8.b. Séparation des classes lipidiques par chromatographie sur couche mince (CCM) :

Une seule migration chromatographique est réalisée afin de séparer les phospholipides (PL), les esters de cholestérol (EC) et les triacylglycérols (TAG). Les échantillons secs sont repris avec de l'éther diéthylique/méthanol (9:1, v/v) puis déposés sur une plaque de silice (gel 60, 20x20 cm) préalablement éluée par du méthanol. La phase mobile très apolaire, composée d'hexane/éther/acide acétique (80:20:1, v/v/v) permet d'éluer les lipides suivant leur polarité (R_f EC = 0,9 ; R_f TG = 0,56), tandis que les phospholipides très polaires (R_f = 0) restent au point initial du dépôt. Les lipides sont révélés sous une lampe UV (220nm) après vaporisation de dichlorofluorescéine (0,02% dans éthanol/eau, 95:5, v/v). Les zones de silice contenant les différentes classes lipidiques sont grattées.

I.8.c. Transméthylation des acides gras :

Cette étape permet de séparer les acides gras du squelette où ils sont estérifiés, tout en les rendant volatils afin de permettre leur analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC). La réaction chimique de transméthylation, en présence d'un catalyseur (le trifluorure de bore, BF₃), permet de rompre la liaison ester pour en former une autre avec un groupement méthyle. 250 µL de toluène/méthanol (40:60, v/v) et 250 µL de BF₃/méthanol (1,3 M, 10% dans le méthanol) sont ajoutés à la silice. Les échantillons sont placés dans un bain sec à 100°C pendant 1h30. La réaction est arrêtée dans la glace pendant 5 minutes puis 1,5 mL de carbonate dipotassique 5%

(K₂CO₃) est ajouté pour neutraliser l'acidité du milieu. L'extraction des acides gras méthylés est réalisée deux fois par 2 mL d'isooctane. Une centrifugation à 600 g de 10 minutes permet de séparer la phase aqueuse de la phase organique. Cette dernière est récupérée et évaporée sous azote. Les échantillons sont repris dans un volume défini d'isooctane pestipur de manière à être suffisamment dilués pour leur analyse par GC.

I.8.d. Analyse par chromatographie en phase gazeuse :

Les acides gras, dérivés sous forme d'esters méthyliques, sont analysés dans un chromatographe en phase gazeuse (HP6890 G1530). 1 µL est injecté *via* un injecteur split/splitless (T = 230°C) dans une colonne capillaire (60 m x 0,25 mm). La température du four augmente régulièrement de 50°C à 140°C à raison de 20°C/minute puis de 140°C à 250°C à raison de 2°C/minute. Les acides gras sont portés à ébullition et entraînés dans la colonne BPX 70 recouverte intérieurement d'un film de phase stationnaire (25 µm) par de l'hydrogène et interagissent avec la phase stationnaire selon leur polarité. Ils sont séparés en fonction de leur point d'ébullition et de leur affinité avec la phase stationnaire. La détection est réalisée par un détecteur à ionisation de flamme (T = 250°C). Le flux de la colonne arrive dans un brûleur alimenté en air et hydrogène. La combustion produit des ions responsables du courant ionique qui est transformé en tension avec un électromètre pour donner un signal. La réponse est proportionnelle au nombre de carbones et de doubles liaisons π présentes dans les molécules détectées. Les différents acides gras sont identifiés selon leur temps de rétention comparativement à des standards injectés seuls (figure 23). Le standard interne permet de quantifier chaque acide gras.

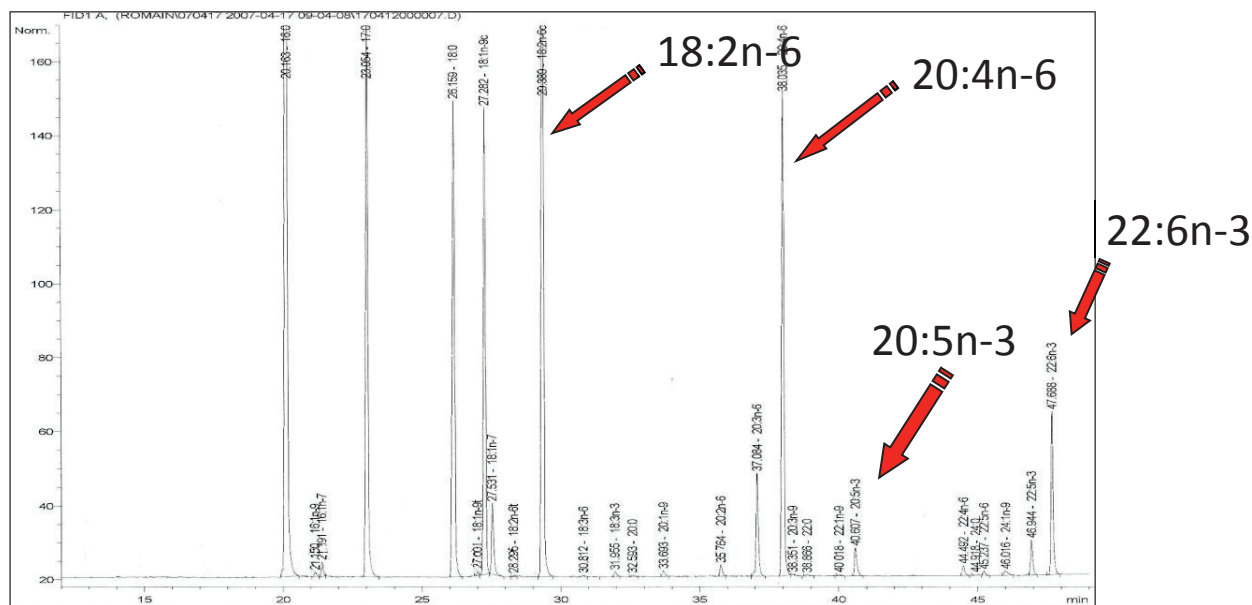


Figure 23 : Chromatogramme typique obtenu après séparation par chromatographie en phase gazeuse (GC) des esters méthyliques d'acides gras des phospholipides.

I.9. Dosage de la vitamine E :

Une extraction liquide-liquide de 50µL de HDL (3mg/mL) auxquels sont ajoutés 470µL d'H₂O a été effectuée. Les isomères de tocophérol sont extraits par 470µL d'éthanol et 2 mL d'hexane. 200 pmoles de tocol sont ajoutées comme standard interne. Le mélange est vortexé et centrifugé à 1800g durant 10 minutes à 10°C. La phase organique supérieure est prélevée et évaporée sous azote et conservée à -20°C jusqu'à analyse. L'extrait est repris par 300 µL de méthanol/eau (85:15, v/v), dont 100 µL sont injectés et analysés par HPLC en phase inverse couplée à un détecteur fluorimétrique. La phase stationnaire est une colonne Nucléosil greffée de C₁₈ (5µm, 150mm x 4,6mm) très hydrophobe et la phase mobile est le solvant méthanol/eau (95:5, v/v) dont le débit est fixé à 1mL/min [Calzada *et al.*, 2007]. Plus la molécule est polaire, plus son temps de rétention est court. Excités à 295 nm, les isomères de tocophérol sont fluorescents à 340 nm. L'α-tocophérol et le γ-tocophérol sont quantifiés grâce au standard interne (figure 24).

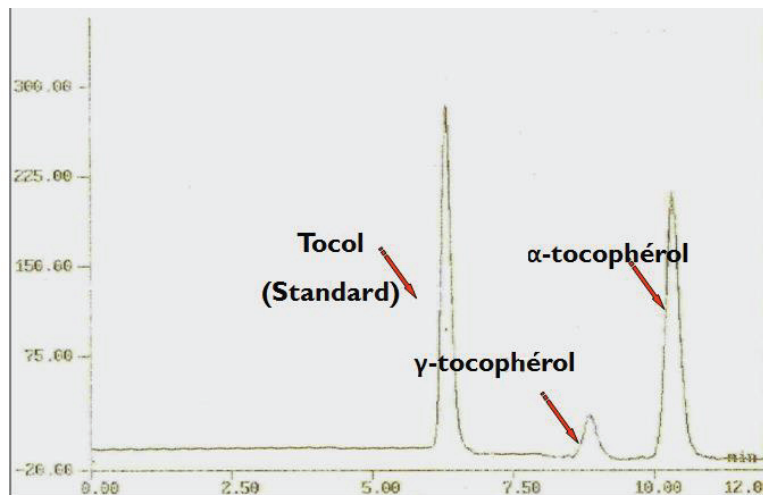


Figure 24: Chromatogramme typique obtenu après séparation des isomères du tocophérol contenus dans les HDL par HPLC couplée à un détecteur fluorimétrique (λ excitation=295nm; λ émission=340nm). Le tocol est le standard interne.

I.10. Dosage du dialdéhyde malonique (MDA) :

Il est l'un des produits terminaux de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés (AGPI) ayant un motif 1,4 cis,cis-pentadiène. Il est considéré comme un marqueur de la peroxydation lipidique non enzymatique.

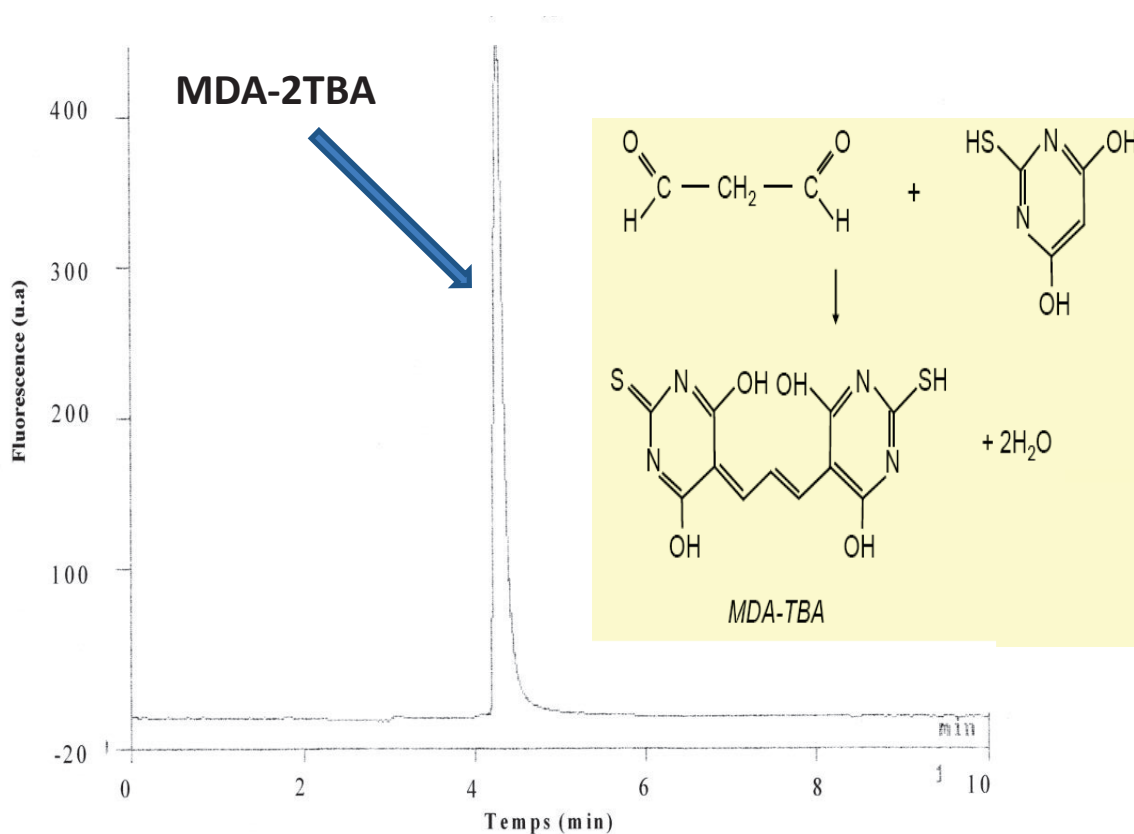


Figure 25 : Chromatogramme de l'adduit du MDA avec 2 molécules de TBA obtenu après séparation par HPLC couplée à un détecteur fluorimétrique.

Le dosage du MDA est basé sur la réaction entre une molécule de MDA et 2 molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) en milieu acide à 100°C selon un mécanisme d'addition nucléophile [Therasse et Lemonnier, 1987] (figure 25).

50 µL d'HDL (3 mg/mL) auxquelles sont ajoutés 450µL d'H₂O, 40 µL de BHT 5 mM, 100 µL d'acide acétique 16,5 N et 200 µL de TBA 10 mM, dissous dans un tampon phosphate (KH₂PO₄ 0,1 M, pH 3), sont placés dans un tube et incubés pendant 1h à 95°C. La réaction est stoppée dans la glace durant 5 minutes. Le milieu est acidifié avec 10 µL d'HCl 6N et le complexe MDA-2TBA extrait par 2 mL d'acétate d'éthyle. Après une centrifugation de 10 minutes à 1800 g, la phase organique supérieure est prélevée et évaporée sous azote. L'adduit MDA-2TBA est

repris par 200 μ L de méthanol/eau (10:90, v/v) dont 100 μ L sont injectés puis analysés par HPLC en phase inverse couplée à un détecteur fluorimétrique. La phase stationnaire est une colonne Nucléosil greffée de C18 (5 μ m, 250 mm x 4,6mm) parcourue par le solvant méthanol/eau (7:3, v/v) à un débit de 0,8 mL/min. Le détecteur fluorimétrique va exciter l'adduit MDA-2TBA à une longueur d'onde de 515 nm qui va émettre à 553 nm. Une gamme étalon de standardisation externe est réalisée parallèlement avec le 1,1,3,3-tétraméthoxypropane (TMP) pour quantifier la concentration de MDA dans les HDL.

I.11. Synthèse de 1-palmitoyl,2-(15(S)-hydroxy-eicosadienoyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine :

Dans le but de quantifier les acides gras monohydroxylés (AGOH) dans les phospholipides, un phospholipide estérifié avec un acide gras hydroxylé pouvant servir de standard interne a été synthétisé, en collaboration avec le laboratoire de Chimie Organique et Bioorganique, ICBMS, INSA-Lyon (Meddy El Alaoui).

Tout d'abord, du 1-palmitoyl,2-eicosadienoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine PC(16:0/20:2n-6) est synthétisé chimiquement à partir d'une lyso-PC (la 1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycéro-3-phosphocholine) (0,2 mmol) et un acide gras libre le 11,14-eicosadiénoïque (20:2n-6) (0,08 mmol). La réaction d'estérification est réalisée pendant 40h à température ambiante en présence de 2 catalyseurs, les 4-pyrrolidinopyridine (PPyr) (0,09 mmol) et dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (0,09 mmol) dans un milieu réactionnel de 1mL de chloroforme anhydre. Après avoir concentré le milieu réactionnel, le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (chloroforme / méthanol / H₂O, 65:35:4, v/v/v). La fraction contenant le produit est purifiée par chromatographie sur résine échangeuse d'ions de type Amberlyst® (chloroforme/méthanol/H₂O, 65:35:4, v/v/v) pour obtenir du PC(16:0/20:2). Du 1-palmitoyl,2-(15(S)-hydroperoxy-eicosadiénoyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine (PC(16:0/15(S)-HpEDE)) est alors synthétisé par voie enzymatique à partir du PC(16:0/20:2n-6) et réduit en PC(16:0/15(S)-HEDE). La concentration du standard est déterminée par spectrophotométrie et la pureté du produit a été contrôlée par HPLC.

I.12. Quantification des acides gras monohydroxylés totaux :

Les AGOH sont soit estérifiés dans les PL, TAG, EC, soit non estérifiés. Ils ont été dosés dans les lipides totaux des HDL et dans les principales classes lipidiques des HDL après séparation des classes lipidiques PL, EC et TAG par CCM suivant le protocole décrit en détail auparavant. Pour la quantification des AGOH dans les PL et les lipides totaux, le standard interne synthétisé PC(16:0/15(S)-HEDE) est ajouté dans les HDL avant extraction lipidique. Pour les EC et TAG, l'acide 15-hydroxy-eicosadiénoïque (15-HEDE) est utilisé comme standard interne et ajouté après séparation des classes lipidiques par CCM. Suivant les dosages, 400 pmoles de PC(16:0/15(S)-HEDE) ou 400 pmoles de 15-HEDE sont ajoutées à 500 µL d'HDL ($\approx$ 4 mg/mL). La phase aqueuse est acidifiée à pH 3 avec de l'acide acétique. Les lipides sont extraits par 1,5 mL d'éthanol et 3 mL de chloroforme en présence de 50 µM de BHT. Suite à la centrifugation de l'échantillon à 600 g pendant 10 minutes, la phase organique inférieure est prélevée, évaporée sous azote et conservée à -20°C. Une seconde extraction est effectuée sur la partie restante (éthanol/chloroforme, 1:2, v/v, BHT 50 µM) et laissée à décanter une nuit. La seconde phase organique est poolée à la première, évaporée sous azote puis conservée à -20°C. Une hydrolyse en condition basique des liaisons esters des PL, EC et TAG est effectuée sur les fractions lipidiques obtenues. Pour cela, l'extrait sec est repris dans 950 µL d'éthanol auquel sont ajoutés 50 µL de KOH 10 M et 50 µM de BHT puis incubé pendant 30 minutes à 60°C. La réaction est arrêtée en plongeant les tubes dans la glace. Les hydroperoxydes d'acides gras présents sont réduits en acides gras hydroxylés en ajoutant 5 µL de tétrahydroborure de sodium (NaBH_4) solubilisé dans l'eau (1 mg/mL) pendant 10 min dans le milieu réactionnel. Ensuite, de l'acide acétique pur (80 µL) est ajouté pour neutraliser le KOH et éliminer l'excès de NaBH_4 qui pourrait réduire les doubles liaisons des AGPI. 1 mL d'eau et 2 mL d'hexane sont ajoutés. Le mélange est vortexé, centrifugé à 800g à 20°C pendant 10 min. La phase organique supérieure est prélevée. Une double extraction est réalisée. Les phases organiques sont évaporées sous N_2 . L'échantillon est repris avec de l'éther diéthylique/méthanol (9:1, v/v) et déposé sur une plaque de silice préalablement éluée par du méthanol. Le solvant de migration hexane/éther diéthylique/acide acétique (60:40:1, v/v/v) permet de séparer les AGOH ($R_f = 0,3$) des acides gras non estérifiés ($R_f = 0,6$). Les AGOH sont extraits trois fois par 2 mL de méthanol. Une

centrifugation à 600 g de 10 minutes permet d'éliminer la silice. Le solvant est prélevé et évaporé sous azote [Colas *et al.*, 2011].

I.13. Analyse des énantiomères d'acides gras hydroxylés par HPLC chirale :

Les AGOH (13-HODE, 9-HODE, 15-HETE) sont repris par de l'acétonitrile/eau pH 3 (3:7, v/v) et analysés par HPLC sur une colonne de silice greffée C18 (X Bridge (3,5 μ m, 4,6 x 150 mm)). Un gradient d'élution est réalisé avec deux solvants A et B, l'éluant A étant composé d'acétonitrile/eau pH 3 (1:9, v/v) et l'éluant B d'acétonitrile pur. Ce gradient permet l'élution des composés injectés (t = 5 min, 0% B; t = 10 min, 30% B; t = 30 min, 40% B; t = 50 min, 60% B; t = 65 min, 100% B). Le débit du solvant est fixé à 1 mL/min. En sortie de colonne, les AGOH, possédant une double liaison conjuguée, sont détectés à 234 nm avec un détecteur à barrette de diodes (figure 26).

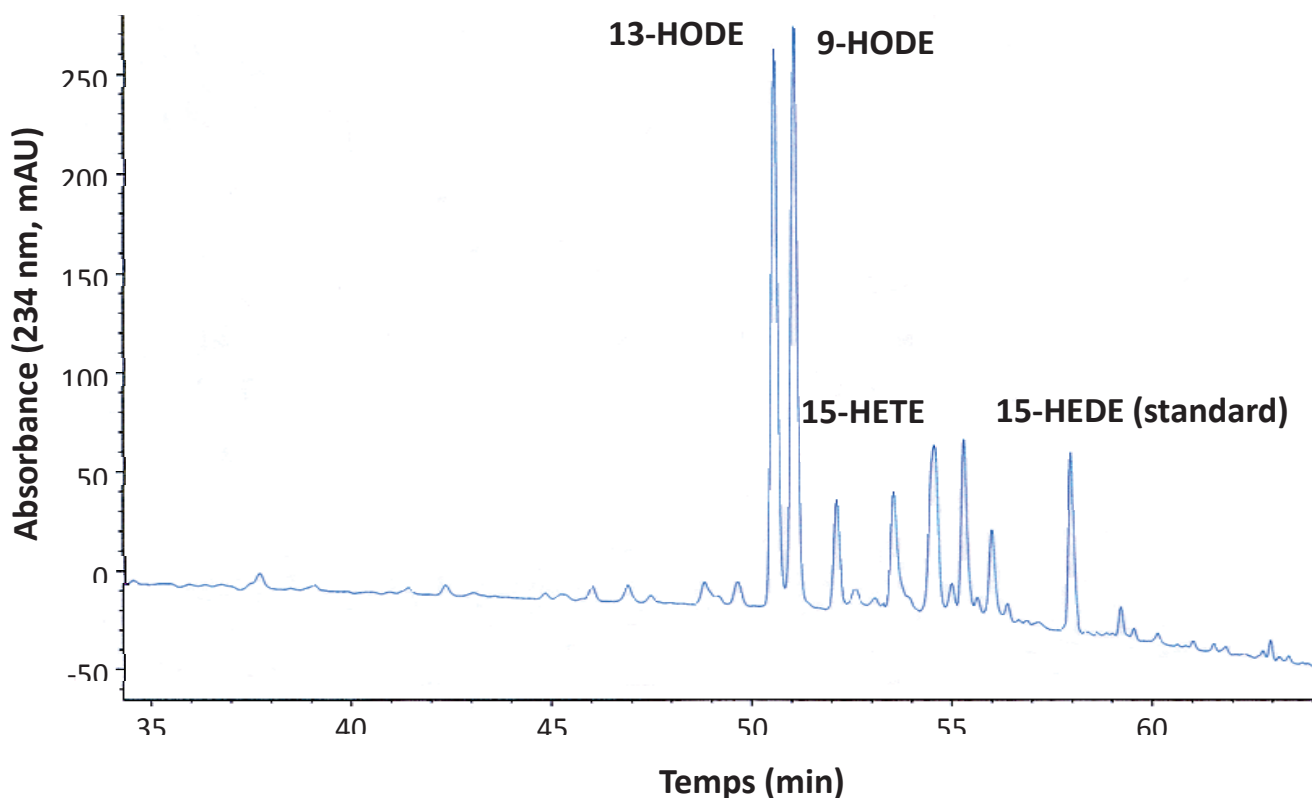


Figure 26 : Profil chromatographique d'acides gras hydroxylés après séparation par HPLC et détection UV à 234 nm.

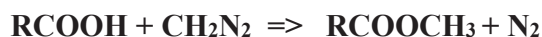
I.13.a. Préparation du diazométhane :

La méthylation des groupements carboxyliques libres s'effectue avec du diazométhane. 10 pastilles d'hydroxyde de potassium (KOH) sont solubilisées dans un mélange d'éther diéthylique/méthanol (3:6, v/v). Le diazométhane sous forme gazeuse est généré par l'addition d'environ 10g de N-Nitroso-N-méthyl-4-toluènesulfonamide utilisé comme précurseur, et piégé par barbotage dans 30 mL d'éther diéthylique stabilisé par 10 % de méthanol. La solution devient de plus en plus jaune et à saturation, elle est prête à être utilisée. La solution saturée en diazométhane peut être conservée à l'obscurité pendant environ un mois.

I.13.b. Méthylation des acides gras hydroxylés :

Ces molécules sont préalablement dérivées sous forme d'esters méthyliques par le diazométhane afin de les rendre plus hydrophobes et faciliter ainsi leur séparation sur colonne chirale.

Les échantillons d'AGOH séparés auparavant par HPLC sont collectés et évaporés sous N₂. En vue de les rendre plus hydrophobes, les AGOH sont dérivés en esters méthyliques avec du diazométhane selon la réaction ci-dessous :



Des standards 13(S)-HODE, 13(R)-HODE, 9(S)-HODE, 9(R)-HODE, 15(S)-HETE, 15(R)-HETE, des standards de mélange racémique 9(R/S)-HODE, 13(R/S)-HODE, 15(R/S)-HETE ainsi que les échantillons biologiques sont évaporés à sec sous azote. Ils sont alors méthylés pendant 15 min à température ambiante par l'addition de 100µl de la solution d'éther saturée en diazométhane. Les échantillons sont ensuite évaporés sous azote et les AGOH méthylés sont repris par un mélange: n-hexane/2-propanol/acide acétique (85:15:0,1, v/v/v) en vue de leur analyse par chromatographie chirale.

I.13.c. Analyse des isomères stéréospécifiques des acides gras hydroxylés par chromatographie chirale :

La chromatographie chirale est réalisée avec une colonne ChiralCel® OD-H (4,6 x 250 mm) remplie d'une phase stationnaire composée de cellulose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) adsorbée sur des particules de gel de silice de 5 µm. L'élution est réalisée en mode isocratique à 25 °C avec une phase mobile constituée d'un mélange de n-hexane/2-propanol/acide acétique (85:15:0,1; v/v/v) dont le débit est fixé à 1 mL/min. Les acides gras monohydroxylés méthylés sont détectés à 234 nm avec un détecteur à barrette de diodes.

I.14. Synthèse de 1-palmitoyl,2-(13(S)-hydroperoxy-octadécadiénoyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine et 1-palmitoyl,2-(13(S)-hydroxy-octadécadiénoyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine:

Du 1-palmitoyl,2-(13(S)-hydroperoxy-octadécadiénoyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine (PC(16:0/13(S)-HpODE) a été synthétisé par voie enzymatique à partir de 1-palmitoyl-2-linoléoyl- sn-glycéro-3-phosphocholine (PLPC ou PC (16: 0/18: 2n-6), suite à la co-incubation de 6 µmoles de PC(16:0/18:2n-6) avec 20000 U/mL de 15-lipoxygénase de soja (Type V) dans un tampon Tris HCl 0,2M à pH=8,8 contenant du désoxycholate (3mM) pendant 30 min sous un flux continu d'oxygène et sous agitation. Les hydroperoxydes de phosphatidylcholine sont élués par le méthanol sur une colonne Sep-Pak C18. Ils sont réduits par le NaBH₄ en hydroxyde de phosphatidylcholine. La concentration de 1-palmitoyl,2-(13(S)-hydroxy-octadécadiénoyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine (PC(16:0/13-HODE)) est déterminée par spectrophotométrie UV à 234 nm. La pureté du produit est vérifiée par HPLC.

I.15. Enrichissement des HDL avec des phospholipides oxydés ou non :

Pour préparer des HDL enrichies en PL oxydés, les HDL contrôles ont été incubées avec du PC (16: 0/13-HODE) ou avec son précurseur PC(16: 0/18 :2n-6) pendant 24 heures à 37°C dans un bain-marie sous agitation. Une dialyse des HDL dans du PBS suivie d'un passage sur colonne de Sephadex G-25 (PD-10) ont été réalisés dans le but d'éliminer les PL non fixés aux particules

d'HDL. Pour vérifier l'enrichissement des HDL, les HDL enrichies sont séparées par FPLC, les fractions correspondantes sont collectées et analysées par HPLC.

I.16. « Fast-protein liquid chromatography » (FPLC) :

La séparation des lipoprotéines par FPLC [Zambon et *al.*, 1996] est basée sur leur différence de taille. Il s'agit d'une chromatographie gel exclusion qui permet leur séparation par ordre de taille décroissante. Le plasma est filtré (0,22 µm) pour éliminer les débris cellulaires. Le plasma et les fractions d'HDL enrichies ou non en PC(16:0/13-HODE) sont injectées sur une colonne Sephadex G-25 parcourue par un tampon Tris pH 7,4 (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2mM, 0,03% d'azide de sodium) circulant à un débit de 0,3 mL/min pour une pression maximale de 1mPa et à 4°C. L'élution des échantillons est suivie par détection de la DO à 280 nm (figure 27). Des fractions de volume variable (de 200µl à 1 mL) sont alors collectées pour les études ultérieures.

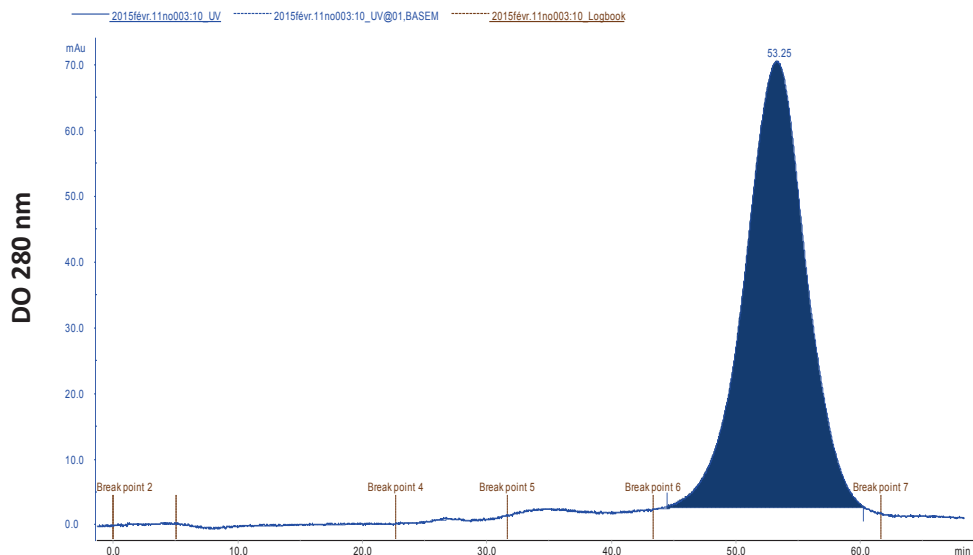


Figure 27: Profil de FPLC typique d'HDL isolées par ultracentrifugation et enrichies avec des phospholipides oxydés.

I.17. Mesure de la taille des particules d'HDL par électrophorèse en conditions natives :

Des gels de polyacrylamide avec un gradient de 4 à 30% sont préparés. Un volume d'échantillon d'HDL est mélangé à un volume d'une solution de dépôt 2X (62,5 mM Tris-HCL à pH 6,8 ; 25% sucrose, 0,025% bleu de bromophénol). La quantité de protéine déposée est de 5 à 10 µg par puits. L'électrophorèse est réalisée dans un tampon de migration contenant 25 mM Tris et 192 mM glycine à pH=8,3. Une première migration sans échantillon à un voltage constant de 125 V pendant 30 min pour stabiliser le gradient, puis est suivie d'une seconde migration en présence de l'échantillon sous une tension de 170V pendant 24 heures à 4°C de façon à séparer les HDL contrôles et glycoxydées ou les sous-classes d'HDL. Le gel est coloré en utilisant une solution de bleu de Coomassie (Blue R-250) (0,3% (w/v) dans un mélange méthanol/acide acétique glacial/H₂O (45:10:45, v/v/v). Le gel est ensuite décoloré plusieurs fois avec un mélange méthanol/acide acétique/H₂O (20:10:70, v/v/v). Les bandes ont été photographiées [Alabakovska *et al.*, 2002].

II. Méthodes relatives aux plaquettes :

II.1. Isolement des plaquettes sanguines :

Les plaquettes sont isolées selon la méthode de Lagarde [Lagarde *et al.* 1980] à partir de sang de donneurs sains n'ayant pris aucun médicament pouvant interférer sur le fonctionnement normal des plaquettes (par exemple aspirine et anti-inflammatoires non stéroïdiens). Le sang est recueilli en présence d'anticoagulant CPD (acide citrique 15,6 mM ; citrate de sodium 89,4 mM ; phosphate monosodique 16,1 mM ; dextrose 128,7 mM, pH 5,6) (1 volume de CPD pour 7 volumes de sang). Il est centrifugé pendant 17 minutes à 200g à 20°C. Nous récupérons la phase supérieure, le PRP (plasma riche en plaquettes), que nous acidifions à pH 6,4 à l'aide d'acide citrique (0,15M) afin d'éviter l'agrégation spontanée des plaquettes pendant la deuxième centrifugation (900g pendant 12 minutes à 20°C). Nous enlevons le surnageant correspondant au plasma pauvre en plaquettes (PPP) et resuspendons les culots plaquettaires par de la Tyrode-

HEPES (NaCl 137 mM ; KCl 12,7 mM ; NaHCO₃ 11,9 mM; NaH₂PO₄, H₂O 0,41 mM ; MgCl₂, 6 H₂O 1 mM; HEPES 5mM ; glucose 5 mM) (pH 7,35). Les plaquettes sont laissées au minimum 1 heure au repos à température ambiante avant toute autre intervention.

II.2. Mesure de l'agrégation plaquettaire :

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

II.3. Dosage des protéines plaquettaires :

Le contenu protéique des plaquettes est déterminé par une réaction colorimétrique selon la méthode de Bradford. Le réactif utilisé est un colorant : le bleu de Coomassie G250 qui absorbe à une longueur d'onde maximale de 465 nm. La fixation covalente du colorant sur les résidus d'acides aminés basiques (arginine, lysine et histidine) provoque un déplacement du maximum d'absorption de 465 à 595 nm. Le nombre de molécules de pigment fixé par molécule de protéine est approximativement proportionnel au nombre de charges positives portées par la protéine. Une gamme étalon est réalisée avec des concentrations connues et croissantes d'albumine bovine sérique (BSA). La lecture spectrophotométrique de la gamme et des échantillons à 595 nm est réalisée en même temps. Chaque échantillon est dosé en triplicate.

II.4. Analyse par immunoblot (western-blotting) des p38 MAPK et phospholipase A₂ cytosolique phosphorylées:

La suspension contenant les plaquettes incubées dans le tube d'agrégomètre est récupérée. Après une centrifugation de 5 minutes à 13000 g, le surnageant est éliminé et remplacé par 500 µL de solution de lyse (Trizma 20 mM, Triton-X100 1%, MgCl₂ 5mM, EGTA 2mM, pH=8 en présence d'inhibiteurs de phosphatases : Na₄P₂O₇, 10 H₂O 40mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 100µM et d'inhibiteurs de protéases : AEBSF 2mM, aprotinine 3µM, leupeptine 43µM, pepstatine 29µM). Les tubes sont vortexés puis placés dans la glace pendant 30 minutes au minimum. Après une centrifugation de 5 minutes à 13000 g, si aucun culot n'est observé, des fractions aliquotes de 50µL sont prélevées (pour les dosages de la concentration en protéines plaquettaires, des p38 MAPK totale et phosphorylée et des cPLA₂ totale et phosphorylée) et conservées à -80°C. La concentration de protéines est déterminée par la méthode de Bradford comme décrite ci-dessus. Suite à la lyse des plaquettes, les protéines sont dénaturées à 100°C pendant 5 min par ajout d'un tampon de dénaturation et séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% bis-Tris pré-coulé, réalisée dans un tampon de migration XT MOPS (Bio-Rad) à une tension constante de 200 V pendant 1h. Des marqueurs colorés de masses moléculaires connues sont aussi déposés afin de permettre la localisation des enzymes d'intérêt sur la membrane. Les protéines séparées sur gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose avec un « mini trans blot transfer cell ». L'électro-transfert est réalisé dans un tampon de transfert (Trizma 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20%) réfrigéré durant 30 minutes à une tension constante de 100 V. La membrane est rincée dans un tampon salin TBS-T (Trizma 20 mM, NaCl 137 mM, Tween 0,1%, pH 7,6) puis incubée durant 1h sous agitation dans du tampon de blocage (TBS-T contenant 5% de lait écrémé) afin de saturer les sites aspécifiques. Après plusieurs rinçages de la membrane dans du TBS-T, elle est incubée une nuit à 4°C avec des anticorps polyclonaux de lapin, soient anti-p38 MAPK ou anti-phospho-p38 MAPK, soient anti-phospholipase A₂ cytosolique (cPLA₂) ou anti-phospho-cPLA₂ (dilués au 1:2500^{ème} dans un tampon TBS-T contenant 1% de BSA), lavée dans du TBS- puis incubée avec un anticorps secondaire polyclonal de chèvre anti-Ig G de lapin conjugué à la peroxydase de Raifort (1:5000^{ème} dans un tampon TBS-T contenant 1% de BSA). La membrane est révélée par chimioluminescence grâce au kit ECL Advance, et les bandes correspondant aux phospho-p38 MAPK et phospho-cPLA₂ sont visualisées avec une caméra

VDS et leur intensité est quantifiée par densitométrie avec le logiciel « Image Quant » et normalisée par les p38MAPK et cPLA₂ totales respectivement.

II.5. Mesure de la concentration de calcium intra-plaquettaire :

Le plasma riche en plaquettes (PRP) est incubé avec 1 $\mu\text{mol/L}$ de Fura 2-AM pendant 45 min à 37 ° C dans un bain-marie sous agitation à l'abri de la lumière. Les plaquettes sont ensuite acidifiées à pH 6,4 avec de l'acide citrique et isolées et mises en suspension dans du tampon Tyrode-HEPES comme décrit ci-dessus, et laissées à température ambiante pendant au moins 1 heure dans l'obscurité. Les plaquettes enrichies avec le Fura 2-AM sont pré-incubées avec les HDL contrôle ou glycoxydées pendant 5 min à 37°C puis stimulées par le collagène pendant 5 min. La concentration externe en Ca^{2+} des suspensions plaquettaires a été ajustée à 1 mmol/L en utilisant une solution de CaCl_2 . Les suspensions plaquettaires ont été excitées alternativement à 340 et 380 nm et l'émission de fluorescence a été enregistrée à 510 nm. La concentration de calcium intracellulaire a été calculée à partir du rapport émission de fluorescence sur excitation [Nofer *et al.*, 1998].

