

2m11.2821.1

Université de Montréal

# **Implication de la GPIIb/IIIa et de la P-sélectine dans l'activation et l'agrégation plaquettaire**

par

Alexandre Caron

Institut de Cardiologie de Montréal

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en pathologie et biologie cellulaire,  
option pathologies cardiovasculaires

Août 2000

©Alexandre Caron, 2000



W  
4  
U58  
2001  
N.008

10/18/2001

**Page d'identification du jury**

**Université de Montréal  
Faculté des études supérieures**

**Ce mémoire intitulé:**

**Implication de la GPIIb/IIIa et de la P-sélectine dans l'activation et  
l'agrégation plaquettaire**

**présenté par:**

**Alexandre Caron**

**a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:**

**Mémoire accepté le: \_\_\_\_\_**

## Sommaire

Les plaquettes assurent un rôle important au sein du maintien de l'homéostasie: grâce à leurs propriétés d'adhésion, d'étalement et d'agrégation, ces dernières participent activement à l'hémostase en formant rapidement un caillot sanguin au niveau de la matrice sous-endothéliale d'un vaisseau endommagé, le tout en communion avec l'action des facteurs de coagulation. Ces événements physiologiques revêtent un rôle crucial dans la conservation de l'intégrité vasculaire normale. Cependant, au sein de plusieurs pathologies cardiovasculaires, les plaquettes s'accumulent sur les parois artérielles dont la surface interne semble avoir été préalablement modifiées par l'athérosclérose. Ainsi, cette fonction ambivalente que possèdent les plaquettes préconise l'apparition de maladies cardiovasculaire importantes, telles que la thrombose, l'angine instable, l'infarctus du myocarde, l'embolie distal et la sténose artérielle menant à l'ischémie, celles-ci se soldant fréquemment par des conséquences graves pour la santé du patient.

Le présent ouvrage propose donc une analyse en profondeur des multiples facettes et fonctions des plaquettes. Suite à une brève description de la structure cellulaire de celles-ci, ce mémoire présente les diverses familles de molécules d'adhésion typiques aux plaquettes, ainsi que leurs principales représentantes, en plus d'une description succincte des nombreuses fonctions plaquettaires au sein des phénomènes physiologiques, c'est-à-dire, l'adhésion à la matrice sous-endothéliale et l'agrégation plaquettaire. Par la suite, ce travail suggère une synthèse concise des interactions plaquettes-neutrophiles, le tout incluant un menu survol de la structure des neutrophiles et de leurs principales molécules d'adhésion, ainsi que l'élaboration des effets physiologiques que possèdent les deux types cellulaires l'un envers l'autre, en plus des molécules d'adhésion impliquées. Enfin, cette section portant sur la revue de la littérature scientifique propose l'étude des divers constituants partageant le titre d'antagonistes de la GPIIb/IIIa, molécule d'adhésion plaquettaire principalement reconnue pour son apport capital dans l'agrégation plaquettaire.

Ayant comme principale hypothèse qu'en plus de la GPIIb/IIIa, d'autres voies indépendantes de cette molécule pourraient également s'inscrire comme participantes importantes au niveau de l'agrégation plaquettaire, les objectifs visés par ce présent mémoire de maîtrise furent donc 1) l'investigation des interrelations entre l'activation et l'agrégation plaquettaire, ainsi qu'au sujet de l'expression de molécules d'adhésion cellulaires; 2) l'approfondissement des effets de trois inhibiteurs de la GPIIb/IIIa, soit abciximab (ReoPro™), tirofiban (Aggrastat™) et roxifiban (XP280) sur l'agrégation et l'expression plaquettaire de trois molécules d'adhésion importantes, à savoir la P-sélectine, la GPIIIa et la forme active de la GPIIb/IIIa et finalement, 3) l'évaluation des effets des antagonistes de la GPIIb/IIIa sur la liaison des plaquettes aux neutrophiles, le tout en réponse à différentes concentrations de thrombine.

Grâce à des protocoles spécifiques utilisant la cytométrie en flux et à l'agrégométrie, il fut démontré, tout au long de cette expérimentation, que 1) l'utilisation de thrombine amplifie l'expression de la P-sélectine et induit l'activation de la GPIIb/IIIa causant ainsi l'agrégation des plaquettes, et ce sans toutefois modifier l'expression de la GPIIIa; 2) l'antagoniste roxifiban demeure l'inhibiteur de la GPIIb/IIIa le plus efficace au niveau de l'agrégation plaquettaire; 3) l'abciximab, le tirofiban et le roxifiban bloquent complètement la liaison de l'anticorps PAC-1 à la forme active de la GPIIb/IIIa, sans cependant influencer la P-sélectine et la GPIIIa; 4) l'inhibition de la GPIIb/IIIa active n'induit point une inhibition complète de l'agrégation plaquettaire et finalement, 5) les inhibiteurs de la GPIIb/IIIa n'affectent pas la liaison des plaquettes aux neutrophiles, alors que le blocage de la P-sélectine inhibe complètement cette liaison.

En somme, ces résultats indiquent que les effets de ces antagonistes de la GPIIb/IIIa sur l'agrégation plaquettaire ne sont point reliés à l'inhibition de l'activation plaquettaire. De plus, le présent ouvrage approuve, suite à l'étude des précédents résultats, l'hypothèse de départ, celle-ci suggérant que d'autres voies indépendantes de la GPIIb/IIIa, telles que la P-sélectine, pourraient également s'inscrire comme participantes importantes au niveau de l'agrégation plaquettaire.

## **Résumé de la contribution originale**

### **Les Interrelations Entre l'Activation Plaquettaire, la Liaison des Plaquettes aux Neutrophiles et les Effets Antiplaquettaires des Antagonistes de la GPIIb/IIIa\***

A. Caron, J.F. Théorêt, Y. Merhi, Institut de Cardiologie de Montréal.

Responsable de l'expression des diverses molécules d'adhésion à la surface cellulaire, l'activation plaquettaire, phénomène physiologique précédant l'agrégation, constitue le premier médiateur de la thrombose artérielle. Afin de réduire l'incidence des pathologies relatives aux thromboses et des complications cliniques découlant d'une intervention par angioplastie coronarienne transluminale percutanée (ACTP), de nombreux antagonistes de la GPIIb/IIIa furent ainsi développés. Cependant, malgré le fait que les effets bénéfiques de ces agents furent documentés au sein de plusieurs études cliniques, les interrelations s'opérant entre leurs effets antiplaquettaires et l'expression, par les plaquettes, des molécules d'adhésion cellulaires ne furent point examinées. Ainsi, cette étude analyse les effets de l'abciximab (Reopro™, un anticorps monoclonal chimérique), du tirofiban (Aggrastat™, un agent peptidomimétique) et la forme active de l'acide libre du roxifiban (un agent non-peptidique) au niveau de l'agrégation des plaquettes humaines isolées grâce à l'utilisation d'un agrégomètre optique, ainsi qu'au niveau de la liaison des plaquettes aux neutrophiles. De plus, le présent ouvrage évalue également les effets de ces agents au niveau de l'expression plaquettaire de la P-sélectine, de la GPIIb/IIIa active et de la GPIIIa via l'usage d'un cytomètre de flux, le tout en réponse à des concentrations croissantes de thrombine. De là, l'agrégation plaquettaire maximale ( $76,3 \pm 2,6\%$ ), l'expression de la P-sélectine ( $88,5 \pm 4\%$ ), l'activation de la GPIIb/IIIa (liaison au PAC-1,  $86,2 \pm 8,9\%$ ) et la liaison des plaquettes aux neutrophiles ( $58,0 \pm 6,4\%$ ) furent obtenues, ceci en utilisant une concentration de thrombine de l'ordre de 0,025 U/mL. Contrairement à ces résultats, l'expression constitutive de la GPIIIa sur les plaquettes au repos (98%) ne fut, quant à elle, guère influencée par l'ajout de thrombine. De plus,

l'abciximab, le tirofiban et le roxifiban inhibèrent l'agrégation plaquettaire et la liaison au PAC-1 de façon dépendante de la concentration, mais ceux-ci n'eurent aucun effet notable sur l'expression de la P-sélectine par les plaquettes activées. À une concentration de 100 nM, l'abciximab, le tirofiban et le roxifiban réduisirent significativement et respectivement l'agrégation plaquettaire de  $45,8 \pm 8,6\%$ ,  $51,9 \pm 5,8\%$  et  $73,9 \pm 1,8\%$ , alors que la liaison au PAC-1 fut respectivement inhibée de 83%, 47% et 100%. Enfin, aucun de ces agents ne modifia significativement la liaison des plaquettes aux neutrophiles, alors qu'un anticorps monoclonal bloqueur anti-P-sélectine parvint à inhiber cette même interaction intercellulaire. Démontrant le potentiel variable de ces trois agents sur l'agrégation et l'activation plaquettaires, ces résultats indiquent que les effets de ces antagonistes de la GPIIb/IIIa sur l'agrégation plaquettaire ne sont point reliés à l'inhibition de l'activation plaquettaire, puisque les niveaux de P-sélectine et de liaison plaquettes-neutrophiles demeurent inchangés en présence de ces antagonistes, et suggèrent donc que d'autres voies indépendantes de la GPIIb/IIIa pourraient être impliquées dans le phénomène d'agrégation plaquettaire.

\* Cette étude est appuyée en partie par la Fondation des Maladies du Cœur du Québec.

# Table des Matières

LISTE DES TABLEAUX .....	x
LISTE DES FIGURES .....	xi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	xii
<b>1. Introduction</b> .....	1
<b>1.1 Composition et fonctions du sang</b> .....	1
<b>1.1.1 Description des plaquettes et de leurs fonctions</b> .....	1
1.1.1.1 <b>Structure des plaquettes</b> .....	1
1.1.1.2 <b>Molécules d'adhésion plaquettares</b> .....	3
1.1.1.2.1 <b>Les Intégrines</b> .....	3
1.1.1.2.1.1 <i>Généralités sur les intégrines</i> .....	3
1.1.1.2.1.2 <i>La <math>\beta_1</math>-intégrine (GP1Ia) plaquettaire GP1a/1Ia</i> .....	4
1.1.1.2.1.3 <i>Les <math>\beta_3</math>-intégrines (GP1IIa) plaquettares</i> <i>GP1Ib/1IIa et GP<math>\alpha</math>v<math>\beta</math>3</i> .....	5
1.1.1.2.2 <b>Les Sélectines</b> .....	7
1.1.1.2.2.1 <i>Généralités sur les sélectines</i> .....	7
1.1.1.2.2.2 <i>La P-Sélectine</i> .....	9
1.1.1.2.3 <b>Les Immunoglobulines</b> .....	11
1.1.1.2.3.1 <i>L'ICAM-1 et l'ICAM-2 plaquettares</i> .....	11
1.1.1.2.3.2 <i>Le PECAM plaquettaire</i> .....	12
1.1.1.2.4 <b>Les Glycoprotéines riches en leucine</b> .....	13
1.1.1.2.4.1 <i>Le complexe plaquettaire GP1b/IX - GPV</i> .....	13
1.1.1.3 <b>Les fonctions plaquettares au sein des</b> <b>    phénomènes physiologiques</b> .....	15
1.1.1.3.1 <b>L'adhésion plaquettaire à la matrice</b> <b>      sous-endothéliale</b> .....	15
1.1.1.3.1.1 <i>Roulement et adhésion primaire des plaquettes</i> ....	20
1.1.1.3.1.2 <i>Adhésion par contact, signalisation</i> <i>intracellulaire et sécrétion plaquettares</i> .....	21
1.1.1.3.1.3 <i>Adhésion ferme à la matrice</i> .....	23
1.1.1.3.2 <b>L'agrégation plaquettaire</b> .....	24
1.1.1.3.2.1 <i>Recrutement plaquettaire et activation</i> <i>par agoniste</i> .....	24
1.1.1.3.2.2 <i>Agrégation, signalisation outside-in et</i> <i>formation du thrombus</i> .....	26
1.1.1.3.2.3 <i>Agrégation in-vitro et implication du</i> <i>«shear stress» dans les conditions pathologiques...</i>	30
1.1.1.3.2.4 <i>Régulations hémostatiques</i> .....	33



<b>1.1.2 Les interactions plaquettes-neutrophiles («binding»)</b> .....	34
<b>1.1.2.1 Introduction</b> .....	34
<b>1.1.2.2 Structure des neutrophiles</b> .....	35
<b>1.1.2.3 Molécules d'adhésion neutrophiliques</b> .....	36
<b>1.1.2.3.1 Les Intégrines</b> .....	36
<b>1.1.2.3.1.1 Les <math>\beta_2</math>-intégrines du complexe</b> <b>CD11/CD18 neutrophilique</b> .....	36
<b>1.1.2.3.2 Les Sélectines</b> .....	38
<b>1.1.2.3.2.1 La L-sélectine neutrophilique</b> .....	38
<b>1.1.2.4 Effets des plaquettes sur les neutrophiles</b> .....	39
<b>1.1.2.5 Effets des neutrophiles sur les plaquettes</b> .....	40
<b>1.1.2.6 Les molécules d'adhésion impliquées</b> .....	42
<b>1.1.2.6.1 P-Sélectine versus PSGL-1</b> .....	42
<b>1.1.2.6.2 GPIIb/IIIa versus MAC-1 via</b> .....	43
<b>1.2 Les antagonistes de la molécule GPIIb/IIIa</b> .....	45
<b>1.2.1 Introduction</b> .....	45
<b>1.2.2 Les désintégrines</b> .....	48
<b>1.2.3 Les antagonistes synthétiques peptidiques et</b> <b>non peptidiques</b> .....	50
<b>1.2.4 Les anticorps monoclonaux murins</b> .....	53
<b>1.2.5 Les antagonistes oraux</b> .....	55
<b>1.2.6 Interrogations non résolues</b> .....	59
<b>2. Hypothèses et Objectifs</b> .....	62
<b>3. Contribution Originale (Article)</b> .....	64
<b>4. Discussion</b> .....	97
<b>5. Conclusion</b> .....	102
<b>6. Références</b> .....	103
<b>7. Remerciements</b> .....	i

## Liste des Tableaux

TABLEAU I: PRINCIPAUX FACTEURS POUVANT INFLUENCER L'EFFICACITÉ DES ANTAGONISTES DE LA GPIIb/IIIa AU SEIN DE DIFFÉRENTS INDIVIDUS.....	47
TABLEAU II: CLASSIFICATION ET DESCRIPTION DES PRINCIPAUX ANTAGONISTES DE LA GPIIb/IIIa PLAQUETTAIRE.....	58

## Liste des Figures

FIGURE 1: L'ADHÉSION PLAQUETTAIRE À LA MATRICE SOUS- ENDOTHÉLIALE.....	17-18
FIGURE 2: L'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE.....	19
FIGURE 3: PRINCIPALES MOLÉCULES D'ADHÉSION ET VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRES PLAQUETTAIRES IMPLIQUÉES DANS LES PHÉNOMÈNES D'ADHÉSION ET D'AGRÉGATION.....	29

### Figures Associées à la Contribution Originale

FIGURE 1: AGRÉGATION PLAQUETTAIRE (A) ET EXPRESSION DES MOLÉCULES D'ADHÉSION PLAQUETTAIRES (B) EN RÉPONSE À DES CONCENTRATIONS CROISSANTES DE THROMBINE.....	92
FIGURE 2: EFFETS DES DIFFÉRENTS ANTAGONISTES DE LA GPIIb/IIIa SUR L'AGRÉGATION DE PLAQUETTES HUMAINES ACTIVÉES À LA THROMBINE (0,025 U/ML).....	93
FIGURE 3: EFFETS DES DIFFÉRENTS ANTAGONISTES DE LA GPIIb/IIIa SUR L'EXPRESSION DE LA P-SÉLECTINE (A), LA LIAISON DU PAC-1 (B) ET L'EXPRESSION DU CD61 (C) ET CE, SUITE À L'ACTIVATION PLAQUETTAIRE À LA THROMBINE.....	94
FIGURE 4: RÉGRESSION LINÉAIRE ENTRE LE % D'INHIBITION DE L'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE ET LE % D'INHIBITION DE LA LIAISON DU PAC-1 ET CE, POUR TROIS DIFFÉRENTS ANTAGONISTES DE LA GPIIb/IIIa.....	95
FIGURE 5: EFFETS DES DIFFÉRENTS ANTAGONISTES DE LA GPIIb/IIIa ET D'UN ANTICORPS MONOCLONAL BLOQUEUR ANTI-P-SÉLECTINE (WASP 12.2) SUR LA LIAISON DES PLAQUETTES ACTIVÉES À LA THROMBINE AUX NEUTROPHILES.....	96

## Liste des Sigles et Abréviations

(Lorsque l'abréviation réfère à un terme anglais, ce dernier est inscrit en italique)

$\beta$ -TG :	Bêta-thromboglobuline
ACTP :	Angioplastie coronarienne transluminale percutanée
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADP :	Adénosine diphosphate
AMP :	Adénosine monophosphate
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
AT-III :	Antithrombine III
ATP :	Adénosine triphosphate
Cox-1 :	Cyclooxygénase-1
DAG :	1,2-diacylglycérol
DGEA :	Séquence peptidique composée des acides aminés Aspartate (D), Glycine (G), Glutamate (E) et Alanine (A)
EGF :	<i>Epidermal growth factor</i> ; Facteur de croissance de l'épiderme
ELAM-1 :	<i>Endothelial leukocyte adhesion molecule</i> ; Molécule d'adhésion leucocytaire endothéliale (E-sélectine, CD62E)
FDA :	<i>US Food and Drug Administration</i> ; Administration américaine des aliments et médicaments
fMLP :	formyl-Méthionine-Leucine-Phénylalanine
GMP :	Guanosine monophosphate
GMP-140 :	<i>Granule membrane protein of molecular mass 140 kDa</i> ; Protéine des granules membranaires de masse moléculaire de 140 kDa (P-sélectine, CD62P)
ICAM :	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i> ; Molécule d'adhésion intercellulaire
ICP :	Intervention coronarienne percutanée
IL-1 :	Interleukine-1
IP <sub>3</sub> :	Inositol 1,4,5-triphosphate

- ITAM : *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif* ;  
Immunorécepteur à motif d'activation associé aux tyrosines
- kDa : Kilodaltons
- KGD : Séquence peptidique composée des acides aminés Lysine (K), Glycine (G) et Asparagine (D)
- KQAGDV : Séquence peptidique composée des acides aminés Lysine (K), Glutamine (Q), Alanine (A), Glycine (G), Asparagine (D) et Valine (V).
- LAM-1 : *Leukocyte adhesion molecule* ; Molécule d'adhésion leucocytaire (L-sélectine, CD62L)
- LECAM-1 : *Leukocyte endothelial cell adhesion molecule* ; Molécule d'adhésion cellulaire leucocytaire et endothéliale (L-sélectine, CD62L)
- LFA-1 : *Lymphocyte function associated antigen-1* ; Antigène-1 à fonction associée aux lymphocytes (CD11a/CD18)
- LNHEV : *Lymph nodes high endothelial venules* ; Veinules des nodules lymphatiques formées d'endothélium hypertrophié
- LPS : Lipopolysaccharides
- LTA<sub>4</sub> : Leucotriène A<sub>4</sub>
- LTC<sub>4</sub> : Leucotriène C<sub>4</sub>
- MAPk : *Mitogen activated protein kinase* ; Protéine mitogène kinase activée
- NK : Cellules *natural-killer*
- NO : *Nitric oxide* ; Oxyde nitrique (Monoxyde d'azote)
- NOS : NO synthases
- PADGEM : *Platelet activation-dependent granule external membrane protein* ; Protéine des granules plaquettaires dont l'expression à la membrane externe des plaquettes est dépendante de l'activation cellulaire (P-sélectine, CD62P)
- PAF : *Platelet-activating factor* ; Facteur d'activation plaquettaire
- PAR : *Protease-activated receptors* ; Récepteurs activés par une protéase

PDGF :	<i>Platelet-derived growth factor</i> ; Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PECAM :	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i> ; Molécule d'adhésion cellulaire plaquettaire et endothéliale (CD31)
PF4 :	<i>Platelet factor 4</i> ; Facteur plaquettaire 4
PGI <sub>2</sub> :	Prostacycline
PIP <sub>2</sub> :	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKC :	Protéine kinase C
PLC :	Phospholipase C
PMN :	Polymorphonucléaire
PRP :	<i>Platelet-rich plasma</i> ; Plasma riche en plaquettes
PSGL-1 :	<i>P-Selectin glycoprotein ligand-1</i> ; Ligand-1 glycoprotéique de la P-sélectine (CD162)
QC :	Queue cytoplasmique
RGD :	Séquence peptidique composée des acides aminés Arginine (R), Glycine (G) et Asparagine (D)
RT :	Région transmembranaire
SCR :	<i>Short consensus regions</i> ; Régions consensus de courte longueur
sLe <sup>a</sup> :	Syalyl Lewis A
sLe <sup>x</sup> :	Syalyl Lewis X
TNF <sub>α</sub> :	<i>Tumor necrosis factor α</i> ; Facteur de nécrose tumorale α
TxA <sub>2</sub> :	Thromboxane A <sub>2</sub>
VCAM :	<i>Vascular cell adhesion molecule</i> ; Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire
VLA :	<i>Very late antigens</i> ; Antigènes tardifs
VnR :	<i>Vitronectin receptor</i> ; Récepteur de la vitronectine (CD51/CD61)
vWF :	<i>von Willebrand factor</i> ; facteur von Willebrand

## ACRONYMES DES ESSAIS CLINIQUES

- ★ CAPTURE : Chimeric 7E3 AntiPlatelet Therapy in Unstable angina REfractory to standard treatment
- ★ EPIC : Evaluation of c7E3 for Prevention of Ischemic Complications
- ★ EPILOG : Evaluation of PTCA to Improve Long-term Outcome by c7E3 GPIIb/IIIa receptor blockade
- ★ EXCITE : Evaluation of oral Xemilofiban in Controlling Thrombotic Events
- ★ IMPACT : Integrilin to Minimize Platelet Aggregation and prevent Coronary Thrombosis
- ★ IMPACT-AMI : IMPACT Acute Myocardial Infarction
- ★ OPUS : Orbofiban in Patients with Unstable coronary Syndromes
- ★ PARADIGM : Platelet Aggregation Receptor Antagonist Dose Investigation for reperfusion Gain in Myocardial infarction
- ★ PARAGON-A : Platelet IIb/IIIa Antagonist for the Reduction of Acute coronary syndrome events in a Global Organization Network
- ★ PRISM : Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management
- ★ PRISM-PLUS : PRISM in Patients Limited by Unstable angina Signs and symptoms
- ★ PROLOG : Precursor to EPILOG
- ★ PURSUIT : Platelet IIb/IIIa in Unstable angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy
- ★ RAPPORT : ReoPro in Acute myocardial infarction and Primary PTCA Organization and Randomized Trial
- ★ RESTORE : Randomized Efficacy Study of Tirofiban for Outcomes and REstenosis

- ★ SYMPHONY : Sibrafiban versus aspirin to Yield Maximum Protection from ischemic Heart events pOst acute corONary sYndromes



À ma mère qui a toujours su  
m'aider et m'encourager  
tout au long de mes années  
d'études, merci et je t'aime.

# **1. Introduction**

## **1.1 Composition et fonctions du sang**

Le sang est un tissu conjonctif liquide constitué de deux parties: le plasma sanguin, liquide aqueux contenant des substances en solution et représentant 55% du sang, et les éléments figurés, des cellules et des fragments cellulaires, composant 45%.

La portion plasmatique est formée à 91,5% d'eau, de 7% de protéines et de 1,5% d'autres solutés, tels que les électrolytes, les nutriments, les gaz, les substances régulatrices (enzymes et hormones), les vitamines et les déchets. La fraction protéique, quant à elle, représente 54% d'albumines, 38% de globulines et 7% de fibrinogène.

Les éléments figurés sont répartis en trois types cellulaires distincts, soit les thrombocytes (ou plaquettes), les érythrocytes (globules rouges) et les leucocytes (globules blancs), ce dernier groupe se subdivisant en deux classes: les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et les agranulocytes (lymphocytes T et B, et monocytes).

Le sang assure trois fonctions générales au sein de l'organisme, soit le transport, la régulation et la protection. Ce dernier rôle, en plus d'englober la prévention de l'infection par les leucocytes spécialisés, consiste également à la prévention de l'hémorragie, où suite à la rupture d'un vaisseau sanguin, les plaquettes et les protéines plasmatiques forment un caillot et arrêtent l'écoulement du sang <sup>1</sup>.

### **1.1.1 Description des plaquettes et de leurs fonctions**

#### **1.1.1.1 Structure des plaquettes**

Les plaquettes, ou thrombocytes, furent découvertes en 1882 par le chercheur italien Giulio Bizzozero qui les décrivit comme étant «la troisième composante cellulaire du sang» <sup>2</sup>. En effet, les plaquettes proviennent de la

défragmentation cytoplasmique de cellules géantes nommées métamégacaryocytes présentes dans la moelle osseuse. Suite à leur passage dans la circulation sanguine, elles sont dénombrées entre 250 000 et 400 000 par millimètre cube, leur taille varie de 2 à 4  $\mu\text{m}$  et elles ne survivent qu'entre cinq et neuf jours <sup>1</sup>.