III. Analyse statistique :

Les valeurs données dans les tableaux et les figures représentent les moyennes $\pm$ S.E.M. de 4 à 10 expériences indépendantes. Les comparaisons des moyennes sont effectuées grâce au test bilatéral et non apparié de Student. Les différences sont considérées comme significatives lorsque $P < 0,05$). Les corrélations sont définies en utilisant le test de corrélation linéaire de Spearman et le logiciel Statview.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les HDL possèdent des propriétés anti-athérogènes dont des propriétés anti-thrombotiques. Les effets des HDL oxydées sur les fonctions plaquettaires sont moins décrits et les résultats publiés sont divergents. Une étude réalisée dans notre équipe sur des patientes abétalipoprotéïnémiques (donc dépourvues de lipoprotéines riches en apoB) a permis de montrer que les HDL fortement oxydées inhibent l'agrégation plaquettaire *via* le récepteur SR-BI [Calzada *et al.*, 2013]. Nos résultats inattendus suggéraient donc que l'oxydation des HDL n'était pas associée à une perte de leurs propriétés antiagrégantes.

Nous avons émis l'hypothèse que les peroxydes lipidiques des HDL pourraient jouer un rôle important dans leurs propriétés antiagrégantes en particulier dans le DT2, pathologie associée à une hyperglycémie et un stress oxydant élevé.

Notre objectif a alors été de modifier des HDL *in vitro* par glycation et/ou oxydation afin de mimer les modifications des HDL de patients diabétiques, de définir le profil en AG et peroxydes lipidiques des HDL, et de déterminer les effets de ces HDL modifiées sur l'agrégation plaquettaire comparativement aux HDL non modifiées. De plus, les effets d'HDL de patients DT2 sur l'agrégation plaquettaire ont été comparés à ceux de témoins.

A. Effets des HDL modifiées par glycation et /ou oxydation sur les plaquettes:

Une étude *in vitro* a d'abord été réalisée afin de tester les effets respectifs de la glycation, de l'oxydation et de la glycoxydation sur les HDL, puis de déterminer l'impact de ces HDL sur l'agrégation plaquettaire.

Après isolement par ultracentrifugation d'HDL à partir du plasma de volontaires sains, nous avons préparé cinq types d'HDL comme décrit dans la partie « méthode » (page 96) qui seront nommées :

- HDL contrôles non incubées (conservées à 4°C, en présence de 1mM d'EDTA et 20 µM de BHT).
- HDL contrôles incubées (incubées pendant 6 jours à 37°C en présence de 1mM d'EDTA et 20 µM de BHT à 37°C).

- HDL glyquées (incubées pendant 5 jours en présence de 50 mM de glucose à 37°C, 1mM d'EDTA et 20 µM de BHT, dialysées puis incubées pendant 1 jour à 37°C).
- HDL oxydées (incubées pendant 5 jours à 37°C, dialysées puis traitées pendant 1 jour par 5 µM de CuCl₂ à 37°C).
- HDL glycoxydées (incubées pendant 5 jours en présence de 50 mM de glucose à 37°C, dialysées puis traitées pendant 1 jour par 5 µM de CuCl₂ à 37°C).

I. Caractérisation des HDL modifiées par glycation et/ou oxydation :

I.1. Composition en acides gras des principales classes lipidiques dans les HDL modifiées *versus* HDL contrôles :

Nous avons analysé par GC la composition détaillée en AG des classes lipidiques principales (PL & EC) des différentes préparations d'HDL. Les résultats sont exprimés en pourcentages molaires.

I.1.a. Composition en acides gras des esters de cholestérol :

Le cœur hydrophobe des HDL contient en majorité des EC qui sont composés: (tableau 5)

- d'AGPI dont le LA (18:2n-6), 43% ; l'AA (20:4n-6), 7% ; l'EPA (20:5n-3), 0,7% et le DHA (22:6n-3), 2%.
- d'AGMI dont l'acide oléique (18:1n-9), 19%.
- d'AGS, principalement l'acide palmitique (16:0), 15% et l'acide stéarique (18:0), 3,3%.

Acide Gras	HDL contrôles non incubées	HDL contrôles incubées	HDL glyquées	HDL oxydées	HDL glycoxydées
16:0	14,75 ± 0,73	14,56 ± 0,49	14,02 ± 0,46	22,75 ± 1,28	28,70 ± 1,22***
18:0	3,30 ± 0,31	2,63 ± 0,23	2,28 ± 0,09	3,95 ± 0,71	7,22 ± 0,89 (*)
18:1n-9	19,39 ± 0,43	18,63 ± 0,33	19,7 ± 0,56	22,72 ± 1,25	27,16 ± 0,84 **
18:2n-6	43,06 ± 0,70	45,45 ± 0,45	44,58 ± 0,35	32,78 ± 2,16 (*)	20,01 ± 1,50 ***
20:4n-6	7,00 ± 0,35	7,12 ± 0,22	7,17 ± 0,25	3,53 ± 0,47 (*)	0,58 ± 0,15***
20:5n-3	0,72 ± 0,07	0,78 ± 0,11	0,63 ± 0,09	0,61 ± 0,10	0,08 ± 0,03*
22:6n-3	1,95 ± 0,21	2,22 ± 0,13	1,79 ± 0,23	1,50 ± 0,43	1,27 ± 0,24

Tableau 5 : Composition en acides gras des esters de cholestérol dans les HDL contrôles et modifiées par glycation et / ou oxydation.

Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire des principaux AG et représentent les moyennes ± S.E.M. de 5 expériences. Significativement différent des HDL contrôles incubées * : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$ et (*) : $P < 0,1$. 18:2n-6 ou LA ; 20:4n-6 ou AA ; 20:5n-3 ou EPA ; 22:6n-3 ou DHA.

En comparant les moyennes des pourcentages molaires des différents AG dans les HDL modifiées à celles des HDL contrôles incubées (tableau 5), une diminution significative des proportions d'AGPI est observée dans les HDL glycoxydées. Le LA, principal AGPI dans les EC, est diminué de 59% dans les HDL glycoxydées. L'AA, deuxième principal AGPI et l'EPA diminuent très significativement dans les EC des HDL glycoxydées (-89% pour l'EPA et - 92% pour l'AA). Le DHA diminue (-35%) mais non significativement. A l'inverse, les pourcentages molaires des 16:0 et 18:0 augmentent.

Comparativement aux HDL contrôles incubées, les proportions de LA et AA tendent à diminuer dans les HDL oxydées (-28% et -50%, respectivement) tandis qu'aucune différence significative n'est observée pour les autres AG. Aucune variation de pourcentages molaires des AG n'est

notée entre les HDL glyquées et les HDL contrôles non incubées comparativement aux HDL contrôles incubées.

I.1.b. Composition en acides gras des phospholipides :

La monocouche amphiphile des HDL contient en majorité des PL composés (tableau 6) :

- d'AGPI dont le LA, 16% ; l'AA, 8,8% ; l'EPA, 0,9% et le DHA, 3,2%.
- d'AGMI dont l'acide oléique (18:1n-9), 8,5%.
- d'AGS, principalement l'acide palmitique, 34% et l'acide stéarique, 18%.
- de 16:0 diméthylacétal (DMA), 18:0 DMA, 18:1n-9 DMA, représentant les AG de la sous-classe des plasmalogènes.

Acide Gras	HDL contrôles non incubées	HDL contrôles incubées	HDL glyquées	HDL oxydées	HDL glycoxydées
16:0	34,16 ± 1,85	35,81 ± 1,90	35,06 ± 1,58	41,28 ± 2,36*	48,87 ± 2,61***
18:0	17,62 ± 0,94	19,69 ± 0,60	19,24 ± 0,78	23,1 ± 1,46*	26,03 ± 1,47***
18:1n-9	8,51 ± 0,36	7,64 ± 0,40	8,24 ± 0,43	10,07 ± 1,21	8,28 ± 2,53 (*)
18:2n-6	16,51 ± 1,06	13,47 ± 1,05	15,04 ± 1,29	10,74 ± 1,41*	6,86 ± 0,78***
20:4n-6	8,77 ± 0,77	8,27 ± 0,79	8,1 ± 0,82	4,25 ± 1,71*	0,76 ± 0,17***
20:5n-3	0,88 ± 0,08	0,89 ± 0,08	0,77 ± 0,15	0,36 ± 0,22	0,42 ± 0,19*
22:6n-3	3,23 ± 0,25	3,18 ± 0,25	2,83 ± 0,37	1,7 ± 0,96	0,27 ± 0,10***
16:0 DMA	1,18 ± 0,12	1,36 ± 0,22	1,18 ± 0,18	0,8 ± 0,27	0,4 ± 0,15***
18:0 DMA	0,32 ± 0,14	0,53 ± 0,12	0,57 ± 0,19	0,25 ± 0,13	0 ± 0 (*)
18:1n-9 DMA	0,18 ± 0,08	0,25 ± 0,09	0,24 ± 0,07	0,17 ± 0,09	0,13 ± 0,07

Tableau 6 : Composition en acides gras des phospholipides dans les HDL contrôles et modifiées par glycation et / ou oxydation.

Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire des principaux AG et représentent les moyennes ± S.E.M. de 5 expériences. Significativement différent des HDL contrôles incubées * :

$P < 0,05$; *** : $P < 0,001$ et (*) : $P < 0,1$. 18:2n-6 ou LA ; 20:4n-6 ou AA ; 20:5n-3 ou EPA ; 22:6n-3 ou DHA) ; DMA : diméthylacétal.

Comparativement aux HDL contrôles incubées, les pourcentages molaires de tous les AGPI majeurs présents dans les PL des HDL glycoxydées sont significativement diminués (-49 % pour LA, -91% pour l'AA, -53% pour EPA et -91% pour le DHA). Les AG de la sous-classe des plasmalogènes (ou 1-alkényl-2-acyl-glycéroPE) sont représentés par les diméthylacétals, formés par transméthylation des chaînes alkényles. Le pourcentage molaire du 16:0 DMA diminue très significativement et celui du 18:0 DMA tend à diminuer. A l'inverse, les proportions de 16:0 et 18:0 augmentent.

Comparativement aux HDL contrôles incubées, seuls les pourcentages molaires de LA et d'AA diminuent significativement dans les PL des HDL oxydées (- 20% ; -48%, respectivement) alors que les proportions d'AGS augmentent. Aucune différence de pourcentages molaires des AG n'a été observée entre HDL glyquées, HDL contrôles incubées ou non.

I.2. Statut redox des HDL :

I.2.a. Dialdéhyde malonique (MDA) :

Le MDA est un marqueur reconnu de la peroxydation lipidique non enzymatique des AGPI du fait de sa stabilité.

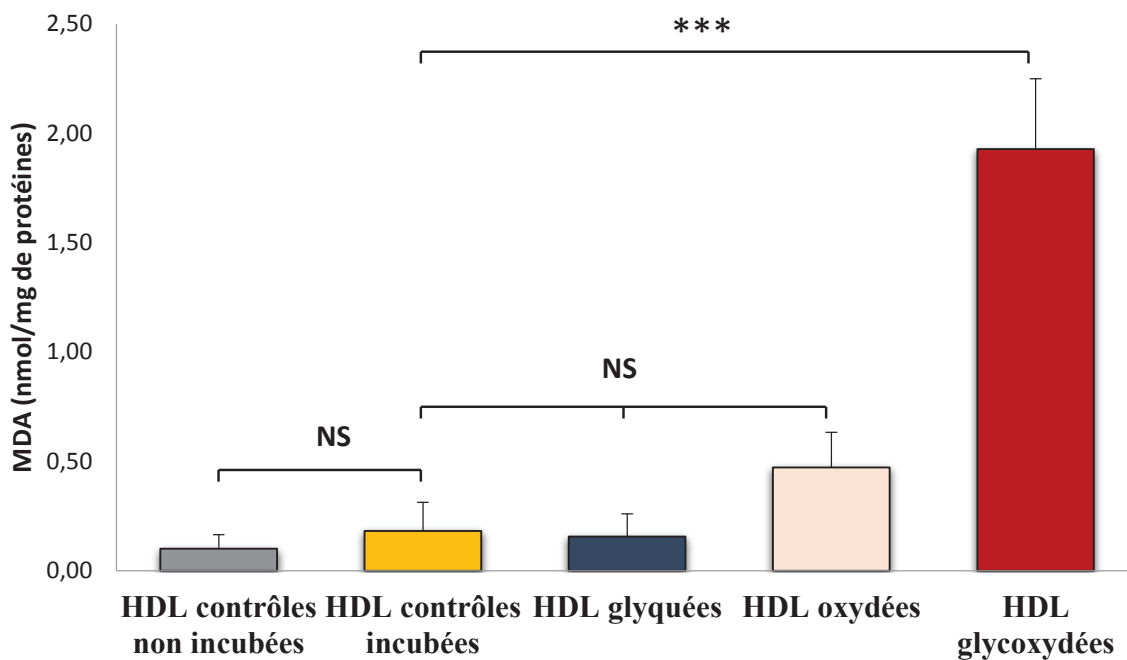


Figure 28 : Concentrations de MDA dans les HDL contrôles et modifiées par glycation et/ou oxydation.

Les résultats, exprimés en nmol/mg de protéines, représentent les moyennes $\pm$ S.E.M. de 5 expériences indépendantes. *** : $P < 0,001$ et NS : non significatif.

La concentration de MDA est augmentée très significativement dans les HDL glycoxydées (10,7 fois plus élevés comparativement aux HDL contrôles incubées) et tend à être dans les HDL oxydées ($P = 0.1$), indiquant un taux élevé de peroxydation lipidique induit par la glycoxydation.

Aucune augmentation significative du MDA dans les HDL glyquées n'a été constatée comparativement aux HDL contrôles incubées ou non (figure 28).

I.2.b. Vitamine E :

En tant qu'antioxydant liposoluble majeur des HDL, la vitamine E constitue la première ligne de défense contre les radicaux peroxydes et alkoxydes dérivés de la peroxydation lipidique. L' α - et le γ - tocophérols sont les principaux isomères présents dans les HDL. L' α -tocophérol est le plus abondant (85%) et le γ -tocophérol représente 15% de la vitamine E.

Vitamine E	α-tocophérol (nmol/mg de protéines)	γ-tocophérol (nmol/mg de protéines)
HDL contrôles non incubées	2,02 $\pm$ 0,12	0,31 $\pm$ 0,02
HDL contrôles incubées	2,04 $\pm$ 0,18	0,32 $\pm$ 0,02
HDL glyquées	1,63 $\pm$ 0,48	0,28 $\pm$ 0,05
HDL oxydées	1,09 $\pm$ 0,49	0,22 $\pm$ 0,06 (*)
HDL glycoxydées	0 $\pm$ 0 ***	0,08 $\pm$ 0,01 ***

Tableau 7: Concentrations d' α -tocophérol et de γ -tocophérol dans les HDL modifiées par glycation et/ou oxydation.

Les résultats, exprimés en nmol/mg de protéines, représentent les moyennes $\pm$ S.E.M. de 5 expériences indépendantes. *** : $P < 0,001$ et (*) : $P < 0,1$ comparativement aux HDL contrôles incubées.

Nous observons une chute de la concentration d' α -tocophérol dans les HDL glycoxydées et une diminution non significative (-46%) dans les HDL oxydées comparativement aux HDL contrôles incubées. Nous observons une diminution très significative (-75%) de la concentration de γ -tocophérol dans les HDL glycoxydées et une tendance à la diminution de γ -tocophérol dans les HDL oxydées (-31%). Aucune diminution des α - et γ -tocophérols n'est observée dans les

HDL glyquées *versus* les HDL contrôles incubées. Aucune différence n'est notée dans les concentrations de ces 2 isomères entre les HDL contrôles, incubées ou pas (tableau 7).

I.2.c. Acides gras hydroxylés dans les classes lipidiques des HDL contrôles et glycoxydées :

Comme nous avons trouvé une diminution des proportions d'AGPI dans les HDL glycoxydées comparativement aux HDL contrôles, cela sous-entend une formation probable de produits de peroxydation lipidique issus de ces AGPI. Parmi eux, les HODEs (2 isomères : 13-HODE et 9-HODE) sont issus de la peroxydation de LA et sont des molécules stables. De la même manière, les HETEs proviennent de la peroxydation de l'AA (dont l'isomère le plus abondant est le 15-HETE). Les AGOH dans les classes lipidiques des HDL contrôles incubées et HDL glycoxydées ont été séparés et analysés par HPLC.

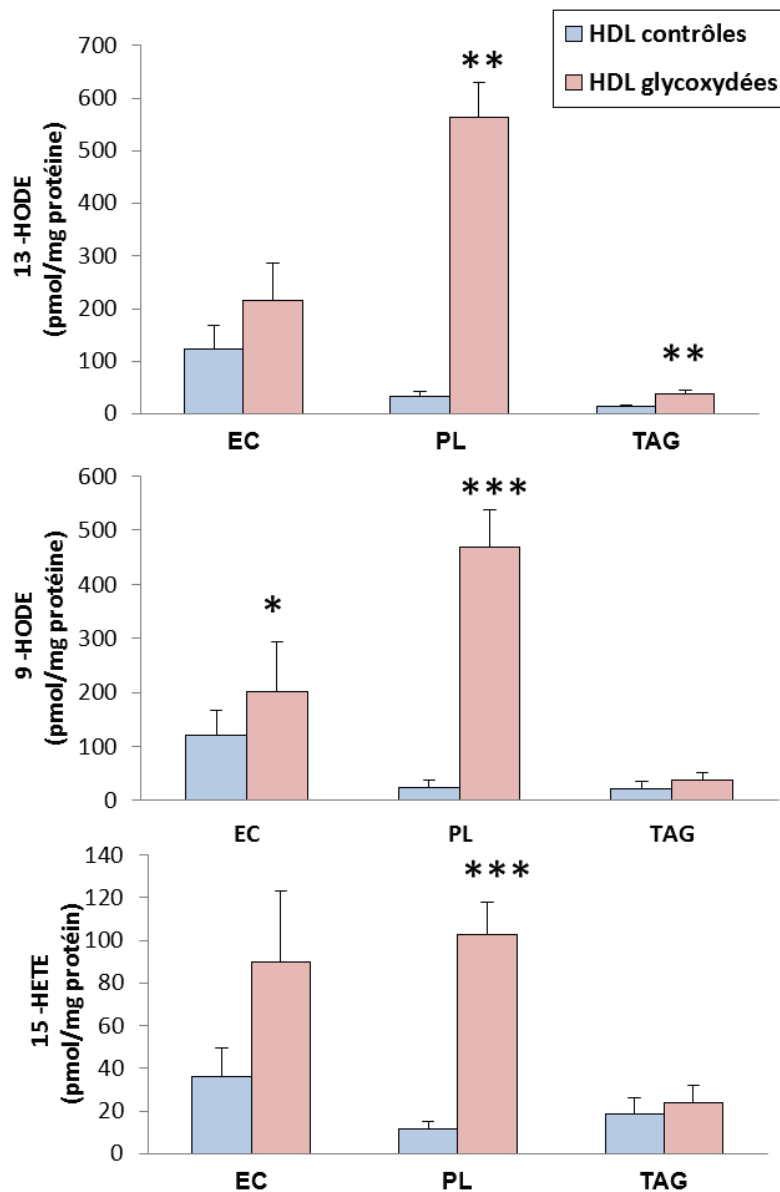


Figure 29: Concentrations en acides gras hydroxylés dans les classes lipidiques d'HDL contrôles incubées et glycoxydées mesurées par HPLC.

Concentrations de 13-HODE (A), de 9-HODE (B) et de 15-HETE (C) dans les HDL contrôles et glycoxydées. Les résultats représentent les moyennes $\pm$ S.E.M. de 5 expériences indépendantes
 , $P < 0,01$; *, $P < 0,001$ par rapport aux HDL contrôles.

Dans les HDL contrôles incubées, les AGOH se trouvent majoritairement dans les EC, et de façon moindre dans les PL et les TAG. Dans les HDL glycoxydées, la plupart d'entre eux sont présents dans les PL. Il est à noter que les concentrations des 13-HODE, 9-HODE et 15-HETE augmentent 17, 20, et 8,5 fois dans les PL des HDL glycoxydées comparativement aux HDL contrôles (figure 29).

Dans les EC des HDL glycoxydées, la concentration de 9-HODE augmente significativement de 1,7 fois et celle de 13-HODE tend à augmenter. Dans les TAG des HDL glycoxydées, la concentration de 13-HODE augmente (2,7 fois) et la concentration des 9-HODE a tendance à augmenter (1,8 fois) par rapport aux HDL contrôles. Par ailleurs, la concentration de 15-HETE a tendance à augmenter dans les EC et les TAG des HDL glycoxydées comparativement aux HDL contrôles.

I.3. Electrophorèse des HDL sur gel de polyacrylamide :



Figure 30: *Electrophorèse des particules d'HDL sur gel de polyacrylamide en conditions natives.*

Pour estimer la taille des particules HDL, une électrophorèse native en gradient (4-30%) en conditions natives sur gel de polyacrylamide a été réalisée, technique utilisée parfois pour séparer les sous-classes d'HDL.

L'albumine sérique humaine a été utilisée comme standard pour connaître la taille apparente des lipoprotéines. La taille apparente de l'albumine est de 7 nm. Les HDL glycoxydées ont une taille plus importante que celle des HDL contrôles. La glycoxydation modifie aussi la charge des HDL (figure 30).

II. Effets des HDL sur l'activation plaquettaire :

II.1. Effets des HDL modifiées par glycation et /ou oxydation sur l'agrégation plaquettaire :

Le collagène est un agoniste primaire physiologique conduisant à l'adhésion et à l'agrégation des plaquettes. Afin de déterminer les effets des différentes préparations d'HDL sur les fonctions plaquettaires, nous avons d'abord recherché la concentration de collagène induisant une agrégation irréversible des plaquettes d'environ 60 à 80 %, appelée concentration « seuil » (“threshold”) (figure 31). Puis nous avons incubé les plaquettes de donneurs sains en absence ou en présence des HDL modifiées ou non, puis ajouté le collagène.

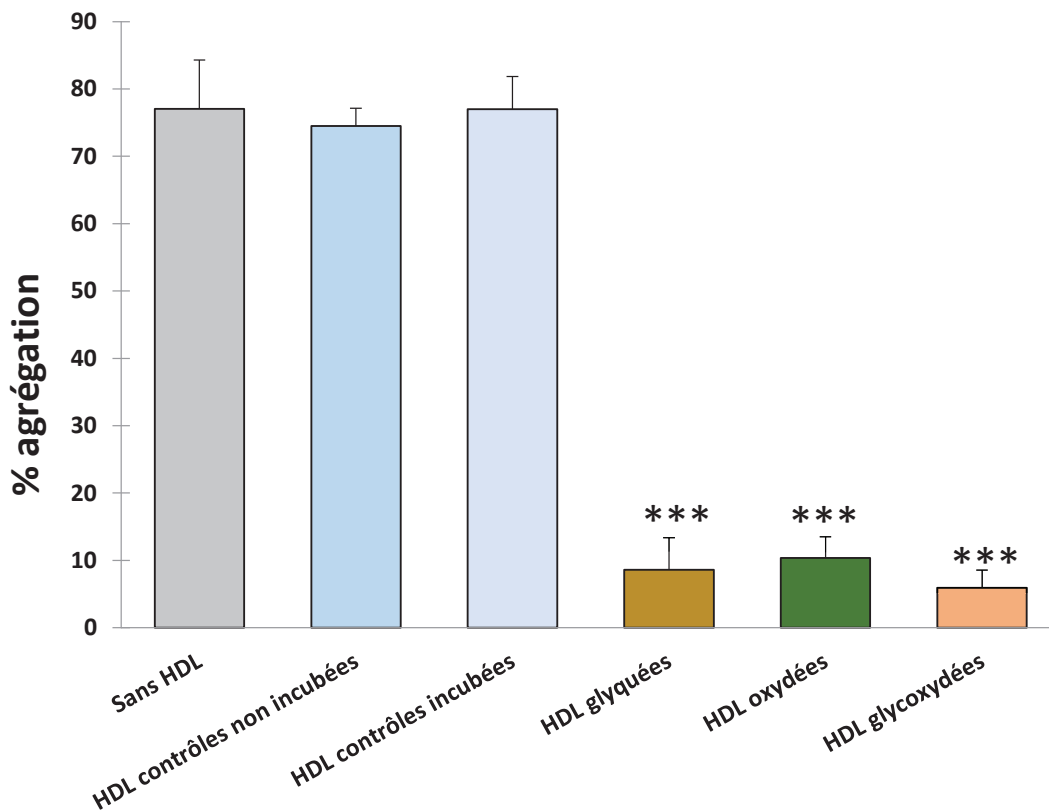


Figure 31: Agrégation plaquettaire induite par le collagène en absence ou en présence des HDL contrôles ou modifiées par glycation et/ou oxydation.

*Les plaquettes isolées du sang de volontaires sains ont été incubées en absence ou en présence des HDL (25µg/mL) pendant 5 minutes à 37°C, puis stimulées par 0,1µg/mL de collagène. La cinétique d'agrégation a été suivie pendant 4 minutes. Les résultats, exprimés en pourcentage d'agrégation, représentent les moyennes $\pm$ S.E.M de 4 expériences. *** : $P < 0,001$ comparativement aux plaquettes contrôles ou aux plaquettes incubées avec des HDL contrôles.*

Les résultats obtenus montrent que les HDL contrôles non incubées ou incubées ajoutées à une concentration de 25µg/mL, n'ont aucun effet sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène comparativement aux plaquettes incubées seulement avec le collagène. La pré-incubation des plaquettes en présence d'HDL modifiées *in vitro* (glyquées, oxydées ou glycoxydées) à une concentration de 25µg/mL inhibe fortement et de façon très significative l'agrégation plaquettaire induite par le collagène (figure 31).

II.2. Effets de concentrations croissantes d'HDL contrôles et glycoxydées sur l'agrégation plaquettaire :

Comme les HDL glycoxydées *in vitro* sont les particules les plus proches des HDL de DT2, nous avons focalisé nos études ultérieures sur ces HDL modifiées.

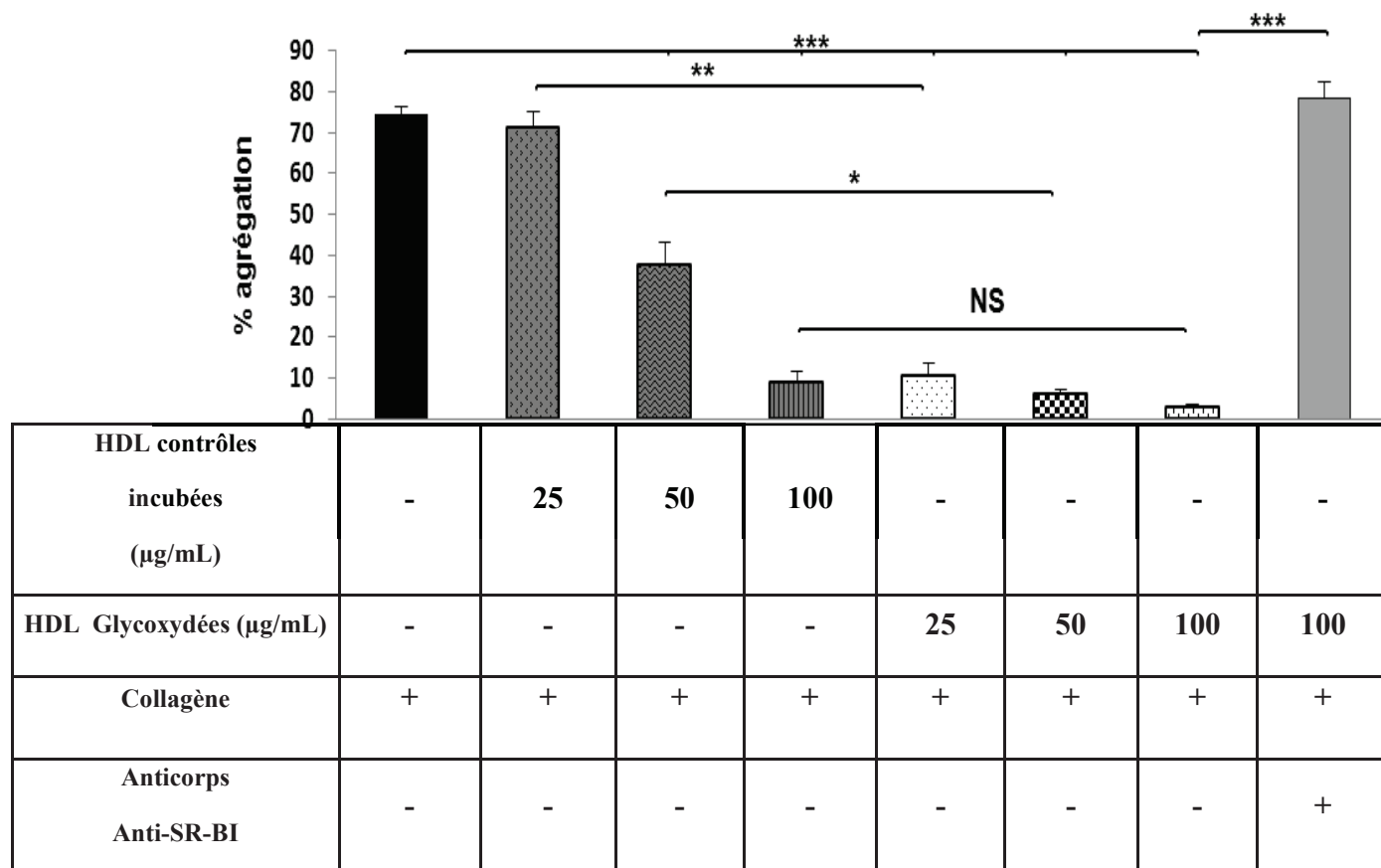


Figure 32 : Effets des HDL contrôles et glycoxydées sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène.

Des plaquettes isolées du sang de volontaires sains ont été pré-incubées en absence ou en présence d'anticorps anti-SR-BI, en absence ou en présence de concentration croissantes d'HDL pendant 5 minutes à 37°C, puis stimulées par 2,5-5 µg/mL de collagène. La cinétique d'agrégation a été suivie pendant 4 minutes à 37°C. Les résultats, exprimés en pourcentage d'agrégation, représentent les moyennes $\pm$ S.E.M. de 10 manipulations indépendantes. Les

astérisques indiquent des différences significatives (, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). NS, non significatif.*

Les HDL contrôles n'inhibent pas l'agrégation induite par le collagène à une concentration inférieure ou égale de 25 $\mu\text{g/mL}$. Par contre, pour des concentrations d'HDL égales ou supérieures à 50 $\mu\text{g/mL}$, les HDL contrôles inhibent l'agrégation plaquettaire de façon significative.

Comparativement aux plaquettes incubées avec le collagène, la pré-incubation des plaquettes avec les HDL glycoxydées pendant 5 min à 37°C conduit à une inhibition de l'agrégation plaquettaire par le collagène de façon dose-dépendante avec une inhibition significative dès 25 $\mu\text{g/mL}$ et presque complète à 100 $\mu\text{g/mL}$ (figure 32). A 50 $\mu\text{g/mL}$, l'effet antiagrégant des HDL glycoxydées est plus important et significatif que celui des HDL contrôles. Cependant, à des concentrations supérieures à 100 $\mu\text{g/mL}$, les effets antiagrégants des HDL contrôles ou glycoxydées sont similaires. Les concentrations utilisées sont inférieures de l'ordre de 10 à 40 fois aux concentrations physiologiques des HDL (de l'ordre de 1mg de protéines/mL).

Comme le récepteur « éboueur » SR-BI est exprimé dans les plaquettes et représente le récepteur spécifique des HDL natives ou ayant subi des modifications oxydatives, son implication dans le mécanisme d'action des HDL a été recherchée. La pré-incubation des plaquettes avec l'anticorps anti-SR-BI pendant 5 min à 37 °C empêche les effets inhibiteurs des HDL glycoxydées (à 100 $\mu\text{g/mL}$) sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène (figure 32).

De plus, la pré-incubation des plaquettes avec l'anticorps anti-SR-BI empêche également l'inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par le collagène en présence des HDL contrôles. En effet, la pré-incubation des plaquettes avec 100 $\mu\text{g/mL}$ d'HDL contrôles incubées conduit à 12% d'agrégation induite par le collagène (comparativement à 71% d'agrégation dans les plaquettes stimulées par le collagène seul) alors que l'addition d'anti-SR-BI lève l'inhibition induite par les HDL contrôles (65% agrégation).

Nous avons vérifié que l'anticorps anti-SR-BI n'avait aucun effet sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène, et que la pré-incubation des plaquettes avec un anticorps contrôle

isotypique non immun anti IgG n'a pas diminué l'effet inhibiteur des HDL glycoxydées sur l'agrégation plaquettaire (données non présentées).

II.3. Effets des HDL contrôles et glycoxydées sur les p38MAPK et cPLA₂ plaquettaires :

Pour déterminer les effets des HDL glycoxydées sur les enzymes clés impliquées dans la libération d'AA des phospholipides membranaires, l'activation par phosphorylation des p38MAPK et cPLA₂ a été déterminée par immuno-détection.

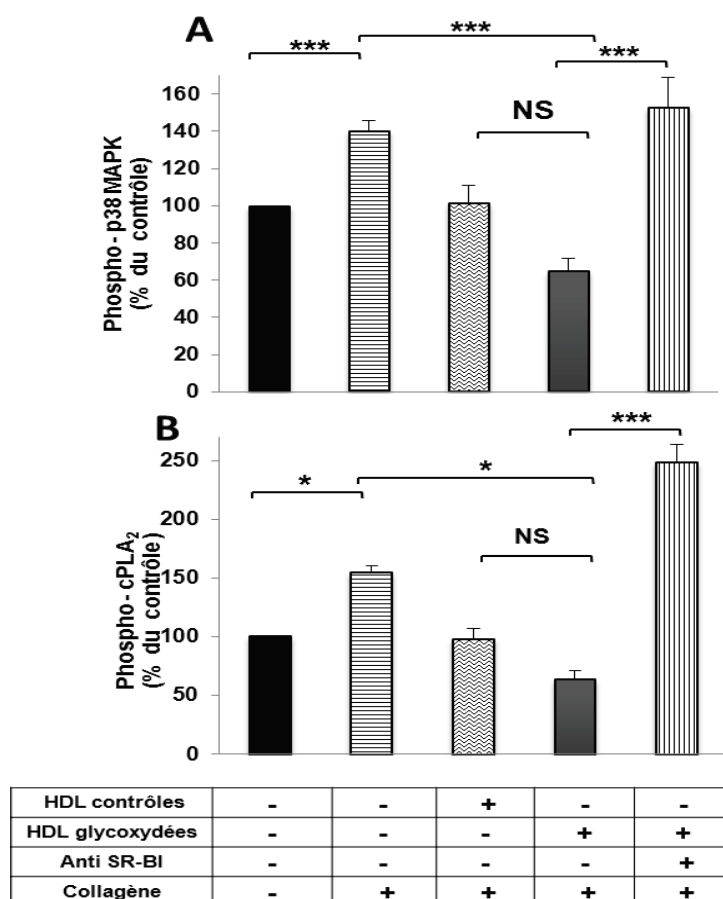


Figure 33: Effets des HDL glycoxydées sur les quantités de p38 MAPK et cPLA₂ phosphorylées. Phosphorylations des p38MAPK (A) et cPLA₂ (B) dans les plaquettes pré-incubées pendant 5 min à 37°C en l'absence ou en présence d'anticorps anti SR-BI puis incubées avec des HDL contrôles ou des HDL glycoxydées (soit 25 ou 50 µg/mL) pendant 5 min à 37°C, et stimulées avec le collagène (2,5 à 5 µg/mL). Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (plaquettes seules), et représentent les moyennes ± S.E.M. de 5 expériences indépendantes. Les astérisques indiquent des différences significatives (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$). NS, non significatif.

Comme représenté sur la figure 33, l'addition de collagène conduit à une augmentation des quantités de p38 MAPK et de cPLA₂ phosphorylées dans les plaquettes. La pré-incubation des plaquettes avec des HDL glycoxydées s'oppose entièrement à l'augmentation de phosphorylation des deux enzymes induites par le collagène comparativement aux plaquettes stimulées par le collagène. En présence d'anticorps anti-SR-BI, les plaquettes ne sont plus

protégées par les HDL glycoxydées contre l'activation des p38MAPK et cPLA₂ induite par le collagène. Les quantités phosphorylées de ces enzymes étant comparables à celles des plaquettes activées par le collagène (figure 33).

II.4. Effets des HDL contrôles et glycoxydées sur la concentration calcique plaquettaire :

Dans les plaquettes, le Ca²⁺ est un second messager clé en aval de la plupart des voies de signalisation et est en particulier essentiel pour la translocation de la cPLA₂ au niveau des membranes. Les effets des HDL contrôles et glycoxydées sur la cinétique de libération du Ca²⁺ induite par le collagène ont été déterminés.

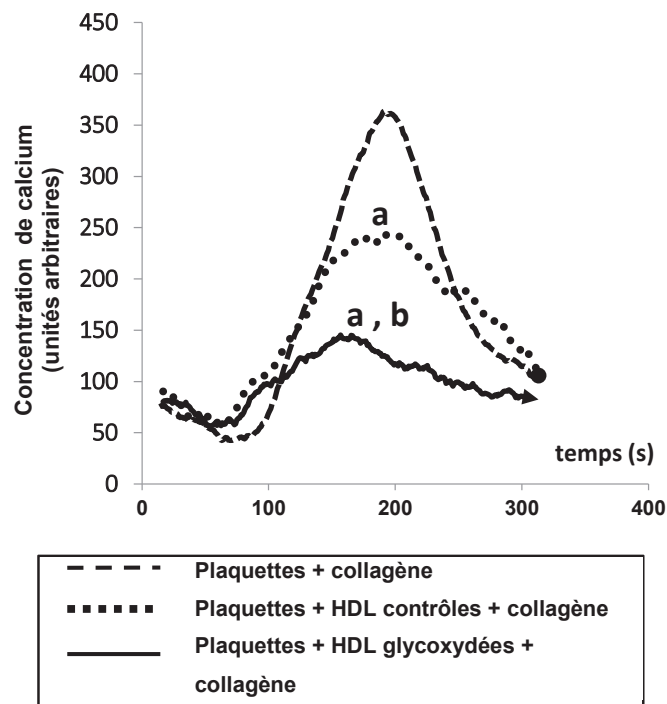


Figure 34 : Concentration du calcium cytosolique dans les plaquettes activées par le collagène en présence ou en absence d'HDL contrôles ou glycoxydées.

Les concentrations intracellulaires de calcium sont déterminées en utilisant le Fura-2 AM pré chargé sur les plaquettes en l'absence ou en présence de 50 µg/mL d' HDL contrôles ou HDL glycoxydées pendant 5 min à 37 ° C et stimulées avec le collagène (2,5 à 5 µg/mL). Les tracés

sont représentatifs de 4 expériences indépendantes. a, $P < 0,001$ comparativement à (plaquettes + collagène); b, $P < 0,05$ comparativement à (plaquettes + HDL contrôles + collagène).

L'addition de collagène dans les plaquettes pré-chargées avec le Fura2-AM a entraîné une augmentation rapide et transitoire de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire. Les HDL contrôles et glycoxydées inhibent significativement l'augmentation de concentration calcique induite par le collagène (figure 34). A dose équivalente d'HDL, les HDL glycoxydées inhibent la libération intracellulaire du Ca^{2+} induite par le collagène dans les plaquettes de 47% tandis que les HDL contrôles l'inhibent de façon moindre (-32%). La différence entre les HDL contrôles et les HDL glycoxydées est significative. De plus, la pré-incubation des plaquettes avec un anticorps anti-SR-BI pendant 5 min à 37°C atténue l'inhibition de la mobilisation du Ca^{2+} induite par les HDL glycoxydées.

III. Effets des HDL enrichies avec du 1-palmitoyl, 2- (13(S)-hydroxy-octadécadiénoyl) -sn-glycéro-3-phosphocholine (PC (16:0/13(S)-HODE)) sur l'agrégation plaquettaire :

Pour déterminer si les PL oxydés contenus dans les HDL glycoxydées ont un rôle dans les effets antiagrégants des HDL, les HDL ont été pré-chargées avec deux concentrations différentes de PC (16:0/13(S)-HODE), synthétisé par 15-lipoxygénation d'une PC(16:0/18:2n-6) et réduction chimique par le NaBH_4 du groupement hydroperoxyde du PC (16:0/13(S)-HpODE) obtenu en hydroxyle PC (16:0/13(S)-HODE).

Pour vérifier l'enrichissement des HDL en espèces oxydées, les concentrations d'AGOH des fractions d'HDL ont été mesurées par HPLC. Nous avons constaté que des concentrations plus élevées de 13-HODE étaient présentes dans les HDL enrichies par rapport aux HDL contrôles, s'avérant proches de celles trouvées dans les HDL glycoxydées *in vitro* (2x [PC (16: 0/13-HODE)]). Par contre les concentrations de 9-HODE étaient similaires dans les HDL contrôles et enrichies, confirmant l'absence de peroxydation lipidique non enzymatique au cours de la préparation des particules d'HDL enrichies (figure 35A).

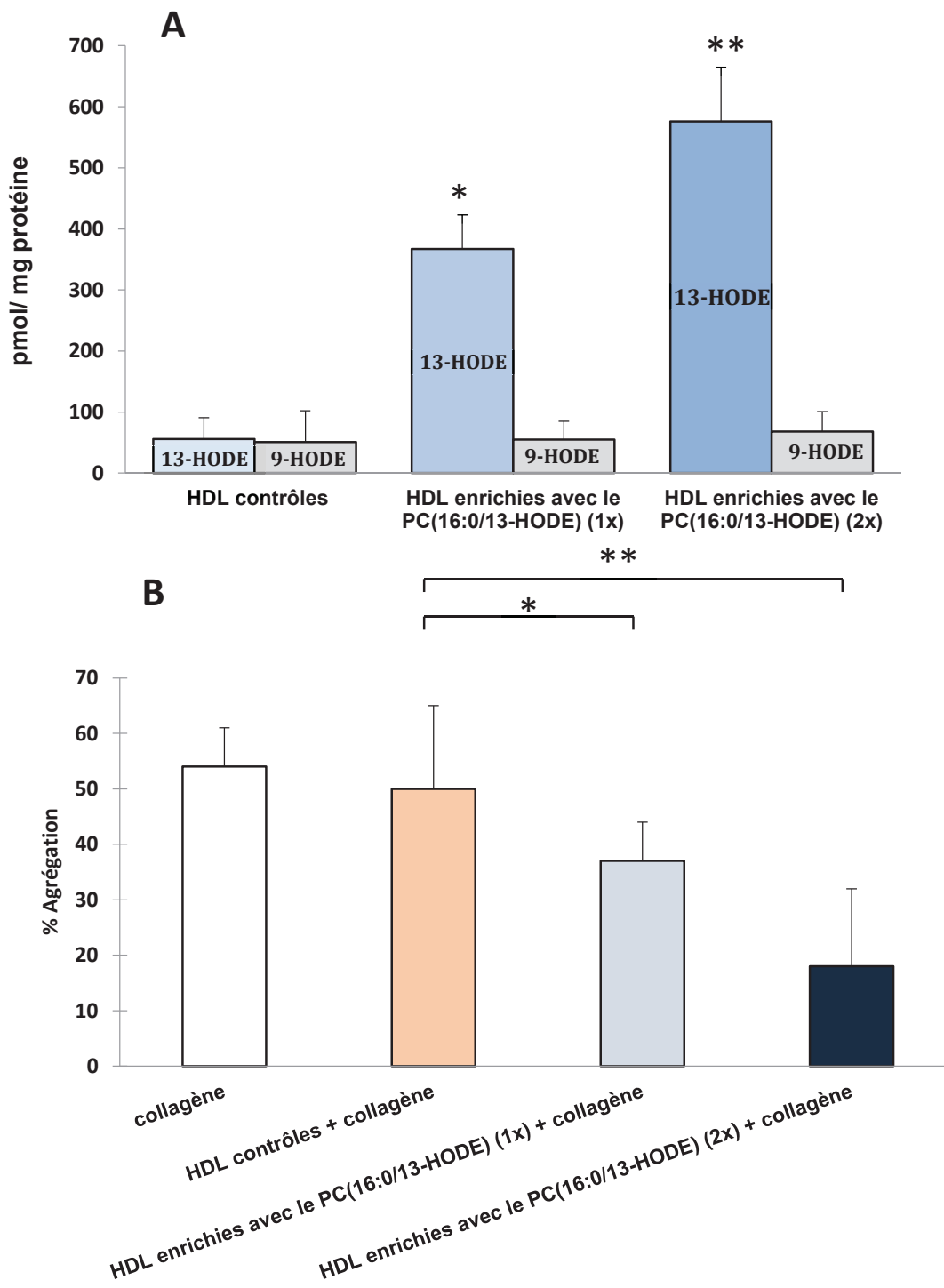


Figure 35: Effets des HDL enrichies avec du 1-palmitoyl, 2-(13-hydroxy-octadécadiénoyl) -sn-glycéro-3-phosphocholine (PC (16 :0/13(S)-HODE) sur l'agrégation plaquettaire.

(A) Concentrations en HODE dans les phospholipides des HDL enrichies ou non avec [PC (16: 0/13-HODE)] ou 2x [PC (16: 0/13-HODE)].

(B) Agrégation des plaquettes incubées en l'absence ou en présence d'HDL contrôles (50 µg/mL) ou HDL enrichies avec [PC (16:0/13(S)-HODE)] ou 2x [PC (16: 0/13(S)-HODE)], et stimulées avec le collagène (2,5 à 5 µg/mL). Les résultats sont les moyennes $\pm$ S.E.M. de quatre préparations différentes d'HDL et de quatre suspensions plaquettaires différentes. Les astérisques indiquent des différences significatives ($P < 0,05$; **, $P < 0,01$).*

Comme le montre la figure 35 B, les HDL enrichies avec des PC(16:0/13(S)-HODE) inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène de façon dose-dépendante. Plus la concentration de phospholipides oxydés enrichies au sein des HDL est importante, plus l'effet antiagrégant est marqué.

Par contre, les HDL natives enrichies avec le précurseur PC (16:0/18:2n-6) n'ont pas d'effet significatif sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène comparativement aux plaquettes incubées avec des HDL contrôles et stimulées par le collagène (données non présentées).

IV. Acides gras hydroxylés dans les HDL de patients diabétiques de type 2 et effets des HDL de patients diabétiques de type 2 sur l'agrégation plaquettaire :

8 patients atteints de DT2 (5 hommes et 3 femmes, âgés de 66 ± 4 ans) ont été recrutés dans le service du département d'endocrinologie et des maladies métaboliques, Hôpital cardiologique, Lyon Bron (Professeur Philippe Moulin). 8 volontaires sains (6 hommes et 2 femmes, âgés de 25 ± 3 ans) ont été prélevés à l'EFS. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique local (CPP Sud-Est IV, Hospices Civils de Lyon).

Les patients avaient un diabète au contrôle glycémique médiocre (glycémie à jeun: $8,7 \pm 1,4$ mmol/L; hémoglobine glyquée HbA1c: $8,3 \pm 0,6\%$, 67 mmol/mol). Ils avaient une hypertriglycémie (triglycérides: $1,9 \pm 0,4$ mmol/L), une concentration de LDL-cholestérol normale ($2,4 \pm 0,2$ mmol/L) et de faibles concentrations d'HDL-cholestérol ($1,1 \pm 0,1$ mmol/L).

IV.1. Acides gras hydroxylés dans les phospholipides et esters de cholestérol des HDL de patients diabétiques de type 2 :

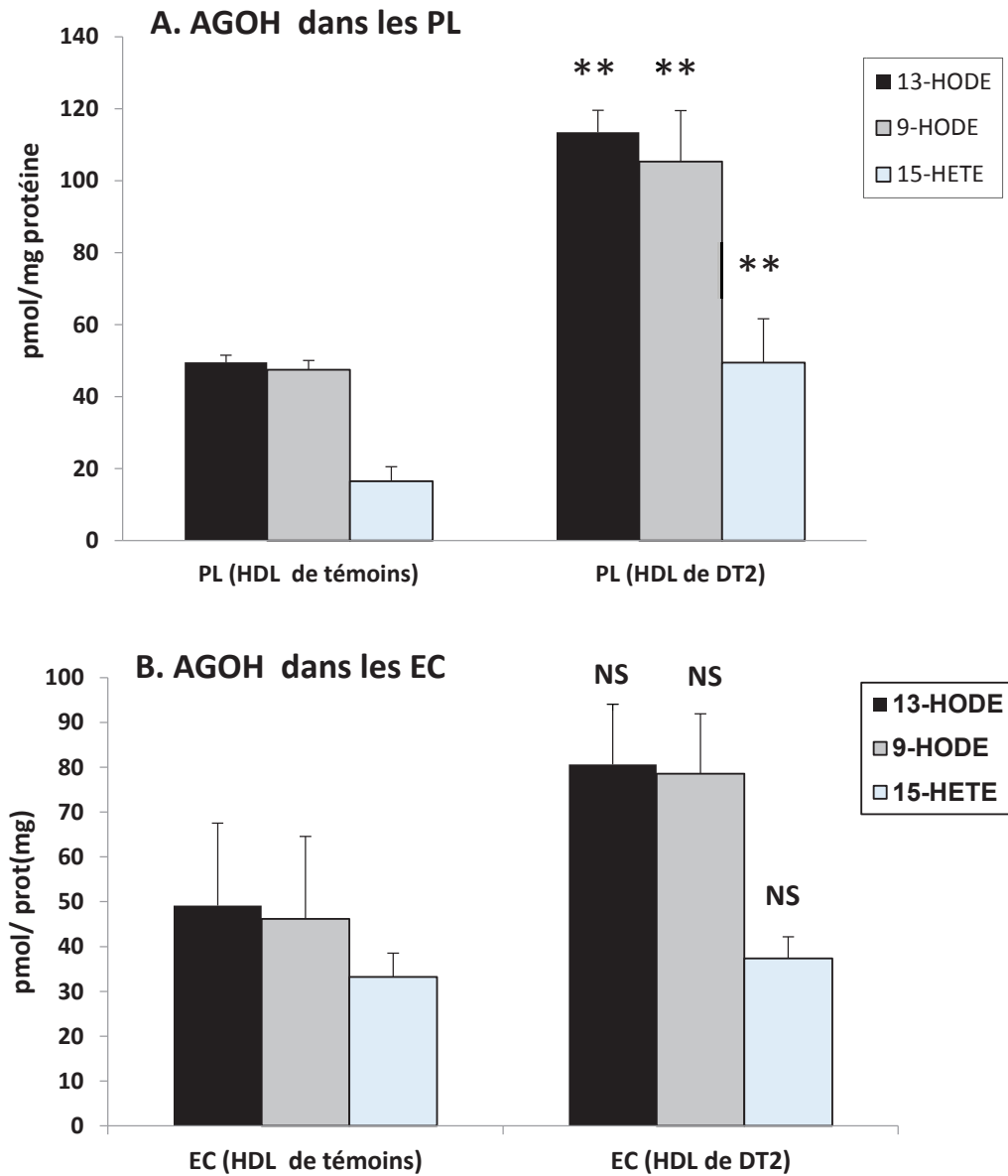


Figure 36: Concentrations des acides gras hydroxylés dans les phospholipides et esters de cholestérol d'HDL de sujets sains et de patients DT2.

Concentrations de 13-HODE, 9-HODE et 15-HETE dans les PL (A) et EC (B) d'HDL de 5 témoins sains et 5 patients atteints DT2. Les résultats sont la moyenne $\pm$ S.E.M. **, $P < 0,01$ comparativement aux HDL de sujets témoins.

Les concentrations des AGOH ont été déterminées dans les 2 principales classes lipidiques des HDL de patients DT2 *versus* les sujets témoins. Les concentrations de 13-HODE et 9-HODE sont deux fois plus élevées dans les PL des HDL de patients DT2 comparativement à celles des sujets témoins. Comparativement aux HDL de témoins, la concentration en 15-HETE (dérivé de l'AA) est 2,4 fois plus élevée dans les HDL de patients DT2 (figure 36A). Nous avons également réalisé les dosages des AGOH dans les EC. Bien que les HODE tendent à augmenter dans les EC de patients DT2, les différences ne sont pas significatives du fait de la viabilité inter-échantillon (figure 36B).

IV.2. Stéréoisomères des acides gras hydroxylés des HDL de patients diabétiques de type 2 :

Des études ont montré que les activités de la 15-LOX et de la 12/15-LOX sont fortement stimulées chez les patients DT2. Pour déterminer si les AGOH des HDL proviennent d'une peroxydation enzymatique (12/15-LOX) ou non enzymatique (radicaux libres), une analyse fine des énantiomères R et S par HPLC en phase chirale a été réalisée sur chaque AGOH.

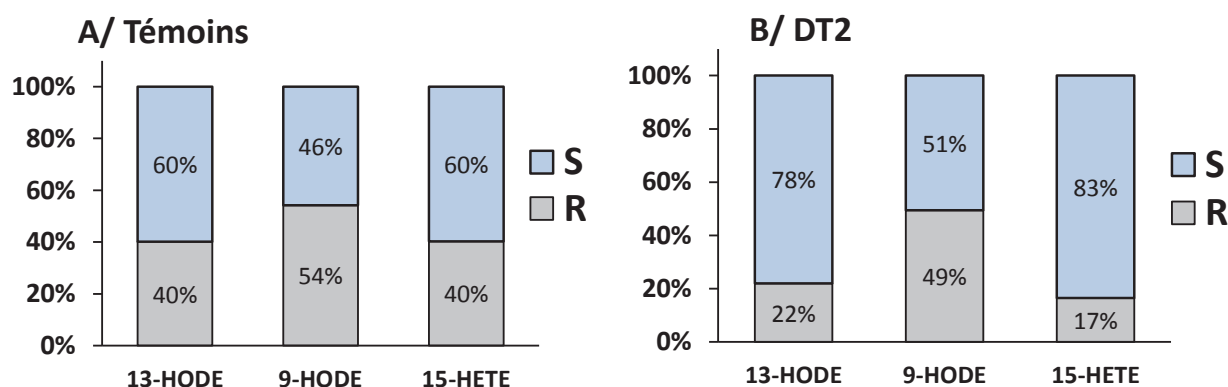


Figure 37 : Pourcentages des énantiomères d'acides gras hydroxylés des HDL de DT2 et de témoins.

Suite à l'analyse par HPLC chirale de chaque AGOH, les résultats sont exprimés en pourcentage d'énantiomères S et R de chaque AGOH dans les lipides totaux d'HDL de 5 témoins (A) et DT2 (B).

Concernant les AGOH du LA, le 13-HODE présent dans les HDL de DT2 est composé de 78% d'isomère S et de 22% d'isomère R, indiquant l'implication de la peroxydation lipidique enzymatique, probablement *via* la 15-LOX, et d'une peroxydation non enzymatique dans la formation du 13-HODE. Les 9(R)-HODE et 9(S)-HODE sont présents dans HDL de patients DT2 à des proportions similaires (51% de 9(S)-HODE et 49% de 9(R)-HODE) suggérant qu'une grande majorité des 9-HODE provient de la peroxydation lipidique non enzymatique. Le 15-HETE comprend 84% d'isomère S et 16% d'isomère R suggérant une contribution de la 15-LOX dans l'oxydation de l'AA (figure 37B).

Par comparaison, les HDL des sujets témoins contiennent 60% d'isomère S et 40% d'isomère R pour les 13(R/S)-HODE et 15(R/S)-HETE et des pourcentages R et S équivalents pour le 9-HODE, ce qui écarte une peroxydation enzymatique dans la formation des AGOH dans les HDL de témoins (figure 37A).

IV.3. Effets des HDL de patients diabétiques de type 2 sur l'agrégation plaquettaire :

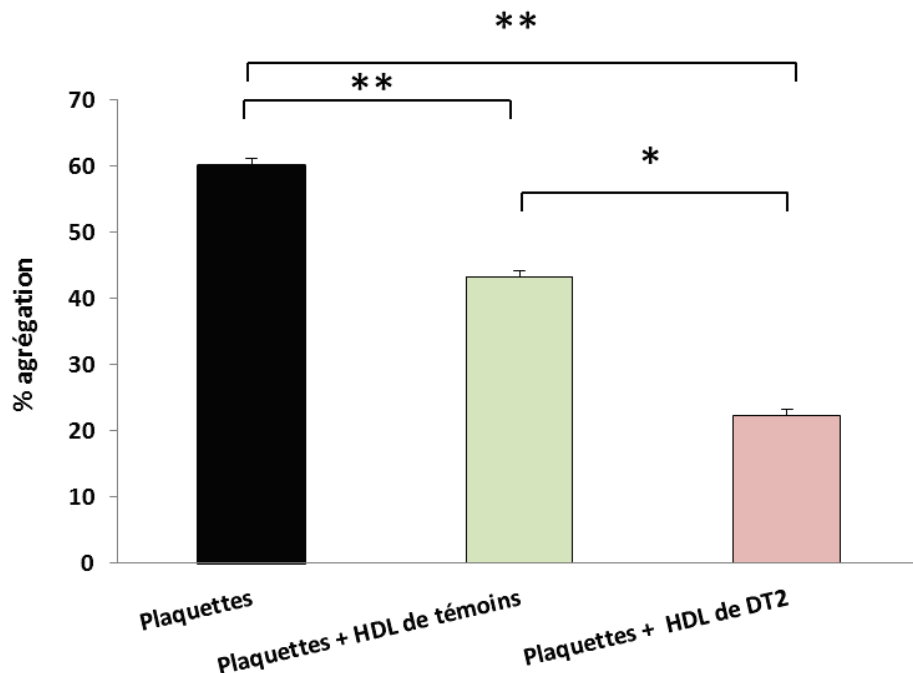


Figure 38: Effets des HDL de patientes DT2 sur l'agrégation plaquettaire.

Agrégation de plaquettes isolées à partir du sang de donneurs sains, pré-incubées pendant 5 min à 37°C en l'absence ou en présence d'HDL (50µg/mL) de sujets témoins et de patients DT2 et stimulées avec le collagène (2,5 à 5µg/mL). Les résultats sont les moyennes $\pm$ S.E.M. de 8 expériences indépendantes réalisées avec huit préparations différentes d'HDL et de plaquettes. Les astérisques indiquent des différences significatives (, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$).*

La pré-incubation des plaquettes avec des HDL de DT2 a entraîné une inhibition significative de l'agrégation plaquettaire induite par le collagène comparativement aux plaquettes seules. À une concentration de 50 µg/mL, les HDL de patients DT2 inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène de 38% tandis qu'à la même dose, les HDL de sujets témoins inhibent de 28% (figure 38).

Il est à noter que les concentrations d'AGOH dans les PL d'HDL de DT2 sont doublées par rapport à celles des sujets sains contrôles (figure 36A).

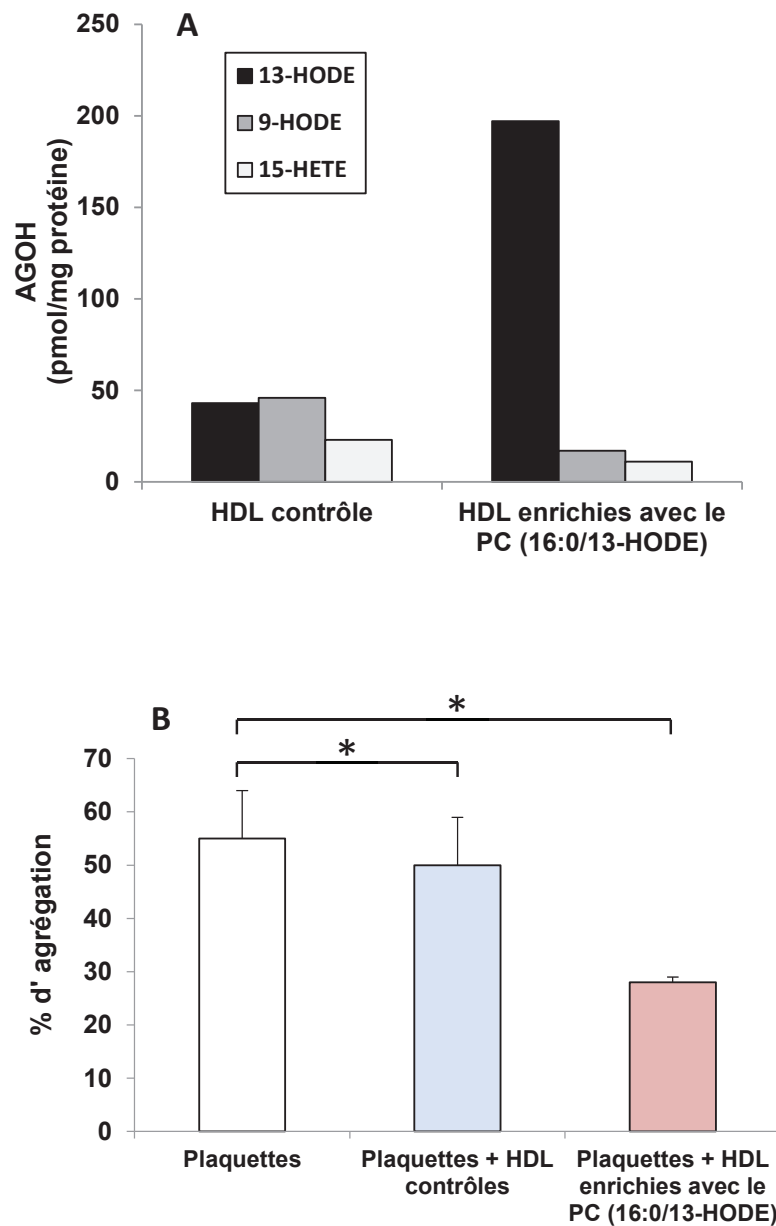


Figure 39 : Effets des HDL enrichies in vitro avec du PC(16:0/13(S)-HODE) sur l'agrégation plaquettaire.

(A) Concentrations de 13-HODE, 9-HODE et 15-HETE dans les HDL enrichies en PC (16:0/13-HODE) ("HDL enrichie") ou non (HDL contrôle), $n=2$. (B) Agrégation des plaquettes pré-incubées pendant 5 min à 37 ° C en l'absence (contrôle HDL) ou en présence d' HDL enrichies en [PC (16: 0/13-HODE)] et stimulées par le collagène. Les résultats sont les moyennes $\pm$

S.E.M. de 4 préparations différentes d'HDL contrôles et enrichies et de plaquettes. Les astérisques indiquent des différences significatives (, $P < 0,05$).*

Les HDL ont été enrichies en PC(16:0/13(S)-HODE) de façon à obtenir des concentrations similaires d'HODE à celles trouvées dans les HDL de DT2 (figure 36A) puis testées sur l'agrégation plaquettaire. Nous avons confirmé l'enrichissement de PC (16:0/13(S)-HODE) par HPLC, la concentration de 13-HODE augmente de 358%. Aucun autre AGOH n'augmente dans les HDL enrichies *in vitro* (figure 39A). De plus, les HDL enrichies avec le PC(16:0/13(S)-HODE) inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène de façon similaire à celle induite par des HDL de patients DT2 (figures 39 B et 38).

V. Schéma récapitulatif :

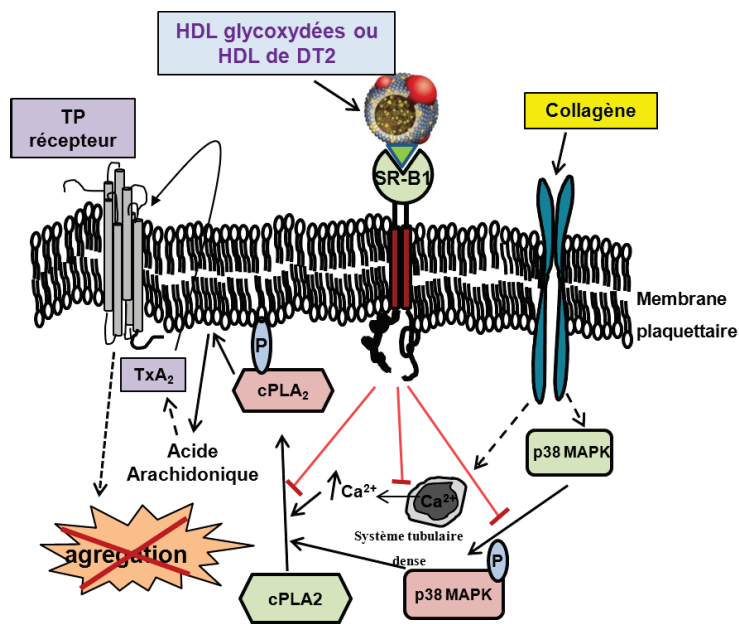


Figure 40 : Schéma illustrant les effets des HDL sur les voies de signalisation plaquettaire.

La liaison des HDL glycoxydées ou des HDL de patients DT2 sur le récepteur SR-BI membranaire conduit à l'inhibition des voies de signalisation de libération de l'AA via une diminution des quantités de p38 MAPK et cPLA₂ phosphorylées et à la moindre libération de Ca²⁺ du système tubulaire dense et inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène.

VI. Effets du mélange (LDL + HDL) sur l'agrégation plaquettaire :

Comme nous l'avons montré, les HDL de patients DT2 inhibent davantage l'agrégation plaquettaire que les HDL de témoins. D'autre part, notre équipe avait montré que les plaquettes de patients DT2 sont hyperactives [Véricel *et al.*, 2004] et que les LDL de patients DT2 activent et stimulent plus l'agrégation plaquettaire que les LDL de témoins [Colas *et al.*, 2011]. Afin de se placer dans des conditions plus physiologiques, nous avons recherché si la présence de LDL pro-agrégantes pouvait modifier les effets anti-agrégants des HDL de DT2.

Le plasma de patients DT2 a été ultracentrifugé à 540000 g pendant 3h30 de façon à éliminer les éventuels CM et les VLDL. La densité de la suspension restante a été ajustée avec du KBr à une densité de 1,21 g/mL et ultra-centrifugée à 540000 g pendant 6h30 pour obtenir une fraction contenant le mélange (LDL + HDL).

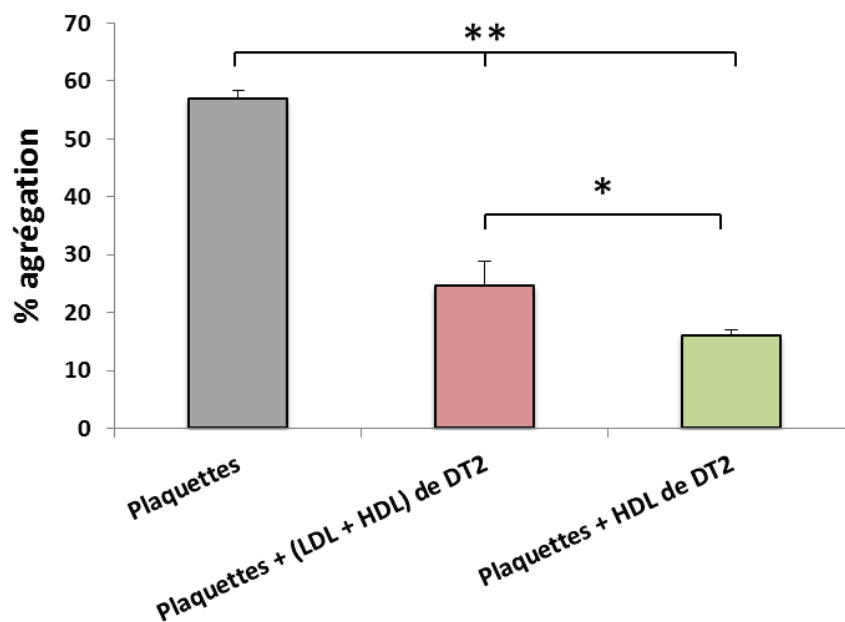


Figure 41: Effets du mélange (LDL + HDL) de DT2 sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène.

Les plaquettes sont pré-incubées en absence ou en présence de (50-100 µg/mL de protéines) d'HDL de DT2 ou des mélanges (LDL + HDL) de DT2, puis stimulées par le collagène (concentration 0.21 µg/ml). Les astérisques indiquent des différences significatives (, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$). N= 4*

Comparativement aux plaquettes stimulées par le collagène, les HDL de DT2 ainsi que le mélange (LDL + HDL) de DT2 inhibent l'agrégation plaquettaire (figure 41). Aux concentrations testées, le mélange (LDL + HDL) de DT2 inhibe cependant l'agrégation plaquettaire, mais de façon moindre que les HDL de patients DT2 (24,6% vs 16%). Ces résultats suggèrent que la présence d'une faible concentration de LDL lève légèrement l'inhibition induite par les HDL. On ne peut pas exclure que les proportions d'HDL et de LDL ne soient pas équivalentes dans le mélange (LDL + HDL) de DT2.

VII. Discussion :

Le DT2 est associé à une augmentation du risque athérothrombotique et à un stress oxydant accru. Bien que le stress oxydant ait surtout été mis en évidence dans le plasma des patients DT2, des HDL oxydées ont été détectées dans l'intima de plaques d'athérosclérose [Nakano et Nagata, 2003] et dans le plasma de patients DT2 [Ueda *et al.*, 2007]. Les HDL ont été décrites comme des capteurs de lipides oxydés provenant des LDL [Castilho *et al.*, 2001 ; Navab *et al.*, 2000] et des transporteurs majeurs des hydroperoxydes lipidiques [Bowry *et al.*, 1992 ; Hahn *et al.*, 1994] et des isoprostanes [Proudfoot *et al.*, 2009]. Nos résultats confirment que les HDL de patients DT2 sont oxydées comme en atteste l'augmentation des concentrations d'acides gras hydroxylés (incluant les hydroperoxydes d'acides gras), produits primaires de peroxydation lipidique, comparativement à celles de témoins sains. En particulier, nous avons mis en évidence une augmentation d'un facteur 2 des concentrations d'HODEs, dérivés du principal AGPI, le LA, et du 15-HETE, dérivé de l'AA, dans les PL des HDL glycoxydées de patients DT2. Des augmentations similaires de 13 HODE, 9-HODE et 15-HETE ont été récemment décrites dans les lipides totaux d'HDL de patients diabétiques [Morgantini *et al.*, 2014], mais c'est la première preuve de l'augmentation des concentrations en AGOH dans les PL des HDL de patients DT2. De plus, l'analyse des énantiomères R et S des AGOH nous a permis de montrer que les 13-

HODE et 15-HETE des HDL de patients DT2 ont un ratio R/S d'environ 20/80 et sont par conséquent formés par voie non enzymatique mais aussi enzymatique, probablement *via* la voie de la 15-LOX, stimulée chez des patients DT2 ou souffrant de MCV [Suzuki *et al.*, 2015 ; Kayama *et al.*, 2009 ; Kuhn *et al.*, 1997 ; Folcik *et al.*, 1995]. Ceci confirme que les HDL, du fait de leur richesse en AGPI, sont la cible de la peroxydation lipidique non enzymatique et enzymatique.

Dans la littérature, le rôle des HDL oxydées sur l'activation plaquettaire est matière à controverse. Bien qu'il ait été montré que les HDL fortement oxydées par le Cu^{2+} [Ardlie *et al.*, 1989, Takahashi *et al.*, 1996] ou oxydées par HOCl, peuvent stimuler l'agrégation des plaquettes par l'intermédiaire de CD36 [Assinger *et al.*, 2008, 2010], le groupe de Podrez a été le premier à montrer que les HDL oxydées par le Cu^{2+} ou la MPO peuvent inhiber l'activation et l'agrégation plaquettaire induite par différents agonistes *via* SR-BI [Valiyaveetil *et al.*, 2008]. Notre équipe avait également décrit des effets antiagrégants d'HDL fortement oxydées provenant de patientes souffrant d'abêtalipoprotéïnémie, une maladie génétique orpheline caractérisée par l'absence de lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine B [Calzada *et al.*, 2013].

D'une part, nous avons montré que les HDL glycoxydées *in vitro* inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène de façon dose-dépendante et s'avèrent plus anti-agrégantes que les HDL contrôles pour des concentrations inférieures à 50µg/mL. Les HDL glyquées et oxydées inhibent également l'agrégation plaquettaire à ces mêmes concentrations. En ce qui concerne les mécanismes d'action des HDL glycoxydées, nous avons focalisé notre étude sur la voie de signalisation conduisant à la libération de l'AA des PL membranaires *via* l'activation des p38 MAPK et cPLA₂ puisqu'elle est l'une des cibles du stress oxydant. Nous présentons des données originales montrant que les HDL glycoxydées s'opposent à l'augmentation de phosphorylation induite par le collagène et donc à l'activation de la p38 MAPK, kinase responsable de la phosphorylation de cPLA₂ [Börsch-Haubold *et al.*, 1997] et de la cPLA₂, enzyme clé impliquée dans la libération d'AA des PL [Kramer *et al.*, 1997] qui constitue une étape limitante dans la biosynthèse des eicosanoïdes biologiquement actifs dans les plaquettes comme le TxA₂.

D'autre part, nous avons montré pour la première fois que des HDL de patients DT2 inhibent l'agrégation plaquettaire à des concentrations aussi faibles que 25 µg de protéines/mL, soit 40

fois moins que la concentration physiologique des HDL. Confirmant nos résultats *in vitro*, les HDL de DT2 s'avèrent plus anti-agrégantes que les HDL de témoins.

De plus, nos résultats indiquent que les HDL glycoxydées *in vitro* ainsi que les HDL de DT2 inhibent l'agrégation des plaquettes par l'intermédiaire du récepteur SR-BI en accord avec les résultats publiés initialement sur les effets des HDL oxydées *in vitro*. Ces études démontraient que les HDL oxydées par le cuivre se lient de façon plus forte au récepteur SR-BI plaquettaire que les HDL non modifiées [Valiyaveetil *et al.*, 2008] et qu'elles sont aussi des ligands plus puissants que les HDL natives au niveau des cellules endothéliales [Nakajima *et al.*, 2000]. En outre, il a été rapporté que l'expression de SR-BI humain est réduite à la surface des plaquettes de patients ayant une maladie athérosclérotique et que son niveau d'expression est corrélé négativement avec l'agrégation plaquettaire [Imachi *et al.*, 2003, 2014], ce qui pourrait impacter sur les propriétés antiagrégantes des HDL de patients DT2. Un dysfonctionnement dans la reconnaissance des HDL par SR-BI pourrait aussi expliquer partiellement le risque athérothrombotique plus élevé des patients DT2. En effet, des études ont montré que des produits avancés d'oxydation des protéines liés à l'albumine, *in vitro* ou provenant de patients souffrant d'insuffisance rénale chronique, puis injectés dans des souris SR-BI +/+, augmentent la demi-vie de leurs HDL d'un facteur 8. Ceci suggère qu'une clairance défailante des HDL via SR-BI pourrait contribuer à la composition anormale des HDL et au risque cardiovasculaire accru chez ces patients [Marsche *et al.*, 2009].

L'analyse par HPLC des AGOH dans les HDL glycoxydées a permis de mettre en évidence une augmentation très forte des HODE et du 15-HETE dans les PL des HDL glycoxydées *in vitro* ainsi qu'une augmentation dans les PL des HDL de DT2, comparativement aux HDL contrôles respectives. Les concentrations des AGOH dans les EC & TAG sont augmentées de façon moindre dans les HDL glycoxydées, probablement du fait de leur localisation dans le noyau des HDL. Par contre, les PL sont des cibles plus accessibles des radicaux libres du fait de leur localisation dans l'enveloppe des particules lipoprotéiques et sont plus susceptibles d'interférer avec les plaquettes *via* SR-BI. De plus, les concentrations d'HODE et de 15-HETE dans les PL d'HDL sont corrélées négativement à l'agrégation plaquettaire induite par le collagène ($r = -0,65$, $P = 0,004$). En nous focalisant sur ces résultats, nous avons pu établir que les PL estérifiés avec du LA oxydé, en particulier le PC (16:0/13-HODE), contribuent aux effets antiagrégants

observés des HDL glycoxydées *in vitro* et des HDL de DT2. L'enrichissement d'HDL avec du PC(16:0/13-HODE) conduit à une inhibition de l'agrégation plaquettaire alors que l'enrichissement des HDL avec de la PC non oxydée n'a pas d'effet significatif. En outre, l'association entre des concentrations élevées de PL oxydés dans les HDL et une moindre réactivité à l'agrégation induite par le collagène sont en accord avec l'étude « Cardiovasculaire Risk in Young Finns » suggérant une corrélation entre un risque cardiovasculaire plus élevé et des niveaux plus faibles de lipides oxydés au sein des HDL [Kresanov *et al.*, 2013].