Les organelles des plaquettes au repos sont disposées de manière uniforme dans le cytoplasme. Les mitochondries génèrent l'énergie nécessaire, sachant que l'état basal plaquettaire ne requiert que diverses phosphorylations oxydatives. Dépourvues de noyau, les plaquettes possèdent cependant un nombre imposant de granules d'entreposage, soit environ 40 par plaquettes. Les granules alpha contiennent du fibrinogène, la thrombospondine, le facteur von Willebrand (vWF), la bêta-thromboglobuline ( $\beta$ -TG), le facteur plaquettaire 4 (PF4), etc.. Les granules denses, quant à eux, renferment du calcium, la sérotonine, l'adénine nucléotidique, etc.. La sécrétion du contenu de ces granules, lors de l'activation plaquettaire, contribue aux diverses interactions entre plaquettes ou entre plaquettes et d'autres cellules. Du côté du cytosquelette et du système microtubulaire, l'actine (10-20%) et la myosine (15-20%) représentent les majeures protéines plaquettaires formant le réseau tridimensionnel cytoplasmique. Un second réseau bidimensionnel formé de courtes chaînes d'actine compose le cytosquelette membranaire, ce dernier étant responsable de la forme discoïde des plaquettes au repos. D'ailleurs, les récepteurs membranaires des plaquettes sont directement reliés à ce réseau grâce à une protéine liant l'actine. De plus, un faisceau marginal de microtubules supporte le cytosquelette membranaire d'actine en l'aidant à conserver sa forme discoïde <sup>3</sup>.

Jouant un rôle crucial dans l'hémostase, les plaquettes participent activement à la coagulation, phénomène physiologique déclenché suite à la rupture des vaisseaux sanguins ou d'une lésion de leur endothélium. En somme, les plaquettes interviennent dans la coordination des différentes phases menant à la formation d'un caillot <sup>4</sup>.

## 1.1.1.2 Molécules d'adhésion plaquettaires

### 1.1.1.2.1 Les Intégrines

#### *1.1.1.2.1.1 Généralités sur les intégrines*

Les protéines de la famille des intégrines furent originellement identifiées grâce à leur propriété adhésive <sup>5</sup>. En effet, celles-ci assurent une fonction capitale au niveau des interactions qu'ont les cellules sanguines entre elles, avec l'endothélium vasculaire ou avec la matrice endothéliale, à savoir la médiation des liaisons cellules à cellules ou cellules à matrice extracellulaire <sup>6</sup>. De plus, les intégrines servent également d'intermédiaire à la signalisation transmembranaire en raison de leur capacité à transmettre l'information de chaque côté de la membrane plasmique, et ce de façon bidirectionnelle <sup>5</sup>. En plus des plaquettes, les intégrines se retrouvent également à la surface, entre autres, des cellules épithéliales et endothéliales, des cellules des muscles lisses, des fibroblastes et des leucocytes <sup>3</sup>. Possédant une structure hétérodimérique, les intégrines sont formées de deux sous-unités distinctes, soit la sous-unité  $\alpha$  et la sous-unité  $\beta$ , toutes deux reliées par des associations non covalentes. À ce jour, au moins 17 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  ont été clonées et plus de 20 associations  $\alpha\beta$  différentes ont été identifiées dans des tissus de vertébrés. Les deux sous-unités possèdent une structure semblable, c'est-à-dire un large domaine extracellulaire avec une extrémité  $\text{NH}_2$ , suivi d'un domaine transmembranaire, le tout terminé par une petite queue cytoplasmique complétée d'un groupement  $\text{COOH}$ .

En se basant sur les diverses sous-unités  $\beta$ , la famille des intégrines peut être divisée en diverses catégories. Les  $\beta_1$ -intégrines, aussi connues sous le nom *Very Late Antigens (VLA)*, représente la classe possédant le dénombrement moléculaire le plus important à la surface des plaquettes. La seconde classe d'intégrines regroupent les  $\beta_2$ -intégrines couplées à trois différentes sous-unité  $\alpha$  ( $\alpha_L$ ,  $\alpha_M$  et  $\alpha_X$ ) et retrouvées uniquement sur les membranes leucocytaires. Enfin, les  $\beta_3$ -intégrines ou cytoadhésines, englobant

deux molécules d'adhésion plaquettaires importantes, soit la GPIIb/IIIa et la  $\alpha_v\beta_3$  (récepteur de la vitronectine), représentent la troisième classe d'intégrines. En ce qui a trait aux classes subséquentes ( $\beta_4$  à  $\beta_8$ ), l'avancement des connaissances scientifiques à leur sujet se fait encore attendre.

#### 1.1.1.2.1.2 La $\beta_1$ -intégrine (GPIIa) plaquettaire GPIa/IIa

L'intégrine GPIa/IIa, également connue sous le nom  $\alpha_2\beta_1$ , VLA-2 ou CD49b/29, est constituée d'une sous-unité  $\alpha_2$  de 150 kDa et d'une sous-unité  $\beta_1$  de 130 kDa <sup>7</sup>. Retrouvée sur différents types cellulaires, tels que les plaquettes, les leucocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales <sup>8</sup>, la GPIa/IIa remplit plusieurs fonctions selon le type cellulaire sur lequel elle est exprimée. Ainsi, lorsque présente sur les plaquettes ou les fibroblastes, cette dernière joue le rôle de récepteur du collagène, alors que lorsqu'elle se retrouve sur les cellules épithéliales ou endothéliales, la GPIa/IIa agit plutôt comme récepteur à la laminine, une glycoprotéine de la membrane basale <sup>9</sup>.

Au niveau des plaquettes, la GPIa/IIa se décrit donc comme une molécule d'adhésion possédant une affinité majeure envers le collagène de type I, comparativement au collagène de type III ne se liant que faiblement à celle-ci <sup>9,10</sup>. Lors de la liaison de la GPIa/IIa à son ligand, cette dernière semble indépendante de la présence de la séquence des acides aminés RGD (Arginine (R), Glycine (G) et Asparagine (D)) retrouvée au sein de diverses protéines, telles que la fibronectine, le fibrinogène, la thrombospondine, le collagène de type I, la vitronectine et le von Willebrand factor (vWF) <sup>6,8</sup>. Contrairement à la plupart des intégrines, cette liaison semble être plutôt dépendante de la séquence DGEA (Aspartate (D), Glycine (G), Glutamate (E) et Alanine (A)), uniquement présente au sein du collagène de type I <sup>11</sup>. Des études récentes ont localisé précisément le site de liaison de la GPIa/IIa au collagène, à savoir une séquence de 191 acides aminés insérée au sein de la sous-unité  $\alpha_2$  et appelée «domaine-I». Celui-ci démontre d'ailleurs une

homologie allant de 23 à 41 % avec les domaines A du vWF, ainsi qu'avec des protéines du complément, des protéines de la matrice cartilagineuse et certaines autres intégrines <sup>8,9</sup>.

Suite à l'adhésion des plaquettes aux fibres de collagène exposées par la matrice sous-endothéliale lors d'un endommagement de la paroi vasculaire, ces cellules s'activent et procèdent à la sécrétion du contenu des granules cytoplasmiques <sup>8</sup>. Malgré l'identification du rôle essentiel et de premier ordre de cette  $\beta_1$ -intégrine au sein des interactions plaquettes-collagène, il demeure encore incertain si cette liaison collagène-GPIa/IIa suffit, à elle seule, à supporter l'adhésion plaquettaire et à induire, chez ces cellules, une activation dépendante du collagène <sup>9</sup>.

#### 1.1.1.2.1.3 Les $\beta_3$ -intégrines (GPIIIa) plaquettaires GPIIb/IIIa et $GP_{\alpha v \beta 3}$

La famille des  $\beta_3$ -intégrines représente une des classes de molécules d'adhésion les plus étudiées depuis les 25 dernières années, principalement pour sa composante GPIIb/IIIa, également connue sous le nom de  $\alpha_{IIb}\beta_3$  et CD41/CD61 <sup>12</sup>. Cette dernière constitue la plus abondante molécule d'adhésion plaquettaire <sup>12</sup> avec plus de 80 000 copies présentes à la surface des plaquettes au repos <sup>13</sup>. La glycoprotéine IIb/IIIa possède une structure typique des intégrines, à savoir une tête globulaire suivie de deux queues flexibles, soit les sous-unités  $\alpha_{IIb}$  et  $\beta_3$  <sup>14</sup>. La sous-unité  $\alpha_{IIb}$  ou GPIIb (1008 acides aminés et 136 kDa) est le produit d'un unique gène ayant subi des modifications intracellulaires protéolytiques et consiste en une chaîne légère (25 kDa) et une chaîne lourde (105 kDa) reliées par l'entremise d'un pont disulfure. La chaîne légère possède une courte queue cytoplasmique, une région transmembranaire et un court domaine extracellulaire, alors que la chaîne lourde est entièrement extracellulaire <sup>13,15</sup>. Quant à la sous-unité  $\beta_3$  ou GPIIIa (92 kDa), elle consiste plutôt en un polypeptide de 762 acides aminés

réparti en une courte queue cytoplasmique, une région transmembranaire et un large domaine extracellulaire <sup>15</sup>.

Des huit sous-unités  $\beta$ , la sous-unité  $\alpha_{IIb}$  ne peut s'associer qu'uniquement avec la sous-unité  $\beta_3$ , phénomène prenant majoritairement place au sein des cellules provenant du linéage des mégacaryocytes <sup>15</sup>. De plus, la combinaison  $\alpha_{IIb}\beta_3$  possède de nombreux sites de liaisons pour des cations divalents, ceux-ci étant requis pour l'attachement du ligand à cette  $\beta_3$ -intégrine <sup>13</sup>.

Lorsque exprimé à la surface de plaquettes au repos, la GPIIb/IIIa possède une affinité faible envers ses différents ligands, et ce même si l'on dénote une présence élevée de ceux-ci dans le sang <sup>13</sup>. Cependant suite à l'activation plaquettaire (lors des premières étapes de l'adhésion ou lors de la liaison d'agonistes à leur récepteur plaquettaire), la GPIIb/IIIa subit une métamorphose-clé, passant ainsi de l'état inactif à un statut actif capable de lier efficacement la fibronectine, le vWF, la vitronectine, la thrombospondine et le fibrinogène, phénomène retrouvé dans la littérature sous le nom explicite d'*inside-out signaling* <sup>13,14</sup>. De plus, ces ligands possèdent tous un point commun primordial à la liaison à la GPIIb/IIIa active, à savoir la présence d'au moins une séquence aminée RGD <sup>14</sup>. D'ailleurs, le ligand principal de la GPIIb/IIIa lors de l'agrégation plaquettaire, soit le fibrinogène, possède deux séquences RGD par demi-molécule, en plus d'une seconde séquence aminée nommée KQAGDV (Lysine (K), Glutamine (Q), Alanine (A), Glycine (G), Aspartate (D) et Valine (V)). Cette deuxième suite d'acides aminés, exclusive au fibrinogène, joue également un rôle majeur lors de la liaison de ce dernier à la GPIIb/IIIa. Présente à l'extrémité terminale de la chaîne  $\gamma$  du fibrinogène, la séquence KQAGDV est de cinq à dix fois moins puissantes que la séquence RGD en ce qui concerne la liaison du fibrinogène à la GPIIb/IIIa active. Cependant, malgré l'importance de leur présence, les relations entre RGD et KQAGDV sont, encore aujourd'hui, de nature inconnue <sup>14</sup>.

En somme, la liaison de la  $\beta_3$ -intégrine GPIIb/IIIa sous forme active au fibrinogène s'effectue par l'entremise de ses deux sous-unités s'associant aux séquences d'acides aminés de la demi-molécule de fibrinogène, c'est-à-dire que sa sous-unité  $\beta_3$  reconnaît spécifiquement la séquence RGD et que sa sous-unité  $\alpha_{IIb}$  se lie plutôt à la suite KQAGDV. Cet attachement moléculaire provoque une association des queues cytoplasmiques de la GPIIb/IIIa afin de former un second domaine de liaison à certaines molécules du cytosquelette et du signallement intracellulaire, phénomène connu sous l'appellation anglophone *outside-in signaling* <sup>13</sup>. Ce phénomène générera donc une amplification de la réponse plaquettaire, le tout solidifiant l'agrégation, où diverses plaquettes adhèrent les unes aux autres par l'entremise de leurs molécules de GPIIb/IIIa et des molécules de fibrinogène <sup>8</sup>.

Une deuxième molécule d'adhésion partageant la même sous-unité  $\beta_3$  que la GPIIb/IIIa s'inscrit sous la classe des cytoadhésines. Il s'agit de la  $\alpha_V\beta_3$ , communément appelée CD51/CD61, VnR ou récepteur de la vitronectine, et ce malgré sa capacité de lier, en plus de la vitronectine, le fibrinogène, le vWF, l'ostéopontine et autres ligands contenant la séquence RGD. Contrairement à la GPIIb/IIIa, la  $\alpha_V\beta_3$  se retrouve sur une multitude de cellules (monocytes, cellules endothéliales, chondrocytes, cellules musculaires lisses, etc.) et qu'en infime quantité sur la surface plaquettaire, soit de 50 à 100 molécules par cellule. Enfin, la fonction de la  $\alpha_V\beta_3$  est constitutive et agit au niveau de l'adhésion cellulaire. À l'encontre de la GPIIb/IIIa, la  $\alpha_V\beta_3$  ne requiert donc pas d'activation initiale ou de transformation afin de s'associer avec ses différents ligands <sup>8,13,16</sup>.

#### 1.1.1.2.2 Les Sélectines

##### 1.1.1.2.2.1 *Généralités sur les sélectines*

L'année 1989 constitua une étape importante dans l'historique des molécules d'adhésion grâce à la découverte d'une seconde famille de protéines



impliquée dans la régulation du trafic leucocytaire et dans les divers processus inflammatoires: les sélectines <sup>17</sup>. Suite au clonage et au séquençage quasi-simultanées de trois types de sélectines, divers noms leur furent attribués en fonction de leur découverte. Ainsi, la P-sélectine ou CD62P fut jadis nommée GMP-140 (*Granule Membrane Protein of molecular mass 140 kDa*) et PADGEM (*Platelet Activation-Dependant Granule External Membrane Protein*). La L-sélectine ou CD62L eut comme synonymes *lymphocyte-homing receptor*, gp90<sup>Mel</sup>, Leu-8, LAM-1 (*Leukocyte Adhesion Molecule*), LECAM-1 (*Leukocyte Endothelial Cell Adhesion Molecule*) et MEL-14. Enfin, la troisième classe de sélectines, ou E-sélectine (CD62E), fut également connu sous l'acronyme ELAM-1 (*Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule*) <sup>18</sup>. Afin de simplifier ces amalgames nominaux, une nomenclature standard fut adoptée, celle-ci désignant plutôt les trois membres de la famille des sélectines en relation avec le type cellulaire originel menant à sa découverte. On obtint alors la P-sélectine (Plaquettes), la L-sélectine (Lymphocytes) et la E-sélectine (cellules Endothéliales).

Provenant de gènes situés sur le chromosome 1 humain et murin <sup>19</sup>, les diverses sélectines possèdent une structure analogique, c'est-à-dire qu'elles représentent des protéines de classe I composées de domaines peptidiques ordonnés en tandem <sup>17</sup>. Ainsi, les sélectines se composent tout d'abord d'un domaine lectine de type C ayant une extrémité NH<sub>2</sub> terminale, suivi d'un domaine *EGF-like* (*Epidermal Growth Factor*), d'une suite de deux (L-sélectine) à neuf (P-sélectine) régions consensus répétées de courte longueur (SCR), le tout conclu par une région transmembranaire (RT) et par une queue cytoplasmique COOH terminale (QC). Les différents domaines des sélectines possèdent une homologie allant de 40% (SCR) à 80% (RT) en ce qui concerne les comparaisons inter-espèces d'une même sélectine, ainsi qu'une homologie passant de 0% (RT et QC) à 52% (lectine) pour ce qui est des comparaisons des différentes sélectines au sein d'une même espèce <sup>17</sup>.

Les trois grandes classes de sélectines diffèrent cependant à de nombreux niveaux, tels que leur distribution cellulaire, leur mécanisme de régulation de l'expression et leurs différents ligands cellulaires.

#### 1.1.1.2.2.2 *La P-sélectine*

La P-sélectine se définit comme étant une glycoprotéine membranaire de 140 kDa exprimée à la surface des plaquettes et des cellules endothéliales ayant subi une dégranulation. Jouant un rôle de premier plan au niveau des interactions plaquettaires et endothéliales avec les différentes cellules sanguines, principalement les leucocytes, la P-sélectine possède une structure typique aux autres sélectines, en plus d'être riche en cystéine et fortement glycosylée <sup>19</sup>.

Contrairement à la E-sélectine, la P-sélectine est synthétisée de façon constitutive puis accumulée dans l'espace intracellulaire via les membranes des granules alpha chez les plaquettes et via les membranes des corps de Weibel-Palade chez les cellules endothéliales <sup>20,21</sup>. Cet entreposage est réalisé grâce à certaines séquences présentes au sein de la queue cytoplasmique de la P-sélectine, celles-ci interagissant directement avec la machinerie de la voie de triage des deux types cellulaires <sup>17</sup>. Ainsi, la P-sélectine n'est pas exprimée de façon constitutive à la surface des plaquettes ou des cellules endothéliales, mais requiert plutôt l'activation cellulaire, phénomène rendu possible grâce à l'action de différents agonistes, tels que la thrombine, l'histamine, certaines composantes du complément, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les activateurs de la protéine kinase C, l'ADP, etc. <sup>20</sup>. Suite à l'activation cellulaire, les membranes des granules alpha et des corps de Weibel-Palade sont rapidement fusionnées à leur membrane cellulaire respective, ceci favorisant, en plus de l'expression de la P-sélectine, le relâchement de divers constituants internes, tels que le fibrinogène et le facteur von Willebrand (vWF) dans le cas des granules alpha <sup>17</sup>. Cependant, l'expression de la P-sélectine à la surface cellulaire est de courte durée; connaissant une distribution maximale 10 minutes suivant la stimulation

cellulaire, la concentration membranaire en P-sélectine décline de façon drastique en moins de 30 minutes, suggérant ainsi que cette molécule d'adhésion est promptement mobilisée et sert rapidement d'intermédiaire à l'adhésion leucocytaire <sup>19,20</sup>.

Une fois internalisée, la P-sélectine est tout d'abord reconnue grâce à la présence d'acides aminés distincts au niveau de sa queue cytoplasmique, puis assujettie à une dégradation lysosomale ou au recyclage dans les granules d'entreposage. Ce second stockage de la P-sélectine permet ainsi aux plaquettes n'ayant pas atteint le seuil maximal d'activation (point à partir duquel les plaquettes ne peuvent plus se désactiver) de se préparer à une nouvelle vague d'activation, sachant que, dépourvu de noyau et d'acides nucléiques, ces dernières possèdent une quantité limitée de P-sélectine et ne peuvent donc pas synthétiser de nouvelles molécules par la voie classique de la transcription et de la traduction protéique. Cependant, à l'encontre des plaquettes, les cellules endothéliales peuvent effectuer la synthèse *de novo* de l'ARNm de la P-sélectine, et donc produire une seconde génération de P-sélectine disponible à la surface cellulaire de deux à quatre heures suivant la stimulation aux LipoPolySaccharides (LPS), au TNF $\alpha$  ou à l'interleukine-1 (IL-1). De là, ce phénomène physiologique suggère un rôle hâtif et tardif de la P-sélectine dans la réponse inflammatoire <sup>17</sup>.

De par son expression unique sur les plaquettes activées, la P-sélectine semble assurer une fonction prédominante au niveau des interactions plaquettes-leucocytes lors de la cicatrisation de plaies et dans le processus d'hémostase. Servant d'intermédiaire à l'adhésion des plaquettes activées aux monocytes, neutrophiles, cellules dites *Natural-Killer (NK)* et lymphocytes T mémoires et activés <sup>17</sup>, la P-sélectine possède de nombreux ligands leucocytaires dont, entre autres, les tétrasaccharides simples (tels que le sialyl-Lewis X) et certaines glycoprotéines (telles que le *P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*, PSGL-1 ou CD162) <sup>20</sup>. Largement caractérisé, le PSGL-1 est d'ailleurs le seul ligand de haute affinité connu de la P-sélectine et se retrouve

exprimée de manière constitutive par la majorité des classes leucocytaires, principalement les neutrophiles, où son dénombrement se chiffre entre 10 000 et 20 000 copies, soit 0,01 % du total protéique de ces cellules. Se classant au sein de la famille des sialomucines, le PSGL-1 possède une structure dimérique de 240 kDa riche en prolines, sérines, thréonines et fortement O-glycosylée. De plus, le PSGL-1 doit subir certaines modifications biochimiques, telles que le sulfatage d'une tyrosine et l'O-glycosylation, afin de démontrer une quelconque affinité avec la P-sélectine 17,21,22.

Des études ont récemment démontré une interaction importante entre la P-sélectine et un autre type de molécules d'adhésion, soit les glycoprotéines riches en leucine ou plus précisément le complexe GPIb/IX/V<sup>23</sup>. Les détails relatifs à cette liaison entre la P-sélectine et la GPIb sont d'ailleurs traités au sein de la section 1.1.1.2.4 portant sur les glycoprotéines riches en leucine (Se référer à la page 14).

### 1.1.1.2.3 Les Immunoglobulines

#### 1.1.1.2.3.1 *L'ICAM-1 et l'ICAM-2 plaquettaires*

Tel que démontré au cours des années 80, une tierce famille de molécules d'adhésion revêt un rôle capital dans l'adhésion intercellulaire et la transmigration leucocytaire: il s'agit des immunoglobulines, dont les principales glycoprotéines sont l'Intercellular Adhesion Molecule 1 et 2 (ICAM-1 ou CD54, et ICAM-2), le Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) et le Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1)<sup>18</sup>.

En opposition avec la molécule VCAM-1 retrouvée en majeure partie sur les cellules endothéliales et musculaires lisses, les ICAM-1 et -2 sont plutôt exprimés par une multitude de cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques, telles que les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules épithéliales et les plaquettes (ICAM-2 seulement). Possédant une structure et une fonction étroitement apparentées, l'ICAM-1 (90 kDa) et l'ICAM-2 (55 kDa) se composent d'un nombre précis de domaines *immunoglobulin-like*

adoptant une forme circulaire via des ponts disulfures (cinq pour l'ICAM-1 et deux pour l'ICAM-2), suivis d'une région transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique. Un point particulier diffère cependant l'ICAM-1 de l'ICAM-2: leur temps d'expression maximal. Contrairement à l'ICAM-2 exprimée en permanence à la surface cellulaire, l'ICAM-1 est plutôt présent suivant une activation cellulaire ou un attachement à une matrice protéique, telle que la fibronectine, le tout de façon abondante après 12 à 24 heures 18,19.

Au niveau plaquettaire, l'immunoglobuline ICAM-2 détient un rôle mineur dans l'adhésion de ce type cellulaire aux leucocytes; possédant comme ligand principal le LFA-1 leucocytaire (acronyme de *Lymphocyte Function associated Antigen-1*, une  $\beta_2$ -intégrine CD11a/CD18), l'ICAM-2, contrairement à sa consœur endothéliale ICAM-1, ne reconnaît pas la molécule Mac-1 également typique aux leucocytes (*Macrophage antigen-1*, une autre  $\beta_2$ -intégrine CD11b/CD18). Conséquemment à ces liaisons de moindre importance au niveau plaquettaire, les deux immunoglobulines ICAM-1 et ICAM-2 assurent donc une fonction beaucoup plus prépondérante en ce qui a trait aux interactions cellules endothéliales-neutrophiles qu'en ce qui concerne les interactions plaquettes-neutrophiles 18,19.

#### 1.1.1.2.3.2 Le PECAM plaquettaire

À l'instar des cellules endothéliales (au niveau des jonctions intercellulaires) et des leucocytes, les plaquettes possèdent également l'immunoglobuline PECAM-1 ou CD31. Cette dernière remplit la fonction générale d'intermédiaire aux interactions endothéliales cellules à cellules, de même qu'au niveau de l'adhésion moléculaire de cellules homotypiques 18. Possédant un poids moléculaire de 130 kDa, cette glycoprotéine possède six domaines *immunoglobulin-like* circulaires, un domaine transmembranaire composé de 19 résidus et une queue cytoplasmique de 118 acides aminés. Celle-ci contient d'ailleurs divers sites potentiels à la phosphorylation et aux

modifications lipidiques pouvant, fort probablement, moduler les propriétés adhésives et/ou la distribution sub-cellulaire de PECAM-1 <sup>24</sup>.

De par son rôle important dans l'interaction entre plaquettes, l'immunoglobuline PECAM-1 reconnaît et adhère à une diversité de glycosaminoglycans (GAGs), mais s'associe principalement avec elle-même, générant ainsi des liaisons intercellulaires PECAM/PECAM <sup>25</sup>. Enfin, conséquemment à sa présence importante sur les plaquettes (environ 10 000 copies / cellule), les lymphocytes T et les monocytes, PECAM-1 semblerait détenir un rôle de premier ordre dans les phénomènes d'endothélialisation, de thrombose et de migration transendothéliale leucocytaire <sup>18</sup>.

#### 1.1.1.2.4 Les Glycoprotéines riches en leucine

##### 1.1.1.2.4.1 *Le complexe plaquettaire GPIb/IX - GPV*

Le complexe plaquettaire GPIb/IX - GPV représente la quatrième famille d'importance de molécules d'adhésion, soit les glycoprotéines riches en leucine. Tout d'abord, le complexe GPIb/IX consiste en trois types de sous-unités transmembranaires de type I nommées GPIb<sub>α</sub>, GPIb<sub>β</sub> et GPIX; les sous-unités GPIb<sub>α</sub> (143 kDa) et GPIb<sub>β</sub> (24 kDa) sont liées l'une à l'autre par l'entremise d'un pont disulfure, alors que la GPIX (20 kDa) s'attache à eux via une liaison non covalente. Chacune de ces sous-unités possède de une à neuf séquence(s) extracellulaire(s) riche(s) en leucine, une région transmembranaire et une courte queue cytoplasmique comprenant approximativement et respectivement 100, 34 et 8 acides aminés. Au niveau des membranes plaquettaires, la GPIb/IX s'associe de façon non covalente avec une seconde glycoprotéine riche en leucine, la GPV (82 kDa), formant ainsi le complexe GPIb/IX-V, dénombré à environ 11 000 copies par plaquettes au repos, soit la moitié du nombre total de GPIb/IX (25 000 copies) <sup>8,25</sup>.

Le complexe GPIb/IX, par l'entremise de sa sous-unité GPIb<sub>α</sub>, s'associe principalement à deux types de ligands ne possédant pas la séquence de reconnaissance peptidique RGD, soit l' $\alpha$ -thrombine et le vWF. Malgré cette

fonction d'activation cellulaire, le rôle premier de ce complexe réside dans l'adhésion à la matrice sous-endothéliale exprimant le vWF. Tout comme la  $\beta_1$ -intégrine GPIa/IIa, la GPIb/IX est exprimée de manière constitutive à la surface des plaquettes et participe donc aux premières étapes de l'adhésion plaquettaire à un endothélium endommagé. En absence de circulation, la liaison du complexe GPIb/IX au vWF matriciel est faible et ne peut soutenir, à elle seule, l'adhésion plaquettaire. Cependant, sous conditions de flot, cette liaison génère l'ouverture des canaux calciques, l'activation plaquettaire, la sécrétion des contenus granulaires et la transformation biochimique des  $\beta_3$ -intégrine GPIIb/IIIa, le tout résultant en une forte adhésion cellulaire et l'agrégation plaquettaire 8,25.

Tel que démontré par le groupe de recherche du Dr Gabriel Romo à l'automne 1999 23, la sous-unité GPIb $_{\alpha}$  du complexe GPIb/IX possède une affinité supplémentaire pour la P-sélectine. En utilisant des ovaires d'hamsters chinois transfectés soit avec le gène de la P-sélectine, soit avec celui de la sous-unité GPIb $_{\alpha}$ , l'équipe mit en évidence que les cellules exprimant la P-sélectine à leur surface adhèrent à la GPIb $_{\alpha}$  immobile, alors que les ovaires exprimant la sous-unité GPIb $_{\alpha}$  roulent et adhèrent sur la P-sélectine des cellules endothéliales stimulées à l'histamine. Ce groupe démontra également l'inhibition du roulement des plaquettes sur un endothélium activé grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre la P-sélectine et la GPIb $_{\alpha}$ . Les conclusions de cette recherche furent donc que le complexe GPIb/IX-V sert d'intermédiaire à l'attachement plaquettaire autant au niveau de la matrice sous-endothéliale (via le vWF) qu'au niveau de l'endothélium activé (via la P-sélectine). Sachant que les plaquettes stimulées expriment à la fois le complexe GPIb/IX-V et la P-sélectine à leur surface, les résultats de cette étude peuvent être extrapolés, suggérant ainsi un rôle important à cette affinité P-sélectine / GPIb/IX-V au sein de l'agrégation plaquettaire.

Pour ce qui est de la GPV, la communauté scientifique la considéra longtemps comme étant le substrat primaire de la membrane plaquettaire à la

thrombine; clivée par cet agent activateur, la GPV libère un fragment de 69,5 kDa au sein du milieu extracellulaire. Cependant, il a récemment été démontré que, malgré le blocage moléculaire du clivage de la GPV, la thrombine active tout de même les plaquettes, produisant ainsi l'agrégation de celles-ci. Aujourd'hui encore, les connaissances scientifiques n'attribuent point de fonction spécifique à cette glycoprotéine riche en leucine.

### 1.1.1.3 Les fonctions plaquettaires au sein des phénomènes physiologiques

#### 1.1.1.3.1 L'adhésion plaquettaire à la matrice sous-endothéliale

D'un point de vue anatomique, les vaisseaux sanguins artériels sont composés de trois couches distinctes, soit l'intima (tunique interne), la média (tunique moyenne) et l'adventice ou externa (tunique externe), chacune d'entre elles comprenant diverses structures histologiques définies. Ainsi, l'intima se compose d'un revêtement d'endothélium (épithélium pavimenteux simple), d'une membrane basale, et d'une couche de tissu élastique (limitante élastique interne), comparativement à la média, celle-ci contenant plutôt des fibres élastiques et des fibres musculaires lisses, et à l'adventice, cette dernière faite principalement de fibres élastiques et collagènes <sup>1</sup>.

Que ce soit sous conditions chirurgicales (à titre d'exemples, l'angioplastie ou suite à un pontage) ou pathologiques (la rupture d'une plaque athéromateuse ou d'un thrombus de la paroi interne), une lésion de ces couches vasculaires entraîne rapidement une réponse plaquettaire. D'ailleurs, l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale exposée demeure une condition préalable à l'initiation de l'hémostase dans un contexte *in vivo*. Tel que décrit au sein des pages précédentes, les membranes plaquettaires contiennent des concentrations élevées d'intégrines et autres glycoprotéines (GP) responsables de l'adhésion des plaquettes à une matrice extracellulaire endommagée. Suite à cette étape cruciale, les plaquettes s'accumulent de façon importante au niveau de la paroi rompue, formant ainsi un caillot



hémostatique mettant fin à l'hémorragie. Contrairement à la simplicité de cette explication, le processus physiologique d'adhésion plaquettaire est assujéti à de nombreux facteurs, dont la densité des récepteurs et des ligands, les taux d'association et de dissociation et les micromécanismes, en plus de requérir à une série complexe d'événements, ceux-ci se résumant globalement en trois étapes distinctes, soit 1) le roulement et l'adhésion primaire des plaquettes; 2) l'activation plaquettaire par contact comprenant la signalisation intracellulaire et la sécrétion, et finalement 3) l'adhésion ferme à la matrice 26,27.

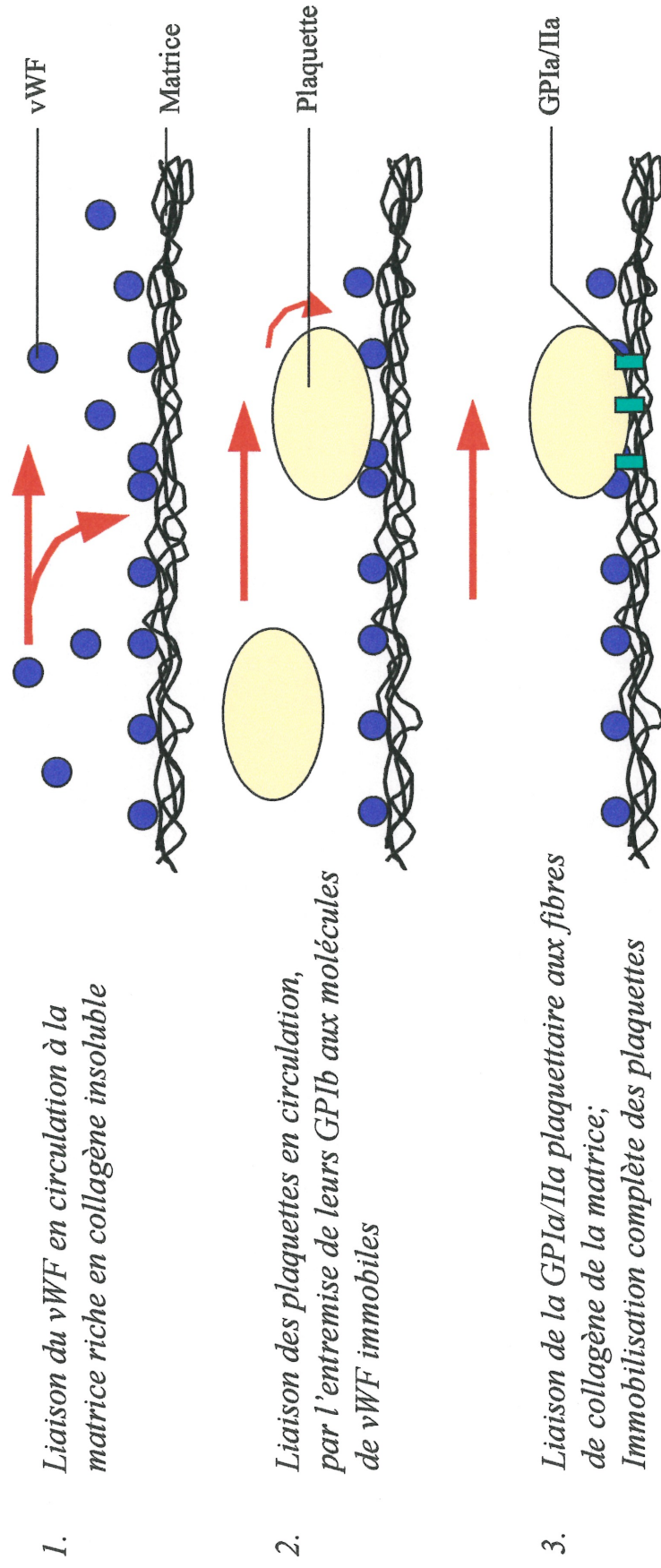
Par la suite, les plaquettes activées ayant adhéré à la matrice procéderont au recrutement d'autres plaquettes, le tout se concluant par leur activation sous l'action d'agonistes maintenant présents dans le sang (ADP, thrombine, etc.), puis par la formation d'un agrégat, phénomène appelé agrégation plaquettaire et traité au sein de la prochaine section (1.1.1.3.2).

Afin d'accompagner l'analyse de ses diverses étapes, les figures 1 (portant sur l'adhésion plaquettaire à la matrice sous-endothéliale) et 2 (schématisant l'agrégation plaquettaire) vous sont présentées aux pages subséquentes.

---

# Figure 1: L'adhésion plaquettaire à la matrice sous-endothéliale

## Étape 1: Roulement et adhésion primaire des plaquettes



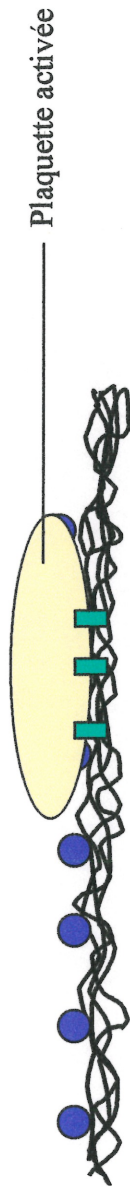
1. Liaison du vWF en circulation à la matrice riche en collagène insoluble

2. Liaison des plaquettes en circulation, par l'entremise de leurs GPIb aux molécules de vWF immobiles

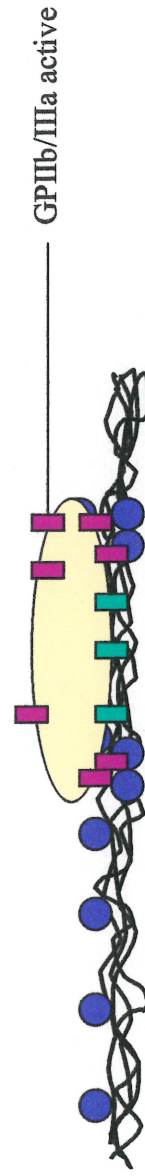
3. Liaison de la GPIa/IIa plaquettaire aux fibres de collagène de la matrice; Immobilisation complète des plaquettes

## Figure 1: L'adhésion plaquettaire à la matrice sous-endothéliale (suite)

**Étape 2: Activation par contact, signalisation intracellulaire et sécrétion plaquettaires**

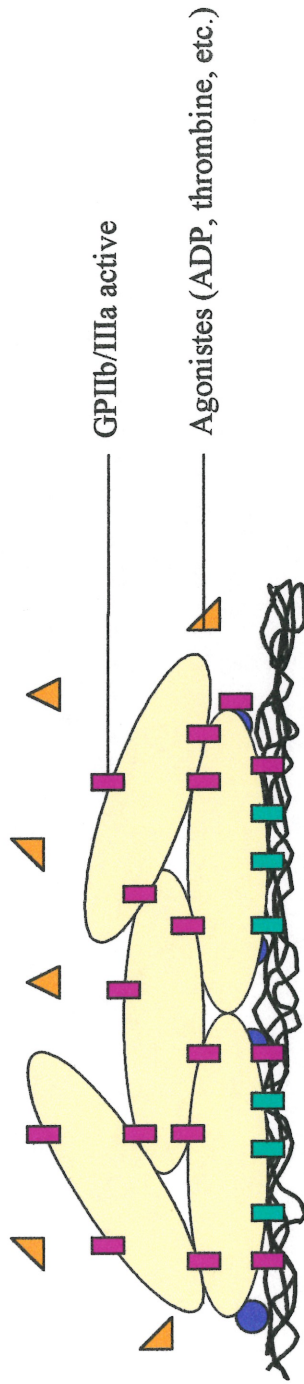


**Étape 3: Adhésion ferme à la matrice**



## Figure 2: L'agrégation plaquettaire

**Étape 4: Recrutement plaquettaire, activation par agonistes, agrégation et formation du thrombus**



#### 1.1.1.3.1.1 *Roulement et adhésion primaire des plaquettes*

L'adhésion primaire des plaquettes à la matrice sous-endothéliale récemment endommagée se produit suite à l'exposition de fibres de collagène du côté du flot sanguin. Malgré le fait que les niveaux de collagène des parois vasculaires varient de 20 % dans l'aorte jusqu'à 40 % au sein des petites artères <sup>28</sup>, le collagène, sous forme insoluble, demeure absent à la surface endothéliale interne des vaisseaux sous conditions physiologiques normales. Cependant, suite à un bris de cette paroi, et par le fait même, exposition du collagène, la surface vasculaire devient hautement thrombogénique, favorisant ainsi le ralentissement et le roulement des plaquettes, le tout menant à une adhésion primaire. En fait, trois étapes importantes coordonnent ce phénomène hémostatique. La première étape consiste en la liaison des molécules de vWF libres en circulation au collagène présent à la surface sous-endothéliale. La seconde étape se distingue par l'interaction des plaquettes en circulation, via leurs GPIb/IX, avec les molécules de vWF immobilisées. Malgré la grande rapidité de cette interaction, la liaison entre la GPIb/IX et le vWF demeure de faible affinité, de sorte que les plaquettes conservent toujours une certaine mobilité sur la surface riche en collagène, mais démontrent cependant une vitesse grandement réduite. Enfin, la troisième étape de l'adhésion primaire débute lors du ralentissement des plaquettes, favorisant ainsi la liaison entre le collagène et leurs molécules d'adhésion GPIa/IIa, GPIV (immunoglobuline) et GPVI (immunoglobuline). Cet attachement provoque d'ailleurs l'activation des intégrines GPIa/IIa, ceci leur conférant une affinité accrue envers le collagène de la matrice. Dès lors, une quantité supplémentaire de GPIa/IIa s'associe aux fibres de collagène, le tout occasionnant une immobilisation complète des plaquettes sur la surface vasculaire endommagée <sup>26,29</sup>.

En résumé, les trois étapes décrites ci-dessus détiennent un rôle capital dans l'initiation du phénomène hémostatique, à savoir «la capture» des plaquettes circulant rapidement sous l'effet du flot sanguin, suivie du ralentissement, du roulement et de l'arrêt final de ces cellules au niveau du site

lésé. Il est cependant déplorable, qu'encore aujourd'hui, de nombreux mécanismes relatifs à l'adhésion primaire des plaquettes demeurent inexpliqués. Par exemple, pourquoi les plaquettes au repos adhèrent-elles au vWF immobilisé à la surface vasculaire endommagée, alors qu'elles ne peuvent aucunement lier la forme soluble de cette protéine sans être préalablement activées ? Bien que diverses réponses furent suggérées à cette interrogation, allant d'une modification structurale du vWF une fois immobilisé à la nécessité de plusieurs sites de liaison entre deux surfaces afin d'obtenir un attachement plus consistant, aucune de celles-ci ne détient une validité expérimentale <sup>26</sup>.

#### 1.1.1.3.1.2 *Activation par contact, signalisation intracellulaire et sécrétion plaquettaires*

L'immobilisation et l'adhésion primaire des plaquettes sur la matrice endommagée engendrent l'enclenchement d'une seconde étape menant à l'activation cellulaire, phénomène perçu par microscopie électronique sous la forme d'un étirement ou étalement plaquettaire <sup>30,31</sup>. Cette activation dite «par contact» est initialement imputable à la GPVI, une molécule d'adhésion détenant une affinité de faible envergure envers le collagène, en plus d'être structurellement associée avec une chaîne homodimérique nommée FcR $\gamma$  <sup>26,32</sup>. Ainsi, conséquemment à la liaison GPVI-collagène, une enzyme intracellulaire de la famille Src, probablement Fyn, phosphoryle deux résidus tyrosine de la portion cytoplasmique ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) de la chaîne FcR $\gamma$ . Ceci permet alors à la tyrosine kinase p72 Syk de s'associer avec la chaîne FcR $\gamma$  phosphorylée en plus d'occasionner l'activation du domaine catalytique de Syk. De là, l'activation de cette kinase modifie à la hausse l'activité et les fonctions de la phospholipase (PL) C $\gamma$ <sub>2</sub>, ceci par l'entremise d'un tierce messenger, le SLP-76. La PLC $\gamma$ <sub>2</sub>, maintenant active, génère à son tour par clivage du PIP<sub>2</sub> (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate), deux seconds messagers importants, DAG (1,2-diacylglycérol) et IP<sub>3</sub> (inositol 1,4,5-triphosphate), ceux-ci provoquant respectivement l'activation d'une

protéine kinase C et l'augmentation de la concentration cytoplasmique en calcium à partir du système tubulaire dense <sup>32</sup>.

Malgré la complexité relative des voies de signalisation intracellulaires plaquettaires ayant lieu suite à un contact adhésif, celles-ci culminent en l'activation cellulaire, comprenant la génération de thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), le changement morphologique, la sécrétion des contenus granulaires et l'activation des intégrines membranaires GPIIb/IIIa. De plus, malgré le rôle prédominant du GPVI au niveau de l'activation plaquettaire par contact, d'autres molécules d'adhésion s'associant au collagène induirait également des voies de signalisation intracellulaires, telles que la GPIa/IIa et la GPIV, en plus de la GPIb/IX-V interagissant principalement avec le vWF <sup>32-34</sup>.

L'un des événements-clé découlant de l'activation est sans contredit la sécrétion plaquettaire, processus correspondant au déversement spécifique par exocytose des contenus lysosomaux et granulaires (granules alpha et granules denses) au sein de l'environnement cellulaire sans toutefois provoquer la perte de constituants provenant d'autres compartiments cytoplasmiques. S'effectuant sur une durée variant de 10 à 120 secondes, dépendamment de la «puissance» du stimulus et de la substance sécrétée mesurée, la sécrétion plaquettaire détient deux fonctions principales, soit 1) l'apparition ou l'augmentation de certaines molécules d'adhésion à la surface des plaquettes, telles que la P-sélectine et la GPIIb/IIIa, par l'entremise des fusions membranaires granulaires et cytoplasmique, en plus de 2) une action directe sur les cellules environnantes, dont les plaquettes en circulation, provoquant ainsi un recrutement supplémentaire et l'amplification de la réponse au site vasculaire endommagé. Le phénomène de sécrétion plaquettaire comprends trois processus sécrétoires distincts en relation avec les trois types d'organelles d'entreposage présents au sein du cytoplasme des plaquettes, soit les granules alpha (facteurs de coagulation, protéines spécifiques aux plaquettes, facteurs de croissance et glycoprotéines), les granules denses (ATP, ADP, calcium, magnésium et sérotonine) et les lysosomes (acides hydrolytiques).

Contrairement aux agonistes faibles ADP, épinéphrine, PAF (*Platelet-Activating Factor*), sérotonine et TxA<sub>2</sub> ne provoquant que l'expulsion des contenus granulaires, le collagène de la matrice favorise l'exocytose des trois types d'organelles d'entreposage, tout comme la thrombine et la trypsine. Sachant que relativement peu de plaquettes en circulation adhèrent aux fibres de collagène de la matrice, la forte réponse sécrétoire occasionnée par l'activation des plaquettes interagissant directement avec le collagène permet ainsi, par l'entremise du relâchement d'ADP, de sérotonine et de TxA<sub>2</sub>, d'activer d'autres plaquettes environnantes. Enfin, malgré le fait qu'aucune substance n'a été clairement identifiée en ce qui concerne l'inhibition de la sécrétion des contenus granulaires, des données récentes démontrent que celles élevant la concentration intracellulaire en AMP cyclique (prostaglandines E<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> et I<sub>2</sub>; adénosine; papavérine, dipyridamole, méthylxanthines) diminuent drastiquement la réaction basale plaquettaire, supposément par la recapture du Ca<sup>++</sup> via l'activation des canaux calciques du système tubulaire dense et l'interférence dans le métabolisme des polyphosphoinositides <sup>35</sup>.

#### 1.1.1.3.1.3 *Adhésion ferme à la matrice*

Tel que décrit précédemment, l'activation plaquettaire suivant un contact avec la matrice riche en collagène génère deux seconds messagers sous l'action d'une phospholipase C, soit IP<sub>3</sub> (ayant pour effet l'augmentation de la concentration cellulaire en calcium, ceci provoquant l'exocytose des granules de sécrétion) et DAG, ce dernier activant une protéine kinase C. L'activation de cette PKC serait responsable de la génération de la pleckstrine phosphorylée qui, toutes deux, occasionneraient l'initiation d'un signal *inside-out*. Ce signal, agissant par l'entremise de régulateurs inconnus, aboutirait probablement à la phosphorylation de certains résidus sérine/thréonine de la partie cytoplasmique de la GPIIb/IIIa, ceci permettant à cette β<sub>3</sub>-intégrine de changer de conformation et par le fait même, favoriser son association avec ses différents ligands, principalement le fibrinogène <sup>12,36-38</sup>.



Au niveau de l'adhésion, la GPIIb/IIIa active assure une certaine fermeté à la liaison plaquettes activées / collagène de la matrice en s'associant avec le vWF sous condition de flot. Ainsi, les molécules d'adhésion GPIb/IX-V, GPIa/IIa, GPIV et GPVI génèrent rapidement des liaisons de faibles affinités avec le vWF ou le collagène de la matrice, le tout permettant l'immobilisation des plaquettes sur la paroi vasculaire endommagée, alors que la GPIIb/IIIa procède à l'adhésion ferme de la cellule qu'une fois cette dernière activée <sup>26</sup>.

Afin de conclure cette section portant sur l'adhésion plaquettaire à la matrice sous-endothéliale, mentionnons simplement que d'autres ligands vasculaires peuvent également s'associer aux plaquettes et donc jouer un rôle d'ordre secondaire au niveau de l'adhésion. Ainsi, la vitronectine exposé par la matrice est reconnue par la GPIIb/IIIa et le récepteur de la vitronectine ( $\alpha_v\beta_3$ ) plaquettaires, tandis que la fibronectine de la paroi endommagée démontre une affinité importante pour la GPIIb/IIIa et la GPIc/IIa présentes à la surface des plaquettes <sup>26</sup>.

#### 1.1.1.3.2 L'agrégation plaquettaire

##### *1.1.1.3.2.1 Recrutement plaquettaire et activation par agoniste*

Alors qu'une monocouche de plaquettes activées recouvrent maintenant la matrice sous-endothéliale, la réponse hémostatique s'engage dans une nouvelle direction, c'est-à-dire l'amplification de la réponse par le recrutement d'autres plaquettes pouvant s'associer à celles formant la monocouche, phénomène appelé agrégation plaquettaire. Afin de générer ces liaisons cellulaires, les plaquettes en circulation doivent être activées. Tel que discuté auparavant, la sécrétion des contenus granulaires des plaquettes ayant préalablement adhérees à la matrice jouent un rôle-clé à ce niveau, ceci en favorisant le relâchement de divers agonistes, tels que l'ADP, la sérotonine et la  $TxA_2$ . De plus, l'enclenchement du processus de coagulation, que ce soit par la voie extrinsèque ou intrinsèque, engendre la conversion de la prothrombine en

thrombine, enzyme reconnu comme étant l'un des agonistes les plus puissants quant au recrutement et à l'agrégation plaquettaire <sup>36</sup>.

L'activation plaquettaire à la thrombine se compare grossièrement à celle induite par le collagène, c'est-à-dire qu'elles provoquent une réponse physiologique et intracellulaire semblables, telle que la signalisation *inside-out*. Ce processus cytoplasmique débute lors de la fixation de la thrombine à la membrane plaquettaire, induisant ainsi un clivage d'un ou plusieurs de ses récepteurs à sept domaines transmembranaires PAR1, PAR3 ou PAR4 (*Protease-Activated Receptors*). Étant couplés, comme tous les récepteurs heptahélicoïdaux, à des familles différentes de protéines G, ces récepteurs, lorsque clivés par l'agoniste, adoptent un changement conformationnel ayant pour conséquence l'activation des phospholipases C de type  $\beta_2$  (PLC $\beta_2$ ). Ainsi, contrairement à l'activation au collagène induisant un accroissement de l'activité de la PLC $\gamma_2$  par phosphorylation de ses résidus tyrosine, celle découlant de l'action de la thrombine occasionne plutôt l'activation d'un autre isoforme de la phospholipase C, soit la PLC $\beta_2$ , et ce, par l'entremise de la sous-unité  $\alpha$  des protéines G de type Gq et/ou du complexe  $\beta\gamma$  des protéines G de type Gi. De là, la signalisation *inside-out* induite par le collagène ou la thrombine emprunte une voie commune, soit l'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> en IP<sub>3</sub> (responsable de l'augmentation de la concentration calcique dans le cytoplasme) et DAG (responsable de l'activation d'une PKC, celle-ci, avec l'aide de la pleckstrine phosphorylée, active à son tour la GPIIb/IIIa membranaire, par phosphorylation d'un ou plusieurs résidus sérine ou thréonine du domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\beta_3$ ) <sup>36,39</sup>.