L'électrophorèse des HDL sur gel de polyacrylamide suggère que les HDL, lorsqu'elles sont glycoxydées, ont une taille apparente plus importante que les HDL contrôles. L'une des hypothèses serait que la glycoxydation modifierait la taille des particules d'HDL, soit par la modification de l'interaction entre l'apoA-I et les PL, soit *via* la réticulation entre les particules d'HDL [Gao *et al.*, 2008]. En effet, il a montré que l'oxydation modérée des HDL permet la dissociation des apolipoprotéines et la fusion entre les particules HDL pour donner des HDL de plus grande taille [Gao *et al.*, 2008]. Une autre hypothèse serait que l'oxydation des HDL modifierait la mobilité électrophorétique des HDL du fait de la formation de PL oxydés chargés négativement. D'autres études ont d'ailleurs montré que les PL oxydés augmentent la charge négative des HDL [Gao *et al.*, 2008, 2010] et contribueraient à leur effet anti-agrégant et que des particules d'HDL3 contenant des PI et PS chargées négativement inhibent l'agrégation plaquettaire *via* SR-BI [Brodde *et al.*, 2011].

En conclusion, nos résultats ne vont pas dans le sens des résultats décrivant la perte de fonctions athéroprotectrices des HDL lorsqu'elles sont oxydées. Bien qu'il soit difficile de comparer les différentes études du fait de conditions expérimentales variables (concentration d'HDL, agent oxydant utilisé, temps d'interaction avec les plaquettes) et des propriétés fonctionnelles étudiées, les discordances pourraient être liés à des différences dans le degré et le type de modification oxydative et fonction des molécules impliquées, déterminant la liaison des HDL aux récepteurs plaquettaires, SR-BI ou CD36, et la capacité des HDL à inhiber ou stimuler l'agrégation plaquettaire *via* SR-BI ou CD36, respectivement [Van Der Stoep *et al.*, 2014].

B. Effets des sous-classes d'HDL sur l'agrégation plaquettaire.

Les HDL sont classiquement divisées en sous-classes HDL2 et HDL3 qui diffèrent par leur taille et densité mais aussi par leurs compositions lipidiques et protéiques. De plus, les HDL3 seraient moins sensibles à l'oxydation que les HDL2. Les résultats des études sur leurs propriétés fonctionnelles respectives sont contradictoires. Dans le diabète de type 2, les concentrations d'HDL cholestérol et d'HDL2 cholestérol sont diminuées alors que celles d'HDL3 cholestérol sont inchangées [Bakogianni *et al.*, 2001 ; Drexel *et al.*, 1992].

Notre objectif a été de déterminer l'impact des sous-classes d'HDL oxydées *in vitro* ainsi que celui de DT2 sur l'agrégation plaquettaire.

I. Effets des HDL2 et HDL3 oxydées *in vitro* sur l'agrégation plaquettaire :

Après isolement par ultracentrifugations séquentielles des HDL2 et HDL3 à partir du plasma de volontaires sains, nous avons oxydé ces sous-classes d'HDL par le cuivre comme décrit dans la partie « méthodes » (page 96) et les nommerons par souci de clarté :

- HDL2 contrôles ou **HDL2C** (incubées pendant 1 jour à 37°C).
- HDL2 oxydées ou **HDL2ox** (incubées pendant 1 jour à 37°C avec 5 μ M de CuCl₂).
- HDL3 contrôles ou **HDL3C** (incubées pendant 1 jour à 37°C).
- HDL3 oxydées ou **HDL3ox** (incubées pendant 1 jour à 37°C avec 5 μ M de CuCl₂).

Nous avons déterminé l'impact de l'oxydation des HDL2 et HDL3 oxydées *in vitro* sur la composition en AG et leurs propriétés anti-agrégantes.

I.1. Composition en acides gras des principales classes lipidiques dans les sous-classes d'HDL oxydées *versus* HDL contrôles :

I.1.a. Composition en acides gras des esters de cholestérol :

Les pourcentages molaires des AG présents dans les EC des HDL2 et HDL3 sont similaires à ceux des HDL totales (tableau 5). Nous ne présenterons que les résultats correspondant aux deux principaux AGPI, LA et AA, cibles préférentielles de l'oxydation.

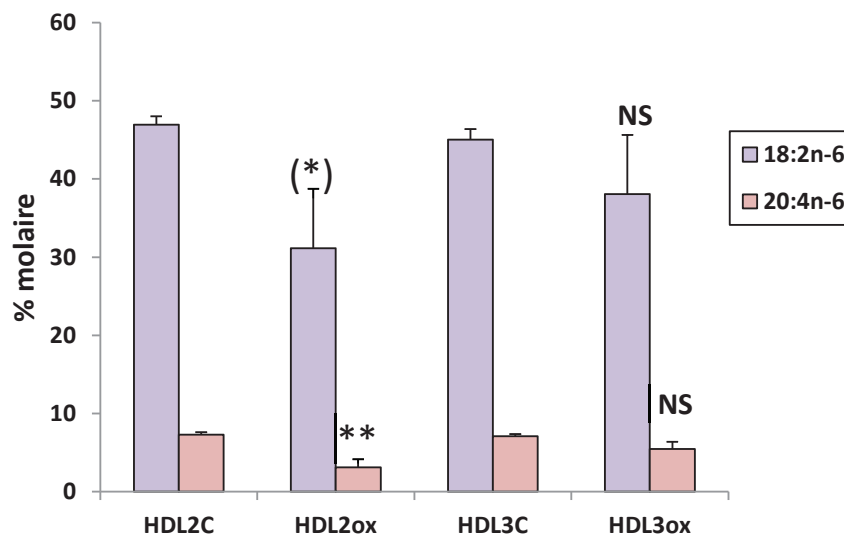


Figure 42: Proportions d'acides linoléique et arachidonique dans les esters de cholestérol des HDL2 et HDL3 contrôles et oxydés.

Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire et représentent les moyennes $\pm$ S.E.M de 5 expériences. Significativement différent des HDL contrôles respectifs **: $P < 0,01$; (*) : $P < 0,1$; NS : non significatif. 18:2n-6 ou LA ; 20:4n-6 ou AA.

Comparativement aux HDL2C, le pourcentage molaire d'AA diminue significativement dans les HDL2ox (-56%) et tend à diminuer pour le LA (-34 %). En revanche, ces pourcentages ne varient pas entre les HDL3C et les HDL3ox.

I.1.b. Composition en acides gras des phospholipides :

Aucune différence n'a été notée dans les pourcentages molaires des AG dans les PL entre HDL2C et HDL3C, et comparativement aux HDL totales (tableau 6).

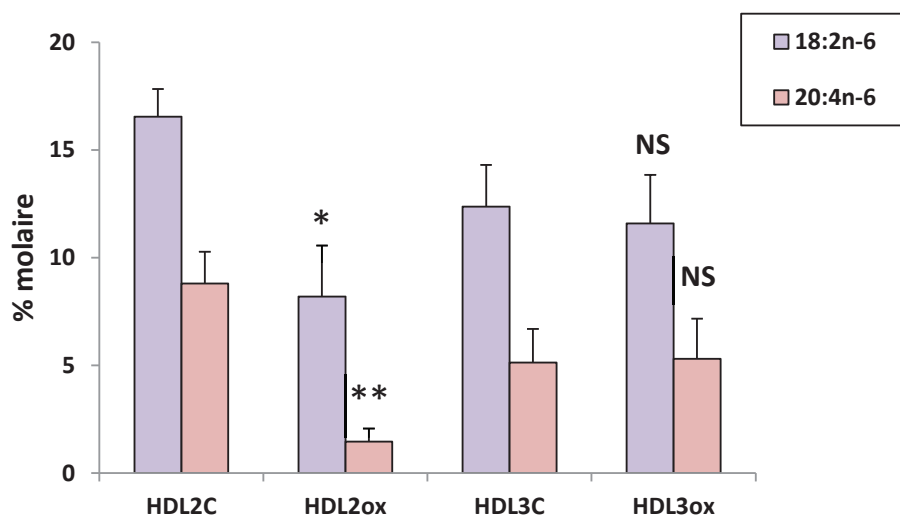


Figure 43: Proportions d'acides linoléique et arachidonique dans les phospholipides des HDL2 et HDL3 contrôles et oxydés.

Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire et représentent les moyennes $\pm$ S.E.M de 5 expériences. Significativement différent des HDL contrôles * : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$; NS : non significatif. 18:2n-6 ou LA ; 20:4n-6 ou AA.

Les pourcentages molaires des LA et AA diminuent de 50% et 93% respectivement dans les HDL2ox comparativement à ceux des HDL2C. Aucune modification des proportions de LA et d'AA n'a été notée entre les HDL3C et les HDL3ox.

Dans les plasmalogènes, les proportions de 18:0 DMA et 16:0 DMA chutent significativement dans les HDL2ox comparativement à celles des HDL2C alors qu'elles ne varient pas dans les HDL3ox comparativement à celles des HDL3C (données non présentées).

I.1.c. Agrégation plaquettaire :

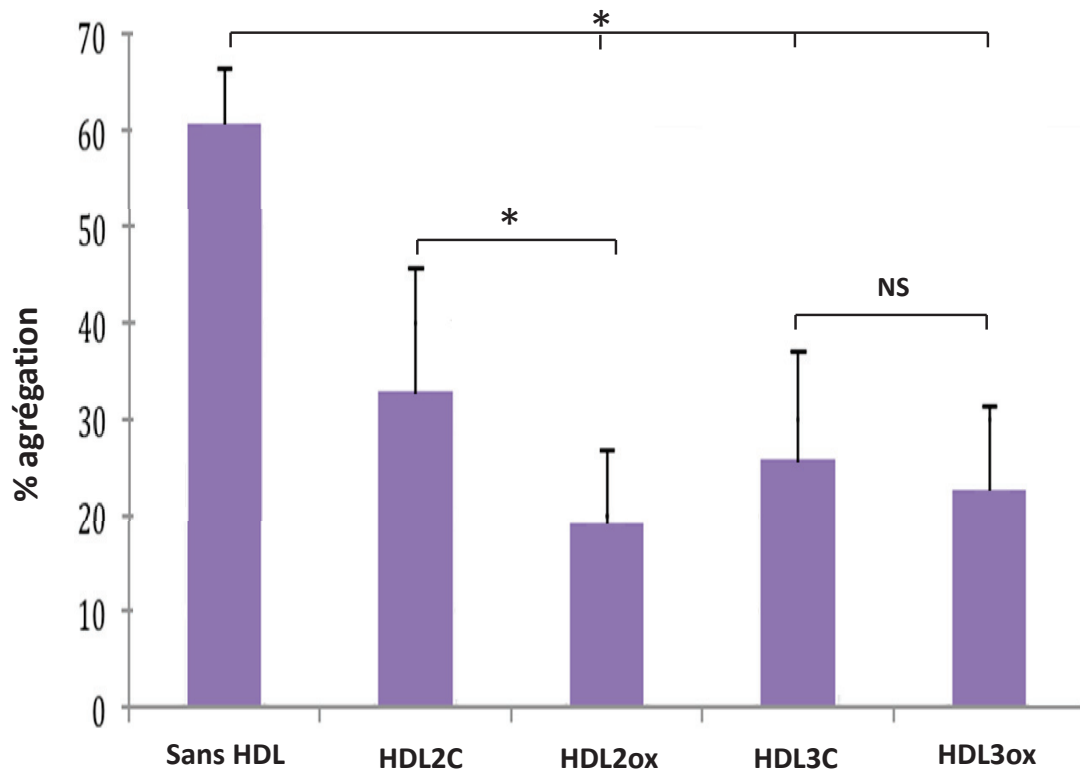


Figure 44 : Effets des HDL2 et HDL3, contrôles et oxydées, sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène.

Des plaquettes isolées du sang de volontaires sains ont été pré-incubées en absence ou en présence des différentes préparations d'HDL (50 $\mu\text{g/mL}$) pendant 5 minutes à 37°C, puis activées par le collagène (5-10 $\mu\text{g/mL}$). La cinétique d'agrégation a été suivie pendant 4 minutes. Les résultats, exprimés en pourcentage d'agrégation, représentent les moyennes $\pm$ S.E.M. de 3 expériences indépendantes. * : $P < 0,05$; NS : non significatif.

Les résultats de la figure 44 indiquent que comparativement aux plaquettes pré-incubées sans HDL, les HDL2ox, HDL3 et HDL3ox inhibent significativement l'agrégation plaquettaire induite par le collagène et que les HDL2C tendent à l'inhiber. Les HDL2ox sont plus anti-agrégantes que les HDL2C (19% vs 33% agrégation) alors que les effets anti-agrégants des HDL3C et HDL3ox sont similaires (26% vs 23% agrégation). Les HDL2ox sont la sous-classe

testée la plus efficace pour inhiber l'agrégation plaquettaire. Ces résultats doivent être pris avec précaution du fait de la grande variabilité de réponse entre les suspensions plaquettaires et du nombre faible de manipulations.

II. Effets des HDL2 et HDL3 de patients diabétiques de type 2 sur l'agrégation plaquettaire :

10 patients DT2 (5 hommes et 5 femmes, âgés de $60 \pm 6,7$ ans) ont été recrutés dans le service du Professeur Philippe Moulin et 10 volontaires sains (dénommés témoins) ont été prélevés à l'EFS. Les patients DT2 avaient un pourcentage d'hémoglobine glyquée ($8,04 \pm 0,6$ %) et une glycémie à jeun ($8,02 \pm 0,5$ mmol/L) élevés. Ils avaient une hypertriglycémie ($2,5 \pm 1,4$ mmol/L), des concentrations normales de LDL-cholestérol ($2,70 \pm 0,4$ mmol/L) et de faibles concentrations de HDL-cholestérol ($1,04 \pm 0,2$ mmol/L).

Les HDL2 et HDL3 ont été isolées parallèlement par ultracentrifugations séquentielles du plasma provenant de patients DT2 ou de témoins. Les différentes préparations de sous-classes d'HDL seront nommées :

- HDL2 contrôles de témoins ou **HDL2C**.
- HDL2 de patients DT2 ou **HDL2 de DT2**.
- HDL3 contrôles de témoins ou **HDL3C**.
- HDL3 de patients DT2 ou **HDL3 de DT2**.

II.1. Acides gras hydroxylés :

Nous avons montré que les PL des HDL totales de DT2 avaient une concentration d'AGOH doublée comparativement à celle d'HDL de témoins sains (figure 36). D'autre part, l'analyse de la composition en AG des HDL2 et HDL3 oxydées *in vitro* a mis en évidence une oxydation plus forte des HDL2 comparativement aux HDL3. Nous avons donc choisi de quantifier les AGOH présents dans les HDL2 et HDL3 de patients DT2. Les analyses n'ont pu être réalisées que sur

les lipides totaux des sous-classes d'HDL du fait des volumes limités de sang de DT2 et par conséquent d'HDL.

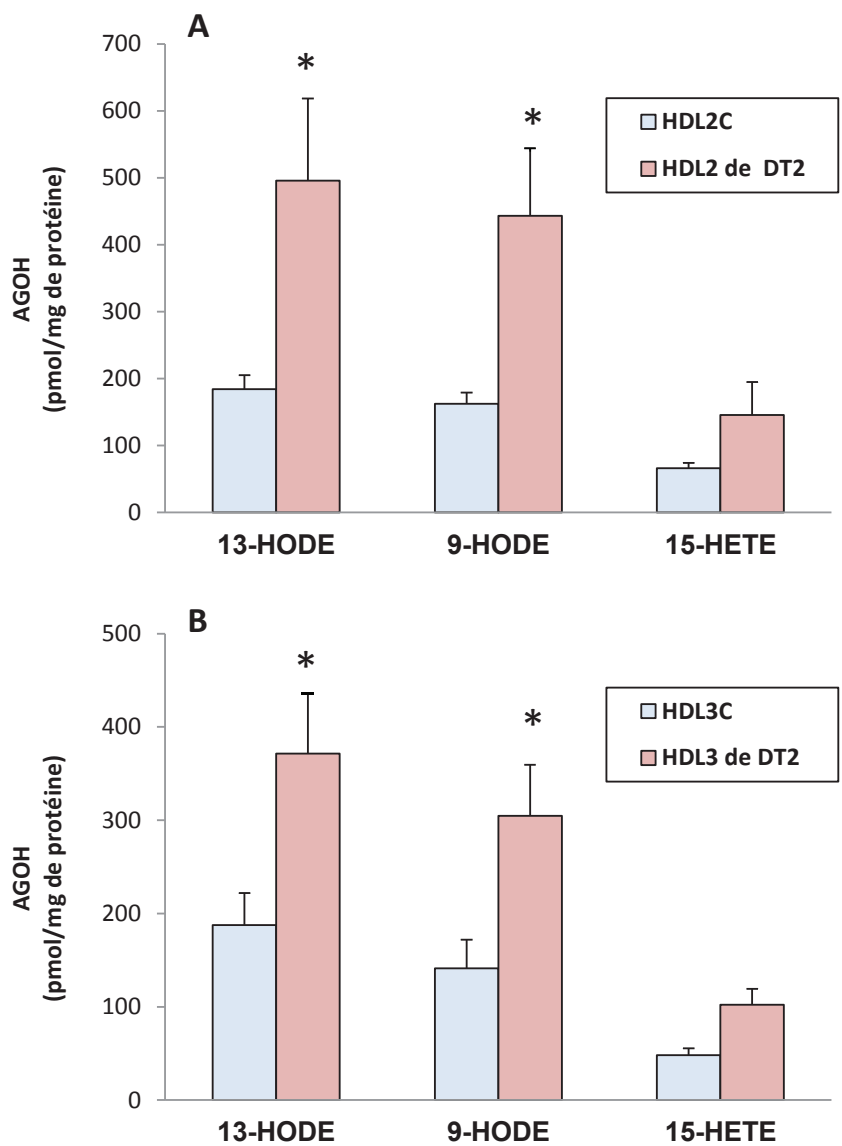


Figure 45 : Concentrations d'acides gras hydroxylés dans les lipides totaux des HDL2 et HDL3 de témoins et de patients DT2.

*Concentrations de 13-HODE, 9-HODE et 15-HETE dans HDL2 (A) & HDL3 (B) de 5 témoins et 5 patients DT2. Les résultats sont les moyennes $\pm$ SEM. *, $P < 0,05$ comparativement aux HDL de témoins.*

Une augmentation significative des concentrations en HODE dans les HDL2 et HDL3 de DT2 a été observée comparativement aux valeurs des témoins. En effet, les concentrations de 13-HODE et 9-HODE augmentent respectivement de 170% et 173% dans les HDL2 de DT2 comparativement à celles des HDLC alors qu'elles augmentent de 97% et 116% dans les HDL3 de DT2 comparativement à celles des HDL3C. Les concentrations de 15-HETE augmentent de 119% dans les HDL2 et de 112% dans les HDL3 de DT2, mais non significativement comparativement aux HDL2C et HDL3C.

II.2. Agrégation plaquettaire :

Nous avons montré que les HDL totales de patients DT2 inhibent l'agrégation plaquettaire de manière plus importante que les HDL de témoins et des données de la littérature suggèrent des effets fonctionnels différents des sous-classes d'HDL. Nous avons donc déterminé l'impact de chaque sous-classe sur l'agrégation plaquettaire.

Du fait des différences de taille et du nombre de particules dans chaque sous-classe, l'addition des HDL a été réalisée en fonction de la concentration de protéines, de la concentration équivalente d'apoA-I et selon le nombre de particules.

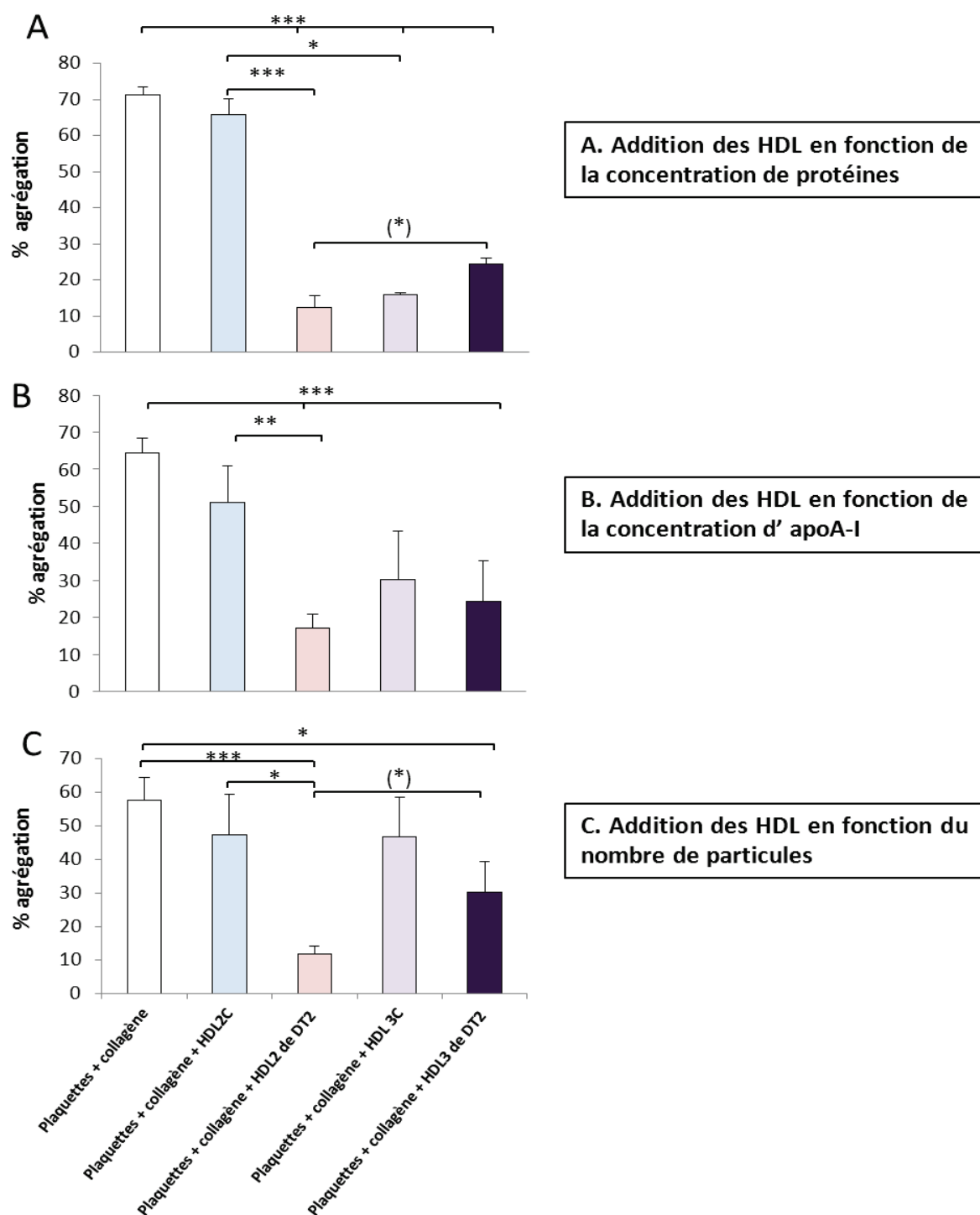


Figure 46 : Effets des sous-classes d'HDL de témoins et de patients DT2 sur l'agrégation plaquettaire.

*Des plaquettes isolées de volontaires sains ont été pré-incubées en absence ou en présence des sous-classes d'HDL (2 ou 3) pendant 5 minutes à 37°C, activées par le collagène (0,11 µg/mL puis la cinétique d'agrégation a été suivie pendant 4 minutes. L'addition des HDL a été faite en fonction de leur concentration protéique à (50 µg/mL), (A) concentration d'apoA-I (B) et nombre de particules estimé (C). Les résultats, exprimés en pourcentage d'agrégation, représentent les moyennes ± S.E.M. de 5 expériences indépendantes. * : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$; NS : non significatif.*

II.2.a. HDL ajoutées aux plaquettes par rapport à la concentration de protéines :

Comparativement aux plaquettes activées par le collagène (sans HDL) (71% d'agrégation), les HDL2 de DT2, HDL 3C et HDL3 de DT2 inhibent significativement l'agrégation induite par le collagène (13%, 16% et 27% respectivement). A noter que, pour la concentration protéique testée, les HDL3C inhibent l'agrégation alors que les HDL2C sont sans effet (27% vs 66%, respectivement) (figure 46A).

Pour une même quantité de protéines ajoutée, les HDL2 de DT2 inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène comparativement aux HDL2C (13% vs 66% respectivement). Cependant, les HDL3 de témoins et de DT2 inhibent de façon similaire l'agrégation.

II.2.b. HDL ajoutées aux plaquettes par rapport à la concentration d'apoA-I :

L'apoA-I est l'apolipoprotéine majeure des HDL et les HDL2 ont plus de molécules d'apoA-I que les HDL3 (4-5 dans les HDL2 vs 2-4 dans les HDL3) [Kontush et Chapman, 2006].

Nous avons ajouté une même quantité d'apoA-I de chaque sous-classe d'HDL aux suspensions plaquettaires en se basant sur la concentration protéique ajoutée dans les HDL2C ci-dessus. Les résultats d'agrégation plaquettaires sont exprimés par rapport à la concentration d'apoA-I dans les HDL (figure 46B) et non plus par rapport à la concentration protéique des HDL comme auparavant.

Comparativement aux plaquettes stimulées par le collagène, les HDL2 de DT2, et les HDL3 de DT2 inhibent significativement l'agrégation induite par le collagène (67% vs 16% et 21% respectivement). Les HDL2C et les HDL3C sont sans effet sur l'agrégation.

Les HDL2 de DT2 inhibent plus l'agrégation plaquettaire que les HDL2C (55% vs 16%). Les HDL3 de DT2 tendent à inhiber plus l'agrégation plaquettaire que les HDL3C (21% vs 29 % respectivement) mais la différence n'est pas significative.

II.2.c. HDL ajoutées aux plaquettes par rapport au nombre de particules :

Les HDL2 sont « plus larges » et moins riches en protéines comparativement aux HDL3 plus petites et plus riches en protéines, mais contiennent moins d'apoA-I par particule. Dans les tests précédents, nous avons par conséquent incubé les plaquettes avec plus des particules HDL3 qu'HDL2 pour avoir une quantité équivalente de protéines ou d'ApoA-I. La question se pose de savoir si les différences observées entre les sous-classes d'HDL seraient dues à des différences du nombre de particules d'HDL ajoutées. Nous avons donc utilisé un autre paramètre, le nombre de particules d'HDL. Celui-ci a été calculé pour chaque préparation d'HDL en utilisant l'algorithme de Shen *et al.*, (1977) modifié par Mazer *et al.*, (2013). Dans ce calcul, les concentrations de protéine, d'apoA-I et de cholestérol total sont prises en compte.

Le nombre de particules ajoutées a été fixé par rapport aux nombres de particules dans les HDL2C, et le même nombre de particules a ensuite été ajouté dans chaque préparation d'HDL.

Les résultats de la figure 46C montrent que les HDL2 de DT2 et les HDL3 de DT2 inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène comparativement aux plaquettes activées seulement par le collagène. Les HDL2C et HDL3C n'inhibent pas l'agrégation, contrairement au résultat de la figure A montrant un effet antiagrégant des HDL3C quand elles sont ajoutées par rapport à la quantité de protéines.

Les HDL2 de DT2 sont plus antiagrégantes que leurs homologues contrôles, confirmant les résultats des figures 46 A, B. Les HDL3 de DT2 tendent à inhiber plus l'agrégation plaquettaire que les HDL3C (30% vs 47 %), mais la différence n'est pas significative. A noter que les HDL2 de DT2 tendent à inhiber plus significativement l'agrégation plaquettaire que les HDL3 de DT2.

En résumé, quels que soient les paramètres utilisés pour fixer l'addition des différentes préparations d'HDL et déterminer leurs effets sur l'agrégation plaquettaire, nous avons observé un effet inhibiteur constant des HDL2 de DT2 et des HDL3 de DT2. De plus, quel que soit le mode d'addition des HDL, les HDL2 de DT2 tendent à être plus antiagrégantes que les HDL3 de

DT2. Les HDL3 de témoins inhibent l'agrégation seulement lorsque les HDL sont ajoutées par rapport à la concentration de protéines alors que les HDL2C n'inhibent pas l'agrégation.

III. Discussion :

Un nombre croissant d'études souligne l'importance de la qualité des HDL et notamment de leur taille et composition sur leurs propriétés anti-athérogènes. Peu de données dans la littérature sont relatives aux effets des sous-classes d'HDL sur l'agrégation plaquettaire et aucune étude n'existe à notre connaissance sur les effets des HDL2 et HDL3 de patients DT2 sur les fonctions plaquettaires.

Nous montrons d'abord que les HDL2 oxydées *in vitro* inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène et qu'elles sont plus puissantes que les HDL2 contrôles non modifiées. Les HDL3, qu'elles soient oxydées ou non par le cuivre, inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène de façon similaire. Nos résultats corroborent ceux obtenus par le groupe de Nofer montrant une inhibition par les HDL3 et HDL3 oxydées de l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine, les HDL3 étant aussi anti-agrégantes que les HDL3 oxydées, pour des concentrations variant de 0,6 à 1,2 g/L [Nofer *et al.*, 1998]. De plus, le traitement des HDL2 par le cuivre résulte en une diminution des proportions des LA et AA dans les PL alors que la composition en acides gras des HDL3 oxydés n'est pas significativement différente de celle des HDL3 contrôles. Nos résultats suggèrent donc que les HDL2 sont plus oxydées que les HDL3, en accord avec les études indiquant que les HDL3 sont plus résistantes à une oxydation induite par HOCl [Chantepie *et al.*, 2009] ou par le cuivre [Shuhei *et al.*, 2010] que les HDL2. De plus, les HDL3 possèdent une activité PON1 plus importante que les HDL2 [Nobécourt *et al.*, 2005] et inhibent l'oxydation des LDL de façon plus prononcée que les HDL2 [Yoshikawa *et al.*, 1997]. Cette différence de sensibilité à l'oxydation des sous-classes d'HDL pourrait expliquer la fluctuation observée dans le degré d'oxydation des HDL totales glycoxydées *in vitro* isolées de différents sujets qui pourraient posséder des ratio HDL2/HDL3 différents.

Nous montrons pour la première fois que des HDL2 et HDL3 isolées du plasma de patients DT2 inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène comparativement aux plaquettes non

incubées avec des HDL, confirmant les effets antiagrégants des HDL2 et HDL3 oxydées *in vitro* et ceux des HDL totales de patients DT2. Les concentrations plus élevées d'AGOH dans les HDL2 de DT2 comparativement à celles des HDL3 de DT2 pourraient expliquer en partie la tendance à une inhibition plus importante de l'agrégation plaquettaire suite à la préincubation des plaquettes avec des HDL2 de DT2.

L'approche consistant à ajouter les HDL en fonctions de différents paramètres, la concentration en protéines, celle en apoA-I et le nombre de particules, nous a permis de montrer que les effets des sous-classes d'HDL sur l'agrégation plaquettaire peuvent varier en fonction du paramètre utilisé.

En effet, les HDL3 de témoins inhibent fortement l'agrégation plaquettaire sur la base de leur concentration de protéines mais n'inhibent plus significativement l'agrégation sur la base de leur concentration en apo A-I ou du nombre de particules. Quel que soit le mode d'addition des HDL, les HDL2 de témoins n'inhibent pas l'agrégation plaquettaire. Nos résultats sur les sous-classes d'HDL de témoins sont en accord avec l'étude du groupe de Nofer montrant une inhibition de l'agrégation plaquettaire par les HDL3 et aucun effet des HDL2 (1g de protéine/mL) [Brodde *et al.*, 2011].

Nous avons observé un effet anti-agrégant constant des HDL2 et des HDL3 de DT2, quel que soit le mode de comparaison, confirmant le rôle important de l'oxydation dans les propriétés anti-agrégantes des HDL.

Comme les HDL2 de patients DT2 s'avèrent les plus puissantes pour inhiber l'agrégation plaquettaire et que les taux d'HDL2 sont diminués chez les patients DT2, cette diminution des HDL2 pourrait contribuer à l'hyperactivation plaquettaire et au risque athérothrombotique élevé chez ces patients.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La première partie de mes travaux a permis de montrer que les HDL glycoxydées *in vitro* et les HDL de patients DT2 inhibent l'agrégation plaquettaire et sont plus anti-agrégantes que les HDL contrôles aux plus faibles concentrations. De plus, des HDL enrichies avec du PC(16 :0/13(S)-HODE) inhibent l'agrégation plaquettaire, suggérant que les PL oxydés pourraient en partie médier les effets inhibiteurs des HDL glycoxydées sur l'agrégation plaquettaire. Le mécanisme d'action de ces HDL glycoxydées, enrichies avec des PL oxydés, et de patients DT2 implique le récepteur SR-BI et une moindre activation des p38 MAPK et cPLA₂. Nos résultats indiquent que l'oxydation des HDL n'est pas forcément associée à une diminution de leurs propriétés anti-agrégantes et bousculent le concept des effets systématiquement néfastes des lipides oxydés et des HDL oxydés sur l'athérothrombose.

La seconde partie présente des données indiquant que les sous-classes des HDL ont des effets sur l'agrégation plaquettaire qui diffèrent selon la sous-classe et le degré d'oxydation. Les HDL2 et les HDL3 de DT2 inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène comparativement aux plaquettes non incubées avec des HDL, confirmant les effets anti-agrégants des HDL totales de patients DT2. De plus, les HDL2 de DT2 possèdent des concentrations plus élevées d'AGOH que les HDL3 de DT2 et ont tendance à inhiber davantage l'agrégation plaquettaire que les HDL3 de DT2. Les HDL2 de témoins n'inhibent pas l'agrégation plaquettaire. Les effets des HDL3 varient en fonction du mode d'addition des HDL aux plaquettes (concentration de protéines, d'apoA-I, nombre de particules).

Ces résultats originaux sont cependant préliminaires et nécessitent d'être confortés.

De nombreuses pistes restent à explorer pour comprendre le mécanisme d'action des HDL glycoxydées de patients DT2 sur les plaquettes et les effets respectifs des sous-classes d'HDL provenant de sujets sains et de patients DT2 :

Nos analyses ont été limitées à certains paramètres du stress oxydant et lipides oxydés des HDL, permettant d'établir la contribution du PC(16 :0/13-HODE) dans les effets anti-agrégants des HDL glycoxydées et de patients DT2. Une analyse lipidomique plus complète devra être réalisée afin d'identifier d'autres molécules impliquées dans le mécanisme d'action des HDL. Nous

chercherons en particulier à identifier et quantifier par LC-MS/MS toutes les espèces phospholipidiques oxydées, fragmentées ou non, dérivées des AGPI dans les HDL de patients DT2 et de témoins.

D'autre part, la glycoxydation des HDL conduit à des changements hétérogènes et multiples affectant aussi la partie protéique des particules, et notamment l'apolipoprotéine A-I, reconnue par SR-BI. Une analyse protéomique des HDL glycoxydées et de patients DT2 permettrait de rechercher leurs éventuelles implications.

Compte-tenu des effets différents et complexes des sous-classes d'HDL sur l'agrégation plaquettaire, nous chercherons à corrélérer la composition de ces sous-classes et la taille des particules (définie par RMN) à leurs propriétés anti-agrégantes.

Notre travail a été focalisé sur les HDL isolées afin de définir leur rôle spécifique dans l'activation plaquettaire dans le contexte du DT2. Afin de se rapprocher d'une situation *in vivo*, les autres classes de lipoprotéines (notamment les LDL) et l'albumine devront être prises en compte. Elles représentent des facteurs importants modulant l'activation des plaquettes puisque les LDL oxydées de patients DT2 activent les plaquettes [Colas *et al.*, 2011] et puisque l'albumine glyquée isolée de patients DT2 contribue à l'hyperactivation plaquettaire [Doweiko *et al.*, 1994; Rubenstein *et al.*, 2009; Blache *et al.*, 2015]. Dans ce contexte, nos expériences préliminaires visant à intégrer les effets des LDL suggèrent que les LDL dans le mélange LDL/HDL de DT2 (avec des ratio physiologiques de ces deux classes) lèvent partiellement l'effet anti-agrégant des HDL à des concentrations de 50 ou 100 µg/mL. Cette étude suggérant que les HDL de DT2 conservent leurs effets anti-agrégants malgré la présence des LDL, devra être approfondie.

Le mécanisme d'action des HDL glycoxydées et de patients DT2 dépend de leur liaison à SR-BI. L'analyse par cytométrie en flux nous permettra de déterminer finement les récepteurs plaquettaires impliqués dans la liaison des sous-classes d'HDL aux plaquettes, dans des conditions physiologiques et pathologiques.