Malgré le fait que l'activation des plaquettes circulant aux abords du site vasculaire lésé est réalisée en majeure partie grâce à l'action de la thrombine, d'autres agonistes importants participent également à ce phénomène, tels que l'ADP et la thromboxane A<sub>2</sub>, ceux-ci préconisant cependant des voies de signalisation cellulaire différentes de la thrombine (par exemple, la voie de l'adénylate cyclase et de la phospholipase A<sub>2</sub> pour l'ADP) en plus de s'associer

à des récepteurs membranaires qui leurs sont particuliers (par exemple, les récepteurs purinergiques P2Y1 et P2T<sub>AC</sub> propres à l'ADP) 39,40.

#### 1.1.1.3.2.2 *Agrégation, Signalisation outside-in et formation du thrombus*

Le changement conformationnel de la GPIIb/IIIa représente le point tournant de l'agrégation plaquettaire; suite à son activation, le fibrinogène sanguin peut dès lors s'associer à cette intégrine plaquettaire. La liaison de ce ligand et le regroupement (*clustering*) des GPIIb/IIIa actives facilitent la formation de ponts assurant ainsi la liaison entre deux plaquettes activées et la consolidation de l'agrégat 36.

Le rôle essentiel du fibrinogène au niveau de l'agrégation plaquettaire demeure une découverte âgée de plus de 25 ans et son association à la GPIIb/IIIa fut démontré en 1985 par Peerschke 40. Récemment, les résultats de nouvelles études ont été publiés afin de rafraîchir cette théorie, suggérant ainsi la possibilité d'autres interactions moléculaires entre les plaquettes. Les recherches de l'équipe du Dr Shaun Jackson, publiées en mars 2000, en sont un exemple concret, ce dernier ayant démontré l'importance de l'association vWF et GPIb/IX plaquettaire. Son modèle révisé de l'agrégation suggère donc les étapes suivantes, soit 1) l'exposition de vWF à la surface des plaquettes immobilisées sur la matrice endothéliale; 2) une phase réversible de l'agrégation plaquettaire basée sur la liaison du GPIb/IX des plaquettes en circulation au vWF de celles ayant adhéré à la paroi vasculaire endommagée; et 3) une phase irréversible de l'agrégation dépendante de la double liaison GPIIb/IIIa active -- fibrinogène -- GPIIb/IIIa active 41. De plus, en se basant sur les études du Dr Romo, l'interaction P-sélectine / GPIb/IX semble être une nouvelle approche prometteuse concernant l'agrégation plaquettaire, quoique n'ayant pas encore été approuvée expérimentalement 23.

L'interaction du fibrinogène avec la GPIIb/IIIa induit également de nombreuses réponses intracellulaires appelées, cette fois-ci, signal *outside-in*. Les phénomènes physiologiques occasionnés suite à cette signalisation

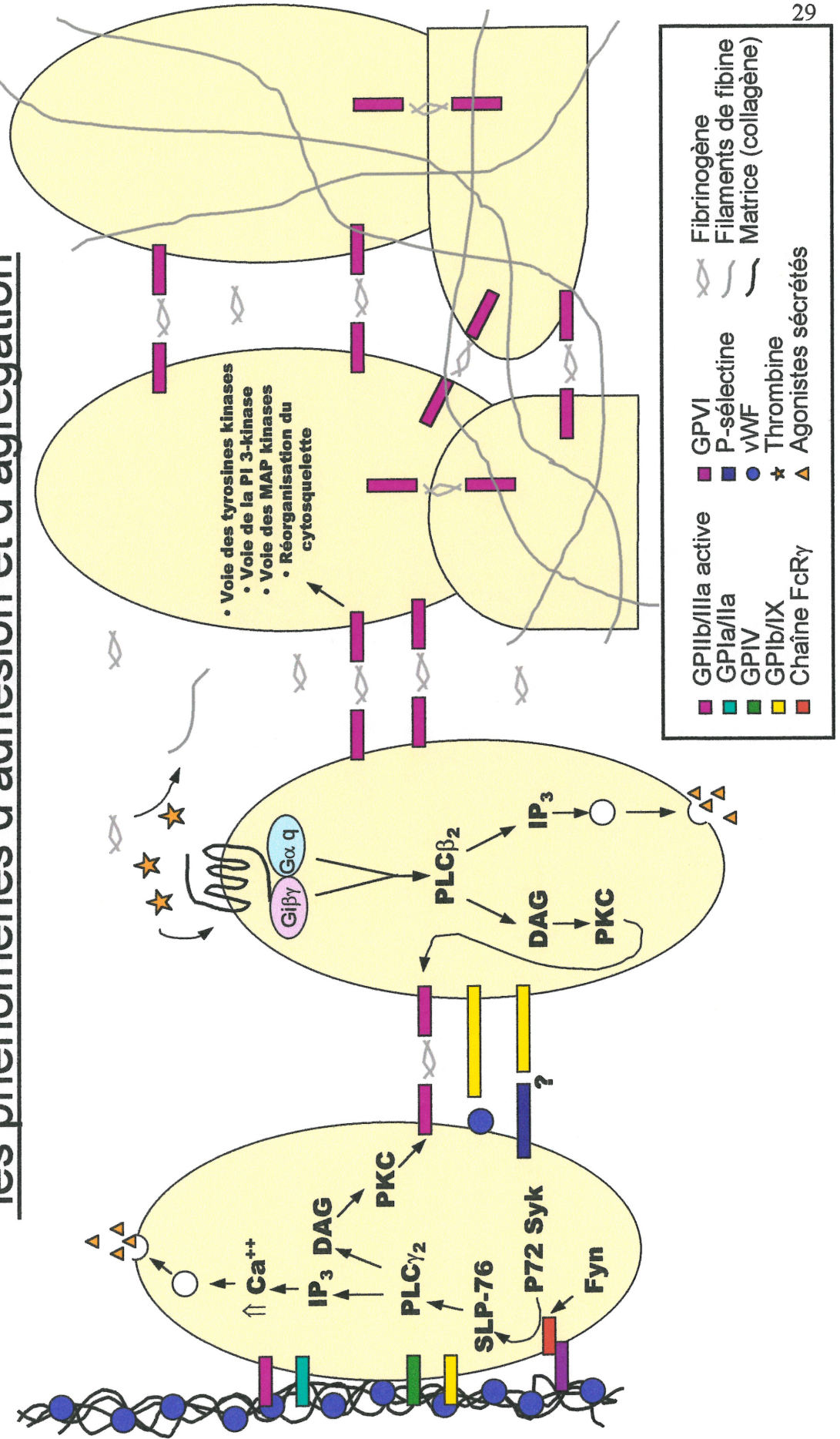
provenant de l'intégrine comprennent une seconde vague d'agrégation, la libération de vésicules membranaires procoagulantes, la réorganisation du cytosquelette et la rétraction des caillots de fibrine. Le regroupement ou *clustering* des complexes GPIIb/IIIa ayant lié le fibrinogène et l'initiation d'une réorganisation cytosquelettique sont à l'origine de la signalisation *outside-in*, cette dernière induisant l'activation de plusieurs voies différentes, dont les trois principales se nomment 1) la voie des tyrosines kinase, 2) la voie de la phosphatidylinositol 3 kinase et 3) la voie des MAP (*Mitogen Activated Protein*) kinases. La partie cytoplasmique de la GPIIb/IIIa s'associant aux protéines cytosquelettiques, plusieurs molécules de cette signalisation telles que la p60 Src, la p72 Syk (également impliquée dans la signalisation *inside-out* lors de l'activation par contact), la pFAK, la PI 3-K et la p21 ras sont recrutées dans les structures du cytosquelette 25,36,39.

Les liaisons interplaquettaires via leurs GPIIb/IIIa et le fibrinogène assurent un attachement lâche entre les cellules du thrombus en formation. Une autre fonction de la thrombine entre alors en jeu, celle-ci visant la transformation du fibrinogène soluble en filaments de fibrine insolubles venant renforcer et stabiliser le caillot 1,4. Une fois formé, le thrombus obture la lésion vasculaire et s'enclenche alors la synérèse, phénomène également connu sous le nom de rétraction du caillot et consistant en la consolidation ou resserrement du caillot de fibrine. Tel que proposé par les études de Budtz-Olsen et de Pollard, la synérèse nécessite une action plaquettaire d'ordre structurale; grâce aux interactions actine/myosine ayant lieu au sein de leur cytoplasme, les plaquettes provoquent la contraction du caillot en rétractant leurs filopodes, ceux-ci étant attachés aux filaments de fibrine. De plus, la libération, entre autres, du facteur XIII par les plaquettes activées favorisent également la compression du thrombus 1,40.

Afin de synthétiser ces diverses notions concernant les fonctions plaquettaires au sein des phénomènes physiologiques, la figure 3 vous est présentée à la page suivante. Cette figure tente donc de regrouper

schématiquement les multiples molécules d'adhésion ainsi que les différentes voies intracellulaires impliquées lors de l'adhésion et l'agrégation plaquettaire suivant un endommagement de la paroi vasculaire. Quoique répertoriées sous forme d'étapes consécutives afin de faciliter leurs analyses, les fonctions plaquettaires ne suivent cependant guère un ordre aussi précis. À titre d'exemple, la formation du thrombus peut s'amorcer avant même que la surface matricielle ne soit complètement recouverte de plaquettes, et ce dû au fait que l'adhésion et l'agrégation plaquettaire constituent des processus dynamiques interreliées l'un à l'autre.

**Figure 3: Principales molécules d'adhésion et voies de signalisation intracellulaires plaquettaire impliquées dans les phénomènes d'adhésion et d'agrégation**



### 1.1.1.3.2.3 Agrégation *in vitro* et implication du «*shear stress*» dans les conditions pathologiques

À l'instar des agonistes et antagonistes chimiques, plusieurs conditions physiques relatives aux vaisseaux sanguins dénotent une influence marquée sur les fonctions plaquettaires. L'une de ces forces mécaniques démontrant l'apport le plus significatif quant à l'hémostase et à la formation du thrombus se nomme «tension de cisaillement» ou *shear stress*, selon son appellation littéraire anglophone. Définies comme étant «la conséquence du mouvement relativement parallèle des fluides planes adjacents sous conditions de flot», les forces de cisaillement, mesurées en dynes/cm<sup>2</sup>, sont imposées aux surfaces des cellules sanguines et aux parois vasculaires, ceci générant une force s'opposant à l'adhésion stable et à l'agrégation <sup>42,43</sup>.

Comparativement aux veines, cette propriété hydrodynamique que possèdent les fluides vasculaires démontre une importance accrue au niveau des artères, plus particulièrement chez les artérioles. Ainsi, sous conditions normales, la force de cisaillement physiologique du circuit artériel se chiffrent entre 20 et 30 dynes/cm<sup>2</sup> (dans le cas du circuit veineux, celles-ci oscillent plutôt entre 1 et 8 dynes/cm<sup>2</sup>), alors qu'en conditions pathologiques (par exemple, lors de la sténose d'une artère coronarienne), les forces de cisaillement décuplent, se situant ainsi à plus de 350 dynes/cm<sup>2</sup>. Le dernier cas, étant fréquemment associé à la formation d'un thrombus plaquettaire, démontre donc qu'une sténose pathologique peut directement mener à une agrégation dépendante du cisaillement au niveau des artères contractées <sup>43</sup>. Ce type d'agrégation, déclenchée par les conditions physiques ambiantes, découle des effets que possèdent les forces de cisaillement envers 1) la fréquence de collision entre les plaquettes en suspension; 2) l'efficacité de l'adhésion plaquettaire (celle-ci décroissant suite à une augmentation des forces); 3) la cinétique de la liaison du fibrinogène aux GPIIb/IIIa actives lorsque la fréquence de collisions plaquettaires induite par le cisaillement excède celle induite par la

diffusion; 4) le relâchement d'ADP provenant des granules denses; et 5) l'association GPIb/IX – vWF sous conditions de cisaillement élevées <sup>44</sup>.

Les recherches concernant les effets des forces de cisaillement sur l'agrégation plaquettaire débutèrent dans les années 60 avec l'invention, en 1962, du premier agrégomètre plaquettaire par Born. Encore utilisée de façon routinière de nos jours, cette méthode *in vitro* permet l'enregistrement des changements de la transmission de la lumière ayant lieu au sein d'une suspension plaquettaire en agitation alors que des agrégats plaquettaires sont en formation. Fidèle représentant des réactions plaquettaires, l'agrégomètre influença grandement les études portant sur l'agrégation, permettant ainsi une meilleure compréhension de l'action des divers agonistes. De plus, grâce au fait que les plaquettes sont agitées afin de les maintenir en suspension, les interactions plaquettes-plaquettes prenant place dans l'agrégomètre se trouvent donc sous l'influence des forces de cisaillement faibles du fluide <sup>43</sup>. De là, il a été prouvé que des plaquettes normales n'agrègent point sous l'effet de ses conditions mécaniques, à moins qu'un agoniste chimique soit ajouté à la suspension <sup>42</sup>. En 1975, Brown et ses collègues démontrèrent les effets directs des forces de cisaillement sur les plaquettes via un viscosimètre à cône et à plateau, appareil exposant les plaquettes de la fraction sanguine PRP (*Platelet-Rich Plasma*) à différentes forces de cisaillement homogènes par l'entremise d'un cône rotatif et d'un plateau stationnaire <sup>42,43</sup>. Ces chercheurs observèrent que sous des conditions pathologiques de forces de cisaillement (>60 dynes/cm<sup>2</sup>), les plaquettes du PRP entreprennent un changement conformationnel, en plus de la sécrétion et de l'enclenchement de l'agrégation. Ces résultats ne furent expliqués qu'en 1978, grâce aux travaux de Weiss, celui-ci mettant en évidence l'importance du vWF dans l'agrégation induite par des forces de cisaillement élevées. Un nouveau modèle de l'agrégation des plaquettes en suspension fut donc proposé, celui-ci impliquant deux types de liaisons moléculaires dépendamment de la puissance des forces de cisaillement en jeu. Ainsi, sous des conditions faibles (conditions



physiologiques *in vivo* ou celles générées via un agrégomètre *in vitro*), l'agrégation plaquettaire implique l'association du GPIIb/IIIa actif au fibrinogène. Cependant, lors de conditions de cisaillement élevées (conditions pathologiques *in vivo* ou celles générées via un viscosimètre à cône et à plateau *in vitro*), la formation d'agrégats par les plaquettes dépend plutôt de la liaison du GPIb/IX au vWF, ce dernier semblant adopter une forme filamenteuse allongée lorsque présent au sein de cet environnement. Cette attachement moléculaire provoque alors l'ouverture des canaux calciques plaquettaires, ceci provoquant un flux transmembranaire d'ions calcium ainsi qu'une augmentation de la concentration cytoplasmique de l'ordre de deux à trois fois. Cette élévation du calcium intracellulaire provoquera, en plus de la sécrétion d'agoniste via l'exocytose des granules, l'activation de la PKC, le tout menant à l'activation des GPIIb/IIIa et à leur liaison au vWF. Cette association GPIIb/IIIa active -- vWF devient alors le centre de l'agrégation plaquettaire induite par des forces de cisaillement pathologiques <sup>42-44</sup>.

En somme, tel que démontré par l'entremise des études *in vitro*, les forces de cisaillement possèdent d'importants effets sur le déclenchement et l'amplification de l'agrégation plaquettaire. Bien que sous conditions physiologiques normales, cette tension hydrodynamique ne semble guère provoquer ou influencer l'agrégation plaquettaire typique (GPIIb/IIIa-Fibrinogène-GPIIb/IIIa), des conditions contraires, soit lorsque les forces de cisaillement deviennent pathologiques, engendrent l'agrégation via un processus différent procurant au vWF un rôle-clé dans les interactions plaquettes-plaquettes <sup>44</sup>. Au niveau clinique, l'importance du déclenchement de l'agrégation par l'entremise de ces forces de cisaillement anormales est bien connue. La condition clinique la plus significative est sans contredit la sténose artérielle causée par l'élévation du *shear stress* lors de l'occlusion chronique athérotrombotique d'une artère coronarienne, carotidienne ou périphérique <sup>43</sup>.

#### 1.1.1.3.2.4 Régulations hémostatiques

La régulation hémostatique constitue en fait une boucle de rétroaction négative afin de contrôler l'amplification de l'agrégation plaquettaire et l'expansion effrénée du thrombus. Un des premiers paliers de cette autorégulation se situe au niveau de la fibrine, cette dernière ayant le pouvoir d'absorber et d'inactiver jusqu'à 90% de la thrombine fabriquée à partir de la prothrombine. Divers agents biologiques assurent également le contrôle de l'agrégation plaquettaire. Ainsi, les leucocytes et les cellules endothéliales produisent la prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ), une prostanoïde entravant l'action agoniste de la  $\text{TxA}_2$ . D'autres agents anticoagulants sont aussi présents dans le sang, tels que l'antithrombine III (AT-III), la protéine C, l'alpha-2-macroglobuline, l'alpha-1-antitrypsine et finalement, l'héparine, cette dernière étant produite par les mastocytes et basophiles et agissant comme bloqueur de la thrombine 1,4.

En plus d'être un puissant vasodilatateur, l'oxyde nitrique (NO) agit également comme inhibiteur de l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. Produit de la conversion de la L-arginine en L-citrulline par la famille des NO synthases (NOS) (dont l'un des ses isoformes est d'ailleurs associé à la membrane des cellules endothéliales (eNOS)), le NO agit sur les plaquettes en élevant leur concentration intracellulaire en GMP cyclique. Le relâchement du NO par les cellules endothéliales est stimulé, entre autres, par les forces de cisaillement, celle-ci agissant directement sur l'élévation de l'ARNm du NO synthase constitutif (cNOS) 43.

## **1.1.2 Les interactions plaquettes-neutrophiles**

### **1.1.2.1 Introduction**

Bien que l'apport plaquettaire aux phénomènes d'hémostase et de thrombose soient connus depuis plus de 25 ans et que le rôle des neutrophiles dans la réponse inflammatoire soit de mieux en mieux compris, l'adhésion et la coopération entre ces deux types cellulaires demeure un principe relativement nébuleux, celui-ci ne semblant intéresser la communauté scientifique que depuis quelques années <sup>45</sup>. Sachant aujourd'hui que les neutrophiles et les plaquettes interagissent physiquement et métaboliquement durant les processus d'inflammation et d'hémostase, diverses études ont récemment démontré que les plaquettes attirent les leucocytes au site endothélial endommagé afin de promouvoir l'inflammation et indirectement l'athérogénèse <sup>46,47</sup>. À l'inverse, l'adhésion neutrophilique à l'endothélium dysfonctionnel conduit également à l'adhésion plaquettaire et à la formation locale du thrombus <sup>47</sup>. De plus, il a été démontré expérimentalement que la stimulation spécifique des neutrophiles ou des plaquettes mène directement à une augmentation du pourcentage de neutrophiles liant les plaquettes. Cependant, bien que la stimulation plaquettaire à la thrombine favorise un accroissement majeur des interactions plaquettes-neutrophiles, la stimulation des neutrophiles à l'aide de fMLP occasionne plutôt une élévation de plus faible envergure du nombre de plaquettes par neutrophiles. La combinaison des deux agonistes, quant à elle, génère un accroissement encore plus élevé du nombre d'événements (adhésion plaquettes-neutrophiles). Ces résultats suggèrent donc que la liaison des plaquettes aux neutrophiles puisse être initiée soit par la stimulation conjointe des deux types cellulaires, soit par leur activation spécifique, cette dernière possibilité menant à des modèles distincts d'adhésion intercellulaire <sup>46</sup>.

Les implications physiopathologiques de ces interactions revêtent une importance capitale; les «co-aggrégats» plaquettes-leucocytes sont fréquemment présents dans la circulation sanguine des patients souffrants

d'angine instable et ayant subi une angioplastie coronarienne ou un pontage de l'artère coronaire 47.

Ayant comme principal objectif une meilleure compréhension des interactions entre les plaquettes et les neutrophiles, la présente section s'attarde ainsi sur les diverses propriétés de cette liaison en décrivant brièvement les différents effets que possèdent les deux types cellulaires l'un envers l'autre, ainsi que les molécules d'adhésion impliquées dans ce phénomène. Le tout sera précédé d'un bref survol physiologique des neutrophiles et de leur structure, ainsi que d'un rapide coup d'œil aux deux principales molécules d'adhésion propres aux leucocytes, soit le complexe CD11/CD18 et la L-sélectine, cette dernière, quoique peu impliquée dans la coopération plaquettes-neutrophiles, assure une fonction décisive dans l'adhésion neutrophilique aux cellules endothéliales bordant le site lésé.

#### 1.1.2.2 Structure des neutrophiles

Dérivant des lignées myéloïdes, les neutrophiles sont des leucocytes granulocytes polymorphonucléaires. Représentant entre 60 et 70% des globules blancs totaux (soit environ 2 500 à 7 500 cellules par millimètre cube), les neutrophiles possèdent un diamètre allant de 10 à 14  $\mu\text{m}$  et une durée de demi-vie d'environ six heures (en circulation) à quelques jours (dans les tissus) 4.

Les neutrophiles se définissent donc comme étant des cellules ne se divisant plus et résultantes de la différenciation terminale leucocytaire. Les neutrophiles comportent de nombreux granules ayant pour but la destruction et la dégradation des microorganismes cibles. Ceux-ci sont catégorisés en trois groupes, soient les granules azurophiles, les granules spécifiques et les granules tertiaires. Les granules azurophiles contiennent des protéases et autres enzymes hydrolytiques, des défensines, des peptides microbicides et des myeloperoxydases, enzymes oxydatives  $\text{Cl}^-$ . Les granules spécifiques, quant à eux, comportent entre autres, de l'apolactoferrine, des collagénases et

une enzyme inconnue clivant la protéine du complément C5 (relâchant ainsi le C5a), alors que leur membrane recèle de protéines de la matrice extracellulaire ainsi que du cytochrome  $b_{558}$ . Enfin, les granules tertiaires renferment des gélatinases, et leur membrane comporte le complexe CD11/CD18 essentiel à l'adhésion cellulaire <sup>48</sup>.

Les neutrophiles possèdent un noyau de structure vestigiale ne pouvant plus répliquer son ADN. Leur membrane plasmique contient des molécules et complexes reliés à la destruction des microorganismes, des senseurs localisant ces microorganismes et auxquels les neutrophiles répondent, ainsi que des molécules d'adhésions. Le cytosquelette des neutrophiles consiste en un système complexe de microfilaments et de microtubules <sup>48</sup>, lequel étant responsable du mouvement ordonné des neutrophiles et faisant de ce type cellulaire l'un des plus mobiles chez les mammifères <sup>45</sup>.

En plus de leur fonction immunitaire comme première ligne de défense de l'organisme, les neutrophiles jouent un rôle prépondérant dans le phénomène d'inflammation aiguë en quittant constamment le compartiment vasculaire. Ils sont d'ailleurs chimiquement attirés vers les sièges d'inflammation où ils accomplissent de manière active la phagocytose <sup>4</sup>.

### 1.1.2.3 Principales molécules d'adhésion neutrophiliques

#### 1.1.2.3.1 Les intégrines

##### 1.1.2.3.1.1 *Les $\beta_2$ -intégrines du complexe CD11/CD18 neutrophilique*

La famille des intégrines leucocytaires comprends trois glycoprotéines hétérodimériques  $\alpha/\beta$  partageant une sous-unité  $\beta_2$  commune nommée CD18. Retrouvées exclusivement sur les surfaces membranaires des leucocytes, ces trois  $\beta_2$ -intégrines diffèrent structurellement l'une de l'autre par leur sous-unité  $\alpha$ , les classifiant ainsi sous l'appellation  $\alpha_L\beta_2$  (également connu sous les noms LFA-1 et CD11a/CD18),  $\alpha_M\beta_2$  (aussi nommé Mac-1, CR3 et CD11b/CD18) et  $\alpha_X\beta_2$  (ou p150/95 et CD11c/CD18). Étant toutes indépendantes de la présence de la séquence aminée RGD, les trois molécules d'adhésion du complexe

CD11/CD18 s'associent cependant à des ligands différents, bien que certains leurs soient communs malgré tout 18,19.

La  $\beta_2$ -intégrine  $\alpha_L\beta_2$  est exprimée de façon constitutive et se retrouve globalement sur tous les types leucocytaires, faisant de cette dernière la plus uniformément répandue du complexe CD11/CD18. Reconnaisant principalement les molécules d'adhésion ICAM-1 et ICAM-2 de la famille des immunoglobulines, LFA-1 acquiert une forme active pouvant lier ses ligands uniquement suite à la phosphorylation de sa sous-unité  $\beta$ , phénomène contrôlé par le domaine cytoplasmique et le site MIDAS (*Metal Ion-Dependent Adhesion Site*) de cette même sous-unité et ne se produisant que lors de l'activation des neutrophiles 18,19. Les changements relatifs à l'affinité (conformation active) et aux forces de liaison («avidity» ou «clustering») de la molécule d'adhésion LFA-1 déterminent sa capacité d'interaction avec ses ligands 48A.

L'intégrine  $\alpha_M\beta_2$ , quant à elle, dénote une présence leucocytaire beaucoup moins générale que  $\alpha_L\beta_2$ ; cette dernière n'est exprimée que par les cellules provenant des lignées myéloïdes (neutrophiles, basophiles et éosinophiles), les monocytes et les cellules NK 18. Participante active aux divers phénomènes biologiques leucocytaires, tels que l'adhésion et la transmigration à travers l'épithélium et l'endothélium, le chimiotactisme et l'agrégation des neutrophiles et enfin, l'adhésion et la phagocytose des particules opsonisées, la  $\beta_2$ -intégrine  $\alpha_M\beta_2$  est exprimée constitutivement et sous une forme inactive à la surface des neutrophiles en circulation. Suite à l'activation cellulaire sous l'effet de différents agonistes, incluant le PAF, l'IL-8, l'adénosine diphosphate (ADP) et le peptide bactérien composé de formyl-méthionine-leucine-phenylalanine, cette molécule d'adhésion subit un changement conformationnel, lui permettant alors de s'associer chimiquement avec ses différents ligands, tels que l'ICAM-1, le fibrinogène, le facteur de coagulation Xa, l'opsonine majeure du sérum nommée iC3b et un ligand, encore inconnu, sur les neutrophiles. Des réserves intracellulaires de CD11b/CD18 sont également disponibles chez les granulocytes au sein de

leurs granules spécifiques et tertiaires, ceux-ci se retrouvant sous une conformation active à la surface membranaire suivant l'activation cellulaire 16,18,19.

À l'instar de la  $\alpha_M\beta_2$ , la  $\alpha_X\beta_2$  est exprimée également par les monocytes et par les cellules dérivant des lignées myéloïdes, mais démontre une abondance accrue au niveau des macrophages présents dans les tissus 18. S'associant principalement avec le fibrinogène, son ligand principal, l'intégrine  $\alpha_X\beta_2$  possède également une affinité particulière pour la molécule du complément iC3b 18.

### 1.1.2.3.2 Les sélectines

#### 1.1.2.3.2.1 *La L-sélectine neutrophilique*

La L-sélectine se distingue grandement de ses deux consœurs à plusieurs niveaux, tels que son expression basale, sa distribution cellulaire, sa régulation de l'expression et ses différents ligands. Représentant la première des sélectines à être étudiée, la L-sélectine se retrouve en majeure partie sur les neutrophiles (95 à 105 kDa), les monocytes (110 kDa), les cellules NK, ainsi que sur la plupart des lymphocytes B et T (75 kDa). Structuralement parlant, cette sélectine se compose de 385 acides aminés répartis sur des domaines similaires à la P-sélectine, à l'exception près qu'elle ne possède que deux régions consensus répétées de courte longueur (SRC), comparativement à neuf pour la P-sélectine. De plus, la L-sélectine présente différents poids moléculaires en relation avec sa distribution cellulaire, ceci étant attribuable à des modifications post-transcriptionnelles de glycosylations 17.

Exprimée de manière constitutive sur les surfaces leucocytaires, la L-sélectine connaît une modulation de son activité tout à fait particulière: sa concentration membranaire décroît rapidement suite à l'activation cellulaire. Ainsi, en réponse à une variété de stimuli, tels que certaines cytokines et *phorbol esters*, la L-sélectine se détache de la membrane plasmique du leucocyte par l'entremise d'un clivage protéolytique ayant lieu à sa base

extracellulaire 17,18,20. Ce même clivage peut également se réaliser en absence d'activation cellulaire, ceci étant possible grâce à l'action de certaines molécules chimiques spécifiques, notamment l'aspirine et la protéine C-réactive 48B,48C. L'intérêt physiologique de ce phénomène inverse demeure, encore aujourd'hui, inconnu, mais suggère cependant que l'activité de cette sélectine semble contrôlée principalement par la régulation de son apparition et de sa disparition de la surface cellulaire. De là, il est possible d'associer à ce mécanisme physiologique, un rôle de régulation inverse de l'adhésion suivant un attachement leucocytaire ferme à l'endothélium. En plus du clivage membranaire, des changements conformationnels pourraient également aider à la régulation des diverses fonctions de la L-sélectine. Des études récentes ont d'ailleurs démontré que l'activation de neutrophiles et de lymphocytes résulte directement en un accroissement rapide et momentané de l'activité de la L-sélectine, le tout ayant lieu quelques minutes avant le clivage 17,18,20.

Principalement responsable des liaisons leucocytaires au niveau des veinules des nodules lymphatiques (*LNHEV*) et des cellules endothéliales activées, la L-sélectine possède une affinité pour de nombreux ligands, dont la nature d'une grande majorité d'entre eux demeure encore indéterminée. Ainsi, les ligands connus de la L-sélectine sont: GlyCAM-1, une molécule sécrétée par les cellules *LNHEV*; une glycoprotéine s'apparentant au CD34 et exprimée, chez l'humain, autant par les cellules *LNHEV* que par les cellules endothéliales; les P- et E-sélectines; le PSGL-1 et finalement, des protéines O-glycosylées différentes du PSGL-1 17.

#### 1.1.2.4 Effets des plaquettes sur les neutrophiles

La liaison des plaquettes aux neutrophiles favorise une coopération directe entre les deux types de cellules sanguines, et ce autant au niveau physique que métabolique. Les plaquettes participent ainsi à certaines fonctions neutrophiliques en agissant directement sur ces leucocytes polymorphonucléaires (PMN) de différentes façons. Un des effets importants



des plaquettes envers les neutrophiles demeurent 1) leur recrutement au site endommagé via la contribution plaquettaire à une panoplie de médiateurs inflammatoires chémotactiques lors de la sécrétion de substances vasoactives préformées, de la synthèse de chémotaxines lipidiques ou du clivage enzymatique du complément, formant ainsi des chémotaxines peptidiques. Le *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) et le facteur plaquettaire 4 (PF4), deux constituants des granules alpha, en sont deux exemples concrets, ceux-ci agissant sur les neutrophiles comme agents chémotactiques <sup>45</sup>.

Les plaquettes participent également 2) au contrôle de la production de substances oxydantes létales par les neutrophiles. Ainsi, la liaison des plaquettes au repos aux polymorphonucléaires entraîne une production importante d'ADP au sein du cytoplasme des neutrophiles, ceci inhibant du même coup la production basale de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), molécule fortement impliquée dans la dégradation lysosomale. Cependant, lors de l'attachement de plaquettes activées à un neutrophile, un phénomène inverse s'enclenche, favorisant ainsi une production accrue du superoxyde de deux à cinq fois supérieure. Ce processus permet l'amplification de la réponse immunitaire non spécifique afin protéger rapidement l'organisme contre l'entrée de microparticules pathogènes suivant une blessure vasculaire <sup>45</sup>.

La liaison des plaquettes aux neutrophiles 3) enclenchent également des voies de signalisation intracellulaires spécifiques favorisant l'activation du neutrophile et de certaines de ses molécules d'adhésion présentes à la surface cellulaire. Enfin, les plaquettes influencent également d'autres fonctions neutrophiliques principales, telles que 4) leur agrégation, 5) leur fonction bactéricide, 6) leur dégranulation et finalement 7) leur adhésion à la matrice sous-endothéliale et aux cellules endothéliales dysfonctionnelles <sup>45</sup>.

#### 1.1.2.5 Effets des neutrophiles sur les plaquettes

À l'instar des effets plaquettaires sur les polymorphonucléaires, les neutrophiles démontrent également un apport important quant aux fonctions

premières des plaquettes. Les liaisons intercellulaires favorisant l'établissement d'un micro-environnement, de nombreuses substances provenant du métabolisme des neutrophiles peuvent ainsi modifier l'activité plaquettaire: c'est le cas, par exemple, des radicaux libres, tels que le l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, ceux-ci, lorsque présents à faible concentration, 1) induisent la sécrétion de sérotonine par les plaquettes, participant ainsi à l'activation plaquettaire <sup>45</sup>.

D'autres agents caractéristiques des neutrophiles déclenchent également cette activation, tels que leurs deux principales enzymes protéolytiques leur permettant de dégrader la matrice extra-cellulaire, soit l'élastase et la cathepsine G. Ces deux enzymes agissent directement sur les plaquettes en 2) clivant la région carboxy-terminale de la chaîne lourde de la sous-unité GPIIb, activant ainsi la GPIIb/IIIa et potentialisant par le fait même l'agrégation plaquettaire. De plus, la cathepsine G semble accentuer l'ouverture des canaux calciques membranaires, ceci ayant pour effet l'activation des voies de signalisation intracellulaires <sup>45</sup>.

En plus de leurs actions prédisposant à l'activation plaquettaire, 3) les neutrophiles semblent également assurer un rôle important dans l'inhibition des fonctions plaquettaires. Grâce à leur production importante d'ectonucléotidases et d'oxyde nitrique, deux composés altérant l'activation des plaquettes et leur recrutement, les neutrophiles peuvent ainsi diminuer la «sensibilité» plaquettaire afin de prévenir leur activation et agrégation déraisonnées <sup>45</sup>.

Participants actifs à certaines voies métaboliques des plaquettes, 4) les neutrophiles synthétisent en plus des composés moléculaires exportables vers le cytoplasme des plaquettes. Tel est le cas des leucotriènes  $LTA_4$  et de certains dérivés de l'acide arachidonique ( $PGG_2$ ,  $PGH_2$ ), le premier ne pouvant être fabriqué par les plaquettes mais pouvant cependant être transformé en  $LTC_4$  par celles-ci, alors que le second, malgré son importante production par les plaquettes, permet une fabrication accrue de la thromboxane  $A_2$  <sup>45</sup>.

### 1.1.2.6 Les molécules d'adhésion impliquées

#### 1.1.2.6.1 *P-sélectine versus PSGL-1*

L'adhésion de plaquettes activées à un neutrophile se réalise tout d'abord grâce à une interaction de forte affinité ayant lieu entre la P-sélectine et le PSGL-1. Cette association, quoique peu résistante aux forces de cisaillement ambiantes, représente le premier contact s'effectuant entre les deux types cellulaires <sup>46</sup>.

Contrairement à la P-sélectine plaquettaire requérant l'activation cellulaire afin de se retrouver à la surface membranaire, le PSGL-1, une sialomucine dimérique O-glycosylée riche en prolines, sérines et thréonines, connaît une expression constitutive à la surface des neutrophiles, ceci attestant de sa capacité à lier la P-sélectine suivant certaines modifications biochimiques, comprenant le sulfatage d'une tyrosine et une glycosylation de grande envergure. De plus, grâce à sa structure dimérique, le PSGL-1 neutrophilique peut s'associer à deux molécules P-sélectine, le tout conférant à cette adhésion transitoire une solidité accrue <sup>22</sup>.

En plus de son rôle de premier ordre au niveau de la liaison des plaquettes aux neutrophiles, le PSGL-1 assure également une fonction de signalisation cytoplasmique. Ainsi, suite à son association à la P-sélectine, diverses voies intracellulaires s'enclenchent au sein du cytoplasme du neutrophile, ceci menant, entre autres, à l'activation cellulaire ainsi qu'à la redistribution du PSGL-1 à la surface membranaire sous forme de groupements concentrés, phénomène qualifié par l'épithète anglophone *PSGL-1 clustering*. Ce repositionnement en amas du PSGL-1, imputable à la cascade des MAP kinase et à l'action des GTPases Ras, entraîne rapidement une diminution de son affinité pour la P-sélectine exprimée par les plaquettes activées et donc, servirait en quelque sorte de mécanisme de régulation négative <sup>22,46</sup>. Ce phénomène moléculaire peut être démontré par l'entremise de la stimulation au fMLP d'une suspension de neutrophiles incubés conjointement avec des

plaquettes préalablement activées, ceci résultant en des liaisons P-sélectine / PSGL-1 moins importantes que lors de la stimulation plaquettaire seule <sup>46</sup>.

Enfin, certains auteurs de la littérature vont même jusqu'à proposer que la «dimérisation» du PSGL-1 détiene une fonction encore plus capitale dans les interactions cytosquelettiques et les voies de signalisation intracellulaires, comparativement à celle ayant trait à ses propriétés médiatrices de l'adhésion intercellulaire <sup>22</sup>.

#### 1.1.2.6.2 GPIIb/IIIa versus MAC-1 via fibrinogène

Suite à liaison provisoire entre la P-sélectine et le PSGL-1, une seconde interaction moléculaire s'enclenche, celle-ci responsable de la stabilité de l'agrégat en formation constitué de plaquettes et de neutrophiles activés. Cette association, impliquant certaines molécules du complexe  $\beta_2$ -intégrine des neutrophiles et la  $\beta_3$ -intégrine GPIIb/IIIa plaquettaire, requiert la présence d'une molécule intermédiaire possédant la séquence RGD, soit le fibrinogène. Ainsi, les plaquettes activées liées aux neutrophiles par l'entremise de leurs P-sélectines membranaires, expriment également de nombreuses copies de la GPIIb/IIIa capables d'interagir avec le fibrinogène ambiant. Les neutrophiles, quant à eux, ayant été préalablement activés via la signalisation intracellulaire découlant de la liaison de leurs molécules de PSGL-1, expriment alors le CD11b (Mac-1) et le CD11c (p150/95) sous forme active, ceux-ci étant également capables de lier le fibrinogène. Des associations solides entre la GPIIb/IIIa et Mac-1 par l'entremise du fibrinogène en résultent donc, le CD11c des neutrophiles ne semblant point jouer un rôle prédominant au sein de cette liaison intercellulaire <sup>46</sup>.

De plus, le troisième complexe des  $\beta_2$ -intégrines, le LFA-1, ne semblerait assurer qu'une fonction mineure au niveau des interactions plaquettes / neutrophiles. Alors que les plaquettes expriment constitutivement quelques molécules ICAM-2, le ligand principal de LFA-1, à leur surface, cette liaison, quoique présente lors du *binding*, ne serait que très peu impliquée au niveau de

ces associations, puisque l'ajout d'un anticorps bloqueur du CD11a n'influence que minoritairement le pourcentage de plaquettes liées aux neutrophiles <sup>46</sup>.

Enfin, une étude a récemment démontré que le blocage de la GPIIb/IIIa grâce à l'utilisation d'antagonistes, entraîne directement une diminution importante de l'expression de Mac-1 actifs. Ceci s'explique grâce au fait qu'une inhibition de la liaison du GPIIb/IIIa au fibrinogène décroît légèrement les interactions plaquettes / neutrophiles, le tout favorisant une activation moindre des neutrophiles et donc, une diminution de la concentration membranaire en Mac-1 actifs <sup>49</sup>.

## **1.2 Les antagonistes de la molécule GPIIb/IIIa**

### **1.2.1 Introduction**

Malgré leurs fonctions cruciales au niveau de l'hémostase, les plaquettes sanguines demeurent tout de même les principales responsables de nombreuses complications pathophysiologiques, la thrombose intravasculaire représentant l'une des pathologies les plus fréquentes et la cause majeure de morbidité et de mortalité au sein des populations occidentales<sup>50</sup>. En plus de sa participation à la formation et migration d'embolie cardiaque, pulmonaire ou cérébrale distale, la thrombose endosse également une importance clinique irrévocable en ce qui a trait aux syndromes coronariens. Ces pathologies cardiaques, tels que l'angine instable, infarctus du myocarde sans onde Q, l'infarctus du myocarde aigu et la resténose abrupte d'une artère coronaire suivant une intervention par angioplastie coronarienne transluminale percutanée (ACTP), possèdent toutes un dénominateur pathophysiologique commun, soit la rupture d'une plaque athérosclérotique, l'activation de la cascade de la coagulation, ainsi que l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaires<sup>50,51</sup>. Tel que décrit aux pages précédentes, la glycoprotéine GPIIb/IIIa assure une fonction centrale au niveau de l'agrégation plaquettaire par l'entremise de sa liaison aux molécules de fibrinogène (sous conditions physiologiques) et aux vWF (sous conditions de forces de cisaillement élevées, par exemple, lors de sténoses ou d'occlusions partielles), ces associations favorisant ainsi le rassemblement des plaquettes et la formation de l'agrégat<sup>52</sup>.

Suite à ces découvertes moléculaires, l'industrie pharmaceutique élaborera divers agents synthétiques ou inspirés de substances chimiques naturelles pouvant bloquer cette fonction première de la GPIIb/IIIa plaquettaire. Afin de constituer une nouvelle génération de puissants médicaments antithrombotiques, ces antagonistes de la GPIIb/IIIa se devaient de répondre à deux buts particuliers échelonnés de courts à longs termes: 1) procurer un soulagement immédiat dans les cas de thromboses artérielles et 2) supprimer

la réactivité plaquettaire excessive au sein des vaisseaux affectés dans le but d'éliminer les possibilités d'occlusions par un thrombus et de resténoses, le tout en conservant une stabilité hémostatique pouvant prévenir tout saignement spontané <sup>52</sup>.

Les résultats de ces recherches furent stupéfiants: cette nouvelle classe de médicaments anti-GPIIb/IIIa, en plus d'interférer directement dans les étapes finales de l'agrégation plaquettaire, parviennent également à bloquer la signalisation *outside-in*, cette dernière étant responsable de la seconde vague d'agrégation, de la sécrétion de vésicules membranaires procoagulantes, de la réorganisation du cytosquelette et de la rétraction des caillots de fibrine. Ainsi, l'inhibition engendrée par ces antagonistes de la GPIIb/IIIa dépasse la théorie de base voulant que ces agents ne servent qu'à décroître le taux de cohésions interplaquettaires <sup>52</sup>.

En clinique, les inhibiteurs de la GPIIb/IIIa démontrent un bénéfice clinique net; fréquemment combinés à l'aspirine, traitement visant à diminuer la réponse plaquettaire en inactivant l'enzyme cyclo-oxygénase (Cox-1) et en prévenant ainsi la formation de thromboxane A<sub>2</sub>, ces bloqueurs, administrés à des patients dans un contexte d'essais cliniques suivant une intervention ACTP ou de syndromes coronariens aigus, réduisirent significativement les risques de décès et d'infarctus du myocarde non fatals de l'ordre de 21 % <sup>13,52</sup>. L'an dernier, plus de 40 000 patients souffrants de problèmes cardiaques reliés à l'ischémie furent traités avec cette nouvelle classe de médicaments antiplaquettaires. Depuis leur avènement au sein de la famille des médicaments antithrombotiques, trois de ces bloqueurs de la GPIIb/IIIa furent homologués par la *US Food and Drug Administration* (FDA), alors que plusieurs autres se retrouvent présentement en phase deux (2) et phase trois (3) de différents essais visant à leur attribuer une série plus élargie d'indications cliniques. En somme, l'avènement de cette nouvelle classe d'agents antithrombotiques offrit aux patients et cliniciens une seconde option, autre que

le traitement monothérapeutique à l'aspirine, lorsque l'inhibition de certaines fonctions plaquettaires est requise <sup>13</sup>.

Malgré les résultats globaux prometteurs concernant les antagonistes de la GPIIb/IIIa, certains essais cliniques mirent en évidence l'importance de la variabilité interindividuelle quant à la réponse au traitement. Ainsi, de nombreux facteurs furent suggérés comme pouvant influencer l'efficacité de ces inhibiteurs au sein de différents individus dont les principaux sont décrits au sein du tableau ci-dessous <sup>52</sup>.

**Tableau I :** Principaux facteurs pouvant influencer l'efficacité des antagonistes de la GPIIb/IIIa au sein de différents individus.

Facteurs	Description supplémentaire
1) Le compte plaquettaire	A) Un compte élevé signifie un faible niveau d'occupation des GPIIb/IIIa par les bloqueurs B) Un compte faible amplifie les risques d'hémorragies.
2) Le taux d'anticorps plasmatiques	A) Envers les déterminants de la classe des immunoglobulines murins B) Envers les néoantigènes de la GPIIb/IIIa (du type anti- <i>Ligand-Induced Binding Sites</i> )
3) La présence de plaquettes activées en circulation	N/A
4) La capacité d'inhibition du <i>pool</i> de GPIIb/IIIa	A) Au niveau des plaquettes circulantes à l'état basal B) Au niveau de son expression à la surface cellulaire et lors de la sécrétion
5) Les variations interindividuelles de la réactivité de l'antagoniste envers la GPIIb/IIIa	A) Influencées par le polymorphisme de la GPIIb et/ou de la GPIIIa B) Influencées par la densité faible ou élevée de la GPIIb/IIIa
6) Les différents taux de métabolisme et d'élimination du médicament	N/A
7) La présence d'autres facteurs à risque de thrombose	A) Haut taux de cholestérol B) Diabète, etc.



8) Le degré d'athérosclérose ou les variations de la dimension de la lésion découlant de l'ACTP et la fréquence des interactions plaquettes / paroi vasculaire	N/A
9) Les variations de la réactivité des plaquettes aux autres médicaments utilisés durant la thérapie	A) Aspirine B) Héparine, etc.

N/A signifie Ne s'Applique pas.

Afin de classer les différents types d'antagonistes de la GPIIb/IIIa, une nomenclature fut adoptée, les regroupant ainsi sous trois catégories principales, soit 1) les désintégrines; 2) les antagonistes synthétiques peptidiques et non peptidiques et finalement, 3) les anticorps monoclonaux murins. La présente section vise donc l'analyse de ces diverses classes ainsi qu'une brève description de leurs bénéfices thérapeutiques, tels que démontrés au sein de différents essais cliniques récents. De plus, la dernière sous-section traitera des nouveaux antagonistes et de leur voie d'administration divergente des procédés traditionnels par injection intraveineuse, soit par comprimés oraux.

### 1.2.2 Les désintégrines

Les désintégrines représentent la seule classe d'antagonistes de la GPIIb/IIIa issue d'une provenance biologique naturelle, à savoir le venin de certaines espèces de serpents. Les principaux agents connus de cette classe sont la trigramine (provenant du *Trimeresurus gramineus*), la bitistatine (dérivant de l'espèce *Bitis arietans*), l'échistatine (extrait du venin de l'*Echis carinatus*), l'applaggine (découlant du *Agkistrodon piscivorus*), la kristine (typique à la vipère des terrains à fosses *Agkistrodon rhodostoma*) et finalement, la barbourine (issue du venin du serpent à sonnettes pygmée *Sistrurus M. barbouri*)<sup>14</sup>.

La principale caractéristique moléculaire des désintégrines provient du fait qu'elles possèdent la séquence RGD au sein d'un groupe disulfure, ceci

leur permettant d'interférer au niveau de la liaison des protéines adhésives (celles-ci contenant également la séquence RGD) à l'intégrine cellulaire. Ainsi, lorsque injectées individuellement dans un modèle canin, la bistatine et la kristine inhibent de façon significative l'agrégation plaquettaire, en plus d'amplifier l'efficacité des agents fibrinolytiques 14,51.

Les antagonistes typiques à la classe des désintégrines ne sont cependant point utilisés en clinique dû à leurs nombreux désavantages potentiels. L'un de ceux-ci consiste en la non-spécificité que possèdent la plupart des désintégrines envers la molécule d'adhésion GPIIb/IIIa, s'associant plutôt à toutes les intégrines reconnaissant la séquence RGD. Ce manque de spécificité peut ainsi interférer dans la liaison de certaines molécules d'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales (adhésion) et aux leucocytes (interactions plaquettes / neutrophiles). Cependant, la désintégrine peptidique barbourine se distingue de ses consœurs en étant spécifique à la GPIIb/IIIa plaquettaire, grâce à la substitution de l'arginine (R) par une lysine (K) dans la séquence RGD 14,51.

Un second inconvénient majeur caractéristique aux désintégrines demeure leur propriété antigénique importante. De provenance reptilienne, ces agents sont rapidement reconnus comme étant étrangers par l'hôte, engendrant ainsi une réponse immunitaire d'envergure. Enfin, les désintégrines sont également considérées comme inductrices occasionnelles de thrombocytopenie transitoire 14,51.

Du côté des avantages, les désintégrines, possédant une demi-vie de courte durée, génèrent des effets antiplaquettaires aisément réversible, ceci assurant ainsi une certaine protection contre les complications hémorragiques. En somme, compte tenu de leurs désavantages importants pour la santé humaine, les désintégrines demeurent une classe de médicaments inutilisables en clinique, mais constituent un gabarit structural inestimable pour le développement d'antagonistes synthétiques peptidiques 14,51.

### **1.2.3 Les antagonistes synthétiques peptidiques et non peptidiques**

S'inspirant ainsi des inhibiteurs biologiques de la GPIIb/IIIa, de nouveaux antagonistes peptidiques furent synthétisés expérimentalement à partir de séquences RGD analogues. Ces «désintégrines modifiées chimiquement» dénotent plusieurs améliorations face à leur vis-à-vis naturel, soit 1) une meilleure résistance à la dégradation enzymatique; 2) un potentiel plus efficace; 3) un risque moindre de saignement prolongé; 4) une propriété immunogène nulle ou minimale; et finalement, 5) une réversibilité rapide, conséquence de leur demie-vie de courte durée. Grâce à l'ingénierie moléculaire, des ponts disulfures furent ajoutés à ces agents peptidiques afin de leur conférer une structure cyclique les rendant plus stable dans le plasma sanguin et augmentant, de plus, leur affinité pour la GPIIb/IIIa plaquettaire <sup>14</sup>.

Divers composés se classifient au sein de ces antagonistes peptidiques, la plupart étant connu sous une appellation alphanumérique, tels que DMP-728 (DuPont Merck Pharmaceuticals), G-4120 (Genentech and Schering-Plough) et MK-852 (Merck). Au niveau clinique, l'eptifibatide (ou intégriline, COR Therapeutics) demeure l'antagoniste synthétique peptidique le plus fréquemment utilisé. Modélisé à partir de la désintégrine barbourine, l'heptapeptide cyclique eptifibatide possède la séquence aminée KGD (analogue à la séquence RGD présente à l'extrémité carboxy-terminale de la chaîne  $\gamma$  du fibrinogène), le rendant spécifique à la GPIIb/IIIa. Ayant été testé au sein de la population humaine par l'entremise des essais cliniques IMPACT (angioplastie coronarienne, n=150) IMPACT-II (angioplastie coronarienne, n=4 010), IMPACT-AMI (infarctus du myocarde aigu, n=180) et PURSUIT (angine instable et infarctus du myocarde sans onde Q, n=10 948), l'eptifibatide reçut finalement l'approbation du FDA américain en tant que traitement pour les patients souffrants d'un syndrome coronarien aigu sous surveillance médicale ainsi que chez les patients devant subir une intervention coronarienne

percutanée (ICP). De plus, cet antagoniste est également prescrit comme adjuvant post-ICP 13,14,51.