Compte-tenu de nos résultats, l'approche visant à prendre en compte la qualité des HDL (composition en peroxydes lipidiques et taille) en regard de leurs propriétés anti-agrégantes pourrait s'avérer une stratégie prometteuse pour diminuer le risque athéro-thrombotique élevé chez les patients diabétiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abumrad NA, el-Maghrabi MA, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* 1993;268:17665-17668.
- Acharjee S, Boden WE, Hartigan PM, Teo KK, Maron DJ, Sedlis SP, Kostuk W, Spertus JA, Dada M, Chaitman BR, Mancini GB, Weintraub WS. Low levels of high-density lipoprotein cholesterol and increased risk of cardiovascular events in stable ischemic heart disease patients: A post-hoc analysis from the COURAGE Trial (Clinical Outcomes Utilizing Revascularization and Aggressive Drug Evaluation). *J Am Coll Cardiol* 2013;62(20):1826-33.
- Actis Dato SM, Rebolledo OR. Lipoprotein glycation and glycooxidation: their importance in diabetes mellitus. *Medicina* 2000;60(5 Pt 1):645-56.
- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996;271(5248):518-20.
- Aiken ML, Ginsberg MH, Byers-Ward V, Plow EF. Effects of OKM5, a monoclonal antibody to glycoprotein IV, on platelet aggregation and thrombospondin surface expression. *Blood* 1990;76(12):2501-9.
- Ailing Ji, Meyer JM, Cai L, Akinmusire A, de Beer MC, Webb NR, van der Westhuyzen DR. Scavenger receptor SR-BI in macrophage lipid metabolism. *Atherosclerosis* 2011;217(1):106-12.
- Akanji AO, Abdella N, Mojiminiyi OA. Determinants of glycated LDL levels in nondiabetic and diabetic hyperlipidaemic patients in Kuwait. *Clin Chim Acta* 2002;317(1-2):171-6.
- Alabakovska SB, Todorova BB, Labudovic DD, Tosheska KN. Gradient gel electrophoretic separation of LDL and HDL subclasses on BioRad Mini Protean II and size phenotyping in healthy Macedonians. *Clin Chim Acta* 2002;317(1-2):119-23.
- Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20(4):470-5.

- Anantharamaiah GM, Hughes TA, Iqbal M, Gawish A, Neame PJ, Medley MF, Segrest JP. Effect of oxidation on the properties of apolipoproteins A-I and A-II. *J Lipid Res* 1988;29(3):309–318.
- Anatol Kontush, M. John Chapman High-Density Lipoproteins: Structure, Metabolism, Function and Therapeutics. 2012 ;ISBN: 978-0-470-40821-6.
- Ardlie NG, Selley ML, Simons LA. Platelet activation by oxidatively modified low density lipoproteins. *Atherosclerosis*. 1989 Apr;76(2-3):117-24.
- Asch AS, Barnwell J, Silverstein RL, Nachman RL. Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest* 1987;79(4):1054-61.
- Asch AS, Silbiger S, Heimer E, Nachman RL. Thrombospondin sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182(3):1208-17.
- Ashby DT, Rye KA, Clay MA, Vadas MA, Gamble JR, Barter PJ. Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(9):1450-5.
- Ashraf MZ, Kar NS, Chen X, Choi J, Salomon RG, Febbraio M, Podrez EA. Specific oxidized phospholipids inhibit scavenger receptor bi-mediated selective uptake of cholesteryl esters. *J Biol Chem* 2008;283:10408–14.
- Assinger A, Koller F, Schmid W, Zellner M, Babeluk R, Koller E, Volf I. Specific binding of hypochlorite-oxidized HDL to platelet CD36 triggers proinflammatory and procoagulant effects. *Atherosclerosis* 2010;212(1):153-60.
- Assinger A, Schmid W, Eder S, Schmid D, Koller E, Volf I. Oxidation by hypochlorite converts protective HDL into a potent platelet agonist. *FEBS Lett* 2008;582(5):778-84.
- Aviram M, Brook JG. Platelet activation by plasma lipoproteins. *Prog Cardiovasc Dis* 1987;30(1):61-72.
- Badrnya S, Schrottmaier WC, Kral JB, Yaiw KC, Volf I, Schabbauer G. Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monolayer extravasation and foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;34: 571–580.
- Baez JM, Barbour SE, Cohen DE. Phosphatidylcholine transfer protein promotes apolipoprotein A-I-mediated lipid efflux in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 2002;277(8):6198-206.

- Bakogianni MC, Kalofoutis CA, Skenderi KI, Kalofoutis AT. Clinical evaluation of plasma high-density lipoprotein subfractions (HDL2, HDL3) in non-insulin-dependent diabetics with coronary artery disease. *J Diabetes Complications* 2001;15(5):265-9.
- Ballantyne CM, Raichlen JS, Nicholls SJ, et al. Effect of rosuvastatin therapy on coronary artery stenoses assessed by quantitative coronary angiography: a study to evaluate the effect of rosuvastatin on intravascular ultrasound-derived coronary atheroma burden *Circulation* 2008;117:2458–66.
- Barnes MJ, Farndale RW. Collagens and atherosclerosis. *Exp Gerontol* 1999;34(4):513-25.
- Barouki R. Ageing free radicals and cellular stress. *Med Sci (Paris)* 2006;22(3):266-72.
- Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, Lopez-Sendon J, Mosca L, Tardif JC, Waters DD, Shear CL, Revkin JH, Buhr KA, Fisher MR, Tall AR, Brewer B; ILLUMINATE Investigators. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med* 2007;357(21):2109-22.
- Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004;95(8):764-72.
- Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991 Apr;40(4):405-12.
- Behnke O, Forer A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol Suppl* 1998;61:3-23.
- Beitz J, Beitz A, Müller G, Giessler C, Mest HJ. Influence of HDL on the formation of 6-keto-PGF1 alpha and TXB2 in vitro: The importance of the source of HDL. *Eicosanoids* 1992; 5: 53–6.
- Bensoussan D, Levy Toledano S, Passa P, Caen J, Caniver J. Platelet hyperaggregation and increased plasma level of Von Willebrand factor in diabetics with retinopathy. *Diabetologia* 1975;11(4):307-12.
- Bergt C, Pennathur S, Fu X, Byun J, O'Brien K, McDonald TO, Singh P, Anantharamaiah GM, Chait A, Brunzell J, Geary RL, Oram JF, Heinecke JW. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(35):13032-7.

- Biggadike K, Angell RM, Burgess CM, Farrell RM, Hancock AP, Harker AJ, Irving WR, Ioannou C, Procopiou PA, Shaw RE, Solanke YE, Singh OM, Snowden MA, Stubbs RJ, Walton S, Weston HE. Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid gamma-lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: an ideal plasma inactivation mechanism. *J Med Chem* 2000;43(1):19-21.
- Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, La Du BN. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos* 2000;28(11):1335-42.
- Blache D, Bourdon E, Salloignon P, Lucchi G, Ducoroy P, Petit JM, Verges B, Lagrost L. Glycated albumin with loss of fatty acid binding capacity contributes to enhanced arachidonate oxygenation and platelet hyperactivity: relevance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2015;64(3):960-72.
- Blake RA, Schieven GL, Watson SP. Collagen stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 2 but not phospholipase C-gamma 1 in human platelets. *FEBS Lett* 1994;353(2):212-6.
- Bochkov VN, Oskolkova OV, Birukov KG, Levonen AL, Binder CJ, Stöckl J. Generation and biological activities of oxidized phospholipids. *Antioxid Redox Signal* 2010;12(8):1009-59.
- Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med* 2011;365:2255–67.
- Borja MS, Zhao L, Hammerson B, Tang C, Yang R, Carson N, Fernando G, Liu X, Budamagunta MS, Genest J, Shearer GC, Duclos F, Oda MN. HDL-apoA-I exchange: rapid detection and association with atherosclerosis. *PLoS One* 2013;8(8):e71541.
- BORN GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962;194:927-9.
- Börsch-Haubold AG, Bartoli F, Asselin J, Dudler T, Kramer RM, Apitz-Castro R, Watson SP, Gelb MH. Identification of the phosphorylation sites of cytosolic phospholipase A2 in agonist-stimulated human platelets and HeLa cells. *J Biol Chem* 1998;273(8):4449-58.

- Börsch-Haubold AG, Ghomashchi F, Pasquet S, Goedert M, Cohen P, Gelb MH, Watson SP. Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in platelets is mediated by multiple stress-activated protein kinase pathways. *Eur J Biochem* 1999;265(1):195-203.
- Börsch-Haubold AG, Kramer RM, Watson SP. Phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by 38-kDa mitogen-activated protein kinase in collagen-stimulated human platelets. *Eur J Biochem* 1997; 245:751-759.
- Bowry VW, Stanley KK, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10316-10320.
- Brass LF, Shaller CC, Belmonte EJ. Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C mediated by platelet thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin. *J Clin Invest* 1987;79(4):1269-75.
- Braun A, Trigatti BL, Post MJ, Sato K, Simons M, Edelberg JM, Rosenberg RD, Schrenzel M, Krieger M. Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res* 2002;90(3):270-6.
- Brewer HB Jr, Ronan R, Meng M, Bishop C. Isolation and characterization of apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV. *Methods Enzymol* 1986;128:223-46.
- Brodde MF, Korporaal SJ, Herminghaus G, Fobker M, Van Berkel TJ, Tietge UJ, Robenek H, Van Eck M, Kehrel BE, Nofer JR. Native high-density lipoproteins inhibit platelet activation via scavenger receptor BI: role of negatively charged phospholipids. *Atherosclerosis* 2011;215(2):374-82.
- Brown BE, Rashid I, van Reyk DM, Davies MJ. Glycation of low-density lipoprotein results in the time-dependent accumulation of cholesteryl esters and apolipoprotein B-100 protein in primary human monocyte-derived macrophages. *FEBS J* 2007;274(6):1530-41.
- Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232(4746):34-47.

- Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels. *Circ Res* 2006;99(7):672-4.
- Brustolin D, Maierna M, Aguzzi F, Zoppi F, Tarengi G, Berti G. Immunoturbidimetric method for routine determinations of apolipoproteins A-I and B. *Clin Chem* 1991;37(5):742-7.
- Bugaud F, Nadal-Wollbold F, Lévy-Toledano S, Rosa JP, Bryckaert M. Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets. *Blood* 1999 ;94(11):3800-5.
- Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009;23(1):49-59.
- Bynagari-Settipalli YS, Lakhani P, Jin J, Bhavaraju K, Rico MC, Kim S, Woulfe D, Kunapuli SP. Protein kinase C isoform ϵ negatively regulates ADP-induced calcium mobilization and thromboxane generation in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(5):1211-9.
- Cai L, de Beer MC, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. Serum amyloid A is a ligand for scavenger receptor class B type I and inhibits high density lipoprotein binding and selective lipid uptake. *J Biol Chem* 2005;280(4):2954-61.
- Calabresi L, Gomaschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(10):1724-31.
- Calkin AC, Drew BG, Ono A, Duffy SJ, Gordon MV, Schoenwaelder SM, Sviridov D, Cooper ME, Kingwell BA, Jackson SP. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux. *Circulation* 2009;120(21):2095-104.
- Calvo C, Ponsin G, Berthezene F. Characterization of the non enzymatic glycation of high density lipoprotein in diabetic patients. *Diabete Metab* 1988;14(3):264-9.
- Calvo C, Ulloa N, Campos M, Verdugo C, Ayrault-Jarrier M. The preferential site of non-enzymatic glycation of human apolipoprotein A-I in vivo. *Clin Chim Acta* 1993;217(2):193-8.

- Calvo D, Dopazo J, Vega MA. The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. *Genomics* 1995; 25: 100–106.
- Calvo D, Vega MA. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J Biol Chem* 1993;268(25):18929-35.
- Calzada C, Coulon L, Halimi D, Le Coquil E, Pruneta-Deloche V, Moulin P, Ponsin G, Véricel E, Lagarde M. In vitro glycoxidized low-density lipoproteins and low-density lipoproteins isolated from T2D patients activate platelets via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1961-1964.
- Calzada C, Véricel E, Colas R, Guillot N, El Khoury G, Draï J, Sassolas A, Peretti N, Ponsin G, Lagarde M, Moulin P. Inhibitory effects of in vivo oxidized high-density lipoproteins on platelet aggregation: evidence from patients with abetalipoproteinemia. *FASEB J* 2013;27(7):2855-61.
- Calzada C, Vericel E, Lagarde M. Low concentrations of lipid hydroperoxides prime human platelet aggregation specifically via cyclo-oxygenase activation. *Biochem J* 1997;325 (Pt 2):495-500.
- Camont L, Lhomme M, Rached F, Le Goff W, Nègre-Salvayre A, Salvayre R, Calzada C, Lagarde M, Chapman MJ, Kontush A. Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(12):2715-23.
- Carballal S, Radi R, Kirk MC, Barnes S, Freeman BA, Alvarez B. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry* 2003;42(33):9906-14.
- Castilho LN, Oliveira HC, Cazita PM, de Oliveira AC, Sesso A, Quintão EC. Oxidation of LDL enhances the cholesteryl ester transfer protein (CETP)-mediated cholesteryl ester transfer rate to HDL, bringing on a diminished net transfer of cholesteryl ester from HDL to oxidized LDL. *Clin Chim Acta* 2001;304(1-2):99-106.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(21):13926-31.

- Chantepie S, Malle E, Sattler W, Chapman MJ, Kontush A. Distinct HDL subclasses present similar intrinsic susceptibility to oxidation by HOCl. *Arch Biochem Biophys* 2009;487(1):28-35.
- Charles MA, Kane JP. New molecular insights into CETP structure and function: a review. *J Lipid Res* 2012;53(8):1451-8.
- Chen K, Febbraio M, Li W, Silverstein RL. A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxidized low-density lipoprotein. *Circ Res* 2008;102(12):1512-9.
- Chen K, Li W, Major J, Rahaman SO, Febbraio M, Silverstein RL. Vav guanine nucleotide exchange factors link hyperlipidemia and a prothrombotic state. *Blood* 2011;117(21):5744-50. z
- Chen N, Liu Y, Greiner CD, Holtzman JL. Physiologic concentrations of homocysteine inhibit the human plasma GSH peroxidase that reduces organic hydroperoxides. *J Lab Clin Med* 2000;136(1):58-65.
- Chen Q, Esterbauer H, Jürgens G. Studies on epitopes on low-density lipoprotein modified by 4-hydroxynonenal. Biochemical characterization and determination. *Biochem J* 1992;288 (Pt 1):249-54.
- Cheung MC, Albers JJ. Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II. *J Biol Chem* 1984;259(19):12201-9.
- Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* 1991;65(6):1043-51.
- Cockcroft S, Thomas GM. Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochem J* 1992;288 (Pt 1):1-14.
- Cockerill GW, Huehns TY, Weerasinghe A, Stocker C, Lerch PG, Miller NE, Haskard DO. Elevation of plasma high-density lipoprotein concentration reduces interleukin-1-induced expression of E-selectin in an in vivo model of acute inflammation. *Circulation* 2001;103(1):108-12.

- Colas R, Sassolas A, Guichardant M, Cugnet-Anceau C, Moret M, Moulin P, Lagarde M, Calzada C. LDL from obese patients with the metabolic syndrome show increased lipid peroxidation and activate platelets. *Diabetologia* 2011; 54:2931-2940.
- Contois JH, Lammi-Keefe CJ, Vogel S, McNamara JR, Wilson PW, Massov T, Schaefer EJ. Plasma lipoprotein(a) distribution in the Framingham Offspring Study as determined with a commercially available immunoturbidimetric assay. *Clin Chim Acta* 1996;253(1-2):21-35.
- Cosemans JM, Iserbyt BF, Deckmyn H, Heemskerk JW. Multiple ways to switch platelet integrins on and off. *J Thromb Haemost* 2008;6(8):1253-61.
- Croset M, Lagarde M. Enhancement of eicosaenoic acid lipoxygenation in human platelets by 12-hydroperoxy derivative of arachidonic acid. *Lipids* 1985;20(11):743-50.
- Croset M, Lagarde M. Stereospecific inhibition of PGH₂-induced platelet aggregation by lipoxygenase products of icosanoic acids. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;112(3):878-83.
- Dangelmaier C, Jin J, Daniel JL, Smith JB, Kunapuli SP. The P2Y₁ receptor mediates ADP-induced p38 kinase-activating factor generation in human platelets. *Eur J Biochem* 2000;267(8):2283-9.
- Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. CD36 mediates the in vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 1997; 138: 707–717.
- de Beer MC, Durbin DM, Cai L, Jonas A, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI. *J Lipid Res* 2001;42(2):309-13.
- de Nigris F, Tajana G, Condorelli M, D'Armiento FP, Sica G, Lerman LO, Napoli C. Glycooxidation of low-density lipoprotein increases TUNEL positivity and CPP32 activation in human coronary cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:710-5.
- Desai K, Bruckdorfer KR, Hutton RA, Owen JS. Binding of apoE-rich high density lipoprotein particles by saturable sites on human blood platelets inhibits agonist-induced platelet aggregation. *J Lipid Res* 1989;30(6):831-40.
- Dimayuga P, Zhu J, Oguchi S, Chyu KY, Xu XO, Yano J, Shah PK, Nilsson J, Cercek B. Reconstituted HDL containing human apolipoprotein A-1 reduces VCAM-1 expression

and neointima formation following periadventitial cuff-induced carotid injury in apoE null mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264(2):465-8.

- Dimayuga P, Zhu J, Oguchi S, Chyu KY, Xu XO, Yano J, Shah PK, Nilsson J, Cercek B. Reconstituted HDL containing human apolipoprotein A-1 reduces VCAM-1 expression and neointima formation following periadventitial cuff-induced carotid injury in apoE null mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264(2):465-8.
- Doggen CJ, Smith NL, Lemaitre RN, Heckbert SR, Rosendaal FR, Psaty BM. Serum lipid levels and the risk of venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(10):1970-5.
- Dole VS, Matuskova J, Vasile E, Yesilaltay A, Bergmeier W, Bernimoulin M, Wagner DD, Krieger M. Thrombocytopenia and platelet abnormalities in high-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(6):1111-6.
- Drexel H, Amann FW, Rentsch K, Neuenschwander C, Luethy A, Khan SI, Follath F. Relation of the level of high-density lipoprotein subfractions to the presence and extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1992;70(4):436-40.
- Duell PB, Oram JF, Bierman EL. Nonenzymatic glycosylation of HDL and impaired HDL-receptor-mediated cholesterol efflux. *Diabetes*. 1991 Mar;40(3):377-84.
- Duell PB, Oram JF, Bierman EL. Nonenzymatic glycosylation of HDL resulting in inhibition of high-affinity binding to cultured human fibroblasts. *Diabetes*. 1990 Oct;39(10):1257-63.
- Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:473.
- Eggerman TL, Hoeg JM, Meng MS, Tombragel A, Bojanovski D, Brewer HB Jr. Differential tissue-specific expression of human apoA-I and apoA-II. *J Lipid Res* 1991;32(5):821-8.
- Evans JH, Spencer DM, Zweifach A, Leslie CC. Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes. *J Biol Chem* 2001;276(32):30150-60.
- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2001;108(6):785-91.

- Ferretti G, Bacchetti T, Marchionni C, Caldarelli L, Curatola G. Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity. *Acta Diabetol* 2001;38(4):163-9.
- Fleisher LN, Tall AR, Witte LD, Miller RW, Cannon PJ. Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1982;257(12):6653-5.
- Folcik A, R A Nivar-Aristy, L P Krajewski, and M K Cathcart Lipoxygenase contributes to the oxidation of lipids in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1995; 96(1): 504–510.
- Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 1982;28(10):2077-80.
- Frank PG, Marcel YL. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res* 2000;41(6):853-72.
- Fruhwirth GO, Moutzi A, Loidl A, Ingolic E, Hermetter A. The oxidized phospholipids POVPC and PGPC inhibit growth and induce apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761(9):1060-9.
- Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation endproduct, N^ε-(carboxymethyl) lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxylation reactions. *J Biol Chem* 1996; 271 : 9982-6.
- Fujimoto Y, Tsunomori M, Muta E, Yamamoto T, Nishida H, Sakuma S, Fujita T. High density lipoprotein inhibits platelet 12-lipoxygenase activity. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1994;85(3):355-8.
- Gantman A, Fuhrman B, Aviram M, Hayek T. High glucose stimulates macrophage SR-BI expression and induces a switch in its activity from cholesterol efflux to cholesterol influx. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391(1):523-8.
- Gao D, Ashraf MZ, Kar NS, Lin D, Sayre LM, Podrez EA. Structural basis for the recognition of oxidized phospholipids in oxidized low density lipoproteins by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI. *J Biol Chem* 2010;285(7):4447-54.
- Gao X, Jayaraman S, Gursky O. Mild oxidation promotes and advanced oxidation impairs remodeling of human high-density lipoprotein in vitro. *J Mol Biol* 2008;376(4):997-1007.

- Garner B, Witting PK, Waldeck AR, Christison JK, Raftery M, Stocker R. Oxidation of high density lipoproteins. I Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol *J Biol Chem* 1998;273(11):6080–6087.
- George JN. Platelets. *Lancet* 2000;355(9214):1531-9.
- Gesquière L, Loreau N, Minnich A, Davignon J, Blache D. Oxidative stress leads to cholesterol accumulation in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 1999;27(1-2):134-45.
- Ghosh J, Myers CE. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(22):13182-7.
- Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabete Metab* 1988;14(1):25-30.
- Godfrey L, Yamada-Fowler N, Smith , Thornalley PJ, Rabbani N. Arginine-directed glycation and decreased HDL plasma concentration and functionality. *Nutr Diabetes* 2014;4:e134.
- Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989;79(1):8-15.
- Goulinet S, Chapman MJ. Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids. Relevance to oxidative resistance and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(4):786-96.
- Gowri MS, Van der Westhuyzen DR, Bridges SR, Anderson JW. Decreased protection by HDL from poorly controlled type 2 diabetic subjects against LDL oxidation may Be due to the abnormal composition of HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(9):2226-33.
- Griffin JH, Kojima K, Banka CL, Curtiss LK, Fernández JA. High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. *J Clin Invest* 1999;103(2):219-27.

- Gutteridge JM. Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochim Biophys Acta* 1986;869(2):119-27.
- Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;339(4):229-34.
- Hahn M, Subbiah MT. Significant association of lipid peroxidation products with high density lipoproteins. *Biochem Mol Biol Int* 1994;33(4):699-704.
- Halenda SP, Rehm AG. Thrombin and C-kinase activators potentiate calcium-stimulated arachidonic acid release in human platelets. *Biochem J* 1987;248(2):471-5.
- Hamberg M, Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71(9):3400-4.
- Hammad SM, Pierce JS, Soodavar F, Smith KJ, Al Gadban MM, Rembiesa B, Klein RL, Hannun YA, Bielawski J, Bielawska A. Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology. *J Lipid Res* 2010;51(10):3074-87.
- Haurand M, Ullrich V. Isolation and characterization of thromboxane synthase from human platelets as a cytochrome P-450 enzyme. *J Biol Chem* 1985;260(28):15059-67.
- Hayek T, Azrolan N, Verdery RB, Walsh A, Chajek-Shaul T, Agellon LB, Tall AR, Breslow JL. Hypertriglyceridemia and cholesteryl ester transfer protein interact to dramatically alter high density lipoprotein levels, particle sizes, and metabolism. Studies in transgenic mice. *J Clin Invest* 1993; 92(3): 1143–1152.
- Hechler B, Eckly A, Ohlmann P, Cazenave JP, Gachet C. The P2Y1 receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel. *Br J Haematol* 1998;103(3):858-66.
- Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, Kim SM, Wong H, Peters AL. Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia* 2000;43(3):312-20.
- Hermo R, Mier C, Mazzotta M, Tsuji M, Kimura S, Gugliucci A. Circulating levels of nitrated apolipoprotein A-I are increased in type 2 diabetic patients. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(6):601-606.

- Higashihara M, Kinoshita M, Kume S, Teramoto T, Kurokawa K. Inhibition of platelet function by high-density lipoprotein from a patient with apolipoprotein E deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 1331–6.
- Hoff HF, Whitaker TE, O'Neil J. Oxidation of low density lipoprotein leads to particle aggregation and altered macrophage recognition. *J Biol Chem* 1992;267(1):602-9.
- Hoosdally SJ, Andress EJ, Wooding C, Marin CA, Linton KJ. The human scavenger receptor CD36; glycosylation status and its role in trafficking and function. *J Biol Chem* 2009; 284: 16277–16288.
- Imachi H, Fukata Y, Murao K. Decreased expression of platelet human scavenger receptor class B type I in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig* 2014;5(3):345-6.
- Imachi H, Murao K, Cao W, Tada S, Taminato T, Wong NC, Takahara J, Ishida T. Expression of human scavenger receptor B1 on and in human platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 ;23(5):898-904.
- Irvine RF. 'Quantal' Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates-a possible mechanism. *FEBS Lett* 1990;263(1):5-9.
- Jacobsen C. Lysine residue 240 of human serum albumin is involved in high-affinity binding of bilirubin. *Biochem J* 1978; 171(2): 453–459.
- Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 1997;272(34):20982-5.
- Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett* 1990;268(1):69-71.
- Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y₁ receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem* 1998;273(4):2030-4.
- Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(14):8070-4.
- Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* 1999 ;103(6):879-87.

- Kalogerakis G, Baker AM, Christov S, Rowley KG, Dwyer K, Winterbourn C, Best JD, Jenkins AJ. Oxidative stress and high-density lipoprotein function in Type I diabetes and end-stage renal disease. *Clin Sci* 2005;108(6):497-506.
- Kan HY, Pissios P, Chambaz J, Zannis VI. DNA binding specificity and transactivation properties of SREBP-2 bound to multiple sites on the human apoA-II promoter. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(4):1104-17.
- Kannel WB, Cupples LA, Gagnon DR. Incidence, precursors and prognosis of unrecognized myocardial infarction. *Adv Cardiol* 1990;37:202-14.
- Kar S, Patel MA, Tripathy RK, Bajaj P, Suvarnakar UV, Pande AH. Oxidized phospholipid content destabilizes the structure of reconstituted high density lipoprotein particles and changes their function. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821(9):1200-10.
- Karadag MK, Akbulut M. Low HDL levels as the most common metabolic syndrome risk factor in heart failure. *Int Heart J* 2009;50(5):571-80.
- Kayama Y, Minamino T, Toko H, Sakamoto M, Shimizu I, Takahashi H, Okada S, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Yoshimura M, Egashira K, Aburatani H, Komuro I. Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure. *J Exp Med* 2009;206(7):1565-74.
- Kiechl S, Willeit J, Mayr M, Viehweider B, Oberhollenzer M, Kronenberg F, Wiedermann CJ, Oberthaler S, Xu Q, Witztum JL, Tsimikas S. Oxidized phospholipids, lipoprotein(a), lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, and 10-year cardiovascular outcomes: prospective results from the Bruneck study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(8):1788-95.
- Kiechl S, Willeit J, Mayr M, Viehweider B, Oberhollenzer M, Kronenberg F, Wiedermann CJ, Oberthaler S, Xu Q, Witztum JL, Tsimikas S. Oxidized phospholipids, lipoprotein(a), lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, and 10-year cardiovascular outcomes: prospective results from the Bruneck study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(8):1788-95.
- Kieffer N, Guichard J, Farcet JP, Vainchenker W, Breton-Gorius **Bacot** J. Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur J Biochem* 1987;164(1):189-95.
- Kingwell BA, Chapman MJ2, Kontush A2, Miller NE3. HDL-targeted therapies: progress, failures and future. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13(6):445-64.

- Kobayashi A, Takanezawa Y, Hirata T, Shimizu Y, Misasa K, Kioka N, Arai H, Ueda K, Matsuo M. Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. *J Lipid Res* 2006;47(8):1791-802.
- Kocher O, Krieger M. Role of the adaptor protein PDZK1 in controlling the HDL receptor SR-BI. *Curr Opin Lipidol* 2009;20(3):236-41.
- Koenig RJ, Peterson CM, Kilo C, Cerami A, Williamson JR. Hemoglobin A1c as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. *Diabetes* 1976;25(3):230-2.
- Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(10):1881-8.
- Kontush A, Chapman M. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006;58(3):342-74.
- Kontush A, Lhomme M, Chapman MJ. Unraveling the complexities of the HDL lipidome. *J Lipid Res* 2013;54(11):2950-63.
- Kontush A, Lindahl M, Lhomme M, Calabresi L, Chapman MJ, Davidson WS. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb Exp Pharmacol* 2015;224:3-51.
- Kontush A, Therond P, Zerrad A, Couturier M, Nègre-Salvayre A, de Souza JA, Chantepie S, Chapman MJ. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(8):1843-9.
- Korhonen A, Jauhiainen M, Ehnholm C, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Remodeling of HDL by phospholipid transfer protein: demonstration of particle fusion by 1H NMR spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249(3):910-6.
- Korpolaal SJ, Van Eck M, Adelmeijer J, Ijsseldijk M, Out R, Lisman T, Lenting PJ, Van Berkel TJ, Akkerman JW. Platelet activation by oxidized low density lipoprotein is mediated by CD36 and scavenger receptor-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2476–83.

- Kothapalli D, Liu SL, Bae YH, Monslow J, Xu T, Hawthorne EA, Byfield FJ, Castagnino P, Rao S, Rader DJ, Puré E, Phillips MC, Lund-Katz S, Janmey PA, Assoian RK. Cardiovascular protection by ApoE and ApoE-HDL linked to suppression of ECM gene expression and arterial stiffening. *Cell Rep* 2012;2(5):1259-71.
- Kozarsky KF, Donahee MH, Glick JM, Krieger M, Rader DJ. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:721–7.
- Kramer RM, Sharp JD. Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A₂. *FEBS Lett* 1997; 410:49-53.
- Kresanov P, Ahotupa M, Vasankari T, Kaikkonen J, Kähönen M, Lehtimäki T, Viikari J, Raitakari OT. The associations of oxidized high-density lipoprotein lipids with risk factors for atherosclerosis: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Free Radic Biol Med* 2013;65:1284-90.
- Krieger M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* 2001;108(6):793-7.
- Kuhn H, Heydeck D, Hugou I, Gniwotta C. In vivo action of 15-lipoxygenase in early stages of human atherogenesis. *J Clin Invest* 1997;99:888–893.
- Kuksis A, Myher JJ, Geher K, Breckenridge WC, Jones GJ, Little JA. Lipid class and molecular species interrelationships among plasma lipoproteins of normolipemic subjects. *J Chromatogr* 1981;224(1):1-23.
- Kunapuli SP, Ding Z, Dorsam RT, Kim S, Murugappan S, Quinton TM. ADP receptors- targets for developing antithrombotic agents. *Curr Pharm Des* 2003;9(28):2303-16.
- Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Matsui H, Mizuno T, Miyata S, Yoshioka A. Platelet shape changes and adhesion under high shear flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(2):329-34.
- Lackner KJ, Law SW, Brewer HB Jr, Sakaguchi AY, Naylor SL. The human apolipoprotein A-II gene is located on chromosome 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122(3):877-83.
- Lagarde M, Bryon PA, Guichardant M, Dechavanne M. A simple and efficient method for platelet isolation from their plasma. *Thromb Res* 1980;17(3-4):581-8.

- Laussac JP, Sarkar B. Characterization of the copper(II)- and nickel(II)-transport site of human serum albumin. Studies of copper(II) and nickel(II) binding to peptide 1-24 of human serum albumin by ¹³C and ¹H NMR spectroscopy. *Biochemistry* 1984;23(12):2832-8.
- Lee SB, Rao AK, Lee KH, Yang X, Bae YS, Rhee SG. Decreased expression of phospholipase C-beta 2 isozyme in human platelets with impaired function. *Blood* 1996;88(5):1684-91.
- Leitinger N. Oxidized phospholipids as triggers of inflammation in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* 2005;49(11):1063-71.
- Léon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, Dierich A, LeMeur M, Cazenave JP, Gachet C. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J Clin Invest* 1999;104(12):1731-7.
- Li D, Weng S, Yang B, Zander DS, Saldeen T, Nichols WW, Khan S, Mehta JL. Inhibition of arterial thrombus formation by ApoA1 Milano. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:378–383.
- Li X, Titlow W, Jackson B, et al. High density lipoprotein binding to scavenger receptor, Class B, type I activates endothelial nitric-oxide synthase in a ceramide-dependent manner. *J Biol Chem* 2002;277:11058–11063.
- Li XA, Guo L, Dressman JL, Asmis R, Smart EJ. A novel ligand-independent apoptotic pathway induced by scavenger receptor class B, type I and suppressed by endothelial nitric-oxide synthase and high density lipoprotein. *J Biol Chem* 2005;280(19):19087-96.
- Liadaki KN, Liu T, Xu S, Ishida BY, Duchateaux PN, Krieger JP, Kane J, Krieger M, Zannis VI. Binding of high density lipoprotein (HDL) and discoidal reconstituted HDL to the HDL receptor scavenger receptor class B type I: effect of lipid association and APOA-I mutations on receptor binding. *J Biol Chem* 2000;275: 21262–21271.
- Liu T, Krieger M, Kan HY, Zannis VI. The effects of mutations in helices 4 and 6 of ApoA-I on scavenger receptor class B type I (SR-BI)-mediated cholesterol efflux suggest that formation of a productive complex between reconstituted high density lipoprotein and SR-BI is required for efficient lipid transport. *J Biol Chem* 2002;277(24):21576-84.
- Lova P, Campus F, Lombardi R, Cattaneo M, Sinigaglia F, Balduino C, Torti M. Contribution of protease-activated receptors 1 and 4 and glycoprotein Ib-IX-V in the

- G(i)-independent activation of platelet Rap1B by thrombin. *J Biol Chem* 2004;279(24):25299-306.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
 - Lusa S, Jauhiainen M, Metso J, Somerharju P, Ehnholm C. The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. *Biochem J* 1996;313 (Pt 1):275-82.
 - Ma Y, Ashraf MZ, Podrez EA. Scavenger receptor BI modulates platelet reactivity and thrombosis in dyslipidemia. *Blood* 2010;116(11):1932-41.
 - Mackey RH, Greenland P, Goff DC Jr, Lloyd-Jones D, Sibley CT, Mora S. High-density lipoprotein cholesterol and particle concentrations, carotid atherosclerosis, and coronary events: MESA (multi-ethnic study of atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol* 2012;60(6):508-16.
 - Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation* 2003;107(22):2775-9.
 - Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984;25(12):1277-94.
 - Mallat Z, Lambeau G, Tedgui A. Lipoprotein-associated and secreted phospholipases A₂ in cardiovascular disease: roles as biological effectors and biomarkers. *Circulation* 2010;122(21):2183-200.
 - Mangin P, Nonne C, Eckly A, Ohlmann P, Freund M, Nieswandt B, Cazenave JP, Gachet C, Lanza F. A PLC gamma 2-independent platelet collagen aggregation requiring functional association of GPVI and integrin alpha2beta1. *FEBS Lett* 2003;542(1-3):53-9.
 - Marcus AJ, Ullman HL, Safier LB. Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. *J Lipid Res* 1969;10:108-14.
 - Marsche G, Frank S, Hrzenjak A, Holzer M, Dirnberger S, Wadsack C, Scharnagl H, Stojakovic T, Heinemann A, Oetl K. Plasma-advanced oxidation protein products are potent high-density lipoprotein receptor antagonists in vivo. *Circ Res* 2009;104(6):750-7.

- Martínez-Beamonte R, Lou-Bonafonte JM, Martínez-Gracia MV, Osada J. Sphingomyelin in high-density lipoproteins: structural role and biological function. *Int J Mol Sci* 2013;14(4):7716-41.
- Mastorikou M, Mackness M, Mackness B. Defective metabolism of oxidized phospholipid by HDL from people with type 2 diabetes. *Diabetes* 2006;55(11):3099-103.
- Mazer NA, Giulianini F, Paynter NP, Jordan P, Mora S. A comparison of the theoretical relationship between HDL size and the ratio of HDL cholesterol to apolipoprotein A-I with experimental results from the Women's Health Study. *Clin Chem* 2013;59(6):949-58.
- McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The emerging roles of PAF acetylhydrolase. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S255-9.
- Mineo C, Deguchi H, Griffin J, Shaul PW. Endothelial and anti-thrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006;98:1352–1364.
- Mineo C, Shaul P. Role of high-density lipoprotein and scavenger receptor B type I in the promotion of endothelial repair. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17:156–161.
- Mineo C, Shaul PW. HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel mechanism of HDL action. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13(6):226-31.
- Morgantini C, Meriwether D, Baldi S, Baldi S, Venturi E, Pinnola S, Wagner AC, Fogelman AM, Ferrannini E, Natali A, Reddy ST. HDL lipid composition is profoundly altered in patients with type 2 diabetes and atherosclerotic vascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc* 2014; 24:594-599.
- Mosior M, Six DA, Dennis EA. Group IV cytosolic phospholipase A2 binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity. *J Biol Chem* 1998;273(4):2184-91.
- Murakami T, Michelagnoli S, Longhi R, Gianfranceschi G, Pazzucconi F, Calabresi L, Sirtori CR, Franceschini G. Triglycerides are major determinants of cholesterol esterification/transfer and HDL remodeling in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(11):1819-28.
- Nagai R, Mera K, Nakajou K, Fujiwara Y, Iwao Y, Imai H, Murata T, Otagiri M. The ligand activity of AGE-proteins to scavenger receptors is dependent on their rate of modification by AGEs. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772(11-12):1192-8.

- Nakajima T, Origuchi N, Matsunaga T, Kawai S, Hokari S, Nakamura H, Inoue I, Katayama S, Nagata A, Komoda T. Localization of oxidized HDL in atheromatous plaques and oxidized HDL binding sites on human aortic endothelial cells. *Ann Clin Biochem* 2000;37 (Pt 2):179-86.
- Nakano T, Nagata A. Immunochemical detection of circulating oxidized high-density lipoprotein with antioxidized apolipoprotein A-I monoclonal antibody. *J Lab Clin Med* 2003; 141:378-384.
- Nakhjavani M, Esteghamati A, Esfahanian F, Ghanei A, Rashidi A, Hashemi S. HbA1c negatively correlates with LCAT activity in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;81(1):38-41.
- Napoli C, Lerman LO, de Nigris F, Loscalzo J, Ignarro LJ. Glycoxidized low-density lipoprotein downregulates endothelial nitricoxide synthase in human coronary cells. *J Am Coll Cardiol* 2002;40(8):1515-22.
- Naqvi TZ, Shah PK, Ivey PA, Molloy MD, Thomas AM, Panicker S, Ahmed A, Cercek B, Kaul S. Evidence that high-density lipoprotein cholesterol is an independent predictor of acute platelet-dependent thrombus formation. *Am J Cardiol* 1999;84:1011–1017.
- Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Datta G, Garber D, Fogelman AM. Human apolipoprotein A-I and A-I mimetic peptides: potential for atherosclerosis reversal. *Curr Opin Lipidol* 2004;15(6):645-9.
- Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res* 2000;41(9):1481-94.
- Navab M, Yu R, Gharavi N, Huang W, Ezra N, Lotfizadeh A, Anantharamaiah GM, Alipour N, Van Lenten BJ, Reddy ST, Marelli D. High-density lipoprotein: antioxidant and anti-inflammatory properties. *Curr Atheroscler Rep* 2007;9(3):244-8.
- Needleman P, Moncada S, Bunting S, Vane JR, Hamberg M, Samuelsson B. Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A₂ from prostaglandin endoperoxides. *Nature* 1976;261(5561):558-60.
- Newman PJ, Gorski J, White GC 2nd, Gidwitz S, Cretney CJ, Aster RH. Enzymatic amplification of platelet-specific messenger RNA using the polymerase chain reaction. *J Clin Invest.* 1988;82(2):739-43.