D'autres modifications chimiques peuvent aussi s'ajouter afin de conférer à la molécule une plus grande résistance enzymatique dans le plasma. C'est le cas, par exemple, de la substitution de l'arginine (R) de la séquence RGD par un groupement amidino- ou benzamidino-, et du remplacement complet de cette séquence par la suite aminée DGEA, celle-ci étant présente normalement sur le collagène de type I 14.

Comparativement aux peptides synthétiques, les antagonistes non peptidiques se caractérisent par deux avantages supplémentaires d'ordre mineur, à savoir leur temps de demi-vie relativement plus élevé, ainsi que leur poids moléculaire plus faible. Englobant une multitude de composés, tels que le fradafiban, le xémilofiban, le roxifiban, l'orbofiban, le lefradafiban et le sibrafiban, la classe des antagonistes non peptidiques se voit fréquemment représenter par deux de ses agents «peptido-mimétiques» typiques, soit le tirofiban (Aggrastat, Merck) et le lamifiban (Hoffmann-La Roche), dont les techniques de biologie moléculaire ont grandement amélioré leur stabilité plasmatique 14,53.

Constitué de dérivés tyrosine non peptidiques, le tirofiban parvient à inhiber les fonctions de la GPIIb/IIIa plaquettaire en «imitant» la séquence RGD associée au fibrinogène, lui conférant ainsi une spécificité accrue pour cette molécule d'adhésion. En plus de posséder une structure s'apparentant aux antibiotiques macrolides polyènes, c'est-à-dire formé d'un noyau macrolide possédant de nombreux groupes cétone ou hydroxyle et portant un ou plusieurs sucres, le tirofiban assure des effets antiplaquettaires réversibles qui, dans le cas de sujets humains, s'estompent après approximativement trois heures. Tout comme le lamifiban, le tirofiban possède une sélectivité quadruplée envers la  $\beta_3$ -intégrine GPIIb/IIIa et ce, comparativement à son

affinité pour la seconde intégrine inscrite au sein cette même classe, soit le récepteur de la vitronectine 14,15.

Les études fondamentales *in vitro* démontrèrent rapidement les effets bénéfiques potentiels du tirofiban sur l'agrégation plaquettaire; à titre d'exemple, suite à l'activation plaquettaire à l'ADP, les concentrations cliniques inhibèrent la liaison au fibrinogène de l'ordre de 17 à 88%, variation imputable aux différentes réponses physiologiques interindividuelles 54. Cependant, il fut également prouvé expérimentalement que le tirofiban n'occasionne point d'effets inhibant sur la synthèse de la thromboxane A<sub>2</sub>, la sécrétion du facteur plaquettaire 4 55 et la dégranulation plaquettaire en général 52.

L'avènement du tirofiban en clinique entraîna une multitude de réactions positives allant même jusqu'à engendrer, sur les pages frontispices des quotidiens *Wall Street Journal* et *USA Today*, des reportages chocs stipulant: «Les chercheurs estiment que l'Aggrastat pourrait potentiellement sauver de cinq à dix milles vies par année et prévenir jusqu'à 40 milles attaques cardiaques annuellement», ceci en plus de provoquer d'imposantes élévations de la valeur des actions de Merck 56. Après d'importantes études cliniques en milieu hospitalier, tels que RESTORE (angine instable et infarctus du myocarde aigu, n=2139), PRISM (angine instable à faible risque, n=3232) et PRISM-PLUS (angine instable et infarctus du myocarde sans onde Q, n=1915), le tirofiban obtint finalement son approbation de la FDA comme complément à l'héparine non fractionnée pour le traitement de syndromes coronariens aigus chez des patients sous surveillance médicale et chez ceux devant subir une intervention ACTP ou une athérectomie 14,51,57.

Pour ce qui est du lamifiban, trois essais cliniques ont étudié ses effets bénéfiques, soit le *Canadian Lamifiban Study* (angine instable, n=365), PARADIGM (infarctus du myocarde aigu, n=353) et PARAGON-A (angine instable, n=2282). Quoique à elles seules ces études n'aient point conduit à l'homologation du lamifiban par la FDA américaine, celles-ci ont tout de même souligné le caractère bénéfique de cet antagoniste sur les taux de décès,

d'infarctus du myocarde et/ou d'interventions urgentes. Ces études démontrèrent également que, contrairement au tirofiban, l'adjonction d'héparine au traitement n'ajoutait pas à l'efficacité du lamifiban mais augmentait cependant le risque d'hémorragies et de saignements <sup>14,53</sup>. Présentement, le statut relatif au lamifiban se classe en fin de phase III des essais cliniques chez l'humain <sup>13</sup>.

#### **1.2.4 Les anticorps monoclonaux murins**

Les anticorps monoclonaux constituent les premiers agents développés contre la molécule d'adhésion plaquettaire GPIIb/IIIa afin d'inhiber la liaison des plaquettes au fibrinogène et, par le fait même, l'agrégation plaquettaire. Introduit en plein cœur des années 1980 (plus exactement, en 1985) grâce aux études de Coller et de ses collègues, un anticorps monoclonal extrait du plasma de souris et nommé «m7E3» fut le premier précurseur à répondre à ces critères. Cependant, deux désavantages majeurs relatifs à cet anticorps vinrent rapidement limiter son utilisation en clinique, soit son potentiel immunogène important et sa capacité d'engendrer une thrombocytopénie. Sachant que ces inconvénients physiologiques étaient imputables à l'association du fragment Fc de l'anticorps aux macrophages de la rate, la suppression de cette portion fut préconisée, ne conservant ainsi que les fragments Fab de l'anticorps. Afin de conférer une certaine stabilité à l'anticorps, les fragments Fab furent joints aux régions constantes d'immunoglobulines humaines, le tout formant ainsi un composé chimérique appelé c7E3FAB chimérique, ou c7E3, ou encore abciximab (ReoPro, Centocor). Grâce à ce procédé de biologie moléculaire, l'élimination de la portion Fc murin permit ainsi d'enrayer toute possibilité de recouvrement des plaquettes canines par des anticorps intacts, en plus de favoriser la dissipation rapide de l'anticorps hors de la rate par l'action macrophagique des leucocytes possédant des récepteurs Fc <sup>14,53</sup>.

Exhibant autant une affinité qu'une spécificité élevée envers la GPIIb/IIIa plaquettaire, l'abciximab se définit comme étant un inhibiteur à faible constante

de dissociation occupant de façon quasi permanente le récepteur <sup>57</sup>. De là, la récupération des fonctions plaquettaires découle plutôt d'une externalisation de nouveaux récepteurs GPIIb/IIIa et de la libération de mégacaryocytes frais dans la moelle osseuse, et non de cette dissociation du médicament <sup>53</sup>. À l'instar du tirofiban, l'abciximab, de par sa demi-vie relativement longue et sa tendance à «adhérer» à la GPIIb/IIIa, semble démontrer des effets bénéfiques allant même au-delà de la durée de perfusion <sup>14,53</sup>. Alors que la concentration plasmatique de l'abciximab décroît rapidement après son injection (10 à 30 minutes seulement), l'association de l'antagoniste à la GPIIb/IIIa demeure tout de même détectable de façon homogène jusqu'à 21 jours suivant le traitement <sup>52,57</sup>.

Au niveau des expérimentations *in vitro*, le potentiel inhibiteur de l'anticorps fut rapidement démontré; diminuant de façon significative l'agrégation plaquettaire induite par divers agonistes, l'abciximab bloque également la phosphorylation des résidus tyrosine typique à la signalisation *outside-in*. Engendrant une obstruction à la liaison de la molécule d'adhésion au fibrinogène plutôt qu'un mimétisme de celui-ci, cet anticorps chimérique empêche ainsi la transduction intracytoplasmique du signal, inhibant par le fait même l'initiation de la voie *outside-in* <sup>58</sup>.

Du côté *in vivo*, l'abciximab demeure l'antagoniste de la GPIIb/IIIa ayant été l'objet de la plus importante évaluation clinique. Suite à la publication de résultats encourageants émanant de courtes séries non randomisées utilisant le c7E3 murin, le c7E3F (ab'2) et le c7E3Fab, plusieurs études ont évalué l'efficacité de ces agents pendant l'angioplastie coronarienne associée à l'angine instable <sup>14</sup>. Parmi ces essais cliniques, mentionnons EPIC (n=2099), PROLOG (n=103), EPILOG (n=2792) et CAPTURE (n=1265), en plus de RAPPORT (n=483), ce dernier visant plutôt l'angioplastie primaire chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde. Les résultats de ces études furent fulgurants: en moins de deux heures, l'agent bloque plus de 80% du pool global de GPIIb/IIIa et occasionne une diminution de l'agrégation plaquettaire de l'ordre de 20%. De plus, l'abciximab entraîne une réduction de 35% du

risque relatif au décès, à l'infarctus du myocarde ou à la revascularisation urgente dans une période de trente jours suivant l'intervention 14,52.

L'abciximab dénote également une certaine affinité envers d'autres intégrines, telles que le récepteur de la vitronectine. Alors que cette spécificité supplémentaire demeure questionnable en ce qui a trait à son importance clinique, l'absence de spécificité absolue envers la GPIIb/IIIa peut cependant représenter un bénéfice-clé envers les possibilités d'hémorragies. Il fut suggéré que cette inhibition du récepteur de la vitronectine par l'abciximab puisse contribuer à la réduction des taux de resténose et à la prévention des complications ischémiques 14,57.

En 1997, l'abciximab reçut sa principale homologation par la FDA en tant qu'agent prescrit à des patients souffrants d'angine instable et ne répondant pas aux thérapies médicales conventionnelles alors que ceux-ci doivent subir une intervention coronarienne percutanée (ICP) dans les 24 prochaines heures. Son utilisation est également approuvée comme adjuvant à l'angioplastie chez des patients démontrant un risque élevé d'occlusion abrupte des vaisseaux coronariens 14. Aujourd'hui, l'abciximab demeure l'un des antagonistes de la GPIIb/IIIa les plus utilisés en clinique; augmentant substantiellement la sûreté des *stents* coronariens, ce bloqueur est préconisé dans plus de 60% des procédures de revascularisation percutanée aux États-Unis 52.

### **1.2.5 Les antagonistes oraux**

En considération avec leur temps de demi-vie d'une durée brève, les antagonistes de la GPIIb/IIIa présentement disponibles doivent être administrés par voie intraveineuse sous forme de bolus suivi d'une infusion continue. De cette façon, ces agents sont donc limités à une utilisation à court terme dans un milieu hospitalier afin de traiter les syndromes coronariens aigus. De là, différents antagonistes oraux de la GPIIb/IIIa actives sont présentement en développement, ceux-ci s'adressant plutôt aux patients souffrant d'angine instable récurrente et à la prévention de l'infarctus du myocarde.



À l'instar des bloqueurs intraveineux, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire par les agents oraux respecte une courbe dose-dépendante. Étant catégorisées soit comme «prodrogue», soit comme «composé oral actif», les deux classes d'antithrombotiques oraux démontrent le même potentiel d'inhibition envers l'agrégation plaquettaire, à l'exception près que la «prodrogue» offre une biodisponibilité accrue. De plus, tous les antagonistes oraux se doivent de répondre à un critère spécifique et crucial au bon fonctionnement de l'hémostase, soit le maintien d'une concentration plasmatique faible minimisant les risques d'hémorragies spontanées mais agissant de façon maximale sur les fonctions interplaquettaires <sup>14</sup>.

Divers prototypes oraux dérivant des antagonistes non peptidiques, tels que le lefradafiban, l'orbofiban, le roxifiban et le sibrafiban, sont présentement assujettis à une multitude de tests pharmacologiques chez des modèles animal et humain. Le xémilofiban (Searle), une «prodrogue» estérifiée convertie en médicament actif sous le pseudonyme SC-54701A, représente l'antagoniste oral le mieux défini de ce groupe. Un nouveau peptide synthétique cyclique RGD nommé DMP-728 (DuPont Merck) s'inscrit également à cette liste, ce dernier se situant présentement aux premières phases d'essais cliniques <sup>14</sup>.

Les résultats globaux des antagonistes oraux lors des tests pharmacologiques ont montré que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire était d'installation rapide, intense et prolongée, quoique étant tout de même fortement influencé par la variabilité des réponses interindividuelles <sup>14,53</sup>. Ayant comme principal objectif la mesure du degré de sécurité relative à l'ingurgitation à long terme (de 90 à 365 jours) de ces agents, plusieurs essais cliniques, dont OPUS (orbifiban), EXCITE (xémilofiban) et SYMPHONY (sibrafiban), démontrèrent que l'incidence de la thrombocytopenie et des saignements importants semblait être de nature infime, et ce pour une cohorte comprenant au total 25 000 patients. Cependant, le recrutement de patients pour l'étude OPUS fut discontinué dans les derniers mois de 1998 dû à une trop grande mortalité au sein de l'une de ces branches. L'attribution de ce

phénomène au hasard ou à l'effet prothrombotique putatif de cette classe de médicament (activation paradoxale de la GPIIb/IIIa à certaine dose) demeure encore, à ce jour, non élucidée <sup>13</sup>.

Afin de résumer les diverses classes d'antagonistes de la GPIIb/IIIa plaquettaire, le tableau II, disponible à la page suivante, regroupe les principaux agents utilisés en clinique, ainsi qu'une brève description de chacun d'eux <sup>14,51,57,59,60</sup>.

**Tableau II :** Classification et description des principaux antagonistes de la GPIIb/IIIa plaquettaire.

Nom commercial	Eptifibatide		Tirofiban		Lamifiban		Abciximab		Xemilofiban	
	Intégriline	Heptapeptide cyclique	Aggrastat	Non peptidique	---	Non peptidique	ReoPro	Anticorps avec fragments Fab murins	---	Non peptidique
Poids moléculaire (kD)	0,832	0,495	0,468	N/D						
Demi-vie plasmatique	~ 2,5 heures	~ 2 à 3 heures	~ 2 à 3 heures	10 à 30 minutes (Action soutenue pendant ~21 jrs)						Plus de 4 heures
Formulation	Intraveineux	Intraveineux	Intraveineux et Orale	Intraveineux						Orale («prodogue»)
Excrétion	50% par le rein	39 à 69% par le rein	90% par le rein	N/D						90% par le rein
Études réalisées dans un modèle animal ou humain	Animal et Humain	Animal et Humain	Animal et Humain	Animal et Humain						Animal et Humain
Approbation de la US Food and Drug Administration (FDA)	Oui	Oui	Non	Oui						Non
Indication(s) approuvée(s)	Syndromes coronariens aigus et Intervention coronarienne percutanée	Syndromes coronariens aigus et ACTP	Fin de phase 3	Syndromes coronariens aigus et ACTP						Intervention coronarienne percutanée
										Fin de phase 3

N/D signifie donnée Non Disponible ou inconnue

### 1.2.6 Interrogations non résolues

Malgré le progrès impressionnant des connaissances scientifiques au sujet de la molécule d'adhésion GPIIb/IIIa et de son rôle au sein des fonctions plaquettaires, ainsi que de l'avènement prometteur des antagonistes au sein des soins cliniques, de nombreuses interrogations demeurent à résoudre 13,14,61. Parmi celles-ci, notons entre autres;

- ⊕ **De quelle façon les ligands et les antagonistes se lient-ils précisément à la GPIIb/IIIa?** Une structure tridimensionnelle modélisée de la molécule d'adhésion est donc capitale afin de mieux comprendre le récepteur et élaborer de nouveaux antagonistes.
- ⊕ **De quelle façon la GPIIb/IIIa s'active-t-elle et est-il possible d'élaborer de nouveaux médicaments antithrombotiques ayant comme cibles ces événements spécifiques à l'activation?** Des études approfondies sur les voies de signalisation intracytoplasmique plaquettaire pourraient ainsi mener à la synthèse de nouveaux agents.
- ⊕ **Les antagonistes interagissent-ils tous différemment avec la GPIIb/IIIa de façon à induire potentiellement de multiples conséquences fonctionnelles?**
- ⊕ **Les antagonistes oraux offrent-ils un traitement sûr, efficace cliniquement et de moindre coût?** Une meilleure définition de l'efficacité de ces antagonistes engendrerait une analyse des coûts et du niveau de sûreté de ceux-ci comparativement aux autres traitements oraux déjà existants (par exemple, l'aspirine).
- ⊕ **Les interactions des antagonistes de la GPIIb/IIIa avec d'autres intégrines revêtent-elles un caractère avantageux?** L'inhibition du récepteur de la vitronectine suite à une action croisée de l'abciximab, par exemple, diminue le taux de resténose et de complications ischémiques.

- ⊕ **De quelle façon certains antagonistes de la GPIIb/IIIa entraînent-ils une thrombocytopénie?** Malgré la rareté de cette problématique, la thrombocytopénie demeure tout de même particulièrement inquiétante.
- ⊕ **Pourquoi certains antagonistes de la GPIIb/IIIa démontrent-ils une efficacité décroissante à des doses élevées?** En plus d'occasionner une augmentation des risques d'hémorragies sévères, certains antagonistes perdent de leur efficacité à de fortes doses, allant même jusqu'à provoquer l'activation paradoxale de la GPIIb/IIIa.
- ⊕ **Est-il possible d'amenuiser les différences entre les réponses interindividuelles suite à un traitement avec un antagoniste de la GPIIb/IIIa commun?**
- ⊕ **Le dosage spécifique à chaque patient et le titrage individuel de l'antagoniste de la GPIIb/IIIa représentent-ils une mesure pouvant accroître la sûreté et l'efficacité des thérapies chroniques?**
- ⊕ **Si ce dosage est désirable, serait-il préférable de mesurer 1) les niveaux sanguin et plasmatique de l'antagoniste de la GPIIb/IIIa; 2) le taux de molécules d'adhésion GPIIb/IIIa ayant été bloquées par le médicament ou 3) l'effet du médicament sur les fonctions plaquettaires, telles que l'agrégation?** Le développement d'un protocole de dosage strict devient donc un prérequis, ce dernier se devant d'être à la fois simple et rapide d'utilisation, robuste et de moindre coût.
- ⊕ **L'administration conjointe de l'aspirine et de l'antagoniste de la GPIIb/IIIa peut-elle apporter une protection cardiaque supplémentaire?**
- ⊕ **Quels sont les risques associés à la réadministration d'un antagoniste de la GPIIb/IIIa à un patient donné?** Les inquiétudes concernent la possibilité d'anaphylaxie, de décroissance de

l'efficacité du médicament et de thrombocytopénie lors d'une seconde intervention nécessitant une réadministration du médicament.

Les réponses à ces interrogations permettront ainsi une meilleure compréhension des structures et fonctions de la molécule d'adhésion plaquettaire GPIIb/IIIa, en plus de définir précisément le potentiel clinique de nouveaux antagonistes, tels que les agents en développement à administration transdermale et intranasale, et de favoriser l'usage de ces médicaments dans un contexte plus efficace et sécuritaire <sup>13,61</sup>.

Grâce aux études pharmacologiques et aux essais cliniques d'envergure, l'action bénéfique des antagonistes de la GPIIb/IIIa est maintenant reconnue et fortement documentée, proposant du même coup, une alternative efficace au traitement monothérapeutique à l'aspirine lorsque l'inhibition des fonctions plaquettaires est cliniquement requise. En extrapolant légèrement la présente situation, il est juste de prévoir qu'au cours des années à venir, virtuellement tous les patients souffrant de maladies cardiaques ischémiques recevront ces nouveaux agents antithrombotiques, sachant qu'actuellement, l'eptifibatide, le tirofiban et l'abciximab possèdent déjà un statut de médicament prescrit en milieu hospitalier. Nous entrons présentement dans une nouvelle ère visant une protection antiplaquettaire de haut calibre, dont seuls certaines connaissances scientifiques et le complètement de récents essais cliniques font encore obstacles à cette nouvelle classe de médicaments <sup>13</sup>.

## **2. Hypothèses et Objectifs**

En somme, l'agrégation plaquettaire demeure l'un des phénomènes physiologiques des plus paradoxaux prenant place, entre autres, au sein du corps humain. D'une part, grâce à son rôle hémostatique vital, cette fonction plaquettaire assure un contrôle sévère envers les hémorragies et saignements prolongés, alors que, d'autre part, cette dernière endosse tout de même la responsabilité d'un grand nombre de décès et ce, que ce soit, par exemple, par l'entremise de thromboses, d'embolies distales ou de sténoses menant à l'ischémie. Afin de palier à cette lacune pathophysiologique, de nombreux antagonistes de la GPIIb/IIIa, molécule principalement reconnue pour son apport capital dans l'agrégation plaquettaire, vinrent s'ajouter à la liste de médicaments antithrombotiques. Quoique leurs propriétés bénéfiques furent démontrées à de multiples reprises au sein de divers essais cliniques, les interrelations entre leurs effets antiplaquettaires et l'expression, par les plaquettes, des molécules d'adhésion cellulaires ne furent point examinées.

De là, l'hypothèse de base de ce travail de recherche fut donc, qu'en plus de la GPIIb/IIIa, d'autres voies indépendantes de la GPIIb/IIIa pourraient également s'inscrire comme participantes importantes au niveau de l'agrégation plaquettaire.

Les objectifs visés furent donc établis comme étant 1) l'investigation des interrelations entre l'activation et l'agrégation plaquettaire, ainsi qu'au sujet de l'expression de molécules d'adhésion cellulaires et, 2) l'approfondissement des effets de trois inhibiteurs de la GPIIb/IIIa, soit abciximab (ReoPro) et tirofiban (Aggrastat) et roxifiban (XP280), sur l'agrégation et l'expression plaquettaire de trois molécules d'adhésion importantes, à savoir la P-sélectine, la GPIIIa et la forme active de la GPIIb/IIIa, le tout en réponse à différentes concentrations de thrombine et grâce à des protocoles spécifiques à la cytométrie en flux et à l'aggrégométrie. Enfin, un troisième objectif vint s'ajouter à ce travail de maîtrise,

c'est-à-dire, 3) l'élaboration des effets de ces antagonistes de la GPIIb/IIIa sur la liaison des plaquettes aux neutrophiles.



### **3. Contribution Originale**

Sujet de l'article scientifique:

**Les Interrelations Entre l'Activation Plaquettaire, la  
Liaison des Plaquettes aux Neutrophiles et les Effets  
Antiplaquettaires des Antagonistes de la GPIIb/IIIa**

To be submitted to: Journal of Cardiovascular Pharmacology™

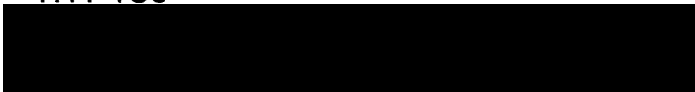
## **Relationship Between the Antiplatelet Effects of GPIIb/IIIa Antagonism, Platelet Activation and Binding to Neutrophils**

Authors:

Alexandre Caron\*,  
Jean-François Théorêt\*,  
Yahye Merhi\*

*\* Laboratory of Experimental Pathology, Montreal Heart Institute and the University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada*

Correspondence address: Dr. Yahye Merhi  
Laboratory of Experimental Pathology,  
Montreal Heart Institute  
5000 Belanger Street East  
Montreal, Quebec, Canada  
H1T 1C8



Running Title: GPIIb/IIIa Antagonism and Platelet Activation

## ABSTRACT

Platelet activation induces cell adhesion molecule expression followed by aggregation and constitutes the primary mediator of arterial thrombosis. To reduce the incidence of thrombosis and clinical complications of PTCA, numerous GPIIb/IIIa antagonists have been developed. Although the clinical benefits of these agents have been documented, the relationship between their antiplatelet effects and platelet cell adhesion molecule expression has not been investigated. This study investigates the effects of abciximab, tirofiban, and the active free acid form of roxifiban on isolated human platelet aggregation using optical aggregometer; platelet P-selectin and GPIIb/IIIa expression, and platelet-neutrophil binding were assessed using flow cytometry. Thrombin at 0.025 U/mL induces maximal platelet aggregation ( $76.3\pm 2.6\%$ ), P-selectin expression ( $88.5\pm 4\%$ ), GPIIb/IIIa activation (PAC-1 binding,  $86.2\pm 8.9\%$ ) and platelet-neutrophil binding ( $58.0\pm 6.4\%$ ), whereas levels of GPIIIa remained unchanged (98%). Agents inhibited in a concentration-dependent manner thrombin-induced platelet aggregation and PAC-1 binding without affecting platelet P-selectin expression. Abciximab, tirofiban and roxifiban (100nM) reduced significantly platelet aggregation by  $45.8\pm 8.6\%$ ,  $51.9\pm 5.8\%$  and  $73.9\pm 1.8\%$ , respectively, whereas PAC-1 binding was inhibited by 83%, 47% and 100%, respectively. None of these agents affected significantly platelet-neutrophil binding, whereas anti-P-selectin blocking monoclonal antibody abolished this binding. These results indicate that the effects of these GPIIb/IIIa antagonists on platelet aggregation are not related to the inhibition of platelet activation, as P-selectin

levels and platelet-neutrophil binding remained unaffected, and suggest that other GPIIb/IIIa-independent pathways may be involved in platelet aggregation.