- Nicholls SJ, Dusting GJ, Cutri B, Bao S, Drummond GR, Rye KA, Barter PJ. Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation* 2005;111(12):1543-50.
- Nicholls SJ, Tuzcu EM, Sipahi I, et al. Statins, high-density lipoprotein cholesterol, and regression of coronary atherosclerosis. *JAMA* 2007;297:499–508.
- Nicholson AC, Frieda S, Pearce A, Silverstein RL. Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(2):269-75.
- Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fässler R. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001;20(9):2120-30.
- Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003;102(2):449-61.
- Nijstad N, Wiersma H, Gautier T, van der Giet M, Maugeais C, Tietge UJ. Scavenger receptor BI-mediated selective uptake is required for the remodeling of high density lipoprotein by endothelial lipase. *J Biol Chem* 2009;284(10):6093-100.
- Niki, E. (2009). Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med* 2009;47(5):469-84.
- Nobécourt E, Davies MJ, Brown BE, Curtiss LK, Bonnet DJ, Charlton F, Januszewski AS, Jenkins AJ, Barter PJ, Rye KA. The impact of glycation on apolipoprotein A-I structure and its ability to activate lecithin:cholesterol acyltransferase. *Diabetologia* 2007;50(3):643-53.
- Nobécourt E, Jacqueminet S, Hansel B, Chantepie S, Grimaldi A, Chapman MJ, Kontush A. Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia. *Diabetologia* 2005;48(3):529-38.
- Nobécourt E, Tabet F, Lambert G, Puranik R, Bao S, Yan L, Davies MJ, Brown BE, Jenkins AJ, Dusting GJ, Bonnet DJ, Curtiss LK, Barter PJ, Rye KA. Nonenzymatic glycation impairs the antiinflammatory properties of apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(4):766-72.

- Nofer JR, Assmann G. Atheroprotective effects of high-density lipoprotein-associated lysosphingolipids. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15(7):265-71.
- Nofer JR, Walter M, Kehrel B, Wierwille S, Tepel M, Seedorf U, Assmann G. HDL3-mediated inhibition of thrombin-induced platelet aggregation and fibrinogen binding occurs via decreased production of phosphoinositide-derived second messengers 1,2-diacylglycerol and inositol 1,4,5-tris-phosphate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(6):861-9.
- Nofer JR1, Brodde MF, Kehrel BE. High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010;37(7):726-35.
- Oak J, Nakagawa K, Miyazawa T. Synthetically prepared Aamadori-glycated phosphatidylethanolamine can trigger lipid peroxidation via free radical reactions. *FEBS Lett* 2000;481(1):26-30.
- Oetl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol* 2007;151(5):580-90.
- Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(2):504-8.
- Ohgami N, Miyazaki A, Sakai M, Kuniyasu A, Nakayama H, Horiuchi S. Advanced glycation end products (AGE) inhibit scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport: a new crossroad of AGE to cholesterol metabolism. *J Atheroscler Thromb* 2003;10(1):1-6.
- Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, Ikemoto M, Arai H, Horiuchi S, Nakayama H. Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol Chem* 2001;276(16):13348-55.
- Oravec S, Demuth K, Myara I, Hornyk A. The effect of high density lipoprotein subfractions on endothelial eicosanoid secretion. *Thromb Res* 1998;92(2):65-71.
- Ozeki Y, Nagamura Y, Ito H, Unemi F, Kimura Y, Igawa T, Kambayashi Ji, Takahashi Y, Yoshimoto T. An anti-platelet agent, OPC-29030, inhibits translocation of 12-lipoxygenase and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid production in human platelets. *Br J Pharmacol* 1999;128(8):1699-704.

- Packer JE, Slater TF, Willson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 1979;278(5706):737-8.
- Pajkrt D, Lerch PG, van der PT, Levi M, Illi M, Doran JE, Arnet B, vanden EA, ten Cate JW, van Deventer SJ. Differential effects of reconstituted high-density lipoprotein on coagulation, fibrinolysis and platelet activation during human endotoxemia. *Thromb Haemost* 1997;77:303–307.
- Palinski W, Ylä-Herttuala S, Rosenfeld ME, Butler SW, Socher SA, Parthasarathy S, Curtiss LK, Witztum JL.. Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. *Arteriosclerosis*. 1990;10(3):325-35.
- Pan B, Ma Y, Ren H, He Y, Wang Y, Lv X, Liu D, Ji L, Yu B, Wang Y, Chen YE, Pennathur S, Smith JD, Liu G, Zheng L. Diabetic HDL is dysfunctional in stimulating endothelial cell migration and proliferation due to down regulation of SR-BI expression. *PLoS One* 2012;7(11):e48530.
- Pankhurst G, Wang XL, Wilcken DE, Baerenthaler G, Panzenbock U, Raftery M, Stocker R. Characterization of specifically oxidized apolipoproteins in mildly oxidized high density lipoprotein *J Lipid Res* 2003;44(2):349–355.
- Panzenböck U, Stocker R. Formation of methionine sulfoxide-containing specific forms of oxidized high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 2005;1703(2):171–181.
- Papkoff J, Chen RH, Blenis J, Forsman J. p42 mitogen-activated protein kinase and p90 ribosomal S6 kinase are selectively phosphorylated and activated during thrombin-induced platelet activation and aggregation. *Mol Cell Biol*. 1994 Jan;14(1):463-72.
- Paragh G, Seres I, Balogh Z, Varga Z, Kárpáti I, Mátyus J, Ujhelyi L, Kakuk G. The serum paraoxonase activity in patients with chronic renal failure and hyperlipidemia. *Nephron* 1998 ;80(2):166-70.
- Passarelli M, Tang C, McDonald TO, O'Brien KD, Gerrity RG, Heinecke JW, Oram JF. Advanced glycation end product precursors impair ABCA1-dependent cholesterol removal from cells. *Diabetes* 2005;54(7):2198-205.
- Patrignani P, Sciulli MG, Manarini S, Santini G, Cerletti C, Evangelista V. COX-2 is not involved in thromboxane biosynthesis by activated human platelets. *J Physiol Pharmacol* 1999 ;50(4):661-7.

- Paul BZ, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism of thromboxane A₂-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *J Biol Chem* 1999;274(41):29108-14.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001;22(2):153-83.
- Pennathur S, Bergt C, Shao B, Byun J, Kassim SY, Singh P, Green PS, McDonald TO, Brunzell J, Chait A, Oram JF, O'brien K, Geary RL, Heinecke JW. Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 2004;279(41):42977-83.
- Philippova M, Resink T, Erne P, Bochkov V. Oxidised phospholipids as biomarkers in human disease. *Swiss Med Wkly* 2014;144:w14037.
- Phillips MC. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem*. 2014 289(35):24020-9.
- Podrez EA, Byzova TV, Febbraio M, Salomon RG, Ma Y, Valiyaveetil M, Poliakov E, Sun M, Finton PJ, Curtis BR, Chen J, Zhang R, Silverstein RL, Hazen SL. Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nat Med* 2007 ;13(9):1086-95.
- Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, Finton PJ, Shan L, Gugiu B, Fox PL, Hoff HF, Salomon RG, Hazen SL. Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 2002;277(41):38503-16.
- Proudfoot JM, Barden AE, Loke WM, Croft KD, Puddey IB, Mori TA. HDL is the major lipoprotein carrier of plasma F₂-isoprostanes. *J Lipid Res* 2009;50(4):716–22.
- Puente Navazo MD, Daviet L, Ninio E, McGregor JL. Identification on human CD36 of a domain (155-183) implicated in binding oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16(8):1033-9.
- Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest* 2006;116(12):3090-100.

- Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest* 2006;116(12):3090-100.
- Rashduni DL, Rifici VA, Schneider SH, Khachadurian AK. Glycation of high-density lipoprotein does not increase its susceptibility to oxidation or diminish its cholesterol efflux capacity. *Metabolism* 1999;48(2):139-43.
- Razavi AE, Ani M, Pourfarzam M, Naderi GA. Associations between high density lipoprotein mean particle size and serum paraoxonase-1 activity. *J Res Med Sci* 2012;17(11):1020-6.
- Rezaee F, Casetta B, Levels JH, Speijer D, Meijers JC. Proteomic analysis of high-density lipoprotein. *Proteomics* 2006;6(2):721-30.
- Rigotti A, Acton SL, Krieger M. The class B scavenger receptors SRBI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 1995;270(27):16221-4.
- Rigotti A, Miettinen H, Krieger M. The role of the high density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid Liadaki KN, Liu T, Xu S, Ishida BY, Duchateaux PN, Krieger JP, Kane J, Krieger M, Zannis VI. Binding of high density lipoprotein (HDL) and discoidal reconstituted HDL to the HDL receptor scavenger receptor class B type I: effect of lipid association and APOA-I mutations on receptor binding. *J Biol Chem* 2000; 275: 21262–21271.
- Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett* 2008;582(13):1783-7.
- Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 2010;21(3):229-38.
- Ruggeri ZM. Role of von Willebrand factor in platelet thrombus formation. *Ann Med* 2000;32 Suppl 1:2-9.
- Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Denèfle P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 1999;22(4):352-5.
- Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S195-200.

- Ryeom S, Silverstein RL, Scotto A, Sparrow JR. Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium may be mediated by the scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 1996;271(34):20536-9.
- Saelman EU, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG, Heijnen HF, Sage EH, Williams S, McKeown L, Gralnick HR, Sixma JJ. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood* 1994;83(5):1244-50.
- Saklatvala J, Rawlinson L, Waller RJ, Sarsfield S, Lee JC, Morton LF, Barnes MJ, Farndale RW. Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue. *J Biol Chem* 1996;271(12):6586-9.
- Sangvanich P, Mackness B, Gaskell SJ, Durrington P, Mackness M. The effect of high-density lipoproteins on the formation of lipid/protein conjugates during in vitro oxidation of low-density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300(2):501-6.
- Sankaranarayanan S, Oram JF, Asztalos BF, Vaughan AM, Lund-Katz S, Adorni MP, Phillips MC, Rothblat GH. Effects of acceptor composition and mechanism of ABCG1-mediated cellular free cholesterol efflux. *J Lipid Res* 2009;50(2):275-84.
- Sattler K, Levkau B. Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection. *Cardiovasc Res* 2009;82(2):201-11.
- Schneider C, Pratt DA, Porter NA, Brash AR. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem Biol* 2007;14(5):473-88.
- Serna J, García-Seisdedos D1, Alcázar A, Lasunción MÁ, Busto R, Pastor Ó. Quantitative lipidomic analysis of plasma and plasma lipoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry. *Chem Phys Lipids* 2015;189:7-18.
- Shah AS, Tan L, Long JL, Davidson WS. Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. *J Lipid Res* 2013;54(10):2575-85.
- Shah PK, Kaul S, Nilsson J, Cercek B. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whosetime for testing is coming. Part II. *Circulation* 2001;104:2498 –2502.
- Shao B, Cavigiolio G, Brot N, Oda MN, Heinecke JW. Methionine oxidation impairs reverse cholesterol transport by apolipoprotein A-I. *Proc Natl Acad Sci U S A*

2008;105(34):12224-9.

- Shao B, Heinecke JW. HDL, lipid peroxidation, and atherosclerosis. *J Lipid Res* 2009;50(4):599-601.
- Shao B, Oda MN, Bergt C, Fu X, Green PS, Brot N, Oram JF, Heinecke JW. Myeloperoxidase impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux through methionine oxidation and site-specific tyrosine chlorination of apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 2006;281(14):9001-4.
- Shao B, Oda MN, Oram JF, Heinecke JW. Myeloperoxidase: an inflammatory enzyme for generating dysfunctional high density lipoprotein. *Curr Opin Cardiol* 2006;21(4):322–328.
- Shao B. Site-specific oxidation of apolipoprotein A-I impairs cholesterol export by ABCA1, a key cardioprotective function of HDL. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821(3):490-501.
- Shattil SJ, Brass LF. Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J Biol Chem* 1987;262(3):992-1000.
- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87(1):4-14.
- Shen BW, Scanu AM, Kézdy FJ. Structure of human serum lipoproteins inferred from compositional analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(3):837-41.
- Shiflett AM, Bishop JR, Pahwa A, Hajduk SL. Human high density lipoproteins are platforms for the assembly of multi-component innate immune complexes. *J Biol Chem* 2005;280(38):32578-85.
- Shuhei N, Söderlund S, Jauhiainen M, Taskinen MR. Effect of HDL composition and particle size on the resistance of HDL to the oxidation. *Lipids Health Dis* 2010;9:104.
- Siegel M, McConnell RT, Abrahams SL, Porter NA, Cuatrecasas P. Regulation of arachidonate metabolism via lipoxygenase and cyclo-oxygenase by 12-HPETE, the product of human platelet lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;89(4):1273-80.

- Siegel-Axel D, Daub K, Seizer P, Lindemann S, Gawaz M. Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 8–17.
- Silva RA, Huang R, Morris J, Fang J, Gracheva EO, Ren G, Kontush A, Jerome WG, Rye KA, Davidson WS. Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(34):12176-81.
- Smith WL, Marnett LJ, DeWitt DL. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther* 1991;49(3):153-79.
- Sorrentino SA, Besler C, Rohrer L, Meyer M, Heinrich K, Bahlmann FH, Mueller M, Horváth T, Doerries C, Heinemann M, Flemmer S, Markowski A, Manes C, Bahr MJ, Haller H, von Eckardstein A, Drexler H, Landmesser U. Endothelial-vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy. *Circulation* 2010;121(1):110-22.
- Stangl H, Hyatt M, Hobbs HH. Transport of lipids from high and low density lipoproteins via scavenger receptor-BI. *J Biol Chem*. 1999 ;274(46):32692-8.
- Subramanian P, Vora M, Gentile LB, Stahelin RV, Chalfant CE. Anionic lipids activate group IVA cytosolic phospholipase A2 via distinct and separate mechanisms. *J Lipid Res* 2007 ;48(12):2701-8.
- Suzuki H, Kayama Y, Sakamoto M, Iuchi H, Shimizu I, Yoshino T, Katoh D, Nagoshi T, Tojo K, Minamino T, Yoshimura M, Utsunomiya K. Arachidonate 12/15-lipoxygenase-induced inflammation and oxidative stress are involved in the development of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 2015;64(2):618-30.
- Takahashi K, Kimura Y, Kioka N, Matsuo M, Ueda K. Purification and ATPase activity of human ABCA1. *J Biol Chem* 2006;281(16):10760-8.
- Takahashi Y, Chiba H, Matsuno K, Akita H, Hui SP, Nagasaka H, Nakamura H, Kobayashi K, Tandon NN, Jamieson GA. Native lipoproteins inhibit platelet activation induced by oxidized lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;222(2):453-9.
- Takeda H, Yano T, Kishikawa H, Miyata T, Shinohara M, Yamaguchi E, Kobori S, Fan JL, Tokunaga O, Shichiri M. Abnormalities in platelets and vascular endothelial cells induced by glycated lipoproteins. *Intern Med* 1992;31(6):746-51.

- Taleb A, Witztum JL, Tsimikas S. Oxidized phospholipids on apoB-100-containing lipoproteins: a biomarker predicting cardiovascular disease and cardiovascular events. *Biomark Med* 2011;5(5):673-94. doi: 10.2217/bmm.11.60.
- Tames FJ, Mackness MI, Arrol S, Laing I, Durrington PN. Non-enzymatic glycation of apolipoprotein B in the sera of diabetic and non-diabetic subjects. *Atherosclerosis*. 1992 Apr;93(3):237-44.
- Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem*. 1989;264(13):7576-83.
- Therasse J, Lemonnier F. Determination of plasma lipoperoxides by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1987;413:237-41.
- Thornalley PJ, Rabbani N. Detection of oxidized and glycated proteins in clinical samples using mass spectrometry--a user's perspective. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840(2):818-29.
- Thorne RF, Mhaidat NM, Ralston KJ, Burns GF. CD36 is a receptor for oxidized high density lipoprotein: implications for the development of atherosclerosis. *FEBS Lett* 2007;581(6):1227-32.
- Tohyama Y, Takano T, Yamamura H. B cell responses to oxidative stress. *Curr Pharm Des* 2004;10(8):835-9.
- Tollefsen DM, Feagler JR, Majerus PW. The binding of thrombin to the surface of human platelets. *J Biol Chem* 1974;249(8):2646-51.
- Tong H, Knapp HR, VanRollins M. A low temperature flotation method to rapidly isolate lipoproteins from plasma. *J Lipid Res* 1998;39(8):1696-704.
- Trigatti B, Rayburn H, Vinals M, et al. Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(16): 9322–9327.
- Tschoepe D, Roesen P, Kaufmann L, Schauseil S, Kehrel B, Ostermann H, Gries FA. Evidence for abnormal platelet glycoprotein expression in diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1990;20(2):166-70.
- Tselepis AD, Dentan C, Karabina SA, Chapman MJ, Ninio E. PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VHDL-1 in human

plasma. Catalytic characteristics and relation to the monocyte-derived enzyme. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(10):1764-73.

- Tsimikas S, Kiechl S, Willeit J, Mayr M, Miller ER, Kronenberg F, Xu Q, Bergmark C, Weger S, Oberhollenzer F, Witztum JL. Oxidized phospholipids predict the presence and progression of carotid and femoral atherosclerosis and symptomatic cardiovascular disease: five-year prospective results from the Bruneck study. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(11):2219-28.
- Ueda M, Hayase Y, Mashiba S. Establishment and evaluation of 2 monoclonal antibodies against oxidized apolipoprotein A-I (apoA-I) and its application to determine blood oxidized apoA-I levels. *Clin Chim Acta* 2007; 78:105-111.
- Ueda Y, Royer L, Gong E, Zhang J, Cooper PN, Francone O, Rubin EM. Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice. *J Biol Chem* 1999; 274: 7165–7171.
- Valiyaveetil M, Kar N, Ashraf MZ, Byzova TV, Febbraio M, Podrez EA. Oxidized high-density lipoprotein inhibits platelet activation and aggregation via scavenger receptor BI. *Blood* 2008;111:1962–71.
- van der Stoep M, Korporaal SJ, Van Eck M. High-density lipoprotein as a modulator of platelet and coagulation responses. *Cardiovasc Res* 2014;103(3):362-71.
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:97-120.
- 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(4):1046-51.
- Vieu C, Jaspard B, Barbaras R, Manent J, Chap H, Perret B, Collet X. Identification and quantification of diacylglycerols in HDL and accessibility to lipase. *J Lipid Res* 1996;37(5):1153-61.
- Viñals M, Xu S, Vasile E, Krieger M. Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HDL) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake. *J Biol Chem* 2003;278(7):5325-32.

- Vincent HK, Bourguignon CM, Weltman AL, Vincent KR, Barrett E, Innes KE, Taylor AG. Effects of antioxidant supplementation on insulin sensitivity, endothelial adhesion molecules, and oxidative stress in normal-weight and overweight young adults. *Metabolism* 2009;58(2):254-62.
- Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet* 2012;380(9841):572-80.
- von Eckardstein A, Assmann G. Prevention of coronary heart disease by raising high-density lipoprotein cholesterol? *Curr Opin Lipidol* 2000;11(6):627-37.
- Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B, Auwerx J. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest* 1995;96(2):741-50.
- Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Heyman RA, Staels B, Auwerx J. Retinoids increase human apolipoprotein A-11 expression through activation of the **mij**
- Wang N, Arai T, Ji Y, Rinninger F, Tall AR. Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *J Biol Chem* 1998; 273: 32920–32926.
- Watson SP, Gibbins J. Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM. *Immunol Today* 1998;19(6):260-4.
- Webb NR, de Beer MC, Asztalos BF, Whitaker N, van der Westhuyzen DR, de Beer FC. Remodeling of HDL remnants generated by scavenger receptor class B type I. *J Lipid Res* 2004;45(9):1666-73.
- Westerbacka J, Yki-Järvinen H, Turpeinen A, Rissanen A, Vehkavaara S, Syrjälä M, Lassila R. Inhibition of platelet-collagen interaction: an in vivo action of insulin abolished by insulin resistance in obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(1):167-72.
- Wiesner P, Leidl K, Boettcher A, Schmitz G, Liebisch G. Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* 2009;50(3):574-85.

- Winocour PD, Watala C, Kinglough-Rathbone RL. Membrane fluidity is related to the extent of glycation of proteins, but not to alterations in the cholesterol to phospholipid molar ratio in isolated platelet membranes from diabetic and control subjects. *Thromb Haemost* 1992;67(5):567-71.
- Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 1987;245(1):243-50.
- Xiang B, Zhang G, Stefanini L, Bergmeier W, Gartner TK, Whiteheart SW, Li Z. The Src family kinases and protein kinase C synergize to mediate Gq-dependent platelet activation. *J Biol Chem* 2012;287(49):41277-87.
- Yacoub D, Théorêt JF, Villeneuve L, Abou-Saleh H, Mourad W, Allen BG, Merhi Y.. Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release. *J Biol Chem* 2006;281(40):30024-35.
- Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Brownlee M. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 2001;50(6):1491-4.
- Yamamoto Y, Takahashi K. Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides *Arch Biochem Biophys* 1993;305(2):541-5.
- Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, de la Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(5):712-9.
- Yang XP, Amar MJ, Vaisman B, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Freeman LA, Kurlander RJ, Patterson AP, Becker LC, Remaley AT. Scavenger receptor-BI is a receptor for lipoprotein(a). *J Lipid Res* 2013;54(9):2450-7.
- Yesilaltay A, Kocher O, Pal R, Leiva A, Quiñones V, Rigotti A, Krieger M. PDZK1 is required for maintaining hepatic scavenger receptor, class B, type I (SR-BI) steady state levels but not its surface localization or function. *J Biol Chem* 2006;281(39):28975-80.
- Yetukuri L, Söderlund S, Koivuniemi A, Seppänen-Laakso T, Niemelä PS, Hyvönen M, Taskinen MR, Vattulainen I, Jauhiainen M, Oresic M. Composition and lipid spatial distribution of HDL particles in subjects with low and high HDL-cholesterol. *J Lipid Res* 2010;51(8):2341-51.

- Yngen M, Norhammar A, Hjemdahl P, Wallén NH. Effects of improved metabolic control on platelet reactivity in patients with type 2 diabetes mellitus following coronary angioplasty. *Diab Vasc Dis Res* 2006;3(1):52-6.
- Yoo JA, Lee EY, Park JY, Lee ST, Ham S, Cho KH. Different Functional and Structural Characteristics between ApoA-I and ApoA-4 in Lipid-Free and Reconstituted HDL State: ApoA-4 Showed Less Anti-Atherogenic Activity. *Mol Cells* 2015;38(6):573-9.
- Yoshikawa M, Sakuma N, Hibino T, Sato T, Fujinami T. HDL3 exerts more powerful anti-oxidative, protective effects against copper-catalyzed LDL oxidation than HDL2. *Clin Biochem* 1997;30(3):221-5.
- Younis N, Charlton-Menys V, Sharma R, Soran H, Durrington PN. Glycation of LDL in non-diabetic people: Small dense LDL is preferentially glycated both in vivo and in vitro. *Atherosclerosis* 2009;202(1):162-8.
- Yuhanna I, Zhu Y, Cox B, et al. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 2001;7:853–857.
- Zambon A, Schmidt I, Beisiegel U, Brunzell JD. Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1996;37(11):2394-404.
- Zannis VI, Lees AM, Lees RS, Breslow JL. Abnormal apoprotein A-I isoprotein composition in patients with Tangier disease. *J Biol Chem* 1982;257(9):4978-86.
- Zhang M, Charles R, Tong H, Zhang L, Patel M, Wang F, Rames MJ, Ren A, Rye KA, Qiu X, Johns DG, Charles MA, Ren G. HDL surface lipids mediate CETP binding as revealed by electron microscopy and molecular dynamics simulation. *Sci Rep* 2015;5:8741.
- Zhang Y, Da Silva JR, Reilly M, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* 2005;115:2870–4.
- Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, Schmitt D, Fu X, Thomson L, Fox PL, Ischiropoulos H, Smith JD, Kinter M, Hazen SL. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2004;114:529–41.

- Zhou H, Tan KC, Shiu SW, Wong Y. Increased serum advanced glycation end products are associated with impairment in HDL antioxidative capacity in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23(3):927-33.
- Zimman A, Titz B, Komisopoulou E, Biswas S, Graeber TG, Podrez EA. Phosphoproteomic analysis of platelets activated by pro-thrombotic oxidized phospholipids and thrombin. *PLoS ONE* 2014; 9: e84488.

ANNEXES

Glycoxidized HDL, HDL Enriched With Oxidized Phospholipids and HDL From Diabetic Patients Inhibit Platelet Function

Quang Huy Lê, Meddy El Alaoui, Evelyne Véricel, Bérénice Ségrestin, Laurent Soulère, Michel Guichardant, Michel Lagarde, Philippe Moulin, and Catherine Calzada

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Q.H.L., E.V., M.G., M.L., P.M., C.C.), UMR 1060, Laboratoire Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie, et Nutrition, Université de Lyon, UMR 1397 Institut National de la Recherche Agronomique, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon (INSA-Lyon), IMBL, 69621 Villeurbanne, France; Laboratoire de Chimie Organique et Bioorganique (M.E.A., L.S.), Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, UMR 5246 Centre National de la Recherche Scientifique, INSA-Lyon, Villeurbanne, France; and Fédération d'Endocrinologie (B.S., P.M.), Hospices Civils de Lyon, 69677 Lyon Bron, France

Context: High-density lipoproteins (HDL) possess atheroprotective properties including anti-thrombotic and antioxidant effects. Very few studies relate to the functional effects of oxidized HDL on platelets in type 2 diabetes (T2D).

Objective: The objective of our study was to investigate the effects of in vitro glycoxidized HDL and HDL from patients with T2D on platelet aggregation and arachidonic acid signaling cascade. At the same time, the contents of hydroxylated fatty acids were assessed in HDL.

Results: Compared with control HDL, in vitro glycoxidized HDL had decreased proportions of linoleic (LA) and arachidonic (AA) acids in phospholipids and cholesteryl esters, and increased concentrations of hydroxy-octadecadienoic acids (9-HODE and 13-HODE) and 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid (15-HETE), derived from LA and AA respectively, especially hydroxy derivatives esterified in phospholipids. Glycoxidized HDL dose-dependently decreased collagen-induced platelet aggregation by binding to scavenger receptor BI (SR-BI). Glycoxidized HDL prevented collagen-induced increased phosphorylation of platelet p38 MAPK and cytosolic phospholipase A₂, as well as intracellular calcium mobilization. HDL enriched with oxidized phosphatidylcholine (PC), namely PC(16:0/13-HODE) dose-dependently inhibited platelet aggregation. Increased concentrations of 9-HODE, 13-HODE, and 15-HETE in phospholipids (2.1-, 2.1-, and 2.4-fold increase, respectively) were found in HDL from patients with T2D, and these HDL also inhibited platelet aggregation via SR-BI.

Conclusions: Our results suggest that in vitro glycoxidized HDL as well as HDL from patients with T2D inhibit platelet aggregation, and suggest that oxidized LA-containing phospholipids may contribute to the anti-aggregatory effects of glycoxidized HDL and HDL from patients with T2D. (*J Clin Endocrinol Metab* 100: 2006–2014, 2015)

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2015 by the Endocrine Society

Received November 25, 2014. Accepted March 18, 2015.

First Published Online March 20, 2015

Abbreviations: 15-HETE, 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid; AA, arachidonic acid; CE, cholesteryl ester; cPLA₂, cytosolic phospholipase A₂; DMA, dimethylacetal; HDL, high-density lipoprotein; HEDE, hydroxy-eicosadienoic acid; HODE, hydroxy-octadecadienoic acid; LA, linoleic acid; LDL, low-density lipoprotein; MDA, malondialdehyde; PC, phosphatidylcholine; PL, phospholipid; PRP, platelet-rich plasma; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SR-BI, scavenger receptor BI; T2D, type 2 diabetes; TAG, triacylglycerols.

There is growing evidence that high-density lipoprotein (HDL) composition determines its functional properties besides the levels of HDL cholesterol (1). HDLs are highly heterogeneous particles consisting of 200 individual molecular lipid species and a hundred of proteins (2, 3). Among lipids, the presence of oxidizable polyunsaturated fatty acids (PUFAs) substrates renders these particles sensitive to oxidative attack. In particular, HDLs are the major carriers of primary and terminal end products of nonenzymatic lipid peroxidation such as lipid hydroperoxides (4) and isoprostanes (5) in human blood plasma. HDLs also remove seeding molecules from low-density lipoproteins (LDLs) such as hydroperoxy-octadecadienoic and hydroperoxy-eicosatetraenoic acids (6). Oxidatively modified HDLs have been detected in vivo (7) in the intima of atherosclerotic plaques in human abdominal aortae (8) and in patients with type 2 diabetes (T2D) (9); however, the molecular mechanisms involved were not investigated compared with the extensive studies on oxidized LDL in atherogenesis. Functional properties of oxidized HDL in T2D, a disease associated with increased risk for atherothrombosis and oxidative stress, have been investigated but gave contradictory results. Most studies showed that HDL might lose their protective properties in T2D (10, 11) whereas other studies provided evidence for beneficial effects such as increased cholesterol efflux from macrophages in patients with T2D (12, 13). Studies on the effects of oxidatively modified HDL on platelet functions are few and contradictory, reporting either a stimulation (14) or inhibition (15) of platelet aggregation by in vitro oxidized HDL. To clarify this issue in the frame of T2D, we undertook two approaches. On one hand, HDLs from control subjects were modified in vitro by glycoxidation to mimic changes occurring in HDL particles of patients with T2D, and their effects on platelet activation were determined and compared with those induced by unmodified HDLs. In contrast, HDLs from patients with T2D were compared with HDLs from healthy control subjects as far as platelet aggregation was concerned. We hypothesized that some elective lipid peroxides in HDL phospholipids (PL) might exert antiaggregating properties.

Subjects and Methods

Study subjects

Eight patients with T2D (5 men and 3 women, age 66 ± 3.5 y) and eight healthy subjects (6 men and 2 women, age 25 ± 2.9 y) were included. The patients had poorly controlled diabetes (fasting glycemia, 8.7 ± 1.4 mmol/L; glycated hemoglobin (HbA_{1c}), $8.3 \pm 0.6\%$, 67 mmol/mol). They had mild hypertriglyceridemia (triglycerides, 1.9 ± 0.4 mmol/L), normal LDL cholesterol (2.4 ± 0.2 mmol/L), and low HDL cholesterol (1.1 ± 0.1 mmol/L). The patients were recruited at the Department of Endocri-

nology and Metabolic Diseases, Cardiovascular Hospital, Lyon Bron. The protocol was approved by the Local Ethics Committee (CPP Sud-Est IV, Hospices Civils de Lyon) and the study was conducted in accordance with the principles of the Helsinki declaration. Written informed consent was obtained from each of the participants.

Isolation of HDL by ultracentrifugation

Blood was collected on EDTA and HDLs were immediately isolated from plasma by potassium bromide stepwise ultracentrifugation (16). HDLs were extensively dialyzed against PBS (pH 7.35) in the presence of 1 mmol/L EDTA. The concentration of proteins was estimated using a Lowry assay (17).

Preparation of HDLs modified by glycoxidation

Glycoxidized HDLs consisted of HDL incubated with 50 mmol/L glucose for 5 days at 37°C, dialyzed in PBS to remove excess glucose, and treated with 5 μ mol/L CuCl₂ for 1 day at 37°C. Control HDL were prepared by incubating native HDL in the presence of butylated hydroxytoluene (5 μ mol/L) and EDTA (1 mmol/L) for 6 days at 37°C. All HDL were finally dialyzed against EDTA-free PBS just before their interaction with platelets.

Platelet isolation

Venous blood was collected on citrate-phosphate-dextrose (19.6 mmol/L citric acid, 89.4 mmol/L sodium citrate, 16.1 mmol/L NaH₂PO₄, 128.7 mmol/L dextrose; pH 5.6) from healthy volunteers who had not ingested any aspirin or anti-inflammatory drugs in the previous 10 days. Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation of the blood at $200 \times g$ for 15 minutes at 20°C. Platelets were isolated as previously described (18).

Synthesis of 1-palmitoyl, 2-(13-hydroxy-octadecadienoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine

1-palmitoyl, 2-(13(S)-hydroperoxy-octadecadienoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (PC(16:0/13(S)-HpODE)) was enzymatically synthesized from 1-palmitoyl, 2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PC(16:0/18:2), Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) following incubation of PC(16:0/18:2) with soybean 15-lipoxygenase (type V) in the presence of deoxycholate for 30 minutes under a continuous flux of oxygen (19). Phosphatidylcholine hydroperoxide formed was reduced by sodium borohydride (NaBH₄) into phosphatidylcholine hydroxide. 1-palmitoyl, 2-(13(S)-hydroxy-octadecadienoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (PC(16:0/13-HODE)) concentration was determined spectrophotometrically by UV absorbance at 235 nm and its purity was checked by HPLC.

Synthesis of 1-palmitoyl, 2-(15(S)-hydroxy-eicosadienoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine

First, 1-palmitoyl, 2-eicosadienoyl-sn-glycero-3-phosphocholine PC(16:0/20:2n-6) was chemically synthesized. To a solution of 1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine (0.2 mmol), eicosa-11,14-dienoic acid (20:2n-6) (0.08 mmol) was added in anhydrous chloroform (1 mL). A solution of freshly recrystallized 4-pyrrolidinopyridine (20) (0.09 mmol) and dicyclohexylcarbodiimide (0.09 mmol) in 1 mL of chloroform was then added dropwise (21). After 40 hours, the reaction mixture was concentrated and the product was then purified by flash chromatography on silica gel (chloroform/methanol/H₂O, 65:

35:4, by volume). Fractions containing the product were further purified by ion exchange chromatography using Amberlyst resin (chloroform/methanol/H₂O, 65:35:4, by vol.) to give PC(16:0/20:2). 1-palmitoyl,2-(15(S)-hydroperoxy-eicosadienoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (PC(16:0/15(S)-HpEDE) was then enzymatically synthesized from PC(16:0/20:2) as described above and reduced into 1-palmitoyl,2-(15(S)-hydroxy-eicosadienoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine [PC(16:0/15(S)-HEDE)], and used as an internal standard in relevant analyses.

In vitro enrichment of HDL with oxidized phospholipids

To prepare HDLs enriched with oxidized PLs, native HDLs were incubated with dried PC(16:0/13-HODE) for 24 hours at 37°C in a shaking bath. Unbound PLs were removed by dialysis in PBS and using PD-10 desalting columns. A similar procedure was applied to prepare HDLs enriched with PC(16:0/18:2).

Characterization of HDL

Fatty acid compositions of lipid classes

Fatty acid methyl esters and fatty dimethylacetals (DMA) were analyzed by gas chromatography as detailed in the [Supplemental Methods](#).

Quantification of monohydroxylated fatty acids

Hydroxylated fatty acids were separated and quantified by reverse-phase HPLC according to the amount of appropriate internal standards, PC(16:0/15-HEDE) and 15-HEDE. For the detailed procedure, please refer to Supplemental Methods.

Stereochemical analysis of hydroxylated fatty acids

Optical isomers of HODE and HETE were separated by chiral phase HPLC as detailed in the Supplemental Methods.

Malondialdehyde determination

Overall lipid peroxidation was assessed by quantitation of thiobarbituric acid-malondialdehyde (MDA) adducts by reverse-phase HPLC with fluorimetric detection. For details, please refer to Supplemental Methods.

Vitamin E determination

Tocopherol isomers were separated by reverse-phase HPLC and measured fluorimetrically containing tocol as an internal standard. For details, please refer to Supplemental Methods.

Platelet aggregation

Aggregation was measured in isolated platelets in a Chrono-log dual-channel aggregometer (Coulter, Margency, France) according to the method of Born (22). Platelet suspensions were preincubated for 5 minutes at 37°C in the presence or absence of different preparations of HDL and then stimulated with threshold concentrations of collagen (Nycomed, Linz, Austria) with continuous stirring at 1000 rpm. The threshold concentration of collagen was defined as the concentration of collagen that induced approximately a 60% increase in light transmission. The extent of platelet aggregation was expressed in terms of percentage of change in light transmission 4 minutes after the addition of collagen.

Platelet p38 MAPK and cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) activation

Chemiluminescent Western blotting detection of p38 MAPK, phospho-p38 MAPK, and phospho-cPLA₂ was performed as described in the Supplemental Methods.

Determination of intracellular Ca²⁺ concentrations

Intracellular calcium concentrations were measured fluorimetrically in fura 2-loaded platelets as described in the Supplemental Methods.

Statistical analysis

Results are expressed as the means $\pm$ SEM. Comparisons between groups were performed using paired Student *t* test.

Results

Characterization of glycoxidized HDL compared with control HDL

Fatty acid composition of phospholipids and cholesteryl esters

Following in vitro glycoxidation, proportions of the main PUFAs, linoleic (LA; 18:2n-6) and arachidonic (AA; 20:4n-6) acids, significantly decreased in PL and cholesteryl esters (CEs) of glycoxidized HDL compared with control HDL (Table 1). In PL from glycoxidized HDL, the proportions of LA, AA, eicosapentaenoic (20:5n-3), and docosahexaenoic (22:6n-3) acids decreased by 54, 91, 56, and 91%, respectively. The proportions of 16:0 DMA, 18:0 DMA, and 18:1 n-9 DMA issued from the alkenyl residue of alkenyl, acyl-glycero-phosphoethanolamine (ethanolamine plasmalogens) decreased in PL from glycoxidized HDL compared with those from control HDL. By contrast, proportions of palmitic (16:0), stearic (18:0), and oleic (18:1n-9) acids increased in modified HDL. In CE, glycoxidation of HDL also led to decreased proportions of LA, AA, and eicosapentaenoic acid, by 53, 92, and 86%, respectively, and increased proportions of palmitic, stearic, and oleic acids.