**Key words:** Platelets, Thrombosis, GPIIb/IIIa Antagonist, P-selectin, Aggregation.

## INTRODUCTION

Adhesive damage caused by atherosclerotic plaque rupture or PTCA intervention induces thrombus formation leading to multiple cardiovascular diseases such as acute myocardial infarction, unstable angina, and restenosis<sup>1,2</sup>. Adhesion of platelets to the damaged vessel wall and to a monolayer of adherent platelets represents the first step in these pathophysiologic reactions. During this process, platelets become activated and promote granules fusion to the cell membrane, which derived from a series of intracellular signaling events leading to P-selectin translocation and to GPIIb/IIIa active conformation acquisition, rendering them able to accomplish their pathophysiologic functions in inflammation and aggregation<sup>3</sup>.

Glycoprotein IIb/IIIa is one of the most abundant platelet receptors with more than 80,000 copies on the cell surface<sup>4,5</sup>. This  $\beta_3$ -integrin is a non-covalently associated  $\alpha/\beta$  heterodimer; the  $\alpha_{IIb}$  (1,008 amino acids, 136 kDa) subunit is composed of a disulfide-linked heavy chain (105 kDa) and light chain (25 kDa)<sup>6-8</sup>, and the  $\beta_3$  subunit is a single polypeptide chain (762 amino kDa, 92 kDa) with an intricate disulfide arrangement<sup>8,9</sup>.

In the resting state, the GPIIb/IIIa receptor is in a low affinity state. However, when the platelets become activated, GPIIb/IIIa undergoes a conformational change, which increases its affinity for its different ligands, such as fibrinogen and vWF (von Willebrand factor)<sup>10</sup>. Interactions between soluble

fibrinogen and the activated GPIIb/IIIa represent the key step in platelet / platelet adhesion, thus leading to aggregation <sup>11</sup>.

P-selectin is a membrane glycoprotein expressed by platelets and endothelial cells after  $\alpha$ -granules (platelets) or Weibel-Palade bodies (endothelium) fusion to the cell membrane following cell activation <sup>12-14</sup>. PSGL-1 (P-selectin Glycoprotein Ligand-1) is the high affinity ligand for P-selectin and is expressed by leukocytes; this interaction being the key step in platelet adhesion to leukocytes <sup>12,14,15</sup>.

In order to reduce the incidence of thrombosis and clinical complications of PTCA, a number of GPIIb/IIIa antagonists have been developed <sup>16</sup>. Blockade of GPIIb/IIIa receptors with GPIIb/IIIa antagonists inhibits platelet aggregation but not platelet adhesion <sup>17</sup>, and, with differential efficiency, the platelet-mediated clot retraction in spite of their equivalent anti-aggregatory potency <sup>18</sup>. The GPIIb/IIIa antagonists are divided in three categories that contain the RGD sequence: naturally occurring disintegrins, synthetic peptides and non-peptides, and monoclonal antibodies <sup>17</sup>. Being involved in the final common pathway for platelet aggregation, GPIIb/IIIa represents a key target for antithrombotic agents, such as roxifiban, abciximab, and tirofiban. Abciximab is the Fab fragment of a monoclonal antibody to GPIIb/IIIa that has been humanized to reduce immunogenicity and thrombocytopenia <sup>19-21</sup>. It also has high-affinity and slow reversibility for GPIIb/IIIa receptors <sup>22</sup>, and was the first GPIIb/IIIa inhibitor to be tested and used extensively in patients <sup>23</sup>. As for roxifiban and tirofiban, they are

both non-peptide peptidomimetic inhibitors that mimic the RGD sequence in fibrinogen, and are highly specific inhibitors of the GPIIb/IIIa receptor 22. Moreover, roxifiban represents a new class of potent GPIIb/IIIa antagonists, along with many new agents with similar structure that have been elaborated as oral prodrug, and proved to be highly effective in inhibiting human platelet aggregation 24-28. Although the clinical benefits of these agents have been vastly documented 17,19-21,29-31, the relationships between their antiplatelet effects, platelet cell adhesion molecule expression, and platelet-neutrophil binding have not been investigated.

This study was designed to investigate effects of three GPIIb/IIIa inhibitors, abciximab (ReoPro™, Centocor), tirofiban (Aggrastat™, Merck), and the active free acid form of roxifiban (XP280, Dupont), on human platelet aggregation, P-selectin and GPIIIa expression, and platelet binding to neutrophils using flow cytometry and aggregometry, in response to thrombin activation.

## METHODS

### Antibodies

All monoclonal antibodies (Mabs) were mouse anti-human directed against cell adhesion molecules (CAMs) and were obtained in FITC- or PE-conjugated form for direct immunostaining. Platelet P-selectin PE-conjugated (anti-CD62P, clone AK-6) and neutrophil MAC-1 PE-conjugated (anti-CD11b, clone ICRF44) were purchased from Serotec (Oxford, England). CD61-FITC (anti-GPIIIa, clone Y2/51) was obtained from DAKO (Mississauga, Ontario, Canada). PAC-1-FITC (activated form of GPIIb/IIIa) was bought from Becton-Dickinson (New-Jersey, USA). We also used two-isotypes control IgG's for non-specific interactions (goat anti-human IgG, FAB specific, FITC- or PE-conjugated from Serotec). Finally, P-selectin inhibitor, clone WASP 12.2, was purchased from Zymed (San Francisco, California).

### Blood sampling

Blood was taken from healthy adult volunteers (male and female of different ages, free from any medication known to interfere with platelets functions for at least 10 days) after informed consent. Samples (60 to 120 mL) were taken from an antecubital vein through a 19-gauge butterfly needle, and anticoagulated with acid-citrate-dextrose (ACD) in a ratio of five parts blood to one part ACD.



### **Platelet isolation**

Platelet isolation was performed as described previously <sup>32,33</sup>. Briefly, ACD-anticoagulated blood was centrifuged 15 min at 500 g. Platelet-Rich Plasma (PRP) was collected, from which platelets were obtained following centrifugation at 800 g for 10 min. Platelets were resuspended in HBSS/HEPES EDTA (Hank's balanced salt solution with 0,4 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA); pH, 6,5, free from Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>). After removal of red blood cells by low speed centrifugation (5 min at 110 g), the platelet suspension was then centrifuged 10 min at 800 g, and platelets were resuspended in HBSS/HEPES buffer pH 7,4 with Ca<sup>2+</sup> (CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM) and Mg<sup>2+</sup> (MgSO<sub>4</sub> 0.81 mM), and adjusted to a final concentration of 250 x 10<sup>6</sup> platelets/mL, using an automated cell counter (T890, Coulter, Burlington, Ontario, Canada).

### **Neutrophil isolation**

Neutrophil preparation was carried out as previously described <sup>32,33</sup>. After PRP collection, during the platelet preparation procedure, the lower phase was treated with an equal volume of HBSS-HEPES citrate (dihydrate sodium citrate 12.9 mmol/L) buffer pH 7.4 without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> that contained 4% dextran (MW 260 kDa, Sigma Chemical Co.). After 35 to 40 minutes sedimentation, the leukocyte-rich suspension was washed, layered over an equal volume of Ficoll-Paque gradient separation medium (Pharmacia Biotech), and centrifuged at 400 g for 30 minutes. After hypotonic lysis of red blood cells, the

isolated neutrophils were resuspended in HBSS-HEPES with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  and adjusted to a final concentration of  $5 \times 10^6/\text{mL}$ , using an automated cell counter.

### **Platelet aggregation**

Optical platelet aggregation was monitored using a four channels whole blood aggregometer (Chronolog-log 810/DR data reduction system, Havertown, PA, USA). Washed platelets samples were placed in proper glass cuvette with a magnetic stir, then pre-warmed at  $37^\circ\text{C}$  in the incubation wells surrounding the heater block cover. Appropriate GPIIb/IIIa antagonist treatments were added to each suspension at various concentrations (10, 50, 100 or 200 nM), and then incubated for 10 min. As reference, 500  $\mu\text{L}$  of buffer was added to an empty cuvette (100% transmittance baseline). Following the incubation time, samples were placed in the aggregometer and stirred at the selected speed of 1000 RPM. Baseline was set in order to obtain 0% aggregation, and 100% aggregation with a 90% deflection. When the 0% transmittance baseline (washed platelets) was stabilized, appropriate thrombin concentration was added to each suspension. The aggregation response was monitored for 10 min.

### **Platelet adhesion molecule expression**

Expression of P-selectin (CD62P) and GPIIIa (CD61) on isolated platelets following pre-incubation for 10 min with the appropriate GPIIb/IIIa antagonist was assessed at baseline and after 5 min activation with different concentration of thrombin (0 - 0,1 U/mL). Platelet samples (50  $\mu\text{L}$ ) were taken from each non-

activated and activated suspension, and then fixed in phosphate buffer saline (PBS) with 1% paraformaldehyde for 1 hour at 4°C in the dark. After being washed with PBS-0.1% sodium azide, the platelets were immunolabeled with saturating concentrations of the relevant monoclonal antibody or an isotype-matched control IgG for 30 min in the dark; they were then washed and fixed with PBS-1% paraformaldehyde for flow cytometry analyses.

The expression of the activated form of GPIIb/IIIa (PAC-1) on isolated platelets pre-incubated for 10 min with the appropriate GPIIb/IIIa antagonist was also assessed at baseline and after activation with thrombin (0,025 U/mL). Platelet samples (50 uL) were immediately taken after thrombin addition to platelet suspension, and then immunolabeled with saturating concentration of PAC-1 antibody or an isotype-matched control IgG for 30 min in the dark, and finally fixed with PBS-1% paraformaldehyde for flow cytometry analyses.

In other experiments, the binding of platelets to neutrophils was determined in mixed cell preparations, using a dual-labeling technique with mouse anti-human Mabs directed against platelet CD61 FITC-conjugated and neutrophil Mac-1 PE-conjugated. Platelets were treated with appropriate GPIIb/IIIa antagonist or with P-selectin inhibitor (function-blocking monoclonal antibody, clone WASP 12.2, Zymed) for 10 minutes at room temperature, before neutrophils and thrombin were added. Five minutes after the addition of thrombin, the cells were fixed with PBS-1% paraformaldehyde for 1 hour at 4°C in the dark. After being washed with PBS-0.1% sodium azide, the cells were labeled with saturating concentrations of the relevant Mabs or isotype-matched

control IgG for 30 minutes in the dark. They were then washed with PBS and fixed with PBS-1% paraformaldehyde for flow cytometry analyses.

### **Flow cytometry**

All samples were analyzed within 6 hours following samples preparation on a Coulter Epics XL Cytometer. Using one-color analyses, platelet population was identified and discriminated from the debris by their scatter profile. Debris was excluded from analysis by setting an appropriate scatter electronic gate or threshold. Fluorescence data were obtained from 5000 events in each sample or a 2 minutes time count. The platelet population has been previously identified with Mabs against CD61 on resting and activated platelets. Results were expressed as the % of positive cells for the specific surface marker(s).

For 2-color analyses, the fluorescence threshold was set to analyze only dual FITC- and PE-labeled cells, corresponding to neutrophils exhibiting platelet-CD61 fluorescence. Results were then expressed as the % of neutrophils exhibiting platelet-bound fluorescence.

### **Statistical analyses**

Results are expressed as mean +/- SEM. Data were compared using one-way analysis of variance (ANOVA). In case of significant difference, Dunnett's Test was performed after ANOVA for intergroup comparisons. Differences were considered statistically significant at the 95% confidence level ( $p < 0.005$ ).

## RESULTS

### **Platelet aggregation and cell adhesion molecule expression**

As shown in figure 1A, thrombin increases in a concentration-dependent manner platelet aggregation. Platelet aggregation increased from  $38.2 \pm 9.4\%$  at 0.01 U/mL to  $76.3 \pm 2.6\%$  at 0.025 U/mL of thrombin and remained statistically unchanged at higher concentrations.

The effects of different concentrations of thrombin on the expression of platelet cell adhesion molecules are presented in figure 1B. At baseline, resting platelets express low level of P-selectin and PAC-1 (less than 5 and 1%, respectively), whereas GPIIIa (CD61) is consecutively expressed (99%). Thrombin at 0,01 U/mL induced almost 50 % increased in both P-selectin and PAC-1 expression, whereas maximal expression (more than 85%) was obtained at 0.025 U/mL of thrombin. However, the expression of CD61 was constant and unaffected by thrombin.

Based on these results, thrombin at 0.025 U/mL was selected for the subsequent experiments with the different GPIIb/IIIa antagonists.

### **Effects of GPIIb/IIIa antagonists**

Figure 2 shows the effect of the different GPIIb/IIIa inhibitors on thrombin-induced human platelet aggregation. Low concentration (10 nM) of abciximab, tirofiban and roxifiban, had no significant effect on platelet aggregation. However, at higher concentrations (50, 100, and 200 nM), these GPIIb/IIIa antagonists inhibited, in a concentration-dependent manner thrombin-induced platelet

aggregation. At 50 nM, abciximab, tirofiban and roxifiban reduced significantly ( $p < 0.05$ ) platelet aggregation by  $16.2 \pm 5.3\%$ ,  $18.8 \pm 5.6\%$  and  $38.2 \pm 9.9\%$ , respectively, while at 100 nM, platelet aggregation was inhibited by  $45.8 \pm 8.6\%$ ,  $51.9 \pm 5.8\%$  and  $73.9 \pm 1.8\%$ , respectively. At 200 nM, these GPIIb/IIIa antagonists were equally effective with more than 70% inhibition of platelet aggregation.

Effects of abciximab, tirofiban and roxifiban on platelet GPIIIa and P-selectin expression, and GPIIb/IIIa activation with PAC-1, are shown in figures 3A, B and C. Agents, at all concentrations tested (50, 100, and 200 nM), had no significant effect on the percentage of thrombin-activated platelets expressing P-selectin (figure 3A) and GPIIIa (figure 3C). On the other hand, these GPIIb/IIIa antagonists inhibited in a concentration-dependent manner the association of PAC-1 antibody with the activated form of GPIIb/IIIa. Interestingly, roxifiban, at 50 nM, inhibited PAC-1 binding by almost 50% ( $p < 0.05$ ), whereas abciximab and tirofiban were ineffective at the same concentration. In addition, complete inhibition of PAC-1 binding was achieved with 100 nM of roxifiban but at 200 nM with abciximab and tirofiban.

Figure 4 shows the correlation between anti-aggregatory effects of the three GPIIb/IIIa antagonists, tested at different concentrations, and their effects on PAC-1 binding. A linear regression with positive significant correlation ( $r = 0.93$ ,  $p < 0.001$ ) was obtained between these two parameters. Figure 4 also shows that despite a complete inhibition (almost 100%) of PAC-1 binding with the different

GPIIb/IIIa antagonists, maximal inhibition of platelet aggregation remained under 75%.

### **Platelet-neutrophil binding**

As shown in figure 5, GPIIb/IIIa antagonists had no significant effect on activated platelet binding to neutrophils at the concentration that induce maximal inhibition of platelet aggregation and PAC-1 binding (200 nM). Among the three agents tested, only abciximab induced a 15% non-significant decreased when compared to thrombin. On the other hand, the anti-P-selectin monoclonal antibody reduced activated platelet-neutrophil binding to the baseline level resulting in 100% inhibition when compared to thrombin.

## DISCUSSION

Platelet activation represents the second step in hemostasis, subsequent to platelet adhesion, and may be induced by several agonists that provoke platelet granules secretion and aggregation <sup>34</sup>. One of the most important and strong agonist, thrombin, increases intraplatelet calcium concentration, and stimulates inside-out signaling and degranulation of platelets <sup>35,36</sup>. Thrombin does so by activating phospholipase C through a G protein-coupled membrane receptors <sup>34,37</sup>.

Platelet activation produces conformational changes in the GPIIb/IIIa receptor, which allows it to become functional and to bind, with higher affinity, fibrinogen, von Willebrand's factor, and other adhesive proteins, such as vitronectin and fibronectin <sup>10,38</sup>. This conformational change in GPIIb/IIIa was demonstrated by the capacity of PAC-1 to bind activated but not resting platelets, which they constitutively expressed CD61 on GPIIIa ( $\beta_3$ -subunit of GPIIb/IIIa complex) (figure 1B). Platelet activation is also accompanied by  $\alpha$ -granules release, which induce rapid translocation of P-selectin to platelet surface, as shown in figure 1B <sup>15</sup>.

Platelet secretion and activation is followed by platelet aggregation. Fibrinogen and other adhesive proteins containing the RGD sequence bind to the activated form of GPIIb/IIIa receptors and mediate aggregation by forming bridges that link platelets together. The binding of fibrinogen molecule to activated GPIIb/IIIa triggers off the outside-in signaling, causing the increase of



platelet response to external stimuli. Our results show that even a small concentration of thrombin (0.01 U/mL) induced a 50% increase in aggregation, and maximal response was obtained with 0.025 U/mL (figure 1A). The results of figures 1A and B are consistent where 0.025 U/mL induced maximal platelet activation and aggregation.

Clinically, targeting GPIIb/IIIa offers great potential in reducing pathophysiological complications occurring following angioplasty and myocardial infarction <sup>1,2</sup>. Many molecules have been designed to interfere with GPIIb/IIIa interactions with its diverse ligands. Amongst them, abciximab was the first GPIIb/IIIa inhibitor to be tested and used extensively in man <sup>23</sup> and tirofiban had undergone extensive clinical trials <sup>22</sup>. Roxifiban represents a new class of potent GPIIb/IIIa antagonists elaborated as oral prodrug <sup>24</sup>. In our study, roxifiban was the most potent GPIIb/IIIa antagonist in reducing thrombin-induced platelet aggregation. At 100 nM, abciximab and tirofiban inhibited significantly platelet aggregation by almost 50%, while roxifiban induced near 74% inhibition at the same concentration.

The antiaggregatory effects of these GPIIb/IIIa antagonists were however not related to any effects on platelet activation as demonstrated by the expression of P-selectin. On the other hand, complete inhibition of the binding of PAC-1 recognizing the active form of GPIIb/IIIa was obtained at 200 nM with abciximab and tirofiban, whereas roxifiban achieved complete inhibition at 100nM.

In addition, these GPIIb/IIIa antagonists were ineffective in reducing activated platelet binding to neutrophils, which is mediated mainly by P-selectin binding to neutrophil PSGL-1. Effectively, the binding of activated platelet expressing P-selectin to neutrophils was completely inhibited by a blocking monoclonal antibody to P-selectin <sup>39,40</sup>. Some studies have pointed out the implication of GPIIb/IIIa in platelet binding to neutrophil via a mechanism involving fibrinogen binding to neutrophil CD11b/CD18 ( $\beta_2$ -integrin, MAC-1) <sup>41,42</sup>. However, the inhibition obtained by using some GPIIb/IIIa antagonist on platelet-neutrophil binding could be related to the inhibition of secondary platelet recruitment on the surface of the neutrophil rather than direct platelet/neutrophil contact <sup>43</sup>.

The lack of complete inhibition of platelet aggregation (maximal inhibition 75%) despite complete inhibition of PAC-1 binding (almost 100%) may suggest that other GPIIb/IIIa-independent pathways may also be involved in platelet aggregation. Recently, it has been shown that platelets can roll on activated endothelium expressing P-selectin via GPIb/IX complex <sup>44</sup>. In addition, it has been recently demonstrated that activated platelets can express PSGL-1, the high affinity ligand for P-selectin <sup>45</sup>. Taken together, these findings may indicate that activated platelets interact together through P-selectin and PSGL-1 or with non-activated platelets via P-selectin and GPIb/IX. The evaluation of these mechanisms of binding in platelet aggregation requires further experiments. Encouraging results (data not shown) have been obtained in lab showing that P-

selectin blockade increases platelet aggregation inhibition induced by GPIIb/IIIa antagonist.

These results, which show variable potency of these agents on platelet aggregation and activation, indicate that the effects of these GPIIb/IIIa antagonists on platelet aggregation are not related to inhibition of platelet activation, and suggest that other GPIIb/IIIa-independent pathways may be involved in platelet aggregation.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Heart and Stroke Foundation of Quebec and the Medical Research Council of Canada.

## REFERENCES

1. Ferns G, Avades T. The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models. *Int J Exp Pathol*. 2000;81:63-88.
2. Fuster V, Badimon L, Badimon J. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 1992;326:242-250,310-318.
3. Nurden A, Poujol C, Nurden P. Different activation states of GPIIb/IIIa complexes in platelets. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 1999;10 (suppl 1):S67-S70.
4. Calvette JJ. Platelet integrin GPIIb/IIIa: structure-function correlations. An update and lessons from other integrins. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999:29-38.
5. Wagner C, Mascelli M, Neblock D, Weisman H, Collier B, Jordan R. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood*. 1996;88:9907-9914.
6. Phillips D, Charo I, Parise L, Fitzgerald L. The platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex. *Blood*. 1988;71:831-843.
7. Benett J. Structural biology of glycoprotein IIb/IIIa. *Trends Cardiovasc Med*. 1996;6:31-36.
8. Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med*. 1995;332(23):1553-1559.

9. Calvete J. Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin. *Thrombosis Haemostasis*. 1994;72:1-15.
10. Haas T, Plow E. Integrin-ligand interactions. *Curr Opin Cell Biol*. 1994;6:656-662.
11. Harker J, Maraganore J, Hirsh J. New antithrombotic agents. In: Company JBL, ed. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia; 1994:1638-1660.
12. Malik AB. Endothelial cell interactions and integrins. *New Horizons*. 1993;1:37-51.
13. Furie B, Furie BC. P-selectin induction of tissue factor biosynthesis and expression. *Haemostasis*. 1996;26:60-65.
14. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest*. 1993;91:379-387.
15. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*. 1996;88:3259-3287.
16. Verstraete M. Synthetic inhibitors of platelet glycoprotein IIb/IIIa in clinical development. *Circulation*. 2000;102:e76-e80.
17. Chong PH. Glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in the management of cardiovascular diseases. *Am J Health-Syst Pharm*. 1998;55:2363-2386.
18. Hantgan RR, Mousa SA. Inhibition of platelet-mediated clot retraction by integrin antagonists. *Thromb Res*. 1998;89:271-279.
19. Topol EJ, Byzova TV, Plow EF. Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet*. 1999;353:227-231.

20. Lincoff AM, Califf RM, J. TE. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:1103-1115.
21. Vaharian A, Garbarz E. "Antiplaquettaires" modernes dans l'angor instable. *Arch Mal Coeur Vais.* 1996;89:1521-1526.
22. Scarborough RM, Kleiman NS, Phillips DR. Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists. What are the relevant issues concerning their pharmacology and clinical use? *Circulation.* 1999;100:437-444.
23. Bihour C, Durrieu-Jais C, Macchi L, Poujol C, Coste P, Besse P, Nurden P, Nurden AT. Expression of markers of platelet activation and the interpatient variation in response to abciximab. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:212-219.
24. Mousa SA, Khurana S, Forsythe MS. Comparative in vitro efficacy of different platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists on platelet-mediated clot strength induced by tissue factor with use of thromboelastography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1162-1167.
25. Li N, Wallen N, Savi P, Herault J, Herbert J. Effects of a new platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist, SR121566 on platelet activation, platelet-leukocyte interaction and thrombin generation. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1998;9:507-515.
26. Mousa SA, Forsythe M, Wityak J, Bozarth J, Mu D-X. Intravenous and oral antiplatelet/antithrombotic efficacy and specificity of XR300, a novel

- nonpeptide platelet GPIIb/IIIa antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31:441-448.
27. Mousa SA, Forsythe M, Bozarth J, Youssef A, Wityak J, Olson R, Sielecki T. XV454, a novel nonpeptide small-molecule platelet GPIIb/IIIa antagonist with comparable platelet alpha(IIb)beta3-binding kinetics to c7E3. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32:736-744.
28. Mousa SA, Kapil R, Mu D-X. Intravenous and oral antithrombotic efficacy of the novel platelet GPIIb/IIIa antagonist roxifiban (DMP754) and its acid XV459. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2535-2541.
29. Nurden AT, Poujol C, Durrieu-Jais C, Nurden P. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors, basic and clinical aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2835-2840.
30. Madan M, Berkowitz SD, Tchong JE. Glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade. *Circulation.* 1998;98:2629-2635.
31. Ferguson JJ, Zaqqa M. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists: current concepts and future directions. *Drugs.* 1999;58:965-982.
32. Merhi Y, Provost P, Chauvet P, Théorêt J, Phillips M, Latour J. Importance of platelets in neutrophils adhesion and vasoconstriction after deep carotid arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1185-1191.
33. Provost P, Borgeat P, Merhi Y. Platelets, neutrophils, and vasoconstriction after arterial injury by angioplasty in pigs: effects of MK-886, a leukotriene biosynthesis inhibitor. *Br J Pharmacol.* 1998;123:251-258.