Vitamin E concentration

The concentrations of α -tocopherol strongly decreased in glycoxidized HDL compared with control HDL (0 in glycoxidized HDL vs 2.04 ± 0.28 nmol/mg HDL protein in control HDL; *n* = 5; *P* < .001). γ -tocopherol concentrations decreased by 75% in glycoxidized HDL (0.08 ± 0.01 in glycoxidized HDL vs 0.32 ± 0.02 nmol/mg HDL protein in control HDL; *n* = 5; *P* < .001).

Table 1. Fatty Acid Composition of Phospholipids and Cholesteryl Esters in Control and Glycoxidized HDL

Fatty Acid, mol %	Phospholipids		Cholesteryl Esters	
	Control HDL	Glycoxidized HDL	Control HDL	Glycoxidized HDL
16:0	34.6 ± 2.1	48.9 ± 2.6 ^b	14.9 ± 1	28.7 ± 2.7 ^b
18:0	18.7 ± 1.2	26 ± 1.5 ^b	2.6 ± 0.4	7.2 ± 2.5 ^c
18:1n-9	8 ± 0.5	10.6 ± 0.7 ^c	19.4 ± 1	27.2 ± 1.9 ^d
18:2n-6	14.8 ± 1.6	6.9 ± 0.8 ^b	44.5 ± 1.3	20 ± 3.4 ^b
20:4n-6	8.8 ± 0.8	0.8 ± 0.2 ^b	7.3 ± 0.5	0.6 ± 0.3 ^b
20:5n-3	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.2 ^c	0.7 ± 0.2	0.1 ± 0.1 ^c
22:6n-3	3.2 ± 0.2	0.3 ± 0.1 ^b	1.9 ± 0.4	1.3 ± 0.5
DMA sum ^a	2.1 ± 0.8	0.53 ± 0.5 ^b		

Results, expressed as mol % of main fatty acids, are means ± SEM of five independent experiments.

^a DMA sum corresponds to the sum of 16:0 DMA, 18:0 DMA, and 18:1 n-9 DMA.

^b *P* < .001 vs control HDL.

^c *P* < .05.

^d *P* < .01.

MDA concentration

The concentrations of MDA, a marker of overall lipid peroxidation, were more than 10-fold higher in glycoxidized HDL compared with control HDL (1.93 ±

0.32 nmol/mg protein in glycoxidized HDL vs 0.18 ± 0.13 nmol/mg protein in control HDL, *n* = 4, *P* < .01).

Concentrations of hydroxylated fatty acids in lipid classes

The concentrations of the stable primary products of PUFA peroxidation, 13-HODE and 9-HODE, derived from LA, and 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid (15-HETE), derived from AA, were assessed in HDL. In control HDL, most hydroxylated fatty acids were present in CE, followed by PL and triacylglycerols (TAG), whereas most of them were present in PL of glycoxidized HDL (Figure 1). HODE concentrations increased strongly in PL of glycoxidized HDL compared with those of unmodified HDL (Figure 1, A and B). 13-HODE concentrations tended to increase (1.8-fold) and 9-HODE concentrations significantly increased in CE from glycoxidized HDL. In TAG, 13-HODE concentrations increased in glycoxidized HDL (2.7-fold) and 9-HODE concentrations tended to increase (1.8-fold) compared with control HDL. 15-HETE concentration increased in PL from glycoxidized HDL (8.5-fold) while 15-HETE concentration tended to increase in CE and TAG from glycoxidized HDL compared with control HDL (Figure 1C).

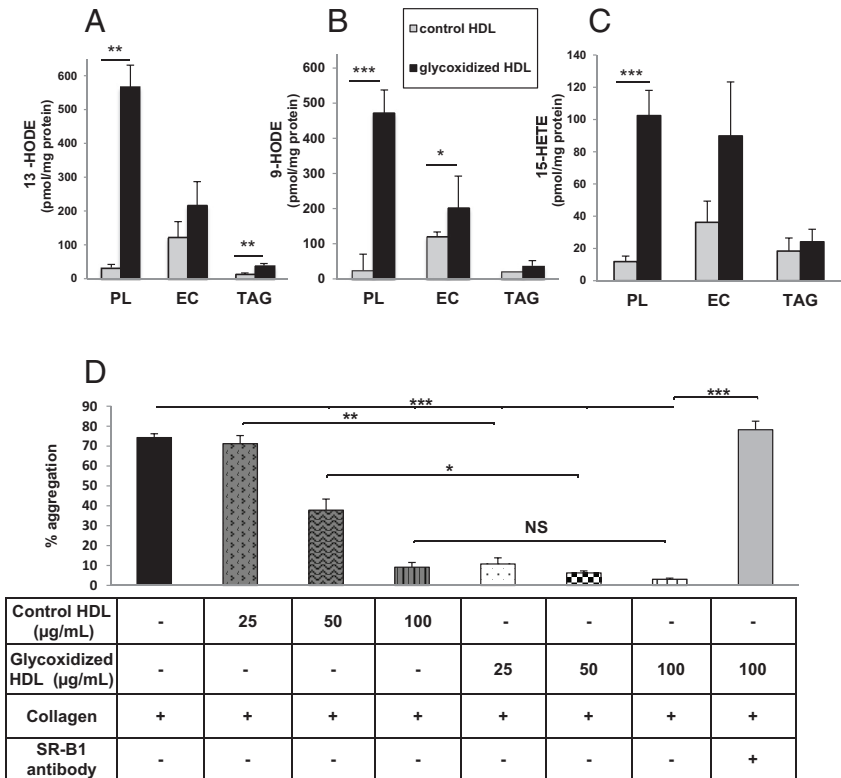


Figure 1. Hydroxylated fatty acids in control and glycoxidized HDL. Effects of respective HDL on collagen-induced platelet aggregation. Concentrations of 13-HODE (A), 9-HODE (B), 15-HETE (C) in control, and glycoxidized HDL. Results are the means ± SEM of five independent experiments. *, *P* < .05; **, *P* < .01; ***, *P* < .001 vs control HDL. D, Platelet aggregation monitored in platelets isolated from healthy donors, following preincubation for 5 minutes at 37°C in the absence or presence of anti-SR-B1 antibody, incubation with either control or glycoxidized HDL (25, 50, or 100 μg/mL) for 5 minutes at 37°C, and stimulation with collagen (2.5–5 μg/mL). Results are the means ± SEM of up to 10 experiments performed with 10 independent preparations of HDL and 10 independent platelet suspensions. Asterisks indicate significant differences (*, *P* < .05; **, *P* < .01; ***, *P* < .001). NS, not significant.

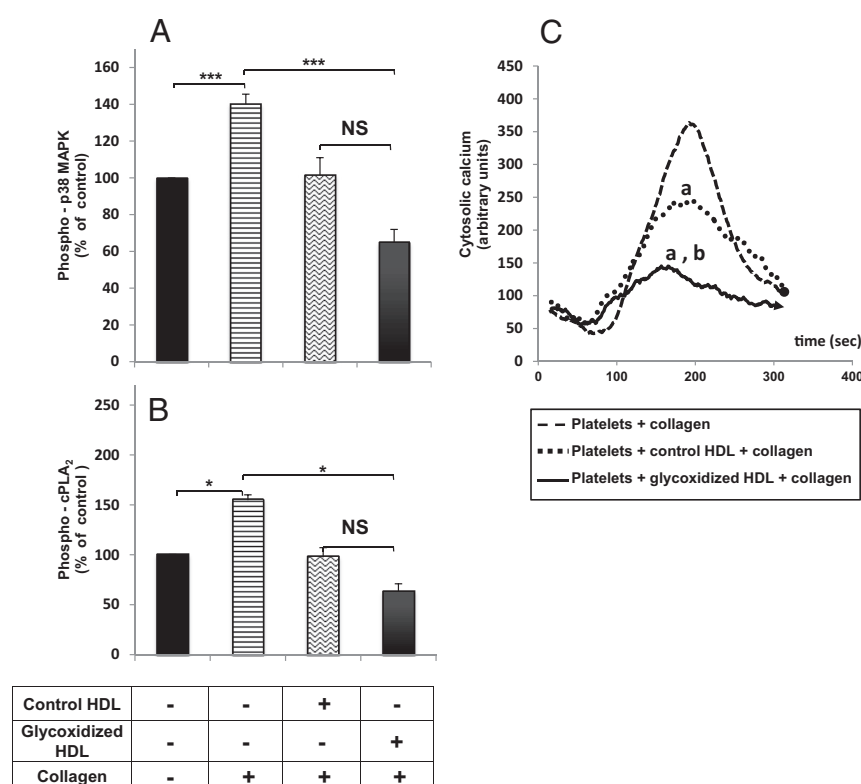


Figure 2. Effects of glycoxidized HDL on platelet p38 MAPK and cPLA₂ phosphorylation, and on collagen-induced increases of calcium concentrations in platelets. Phosphorylation levels of p38 MAPK (A) and cPLA₂ (B) in platelets preincubated for 5 minutes at 37°C in the absence or presence of anti-SR-BI blocking antibody, then incubated with control or glycoxidized HDL (either 25 or 50 μ g/mL) for 5 minutes at 37°C, and stimulated with collagen (2.5–5 μ g/mL). Results, expressed as percentages of control, represent the means $\pm$ SEM of five independent experiments. Asterisks suggest significant differences (*, $P < .05$; ***, $P < .001$). NS, not significant. C, Intracellular concentrations of calcium in fura 2-AM-loaded platelets preincubated in the absence or presence of 50 μ g/mL control or glycoxidized HDL for 5 minutes at 37°C and stimulated with collagen (2.5–5 μ g/mL). Tracings are representative of four independent experiments. a, $P < .001$ vs (platelets + collagen); b, $P < .05$ vs (platelets + control HDL + collagen).

Effects of control and glycoxidized HDL on platelet activation

Compared with platelets incubated with collagen, preincubation of platelets with glycoxidized HDL for 5 minutes at 37°C resulted in a dose-dependent inhibition of collagen-induced platelet aggregation with near complete inhibition at 100 μ g/mL (Figure 1D). Control HDL had no effect at 25 μ g/mL but significantly inhibited collagen-induced platelet aggregation at concentrations greater than or equal to 50 μ g/mL. Because scavenger receptor SR-BI binds modified HDL and is expressed in platelets (23), its involvement in the mechanism of action of HDL on these cells was sought. Preincubation of platelets with anti-SR-BI blocking antibody for 5 minutes at 37°C fully prevented the inhibitory effects of glycoxidized HDL on collagen-induced platelet aggregation (Figure 1D). Preincubation of platelets with anti-SR-BI also prevented the inhibition of collagen-induced platelet aggregation in presence of control HDL (aggregation rate: 65% in plate-

lets incubated with anti-SR-BI antibody and 100 μ g/mL control HDL vs 12% in platelets incubated with 100 μ g/mL control HDL). Anti-SR-BI blocking antibody had no effect on collagen-induced platelet aggregation, and preincubation with nonimmune isotype control antibody did not reduce the inhibitory effect of glycoxidized HDL on platelet aggregation (data not shown).

To determine the effects of glycoxidized HDL on key enzymes involved in the release of AA from membrane PL, phosphorylation of p38 MAPK and cPLA₂ was determined in platelet suspensions incubated in the absence or presence of HDL for 5 minutes and further stimulated with collagen for 4 minutes. As shown in Figure 2, A and B, addition of collagen to platelets resulted in increased amounts of phosphorylated p38 MAPK and cPLA₂. Preincubation of collagen-stimulated platelets with glycoxidized HDL fully prevented the collagen-induced increased phosphorylation of both enzymes.

Given that Ca²⁺ is a key second messenger downstream of most signaling pathways and is essential for the translocation of cPLA₂ to membranes, the effects of control and glycoxidized HDL on the kinetics of collagen-induced Ca²⁺ release were determined (Figure 2C). Addition of collagen to fura 2-AM-loaded platelets resulted in a rapid and transient increase in intracellular Ca²⁺ levels. Glycoxidized HDL inhibited collagen-induced intracellular Ca²⁺ increase in platelets by 47% whereas control HDL decreased it by 32%. Preincubation of platelets with anti-SR-BI blocking antibody for 5 minutes at 37°C alleviated the inhibitory effects of glycoxidized HDL on phosphorylation of p38 MAPK and cPLA₂, and Ca²⁺ mobilization (data not shown).

Effects of HDL enriched with 1-palmitoyl,2-(13-hydroxy-octadecadienoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine on platelet aggregation

To determine the role of oxidized LA-containing PL for antiaggregating effects of HDL, HDL were preloaded with two different concentrations of PC(16:0/13-HODE) prepared by 15-lipoxygenation of LA esterified to phosphati-

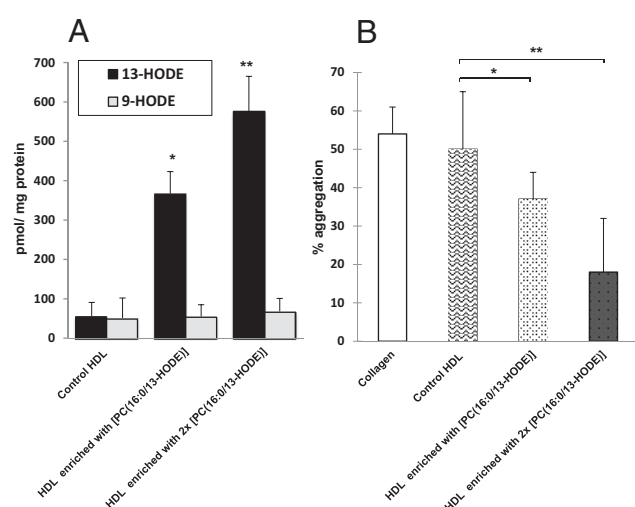


Figure 3. Effects of HDL enriched with oxidized phosphatidylcholine on collagen-induced platelet aggregation. A, Concentrations of HODE in HDL samples enriched or not with [PC(16:0/13-HODE)] or 2 [PC(16:0/13-HODE)]. **, $P < .01$ HDL enriched with PC(16:0/13-HODE) vs control HDL. B, Collagen-induced aggregation obtained in platelets preincubated for 5 minutes at 37°C in the absence (control HDL) or presence of HDL (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) enriched with [PC(16:0/13-HODE)] or 2 $\times$ [PC(16:0/13-HODE)], and stimulated with collagen (2.5–5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Results are the means $\pm$ SEM of four different preparations of various HDL and four different suspensions of platelets. Asterisks indicate significant differences (*, $P < .05$; **, $P < .01$).

dylcholine, followed by chemical reduction with NaBH_4 (Figure 3A). As expected, higher concentrations of 13-HODE, close to those found in glycoxidized HDL, were present in enriched HDL compared with control HDL, whereas concentrations of 9-HODE were similar in control and enriched HDL, confirming the absence of non-enzymatic lipid peroxidation during the preparation of enriched HDL particles. As shown in Figure 3B, HDL enriched with PC(16:0/13-HODE) inhibited collagen-induced platelet aggregation. The more HDLs were enriched with PC(16:0/13-HODE), the more platelet aggregation was inhibited. HDL enriched with native PC(16:0/18:2) had no significant effect on collagen-induced platelet aggregation compared with platelets incubated with control HDL and stimulated with collagen (data not shown).

Effects of glycoxidized HDL obtained from patients with T2D on platelet aggregation

The concentrations of hydroxylated fatty acids were assessed in HDL PL from poorly controlled patients with T2D and control subjects. 13-HODE and 9-HODE concentrations were 2-fold higher in HDL PL from patients with T2D compared with those in control subjects. 15-HETE concentration was 2.4-fold higher in patients' HDL PL compared with its concentration in control HDL (Figure 4A). To determine whether hydroxylated fatty acid products originated from enzymatic or nonenzymatic lipid peroxidation, chiral-phase HPLC was carried out on

each isomer. Concerning hydroxylated LA metabolites, 9(R)-HODE and 9(S)-HODE enantiomers were equally present in HDL from patients with T2D (51% 9(S)-HODE and 49% 9(R)-HODE), suggesting that the great majority of 9-HODE originated from nonenzymatic lipid peroxidation. 13-HODE consisted of 78% S isomer and 22% R isomer, indicating the involvement of enzymatic lipid peroxidation, presumably by 15-/ ω 6-lipoxygenase, together with nonenzymatic lipid peroxidation in the formation of 13-HODE. 15-HETE comprised 84% S and 16% R isomer, suggesting again the involvement of 15-lipoxygenase in the oxidation of AA. By comparison, unmodified HDL from control healthy subjects contained equal ratios of 9(R/S)-HODE, 60% S isomer and 40% R isomer for 13-HODE and 15-HETE, suggesting that the lipoxygenation was a minor process compared with what occurred in T2D.

The preincubation of platelets with HDL from patients with T2D resulted in an inhibition of collagen-induced platelet aggregation compared with control platelets incubated with collagen (Figure 4B). The inhibitory effect of patient HDL on collagen-induced platelet aggregation was stronger than the one induced by control HDL because 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ patients' HDL inhibited collagen-induced platelet aggregation by 63% whereas 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ control HDL inhibited it by 28%. To establish the role of oxidized PL in the antiaggregating effects of HDL, HDL were enriched with PC(16:0/13-HODE) to obtain similar amounts of hydroxylated fatty acid as those found in T2D HDL (Figure 4C). PC(16:0/13-HODE) enriched HDL inhibited collagen-induced platelet aggregation to a similar extent as patient HDL (Figure 4D).

Discussion

The present results suggest that HDL modified by glycoxidation inhibited platelet aggregation via SR-BI in a dose-dependent manner and displayed higher antiaggregatory potency than control HDL. Regarding the platelet-signaling cascade involved in the mechanism of action of HDL, we present new data showing that in vitro glycoxidized HDL prevented both the collagen-induced increased phosphorylation of p38 MAPK, the stress kinase responsible for the phosphorylation of cPLA₂ (24) and that of cPLA₂, the key enzyme involved in the release of AA from membrane PL (25), which constitutes a rate-limiting step in the biosynthesis of biologically active eicosanoids. Supporting our in vitro results, we show for the first time that HDL from patients with T2D also inhibited platelet aggregation via SR-BI at concentrations as low as 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Our results are in line with our previous results reporting anti-

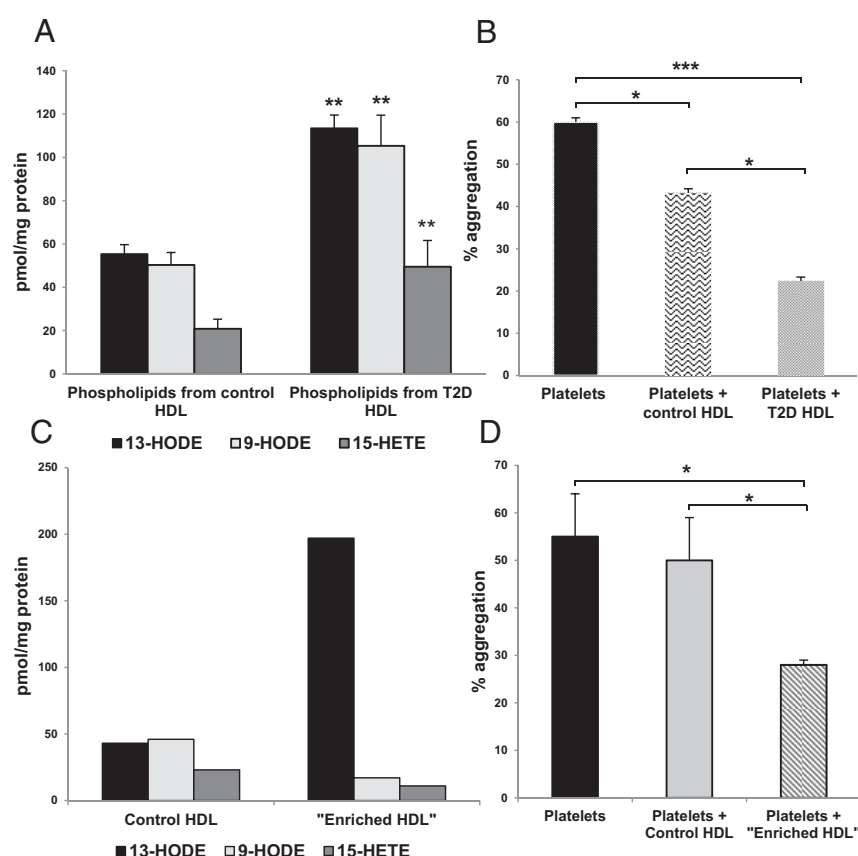


Figure 4. Hydroxylated fatty acids in HDL phospholipids from control healthy subjects and from patients with T2D. Effects of respective HDL on collagen-induced platelet aggregation. A, Concentrations of 13-HODE, 9-HODE, and 15-HETE in HDL PL from five control healthy subjects and five patients with T2D. Results are the means $\pm$ SEM. **, $P < .01$ vs HDL from control subjects. B, Platelet aggregation monitored in platelets isolated from healthy donors, preincubated for 5 minutes at 37°C in the absence or presence of HDL (50 µg/mL) from control subjects and patients with T2D for 5 minutes at 37°C, and then stimulated with collagen (2.5–5 µg/mL). Results are the means $\pm$ SEM of eight independent experiments performed with eight different preparations of HDL and platelets. Asterisks suggest significant differences (*, $P < .05$; ***, $P < .001$). C, Concentrations of 13-HODE, 9-HODE, and 15-HETE in HDL samples enriched with PC(16:0/13-HODE) ("enriched HDL") or not (control HDL), $n = 2$. D, Collagen-induced aggregation obtained in platelets preincubated for 5 minutes at 37°C in the absence (control HDL) or presence of HDL enriched with [PC(16:0/13-HODE)] ("enriched HDL") and stimulated with collagen. Results are the means $\pm$ SEM of four different preparations of control and enriched HDL. Asterisks indicate significant differences (*, $P < .05$).

aggregatory properties of severely oxidized HDL isolated from patients with abetalipoproteinemia, an orphan metabolic disease characterized by the absence of apolipoprotein B-containing lipoproteins (26), and extend them in T2D, a common and growing disease known to be associated with chronic oxidative stress (27). Patients with T2D, with (28) or without cardiovascular complications (29), show platelet hyperactivation evidenced by increased platelet adhesion and aggregation as well as increased thromboxane A_2 production. Oxidatively modified lipoproteins present in plasma from patients with T2D may represent important contributing factors modulating platelet activation, as shown with oxidized LDL from patients with T2D which activate platelets (30). Decreased plasma levels of HDL in patients with T2D lead to lower levels of oxidized

HDL, and it is likely that the antiaggregatory effects of HDL from T2D may be reduced and might indirectly contribute to platelet hyperactivation in T2D. So far, few studies have investigated the effects of oxidized HDL on platelet function. Although it has been shown that hypochlorite-oxidized HDL may stimulate platelet aggregation via CD36 (31), HDL oxidatively modified by copper sulfate or myeloperoxidase strongly inhibit agonist-induced platelet activation and aggregation via SR-BI (15). Besides effects of HDL on platelet function, oxidative modification of HDL (as a result of in vitro oxidation or diabetes) may decrease cholesterol efflux capacity (32, 33), impair their capacity to protect LDL from oxidation (10), and alter their anti-inflammatory properties (34). Nevertheless, a few studies reported beneficial effects of HDL modified by oxidative tyrosylation on the efflux of cholesterol in fibroblasts and macrophages (35). Altogether, these discrepant results might be related to differences in the extent and type of HDL oxidation, which may determine the binding of HDL to either SR-BI or CD36 platelet receptors and the capacity of HDL to inhibit or stimulate platelet aggregation by binding either to SR-BI or CD36 respectively (36). Our results are also in agreement with studies demonstrating that copper-oxidized HDL showed better binding to platelet SR-BI than native

HDL (15), and showing that oxidized HDL were more effective competitors than native HDL in cultured endothelial cells (8). In addition, it has been reported that the abundance of human SR-BI was reduced on the surface of platelets from patients with atherosclerotic disease and that its expression level correlated negatively with platelet aggregation (23), which might impair the antiaggregatory properties of HDL in patients with T2D.

We also establish the contribution of PL esterified with oxidized LA, especially PC(16:0/13-HODE), in the antiaggregatory properties of glycoxidized HDL. First, HODEs and 15-HETE were strongly increased in PL from in vitro glycoxidized HDL. It was associated with decreased proportions of LA and AA in this class of lipids,

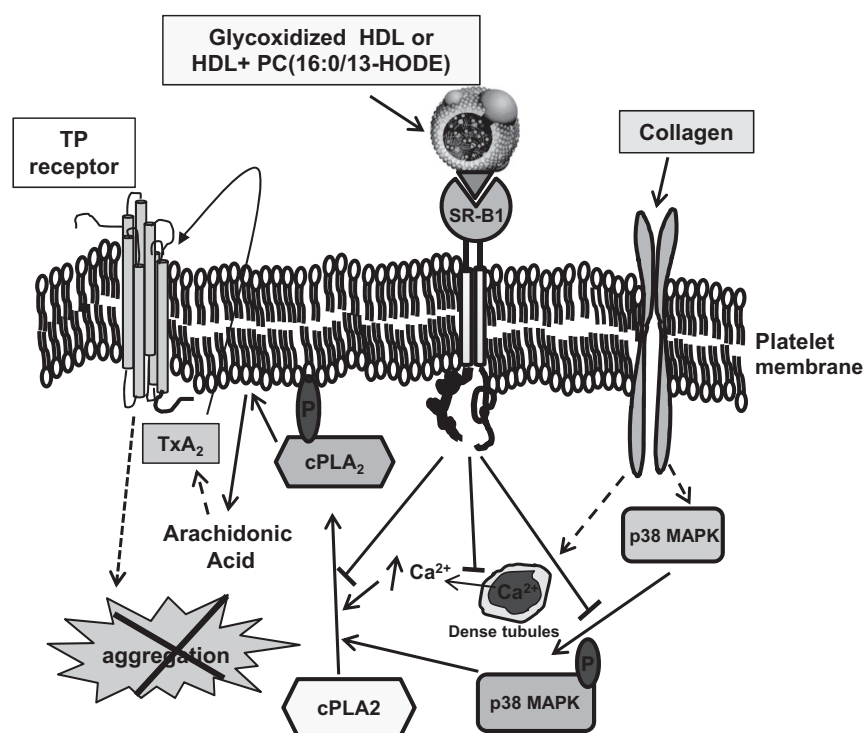


Figure 5. Summary diagram for the effects of glycoxidized HDL on platelet signaling pathways. Binding of glycoxidized HDL or HDL enriched with PC(16:0/13-HODE) to SR-B1 receptor on platelet membranes led to the inhibition of signaling pathways through decreased phosphorylated p38 MAPK and cPLA₂ levels and inhibited collagen-induced platelet aggregation.

increased MDA levels, and vitamin E consumption. Increased concentrations of HODE and 15-HETE, originating from both enzymatic and nonenzymatic lipid peroxidation, were also observed in HDL PL from patients with T2D compared with control HDL. It should be underlined that the concentrations of HODEs and HETE in HDL PL were negatively associated with collagen-induced platelet aggregation ($r = -0.65$, $P = .004$). This confirms PL esterified with oxidized LA as important biologically active components supporting protective effects of HDL against platelet aggregation. Second, in vitro enrichment of HDL in phosphatidylcholine carrying out 13(S)-HODE inhibited platelet aggregation whereas enrichment of HDL with nonoxidized phosphatidylcholine had no significant effect on platelet aggregation. Similar increases of 13-HODE, 9-HODE, and 15-HETE have been recently described in HDL total lipids from patients with diabetes compared with those from patients without diabetes (37) but this is the first evidence of increased content of hydroxylated fatty acids in the phospholipid class of HDL from patients with T2D correlated with atheroprotective activities of HDL. Moreover, the association of higher levels of oxidized PL in HDL and lower response to aggregation are in line with the Cardiovascular Risk in Young Finns study suggesting that an elevated cardiovascular risk profile was associated with lower oxidized HDL lipids levels (38). Due to their localization at the surface of HDL particles, it is

conceivable that PL are more accessible targets of free radicals compared with CE and TAG localized in the core of HDL, and are more likely to interfere with platelets following SR-B1 interaction. In addition, the structure of lipoproteins in the physiological conditions might increase the preferential oxidation of linoleate into HODE over cholesterol as shown in human plasma (39). A limitation of our study is that lipidomic analyses were limited to HODE and HETE species, including their stereo-isomers. The contribution of other oxidized lipid species should be explored to decipher the molecules involved in the protective role of glycoxidized HDL on platelet aggregation, although inhibition of platelet aggregation by exogenous PC(16:0/13-HODE) was very similar to that observed by endogenous ones in glycoxidized HDL as well as in HDL from patients with T2D.

We conclude from our experiments that as far as platelet aggregation is concerned, the ability of HDL to decrease platelet aggregation is not impaired in glycoxidized HDL, but even increased compared with control HDL. Supporting our in vitro results, we also show that glycoxidized HDL from patients with T2D retain their antiaggregating properties. We show that the HDL content of hydroxylated fatty acids esterified in PL could contribute to the inhibitory effects of glycoxidized HDL on platelet aggregation and associated signaling pathways through SR-B1 (Figure 5). Our consistent findings challenge the concept of the systematic detrimental effects of oxidized lipids on atherothrombosis.

Acknowledgments

The authors are grateful to all participants for their cooperation and to the nurses at Hospices Civils de Lyon for their expert blood drawing.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr Catherine Calzada, Inserm UMR.1060/Université de Lyon, Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie, et Nutrition, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, IMBL, Bât. Louis Pasteur, 20 Avenue Albert Einstein, 69621 Villeurbanne, France. E-mail: catherine.calzada@insa-lyon.fr.

This work was supported by Inserm. Q.H.L. is funded by the French Ministry of Education and Research for his PhD thesis.

M.E.A thanks the “Région Rhône-Alpes” for a PhD grant. C.C. is supported by the CNRS.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Marsche G, Saemann MD, Heinemann A, Holzer M. Inflammation alters HDL composition and function: Implications for HDL-raising therapies. *Pharmacol Ther*. 2013;137:341–351.
- Davidsson P, Hulthe J, Fagerberg B, Camejo G. Proteomics of apolipoproteins and associated proteins from plasma high-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:156–163.
- Kontush A, Lhomme M, Chapman MJ. Unraveling the complexities of the HDL lipidome. *J Lipid Res*. 2013;54:2950–2963.
- Bowry VW, Stanley KK, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:10316–10320.
- Proudfoot JM, Barden AE, Loke WM, Croft KD, Puddey IB, Mori TA. HDL is the major lipoprotein carrier of plasma F2-isoprostanes. *J Lipid Res*. 2009;50:716–722.
- Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: Steps 2 and 3. *J Lipid Res*. 2000;41:1495–1508.
- Nakano T, Nagata A. Immunochemical detection of circulating oxidized high-density lipoprotein with anti-oxidized apolipoprotein A-I monoclonal antibody. *J Lab Clin Med*. 2003;141:378–384.
- Nakajima T, Origuchi N, Matsunaga T, et al. Localization of oxidized HDL in atherosclerotic plaques and oxidized HDL binding sites on human aortic endothelial cells. *Ann Clin Biochem*. 2000;37:179–186.
- Ueda M, Hayase Y, Mashiba S. Establishment and evaluation of 2 monoclonal antibodies against oxidized apolipoprotein A-I (apoA-I) and its application to determine blood oxidized apoA-I levels. *Clin Chim Acta*. 2007;378:105–111.
- Nobécourt E, Jacqueminet S, Hansel B, et al. Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia. *Diabetologia*. 2005;48:529–538.
- Sorrentino SA, Besler C, Rohrer L, et al. Endothelial-vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy. *Circulation*. 2010;121:110–122.
- Low H, Hoang A, Forbes J, et al. Advanced glycation end-products (AGEs) and functionality of reverse cholesterol transport in patients with type 2 diabetes and in mouse models. *Diabetologia*. 2012;55:2513–2521.
- de Vries R, Groen AK, Pertion FG, et al. Increased cholesterol efflux from cultured fibroblasts to plasma from hypertriglyceridemic type 2 diabetic patients: roles of pre beta-HDL, phospholipid transfer protein and cholesterol esterification. *Atherosclerosis*. 2008;196:733–741.
- Assinger A, Schmid W, Eder S, Schmid D, Koller E, Volf I. Oxidation by hypochlorite converts protective HDL into a potent platelet agonist. *FEBS Lett*. 2008;582:778–784.
- Valiyaveetil M, Kar N, Ashraf MZ, Byzova TV. Oxidized high-density lipoprotein inhibits platelet activation and aggregation via scavenger receptor BI. *Blood*. 2008;111:1962–1971.
- Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*. 1955;34:1345–1353.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265–275.
- Lagarde M, Bryon PA, Guichardant M, Dechavanne M. A simple and efficient method for platelet isolation from their plasma. *Thromb Res*. 1980;17:581–588.
- Januel C, El Hentati FZ, Carreras M, et al. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx-4) localization in resting platelets, and compartmental change during platelet activation. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761:1228–1234.
- Schmidpeter A, Luber J. Spirophosphoranes from acylhydrazines and phosphorus(III) compounds. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1972;11:306–307.
- Duclos RI. Synthesis of 1-palmitoyl-2-hexadecyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PHPC). *Chem Phys Lipids*. 1993;66:161–170.
- Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962;194:927–929.
- Imachi H, Murao K, Cao W, et al. Expression of human scavenger receptor B1 on and in human platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:898–904.
- Börsch-Haubold AG, Kramer RM, Watson SP. Phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by 38-kDa mitogen-activated protein kinase in collagen-stimulated human platelets. *Eur J Biochem*. 1997;245:751–759.
- Kramer RM, Sharp JD. Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). *FEBS Lett*. 1997;410:49–53.
- Calzada C, Véricel E, Colas R, et al. Inhibitory effects of in vivo oxidized high-density lipoproteins on platelet aggregation: Evidence from patients with abetalipoproteinemia. *FASEB J*. 2013;27:2855–2861.
- Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53:119–124.
- Ferroni P, Basili S, Falco A, Davì G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1282–1291.
- 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;53:1046–1051.
- Colas R, Sassolas A, Guichardant M, et al. LDL from obese patients with the metabolic syndrome show increased lipid peroxidation and activate platelets. *Diabetologia*. 2011;54:2931–2940.
- Assinger A, Koller F, Schmid W, et al. Specific binding of hypochlorite-oxidized HDL to platelet CD36 triggers proinflammatory and procoagulant effects. *Atherosclerosis*. 2010;212:153–160.
- Nagano Y, Arai H, Kita T. High density lipoprotein loses its effect to stimulate efflux of cholesterol from foam cells after oxidative modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:6457–6461.
- Cavallero E, Brites F, Delfly B, et al. Abnormal reverse cholesterol transport in controlled type II diabetic patients. Studies on fasting and postprandial LpA-I particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:2130–2135.
- Morgantini C, Natali A, Boldrini B, et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of HDLs are impaired in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2011;60:2617–2623.
- Francis GA, Mendez AJ, Bierman EL, Heinecke JW. Oxidative tyrosylation of high density lipoprotein by peroxidase enhances cholesterol removal from cultured fibroblasts and macrophage foam cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:6631–6635.
- van der Stoep M, Korpelaar SJ, Van Eck M. High-density lipoprotein as a modulator of platelet and coagulation responses. *Cardiovasc Res*. 2014;103:362–371.
- Morgantini C, Meriwether D, Baldi S, et al. HDL lipid composition is profoundly altered in patients with type 2 diabetes and atherosclerotic vascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc*. 2014;24:594–599.
- Kresanov P, Ahotupa M, Vasankari T, et al. The associations of oxidized high-density lipoprotein lipids with risk factors for atherosclerosis: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:1284–1290.
- Yoshida Y, Niki E. Relative susceptibilities of linoleates and cholesterol to oxidation assessed by total hydroxyoctadecadienoic acid and 7-hydroxycholesterol. *J Oleo Sci*. 2008;57:407–414.

Moderate oral supplementation with docosahexaenoic acid improves platelet function and oxidative stress in type 2 diabetic patients

Evelyne Véricel¹; Romain Colas¹; Catherine Calzada¹; Quang Huy Lê¹; Nathalie Feugier²; Christine Cugnet³; Hubert Vidal¹; Martine Laville^{1,2}; Philippe Moulin^{1,3}; Michel Lagarde¹

¹Université de Lyon, Inserm UMR 1060, Laboratoire CarMeN, Université Claude Bernard Lyon 1, INSA-Lyon, Villeurbanne, France; ²Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Pierre-Bénite, France; ³Hôpital Cardiovasculaire Louis Pradel, Lyon-Bron, France

Summary

Platelets from patients with type 2 diabetes are characterised by hyperactivation and high level of oxidative stress. Docosahexaenoic acid (DHA) may have beneficial effects on platelet reactivity and redox status. We investigated whether moderate DHA supplementation, given as a triglyceride form, may correct platelet dysfunction and redox imbalance in patients with type 2 diabetes. We conducted a randomised, double-blind, placebo-controlled, two-period crossover trial (n=11 post-menopausal women with type 2 diabetes) to test the effects of 400 mg/day of DHA intake for two weeks on platelet aggregation, markers of arachidonic acid metabolism, lipid peroxidation status, and lipid composition. Each two week-period was separated from the other by a six-week washout. Daily moderate dose DHA supplementation resulted in reduced platelet aggregation induced by

collagen (-46.5 %, $p < 0.001$), and decreased platelet thromboxane B₂ (-35 %, $p < 0.001$), urinary 11-dehydro-thromboxane B₂ (-13.2 %, $p < 0.001$) and F₂-isoprostane levels (-19.6 %, $p < 0.001$) associated with a significant increase of plasma and platelet vitamin E concentrations (+20 % and +11.8 %, respectively, $p < 0.001$). The proportions of DHA increased both in plasma lipids and in platelet phospholipids. After placebo treatment, there was no effect on any parameters tested. Our findings support a significant beneficial effect of low intake of DHA on platelet function and a favourable role in reducing oxidative stress associated with diabetes.

Keywords

Platelet aggregation, arachidonic acid, vitamin E, isoprostane, plasma and platelet lipid composition

Correspondence to:

Evelyne Véricel
UMR Inserm U.1060 / Université de Lyon / INSA-Lyon,
Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition CarMeN,
IMBL, Bât Louis Pasteur, INSA, 20 Ave A. Einstein
69621 Villeurbanne Cedex, France
Tel.: +33 4 72 43 84 79, Fax: +33 4 72 43 85 24
E-mail : evelyne.vericel@insa-lyon.fr

Financial support:

This work was supported by Inserm and a grant from the Fondation Cœur & Artères.

Received: December 2, 2014

Accepted after major revision: February 1, 2015

Epub ahead of print: April 2, 2015

<http://dx.doi.org/10.1160/TH14-12-1003>

Thromb Haemost 2015; 114: 289–296

Introduction

In 2035, the number of people affected by diabetes mellitus could reach more than 550 million in the world (1). Moreover, cardiovascular disease is one of mortality causes in type 2 diabetes (2). Indeed, it is fully recognised that long-term macrovascular complications are the main cause of morbidity and mortality associated with diabetes. In type 2 diabetes, a complex interplay occurs between hyperglycaemia and oxidative stress. Factors that may contribute to increased oxidative stress in diabetes mellitus include protein glycation, increased formation of reactive oxygen species, and antioxidant deficiencies (3, 4). On the other hand, it is generally admitted that platelet activation contributes to the increased incidence of thrombotic and atherosclerotic diseases. During platelet activation, several steps occur including the release of arachidonic acid (ARA) from membrane phospholipids. Once released, ARA can be oxygenated into thromboxane A₂ (TxA₂), a potent pro-aggregatory and vaso-constricting compound (5) that rapidly breaks down to form the stable and inactive product thromboxane

B₂ (TxB₂). Moreover, we have shown that increased platelet aggregation is already detectable in diabetic patients who do not suffer from vascular complications linked with impairment of antioxidant mechanisms (6).

For several decades, there has been accumulating evidence that n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) could protect against cardiovascular diseases and interestingly, there is a low prevalence of diabetes and coronary heart disease in populations known for high intake of n-3 fatty acids (7, 8). Because of the pivotal role of platelets in the regulation of hemostasis and athero-thrombosis, some studies have focused on the effects of n-3 PUFA on these cells. It is widely accepted that eicosapentaenoic (EPA or 20:5n-3) and docosahexaenoic (DHA or 22:6n-3) acids can decrease platelet function (9). Moreover, DHA could be associated with reduced progression of coronary atherosclerosis (10). Despite these described protective effects, some studies failed to report a beneficial association between n-3 PUFA consumption and cardiovascular events (11). Among some explanations for these discordant results, some pertain to the high unsaturation of these PUFA. Indeed, DHA is

highly oxidisable owing to the presence of six double bonds, and it is known that lipid peroxidation provides some peroxidised lipids increasing the oxidative stress. Such a lipid peroxidation has been implicated to the pathogenesis of cardiovascular diseases (12). Previously, we have shown a bimodal *in vitro* effect of DHA with antioxidant and pro-oxidant effects at low and high concentrations, respectively (13). More recently, we have conducted an *ex vivo* study, with healthy volunteers, which has shown the validity of our *in vitro* findings (14). Following ingestion of increasing doses of DHA (200, 400, 800, 1600 mg/day of DHA for two weeks each), we have shown that platelet reactivity was decreased after 400 and 800 mg DHA/day. It was concluded that low consumption of DHA (400 to 800 mg/day) could be an effective “treatment” to protect healthy volunteers from platelet-related cardiovascular events.

These data prompted us to perform a randomised double-blind study to determine whether a modest intake of DHA (400 mg/day for two weeks) may be also beneficial in type 2 diabetic patients, a population characterised by platelet hyperactivity, impaired antioxidant defense, and increased oxidative stress, in opposing that oxidative stress or synergising with it.

Materials and methods

Materials

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, Fallavier, France). All solvents were provided by Carlo Erba-Reactifs (Val de Reuil, France). Silica gels 60 plates were supplied by Merck (VWR International, Strasbourg, France).

Ethics statement

Informed, written consents were obtained from all participants and the protocol was approved by the local ethic committee, the “Comité de Protection des Personnes Sud-Est II” (Clinical-Trials.gov Identifier is NCT01150292).

Study design

Eleven post-menopausal women with type 2 diabetes participated. Subjects with diabetes had recent glycated haemoglobin (HbA1c: $7.89 \pm 1.27\%$, 62.8 ± 14.1 mmol/mol, $n=11$), anti-diabetic drugs but no drugs known to affect platelet function

(acetylsalicylic acid, clopidogrel, gliclazide, ticlopidine, non-steroidal anti-inflammatory drugs). A randomised, placebo-controlled clinical trial was conducted. The subjects were randomly assigned in double-blind fashion to DHA or placebo, administered for two weeks. After baseline visit, subjects were randomly assigned to take two capsules/day of DHA or placebo with meals for two weeks, then, after six weeks of wash out, subjects took two capsules/day of placebo or DHA (► Figure 1). Capsules of DHA (Pro-Mind) were supplied by Decola (Maldegem, Belgium). Each capsule contained 200 mg DHA, as the only PUFA, in triglycerides from algal oil, 175 mg gelatin, 0.125 mg DL-alpha-tocopherol, and 0.125 mg ascorbic palmitate. Placebo capsules were made, specifically upon our request, by Ayanda GmbH & Co.KG (Pritwalk, Germany) and contained the same quantities of antioxidants and triglycerides of sunflower oil. Placebo and DHA capsules were indistinguishable and independently packaged by the Central Pharmacy of the hospital (Hospices Civils de Lyon). Pharmacists dispensed placebo or DHA capsules in a random process. All study personnel and participants were blinded to treatment assignment and the code was only revealed to the researchers after laboratory analyses were completed. A dietary record was obtained on the first visit and dietary changes monitored at each visit.

Blood and urine samples were collected after overnight fasting before and after each supplementation. Urine samples were stored immediately at -80°C in presence of butylated hydroxy-toluene (BHT).

Plasma lipid measurements

Total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-, low-density lipoprotein (LDL)- cholesterol and triglyceride concentrations were measured using commercial enzymatic kits. Intra-assay and inter-assay coefficients of variation were $<10\%$.

Plasma preparation and isolation of platelets

Blood samples were collected in tubes containing acid-citrate-dextrose (0.8% citric acid, 2.2% sodium citrate, and 2.45% dextrose, 6:1 v/v) and platelets were isolated as described previously (15). The supernatant removed from above the platelet pellet was centrifuged for 10 minutes (min) at 18°C to obtain platelet-poor plasma.

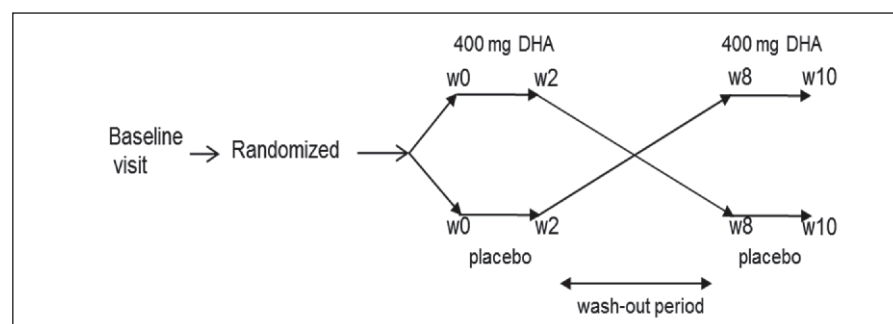


Figure 1: Study design.

Platelet aggregation

Collagen (Horm, from Nycomed, Linz, Austria) was used as agonist to induce platelet aggregation in a Chronolog dual-channel aggregometer (Coulter, Margency, France) according to the turbidimetric method of Born (16). Intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 5% and 6%, respectively, with a lower detection limit of <0.1%.

Arachidonic acid metabolism

Metabolism of exogenous arachidonic acid

The oxygenation of ARA through the lipoxygenase and cyclooxygenase pathways was determined by incubating 2.2 µM of [$1-^{14}\text{C}$] ARA (specific activity 2.07 GBq/mmol, G.E. Healthcare, Vélisy-Villacoublay) with platelets for 4 min at 37°C. Following lipid extraction and thin-layer chromatography (TLC) separation, oxygenated products were visualised and quantified with a TLC analyser radioscanner (Raytest, Paris, France) (17). Intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 9% and 10%, respectively, with a lower detection limit of <0.1%.

Basal formation of platelet thromboxane B_2 and its urinary 11-dehydro metabolite

In the absence of specific stimulation, platelets in presence of BHT as an antioxidant (5×10^{-5} mol/l) were immediately frozen. TxB_2 was quantified by immunoassay according to the manufacturer's recommendations (Enzo Life Sciences, Lyon, France) (Intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 4%). Spot urine samples were collected and stored immediately at -80°C in presence of BHT, and then 11-dehydro- TxB_2 was also quantified by immunoassay. Intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 12% and 13%, respectively, and the limit of detection was 10 pg/ml for both kits.

Antioxidant status

Plasma and platelet vitamin E

Alpha- and gamma-tocopherol concentrations were determined according to a described method (18). Briefly, after extraction with hexane, tocopherol isomers were separated by reverse-phase HPLC and detected by fluorimetry (excitation and emission at 295 nm and 340 nm, respectively). Intra-assays and inter-assay coefficients of variation were <5% and the limit of detection was 4 pmol.

Lipid peroxidation markers

The malondialdehyde (MDA) content of unstimulated platelets was measured by the HPLC technique of Therasse and Lemonier (19) with fluorimetric detection (excitation 515 nm, emission 553 nm). Intra-assay and inter-assay coefficients of variation

were 12% and 15%, respectively, and the limit of detection was 5 pmol.

Urinary isoprostane (8-iso-PGF $_{2\alpha}$ or 15-F $_{2t}$ -IsoP) and creatinine were determined by immunoassay (Enzo Life Sciences, Lyon, France) and urinary isoprostane expressed per milligram of creatinine. Intra-assays and inter-assays coefficient of variations were 5% and 9%, respectively, and the limit of detection was 15 pg/ml for isoprostane kit. Intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 4% and 3%, respectively, and the limit of detection was 0.3 µg/ml for creatinine kit.

Lipid analysis

Plasma lipids were extracted twice with chloroform/ethanol (2:1, v/v) containing BHT and 1,2-diheptadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine as an internal standard and transmethylated with methanol (20). Fatty acid methyl esters (FAMES) were analysed by gas chromatography (GC) and values were calculated as mole percentages (mol%) of all FAMES determined (C_{16} to C_{24}).

Platelet lipids were extracted twice with chloroform/ethanol (2:1, v/v) containing BHT and 1,2-diheptadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine and 1,2-diheptadecanoyl-*sn*-3-phosphoethanolamine as internal standards. Phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) were separated by TLC, transmethylated with methanol and analysed by GC. Intra-assay and inter-assay coefficients of variation were between 3% and 10% according to the fatty acid, and the limit of detection was 10 ng.

Sample size calculation

The sample size calculation was based on our previous data. Considering that, first the percent of aggregation was increased in diabetic patients compared to controls (6), and second 400 mg-DHA ingestion in healthy volunteers decreased platelet aggregation induced by collagen (14), we estimated that 13 subjects would give 80% power to detect a 40% difference in platelet aggregation induced by collagen at a significance level of $p=0.05$. Fourteen diabetic patients were recruited but three voluntarily withdrew.

Statistical analysis

The study was designed as a two-period crossover study with double blinding to the order of randomisation to DHA or placebo. Statistical analyses were performed by using StatView 5 for Windows (Abacus Corp, Baltimore, MD, USA). The non-parametric Friedman test was used to analyse the differences for all the variables. Wilcoxon's post-test was used to identify group differences. Results are presented as mean $\pm$ SEM ($n=11$).

Results

Subjects' characteristics

Eleven post-menopausal women with type 2 diabetes were included in the protocol analysis. Their mean age was 59.8 ± 4.7

	Pre DHA	Post DHA	Pre placebo	Post placebo
Weight (kg)	84.2 ± 4.8	83.3 ± 5	83.7 ± 4.6	83.8 ± 4.8
Diastolic blood pressure (mmHg)	75.8 ± 1.5	77.8 ± 3	79 ± 3	74.2 ± 2.8
Systolic blood pressure (mmHg)	137 ± 5.9	141.2 ± 5.2	137.8 ± 3.7	137.3 ± 6.3
Triglycerides (mmol/l)	1.67 ± 0.8	1.51 ± 0.16	1.75 ± 0.17	1.91 ± 0.24
Total cholesterol (mmol/l)	4.37 ± 0.23	4.47 ± 0.33	4.59 ± 0.30	4.30 ± 0.25
HDL cholesterol (mmol/l)	1.18 ± 0.06	1.18 ± 0.08	1.13 ± 0.07	1.12 ± 0.07
LDL cholesterol (mmol/l)	2.41 ± 0.26	2.53 ± 0.30	2.54 ± 0.33	2.35 ± 0.21

Data are means ± SEM (n=11). There were no significant differences between pre DHA and post DHA values and between pre placebo and post placebo values.

Table 1: Characteristics of participants before and after DHA or placebo supplementation.

years at baseline. Some anthropometric variables were measured such as body mass index (BMI) ($34.1 \pm 5.1 \text{ kg/m}^2$), waist and hip circumferences ($113.7 \pm 10.1 \text{ cm}$ and $115 \pm 10.5 \text{ cm}$, respectively, n=9 to 11). Patients followed the DHA and placebo supplementations without any reported difficulty. According to patient self-reports, lifestyle and medication were unchanged throughout the study. As reported in ►Table 1, there were no significant differences in metabolic parameters measured during placebo or DHA treatment.

Platelet aggregation

As shown in ►Figure 2, platelet aggregation induced by $0.05 \mu\text{g/ml}$ collagen was significantly decreased (-46.5%) after the 400 mg/d DHA supplementation compared to baseline. No effect was observed after placebo treatment.

Platelet metabolism

Incubations of platelets with exogenous ARA allowed us to determine the specific oxygenation of this fatty acid by cyclooxygenase

and 12-lipoxygenase. Interestingly, DHA intake affected significantly the formation of TxB_2 with a decrease of 35% (►Table 2). Moreover, 12-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid (HHT), the other main cyclooxygenase product in platelets was decreased by 16.4% ($p=0.06$). Altogether, a significant decrease of the cyclooxygenase pathway was noted whereas the formation of 12-HETE, the lipoxygenase end-product, was not affected by DHA supplementation (►Table 2). In the absence of specific stimulation, lower amount of basal TxB_2 was found after DHA intake compared to before DHA (►Table 2). One major urinary metabolite of TxB_2 (11-dehydro- TxB_2) was also significantly decreased after DHA supplementation (►Table 2). No effect was observed after placebo treatment.

Antioxidant status and lipid peroxidation

To evaluate the antioxidant status, alpha-tocopherol level, an effective lipophilic antioxidant and free radical scavenger, was determined in both plasma and platelets. As shown in ►Table 2, significant increases of plasma and platelet alpha-tocopherol levels were observed after DHA intake compared to tocopherol levels before supplementation. A tendency to the increase was observed for platelet gamma-tocopherol levels but the difference did not reach statistical significance (pre DHA: 34.1 ± 1.7 vs post DHA: $39.5 \pm 2.8 \text{ pmol/mg prot.}$, $p=0.09$, $n=10$). To assess the overall lipid peroxide levels in platelets, platelet MDA contents were determined and a tendency to decrease was observed ($p=0.06$) (►Table 2) after DHA supplementation compared to pre DHA. Finally, we measured a urinary marker of oxidative stress, 8-iso-PGF_{2alpha} (or 15-F_{2t}-IsoP). The level of this marker was significantly decreased after DHA intake compared to the control before supplementation of DHA (►Table 2). No effect on the antioxidant status and lipid peroxidation was observed after placebo treatment as compared to the situation before placebo.

Fatty acid composition of plasma and platelet lipids

In plasma, supplementation of the diet with 400 mg DHA/d for 2 weeks, induced a significant increase of DHA ($+40\%$) in total lipids (►Figure 3A). This result reflects acceptable compliance for

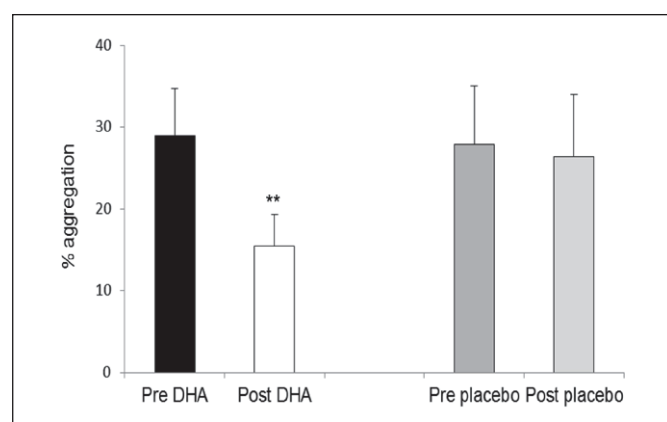


Figure 2: Influence of DHA or placebo intake on platelet aggregation. Percentages of aggregation were assessed 4 min after the addition of $0.05 \mu\text{g/ml}$ collagen. All values are means ± SEM, $n=11$. ** $p<0.001$ post DHA vs pre DHA.

Table 2: Effect of DHA and placebo on platelet arachidonic acid metabolism, antioxidant status and lipid peroxidation.

	Pre DHA	Post DHA	Pre placebo	Post placebo
TxB ₂ (nmol/mg prot.)	0.92 ± 0.2	0.60 ± 0.16**	0.68 ± 0.11	0.55 ± 0.07
HHT (nmol/mg prot.)	0.55 ± 0.09	0.46 ± 0.10	0.47 ± 0.06	0.46 ± 0.05
TxB ₂ + HHT (nmol/mg prot.)	1.48 ± 0.28	1.07 ± 0.26*	1.15 ± 0.17	1.02 ± 0.12
12-HETE (nmol/mg prot.)	0.27 ± 0.08	0.24 ± 0.07	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.02
Basal TxB ₂ (pmol/mg prot.)	102.9 ± 14	70.9 ± 12.1**	81.2 ± 13.6	85.1 ± 13.3
11-dehydro-TxB ₂ (ng/mg creat.)	6.1 ± 0.5	5.3 ± 0.4**	5.8 ± 0.6	6.2 ± 0.8
Plasma vitamin E (nmol/ml) n=10	8.5 ± 0.9	10.2 ± 0.8**	11.2 ± 1.1	10.6 ± 1.2
Platelet vitamin E (pmol/mg prot.)	220.1 ± 13.5	246.1 ± 17.7**	251.1 ± 11.9	234.6 ± 12.1
MDA (pmol/mg prot.)	211.9 ± 36.4	147.2 ± 29.3	228.2 ± 48.1	219.1 ± 37.6
15-F2t-IsoP (ng/mg creat.)	5.1 ± 0.9	4.1 ± 0.8**	4.1 ± 0.7	5.2 ± 1

Formation of the main ARA metabolites through cyclooxygenase (TxB₂ and HHT) and lipoxygenase (12-HETE) produced after stimulation with 2.2 microM [14C] ARA during 4 min. at 37 °C (the first four lines). Platelet lipids were extracted and separated by TLC, and metabolites of [14C] ARA were quantified by radio-chromatography. Basal formations of TxB₂ in unstimulated platelets and of one major urinary metabolites of TxB₂, 11-dehydro-TxB₂, were quantified by immunoassays. Plasma, platelet vitamin E (alpha-tocopherol) and platelet MDA were extracted and quantified after HPLC separation. Urinary isoprostanes were quantified by immunoassays. There were no significant differences between pre placebo and post placebo values. All values are means ± SEM, n=11. *p<0.05, **p<0.001 compared to values before DHA (pre DHA).

capsule intake. Interestingly, this change was accompanied by a concomitant slight but significant decrease of 22:5n-3 (-9.9%) while 20:5n-3 proportion did not change significantly. No effect on the main n-6 fatty acids (18:2, 20:3 and 20:4) was observed (► Figure 3B). Regarding platelets, a significant increase of DHA in PC (+36%) was detected (► Figure 3C) as well as in PE (+29%) (► Figure 3E). As already found in plasma, the 22:5n-3 proportion decreased significantly in PE (-18.7%) and a tendency to decrease could be observed in PC (-10.7%). No effect on the main n-6 fatty acids (18:2, 20:3 and 20:4) was observed in PC (► Figure 3D) and PE (► Figure 3F) after DHA supplementation. Placebo supplementation had no significant effect either on plasma lipid composition or platelet phospholipids (► Figure 3A-F). Proportions of saturated fatty acids (and 16:0 and 18:0 dimethyl-acetals for PE, representing plasmalogens), and monounsaturated fatty acids remained constant for all plasma and platelet lipids (results not shown).

Discussion

Platelet aggregation is a complex process involving multiple receptors and signalling pathways. Collagen-induced platelet shape change and aggregation involves the participation of its receptors, the release of endogenous arachidonic acid and formation of TxA₂, and the response to the latter lipid mediator. Indeed, whole reactivity to collagen could not take into account the reactivity to other specific agonists such as ADP and epinephrine. Because we have previously shown that low supplementation of DHA can reduce platelet aggregation in response to collagen, in healthy volunteers

(14), the primary objective of this study was to investigate the efficacy of 400 mg DHA daily supplementation for two weeks on platelet function in type 2 diabetic patients, who are characterised by platelet hyperactivity (6). One of the main findings of the study is the demonstration that this modest oral dose of DHA was able to reduce platelet aggregation in response to collagen in post-menopausal women with type 2 diabetes mellitus. In such a population, Woodman et al. (21) and Venkatakrishnan et al. (22) already showed that DHA supplementation reduced collagen-induced platelet aggregation, but our result is the first one obtained after such a low DHA supplementation. In addition and in agreement with our data on platelet aggregation, we show for the first time that the conversion of exogenous ARA into cyclooxygenase products was decreased after DHA intake while conversion of ARA by the lipoxygenase pathway was not affected as already observed *in vitro* (23). Moreover, the basal formation of platelet TxB₂ was significantly reduced after DHA as well as the concentration of one major urinary metabolite (11-dehydro-TxB₂), which represents a biomarker of platelet activity (24), and reflects the whole biosynthesis of TxA₂ by platelets and extra-platelet sources. Altogether, our results indicate that moderate DHA intake efficiently decreased platelet reactivity in patients with type 2 diabetes mellitus.

Because of the high susceptibility of DHA to oxidative damage, care was taken to ensure that DHA supplementation did not increase lipid peroxidation. Indeed, numerous studies support the conclusion that there is an association between diabetes and oxidative stress. It is known that oxidative stress may be an important factor in the pathogenesis of cardio-vascular diseases (3), and also precedes the development of atherosclerosis as already shown in patients affected by type 1 (25) or type 2 diabetes without vascular

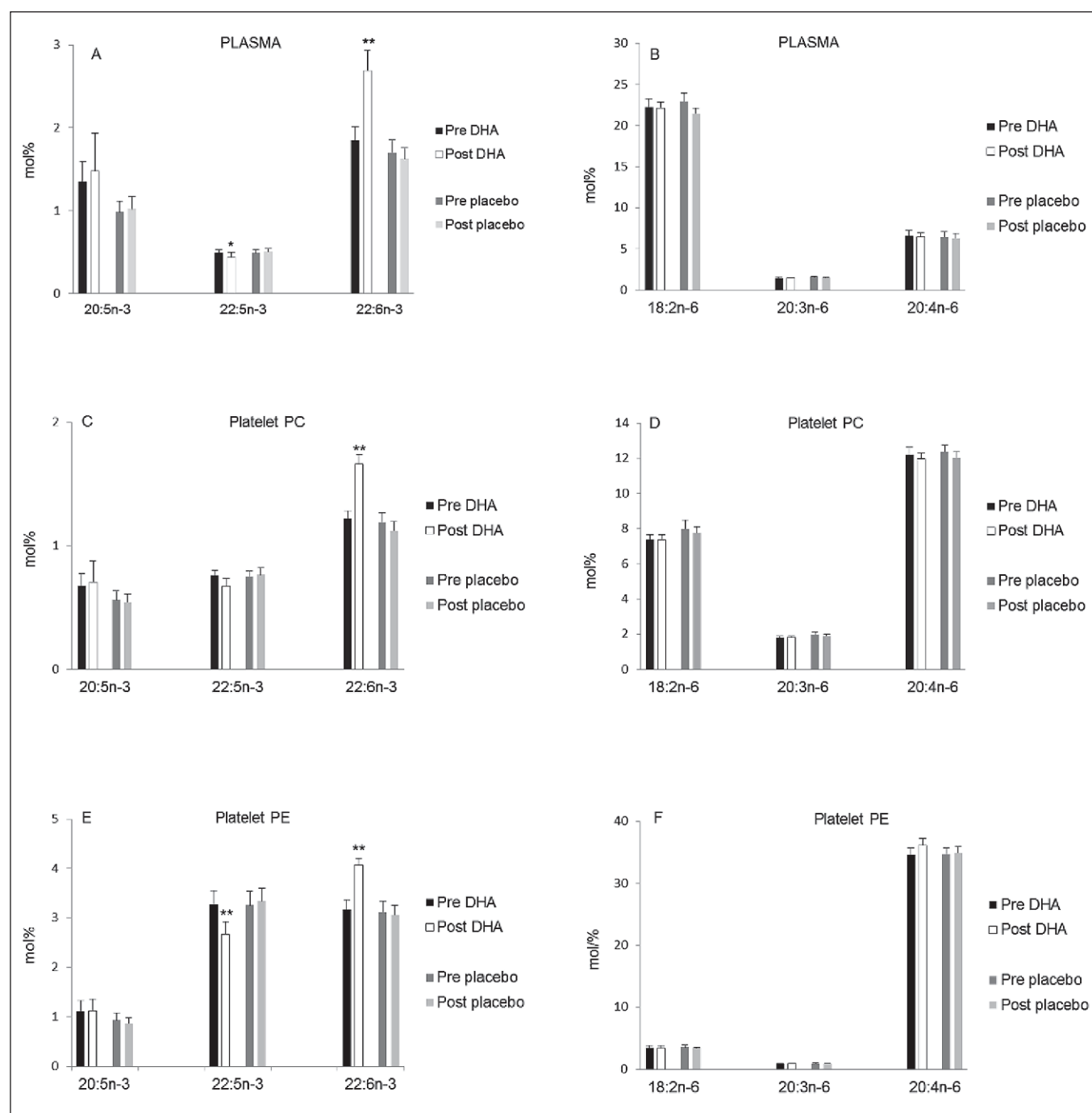


Figure 3: Effect of the DHA or placebo intake on plasma and platelet lipid composition. A) Effect of the DHA or placebo supplementation on main n-3 fatty acids in plasma. B) Effect of the DHA or placebo supplementation of DHA on main n-6 fatty acids in plasma. C) Effect of the DHA or placebo supplementation on main n-3 fatty acids in platelet phosphatidyl-

choline (PC). D) Effect of the DHA or placebo supplementation of DHA on main n-6 fatty acids in platelet PC. E) Effect of the DHA or placebo supplementation on main n-3 fatty acids in platelet phosphatidylethanolamine (PE). F) Effect of the DHA or placebo supplementation on main n-6 fatty acids in platelet PE. ** $p < 0.001$ post DHA vs pre DHA.

complications (6). Previously, it was shown that plasma MDA significantly decreased after n-3 PUFA (EPA+DHA) supplement in patients with type 2 diabetes mellitus (26) or did not increase after DHA or EPA intervention (27). Platelet MDA is considered as a global oxidative stress marker (produced by both enzymatic and

non-enzymatic oxidation). Interestingly, we observed a tendency, close to significance, to a decrease of platelet MDA after the 400 mg/d DHA supplement. Accordingly, F2-isoprostanes, products of free radical peroxidation of ARA, released by PLA₂ activity to the blood stream and finally excreted into urine, provide a reliable

measure of *in vivo* oxidative stress (28). As already shown by Mori et al. (29), we also found a significant decrease of 15-F_{2t}-isoprostane excretion following DHA intake. These results are also in agreement with those of McDonald et al. (30) who found an n-3 PUFA-mediated decrease in platelet isoprostane levels in a group of patients with type 2 diabetes. However, both studies (29, 30) dealt with much higher intake of EPA plus DHA. The augmented oxidative stress reported in diabetic patients (3, 6) may be the result of higher free radical production but also caused by decreased antioxidant defenses. For a long time, it has been reported that alpha-tocopherol level was decreased in plasma (31) as well as in platelets from patients with diabetes (6). Interestingly, our evaluation of plasma and platelet alpha-tocopherol levels before and after 400 mg/day DHA supplementation confirmed the efficacy of the intervention. Indeed, consistent with decreased lipid peroxidation, plasma and platelet vitamin E levels were significantly increased as already observed in platelets after low intake of EPA (18) or DHA (14).

Supplementation of patients with 400 mg/day DHA had no effect on the plasma lipid profile with no changes in the concentrations of total cholesterol, cholesterol fractions and triglycerides but it should be noted that the baseline values were already quite in the normality or borderline high. In agreement, several reports have indicated that DHA supplementation reduced plasma triglycerides with doses superior to 2 g/day (32) and had no significant effects on total cholesterol and lipid subfractions (33).

Baseline plasma DHA proportion is generally low because this fatty acid is consumed in small quantities in dietary lipids and the synthesis from alpha-linolenic and eicosapentaenoic acids is not efficient in humans. Consequently, a low supplementation like 400 mg/day DHA induced a substantial increase in plasma lipids vs baseline. We have indeed previously reported that a 200 mg/day DHA dose was sufficient to increase DHA proportion in both plasma phospholipids and cholesteryl esters in healthy men (14). As already reported (14, 34, 35), we found a decreased 22:5n-3 proportion in response to DHA intake. To explain this decrease, Conquer and Holub (36) had proposed a possible competition between DHA and 22:5n-3 to esterification into phospholipids while other modifications of metabolism could not be ruled out.

The biological actions of DHA may probably be due to different mechanisms induced by the fatty acid itself, esterified or not. Indeed, we cannot exclude some effects of DHA on the molecular organisation of plasma membrane according to its incorporation into phospholipids and the remodelling of cholesterol-enriched lipid microdomains (37). The effects of such small doses of DHA on the regulation of numerous gene products (38) have not been shown, but they cannot be excluded either. Moreover, since more than 10 years, there is a growing interest for the effects of DHA oxygenated metabolites either on oxidative stress (39) or on platelet aggregation (40). Thus, additional mechanisms may mediate the effects observed in the current study. Nevertheless, our results reinforce recommendations for a low intake of DHA but the duration of such a supplement remains to be established.

Altogether, in this randomised study, our findings indicate that a modest DHA intake, not only decreases platelet reactivity, but

What is known about this topic?

- Increased platelet function and oxidative stress are observed in patients with type 2 diabetes.
- DHA may exert athero-protective properties under certain conditions.
- DHA may have a bimodal effect with antioxidant and pro-oxidant at low and high concentrations, respectively.

What does this paper add?

- Moderate dose of DHA reduced platelet hyper-aggregation of patients with type 2 diabetes.
- In these conditions, DHA reduced oxidative stress associated with type 2 diabetes.
- Our study supports a beneficial effect of low intake of DHA in patients with type 2 diabetes.

offers an additional therapeutic benefit in reducing redox status in patients with type 2 diabetes mellitus. Our results reinforce the antioxidant potential of low doses of DHA already suggested in healthy subjects (14).

Acknowledgements

The authors are grateful to all patients for their cooperation. The authors thank and express deep gratitude to Drs Stéphanie Lambert-Porcheron and Migueline Nouvel for the patient recruitment. The authors also thank the staff at the Pharmacie Centrale des Hospices Civils de Lyon for the randomisation process and the dispatching of capsules, the nurses at the Department of Endocrinology and at the Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes for their expert blood drawing and some lipid analyses.

Conflicts of interest

None declared.

References

1. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract* 2014; 103: 137–149.
2. Barr ELM, Zimmet PZ, Welborn TA, et al. Risk of cardiovascular and all-cause mortality in individuals with diabetes mellitus, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study (AusDiab). *Circulation* 2007; 116: 151–157.
3. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1–9.
4. Zatalia SR, Sanusi H. The role of antioxidants in the pathophysiology, complications, and management of diabetes mellitus. *Acta Med Indones* 2013; 45: 141–147.
5. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci* 1975; 72: 2994–2998.
6. Véricel E, Januel C, Carreras M, et al. Diabetic patients without vascular complications display enhanced basal platelet activation and decreased antioxidant status. *Diabetes* 2004; 53: 1046–1051.

7. Feskens EJ, Virtanen SM, Rasanen L, et al. Dietary factors determining diabetes and impaired glucose tolerance: a 20-year follow-up of the Finnish and Dutch cohorts of the Seven Countries Study. *Diabetes Care* 1995; 18: 1104–1112.
8. De Caterina R, Madonna R, Bertolotto A, et al. N-3 fatty acids in the treatment of diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30: 1012–1026.
9. Gao LG, Cao J, Mao QX, et al. Influence of omega-3 polyunsaturated fatty acid-supplementation on platelet aggregation in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* 2013; 226: 328–334.
10. Erkkilä AT, Matthan NR, Herrington DM, et al. Higher plasma docosahexaenoic acid is associated reduced progression of coronary atherosclerosis in women with CAD. *J Lipid Res* 2006; 47: 2814–2819.
11. Sacks FM, Stone PH, Gibson CM, et al. (HARP Research Group). Controlled trial of fish oil for regression of human coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 1492–1498.
12. Yagi K. Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys lipids* 1987; 45: 337–351.
13. Véricel E, Polette A, Bacot S, et al. Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets. *J thromb Haemost* 2003; 13: 566–572.
14. Guillot N, Caillet E, Laville M, et al. Increasing intakes of the long-chain omega-3 docosahexaenoic acid: effects on platelet functions and redox status in healthy men. *FASEB J* 2009; 23: 2909–2916.
15. Lagarde M, Bryon PA, Guichardant M, et al. A simple and efficient method for platelet isolation from their plasma. *Thromb Res* 1980; 17: 581–588.
16. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927–929.
17. Boukhchache D, Lagarde M. Interactions between prostaglandin precursors during their oxygenation by human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1982; 713: 386–392.
18. Croset M, Véricel E, Rigaud M, et al. Functions and tocopherol content of blood platelets from elderly people after low intake of purified eicosapentaenoic acid. *Thromb Res* 1990; 57: 1–12.
19. Therasse J, Lemonnier F. Determination of plasma lipoperoxides by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1987; 413: 237–241.
20. Bowyer DE, Leat WM, Howard AN, et al. The determination of the fatty acid composition of serum lipids separated by thin-layer chromatography; and a comparison with column chromatography. *Biochim Biophys Acta* 1963; 70: 423–431.
21. Woodman RJ, Mori TA, Burke V, et al. Effects of purified eicosapentaenoic acid on platelet, fibrinolytic and vascular function in hypertensive type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* 2003; 166: 85–93.
22. Venkatakrishnan P, Anuradha S, Bhattacharjee J, et al. Effects of low dose of omega-3 fatty acids on platelet functions and coagulation profile in Indian patients with type 2 diabetes mellitus with vascular complications : a prospective, preliminary study. *J Indian Acad Clin Med* 2007; 8: 45–52.
23. Corey EJ, Shih C, Cashman JR. Docosahexaenoic acid is a strong of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 80: 3581–3584.
24. Catella F, Healy D, Lawson, et al. 11-dehydro-thromboxane B2: a quantitative index of thromboxane A2 formation in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5861–5865.
25. Davi G, Chiarelli F, Santilli F, et al. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation* 2003; 107: 3199–3203.
26. Kesavulu MM, Kameswararao B, Apparao Ch, et al. Effect of omega-3 fatty acids on lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 2002; 28: 20–26.
27. Azizi-Soleiman F, Jazayeri S, Eghtesadi S. Effects of pure eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on oxidative stress, inflammation and body fat mass in patients with type 2 diabetes. *Int J Prev Med* 2013; 8: 922–928.
28. Praticò D. F(2)-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis* 1999; 147: 1–10.
29. Mori TA, Woodman RJ, Burke V, et al. 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: 772–781.
30. McDonald DM, O'Kane F, McConville M, et al. Platelet redox balance in diabetic patients with hypertension improved by n-3 fatty acids. *Diabetes Care* 2013; 36: 998–1005.
31. Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, et al. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia* 1997; 40: 647–653.
32. Pirillo A, Catapano AL. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of atherogenic dyslipidemia. *Atheroscler Suppl* 2013; 14: 237–242.
33. Hartweg J, Farmer AJ, Perera R, et al. Meta-analysis of the effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on lipoproteins and other emerging lipid cardiovascular risk markers in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007; 50: 1593–1602.
34. 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: 2446–2450.
35. 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; 12: 3032–3039.
36. Conquer JA, Holub BJ. Dietary docosahexaenoic acid as a source of eicosapentaenoic acid in vegetarians and omnivores. *Lipids* 1997; 32: 341–345.
37. Shaikh SR, Kinnun JJ, Leng X, et al. How polyunsaturated fatty acids modify molecular organization in membranes: Insight from NMR studies of model systems. *Biochim Biophys Acta* 2014; Epub ahead of print.
38. Jump DB, Botolin D, Wang Y, et al. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J Nutr* 2005; 135: 2503–2506.
39. Mukherjee PK1, Marcheselli VL, Serhan CN, et al. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 8491–8496.
40. Chen PI, Véricel E, Lagarde M, et al. Poxytins, a class of oxygenated products from polyunsaturated fatty acids, potentially inhibit blood platelet aggregation. *FASEB J* 2011; 25: 382–388.