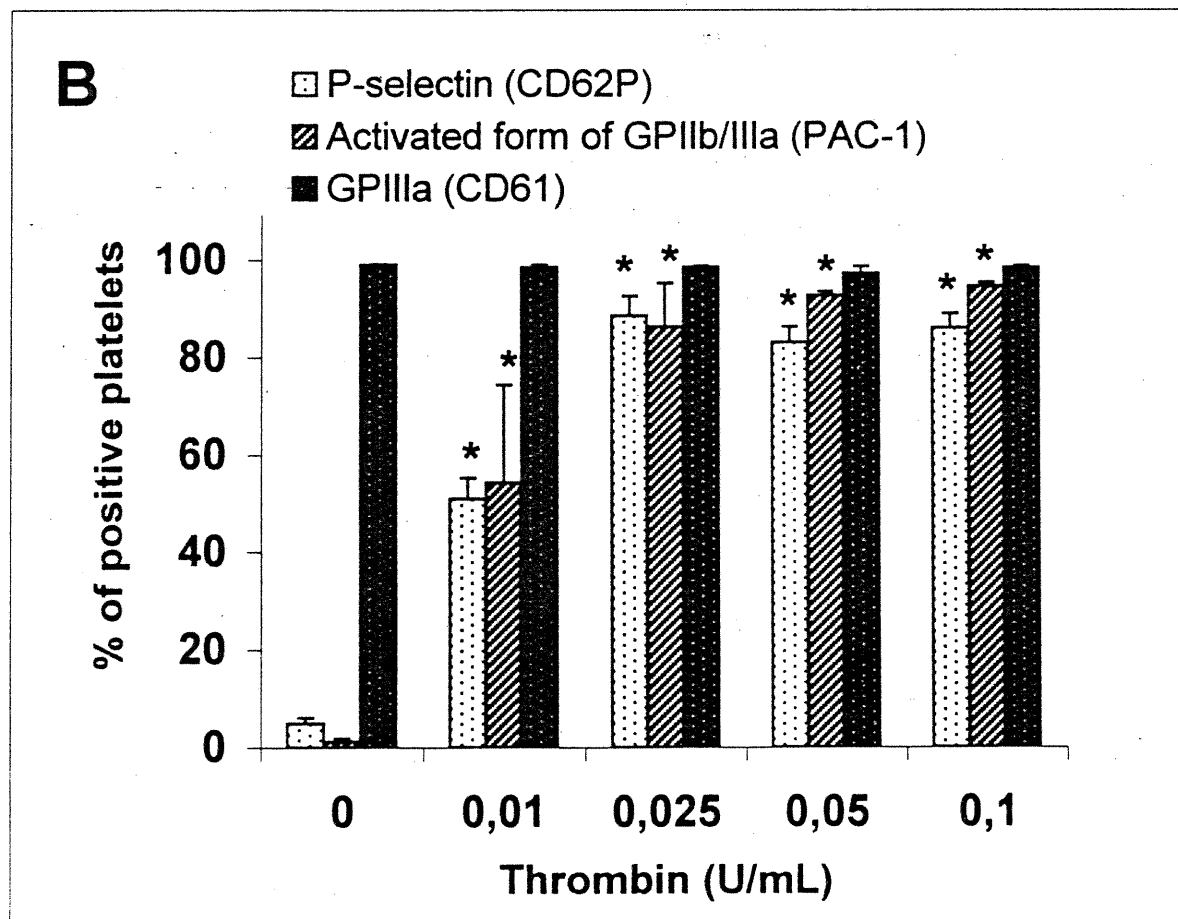
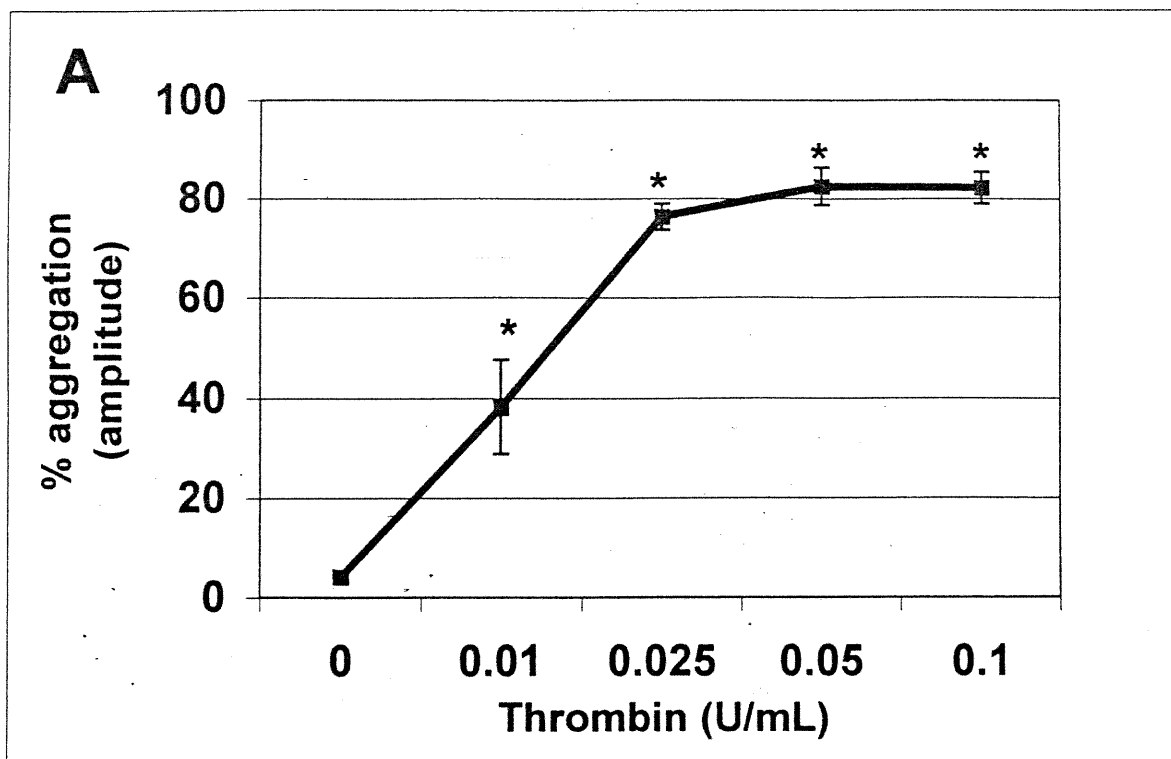
34. Ellis S, Bates E, Schaible T. Prospects for the use of antagonists to the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor to prevent postangioplasty restenosis and thrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 1991;17:89B-95B.
35. Levy-Toledano S, Maclouf J, Bryckaert M, Rosa J-P. Les voies de signalisation plaquettaire: peut-on les "séquencer" ? *Hématologie*. 1998;5:350-359.
36. Shattil SJ. Signaling through platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thrombosis Haemostasis*. 1999;82:318-325.
37. Lévy-Toledano S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a 'hierarchy' ? *Haemostasis*. 1999;29:4-15.
38. Moroi M, Jung SM. Integrin-mediated platelet adhesion. *Front Biosci*. 1998;3:d719-728.
39. Brown KK, Henson PM, Maclouf J, Moyle M, Ely JA, Worthen GS. Neutrophil-platelet adhesion: relative roles of platelet P-selectin and neutrophil beta-2 (CD18) integrins. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;18:100-110.
40. de Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V. Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction. *Haemostasis*. 1999;29:41-49.
41. Konstantopoulos K, Neelamegham S, Burns AR, Hentzen E, Kansas GS, Snapp KR, Berg EL, Hellums JD, Smith CW, McIntire LV, Simon SI. Venous levels of shear support neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in blood via P-selectin and beta2-integrin. *Circulation*. 1998;98:873-882.

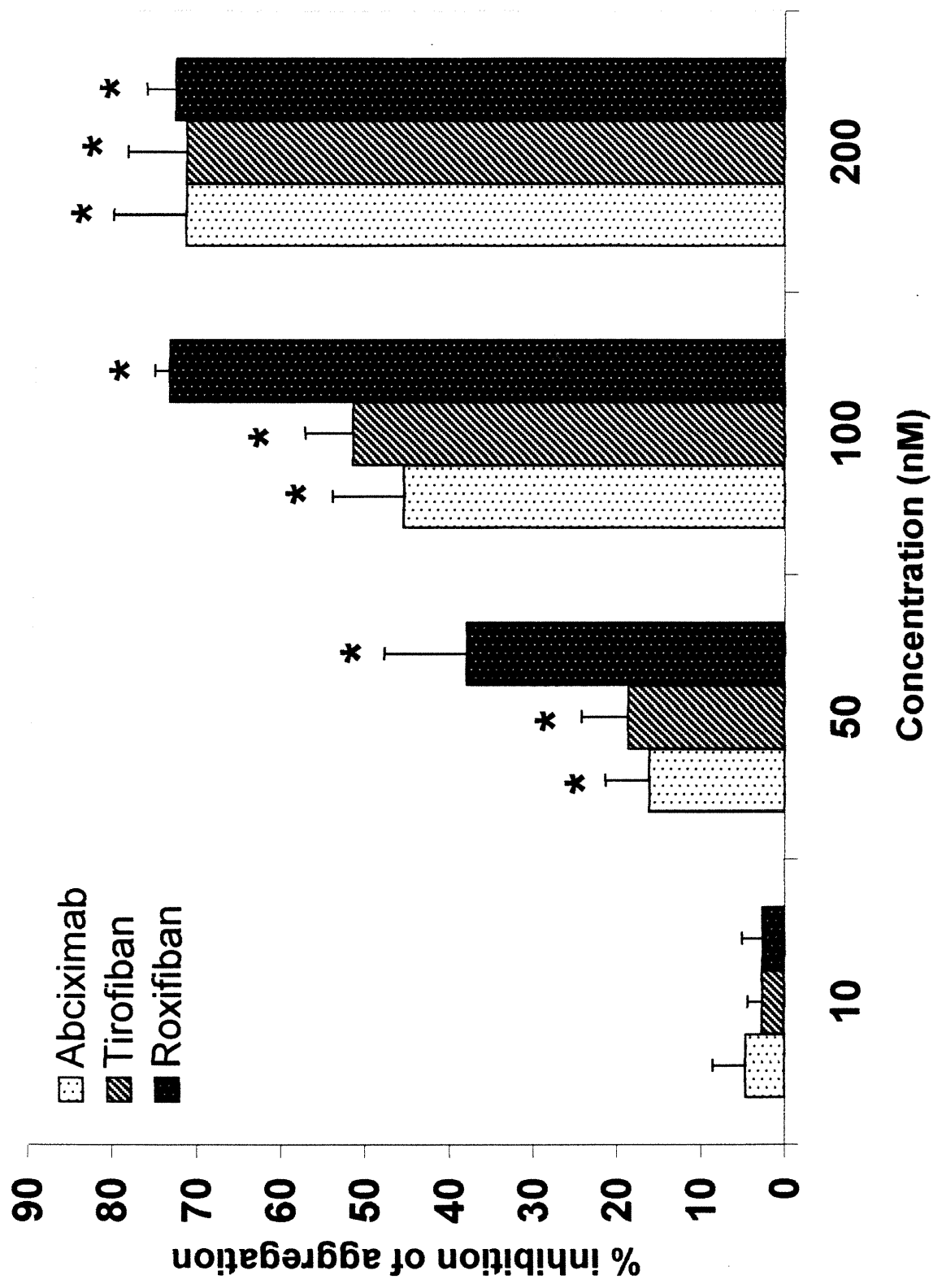
42. Xiao Z, Theroux P, Frojmovic M. Modulation of platelet-neutrophil interaction with pharmacological inhibition of fibrinogen binding to platelet GPIIb/IIIa receptor. *Thrombosis Haemostasis*. 1999;81:281-285.
43. Rinder, Bonan, Rinder, Ault, Smith. Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood*. 1991;78:1730-1737.
44. Romo G, Dong J-F, Schade A. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med*. 1999;190:803-813.
45. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med*. 2000;191:1413-1422.

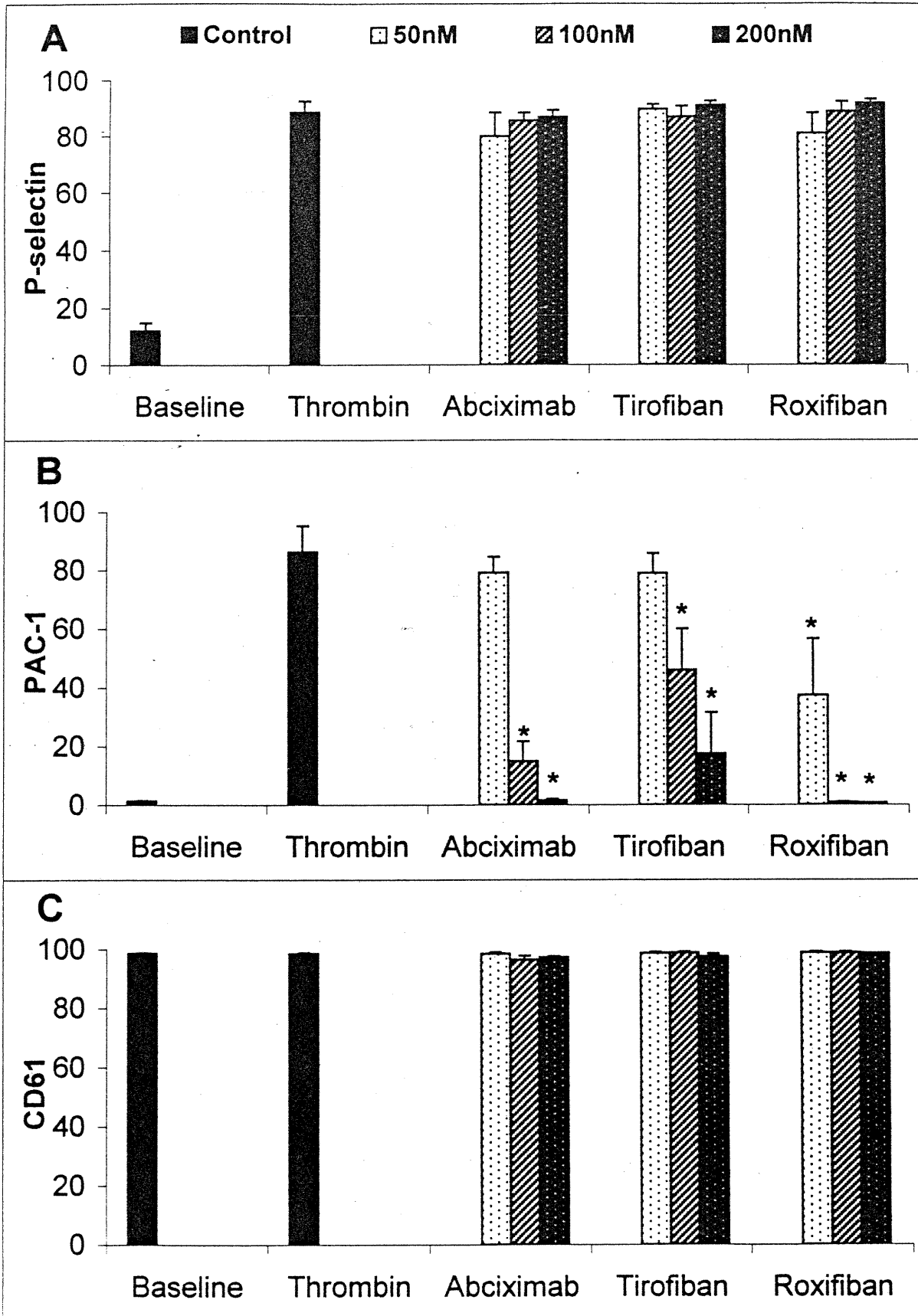
## FIGURE LEGENDS

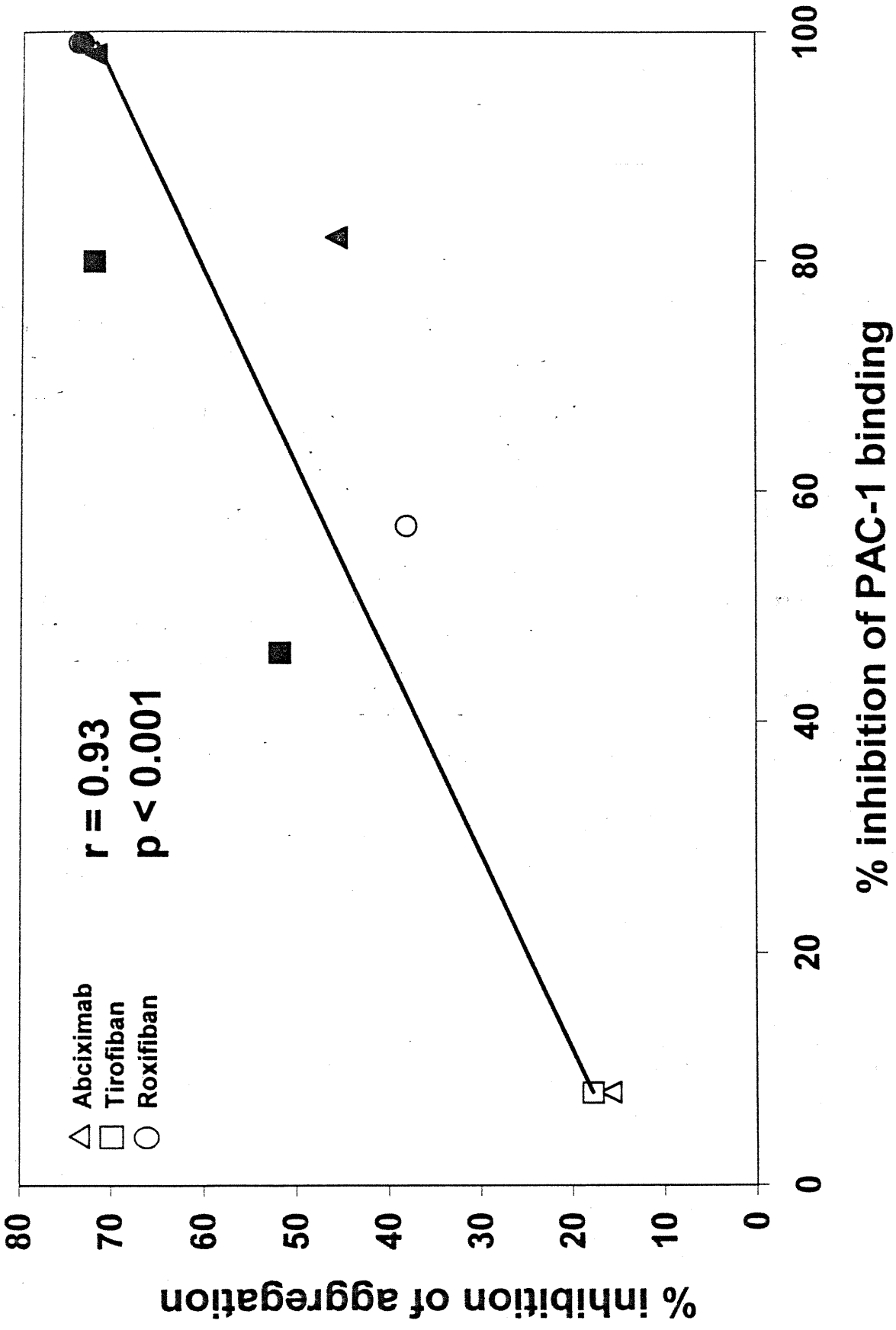
1. **FIGURE 1.** Platelet aggregation (**A**) and platelet cell adhesion molecule expression (**B**) in response to increasing concentrations of thrombin. Results are mean  $\pm$  SEM, **A**: n=5-10, **B**: n=6, \* p<0.05 vs. Control without thrombin.
2. **FIGURE 2.** Effects of the different GPIIb/IIIa antagonist on platelet aggregation induced by 0.025 U/mL thrombin. Mean  $\pm$  SEM, n=6, \* p<0.05 vs. Control.
3. **FIGURE 3.** Effects of the different GPIIb/IIIa antagonists on thrombin-induced platelet P-selectin expression (**A**), PAC-1 binding (**B**), and CD61 expression (**C**). Mean  $\pm$  SEM, n=6, \* p<0.05 vs. Thrombin.
4. **FIGURE 4.** Linear regression between the % inhibition of platelet aggregation, and the % inhibition of PAC-1 binding, obtained with the different GPIIb/IIIa antagonists. White, gray and black characters correspond to 50, 100 and 200 nM, respectively.
5. **FIGURE 5.** Effect of the different GPIIb/IIIa antagonists and an anti-P-selectin function-blocking monoclonal antibody on thrombin-

induced platelet binding to neutrophils. Mean  $\pm$  SEM, n=6, \* p<0.05 vs. Thrombin.

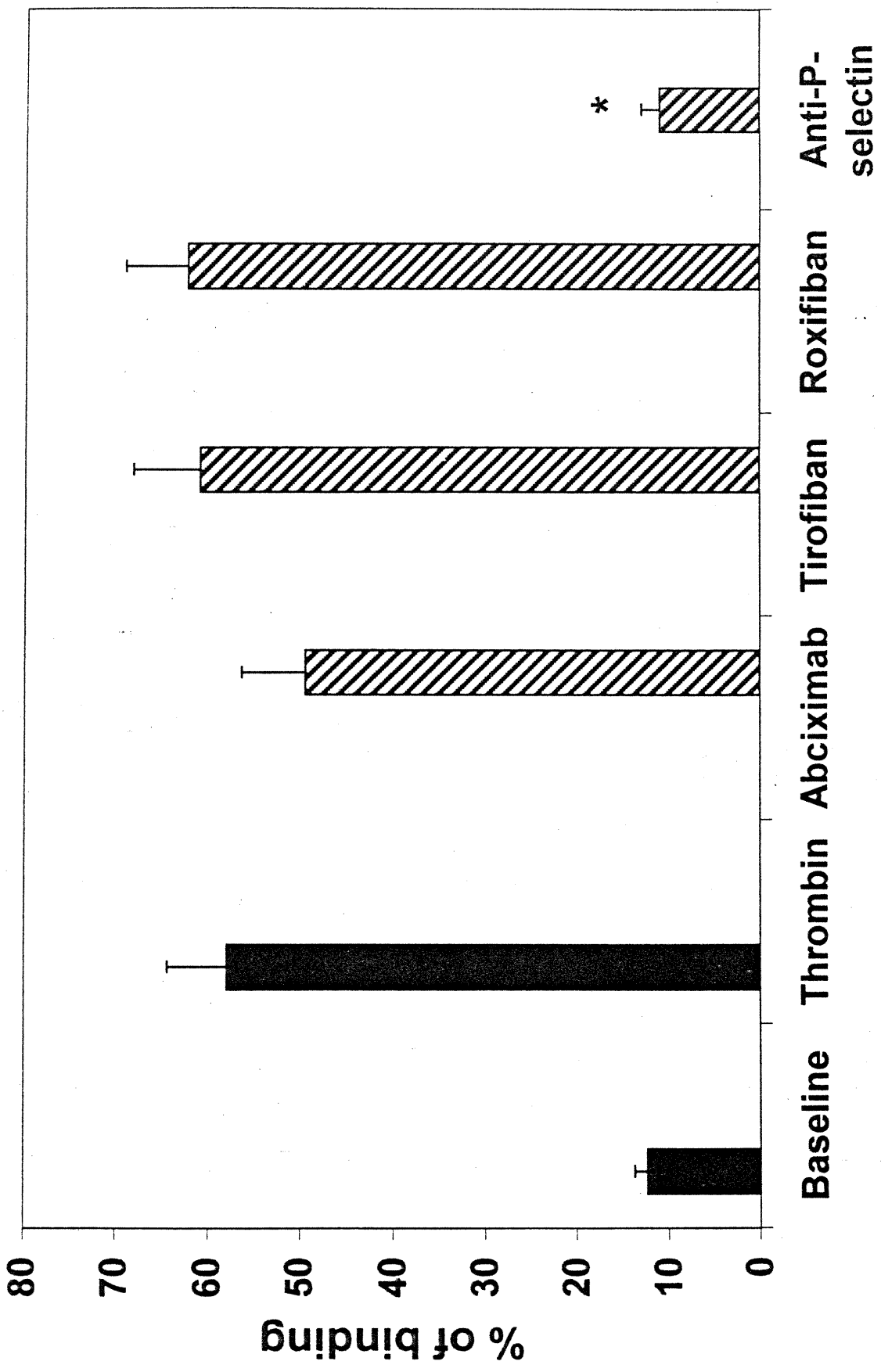












## 4. Discussion

Conséquemment à la rupture d'une plaque athérosclérotique ou à l'imposition d'une intervention percutanée transluminale coronarienne, l'exposition de la matrice sous-endothéliale par la paroi interne endommagée d'un vaisseau sanguin enclenche une multitude de processus pathophysiologiques, tels que la formation d'un thrombus, le tout se soldant fréquemment par diverses maladies cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde aigu, l'angine instable et la réocclusion aiguë <sup>14,59</sup>. L'adhésion plaquettaire à la paroi vasculaire et aux autres plaquettes représente l'événement clé menant à la formation d'un thrombus. Lors de ce phénomène, les plaquettes s'activent et sécrètent leurs contenus granulaires et lysosomaux, favorisant ainsi l'expression et l'activation de certaines de leurs molécules d'adhésion, en plus de promouvoir activement leur agrégation. Parmi les agonistes importants provoquant l'enclenchement de ce processus, la thrombine représente l'un des plus puissants activateurs plaquettaires, celle-ci augmentant rapidement la concentration calcique intracellulaire, en plus de stimuler les voies de signalisation *inside-out* et la dégranulation plaquettaire.

Tel que représenté au sein de la figure 1B de la contribution originale, l'usage de différentes concentrations de thrombine induit l'activation plaquettaire, perceptible notamment grâce au changement conformationnel de la GPIIb/IIIa, la rendant fonctionnelle et capable de s'associer avec une grande affinité au fibrinogène, au vWF et aux autres protéines adhésives, telles que la vitronectine et la fibronectine <sup>14,26</sup>. Cette modification structurale de la GPIIb/IIIa fut démontrée par l'entremise de la capacité que possède l'anticorps PAC-1 à s'associer avec la molécule d'adhésion plaquettaire uniquement lorsque celle-ci détient une forme active. De plus, l'activation plaquettaire est également démontrable par la présence importante de la P-sélectine à la surface d'une majorité de plaquettes. Sachant qu'au niveau des plaquettes à l'état basal, cette molécule d'adhésion se retrouve principalement au sein des

granules alpha et que seule la stimulation cellulaire provoque l'expression rapide de la P-sélectine à la surface plaquettaire conséquemment à la fusion des membranes granulaires et cytoplasmiques, il est donc normal de constater une élévation du nombre de plaquettes exprimant la P-sélectine à leur surface suite à une activation à la thrombine. Pour ce qui est de la GPIIIa (sous-unité  $\beta_3$  de la GPIIb/IIIa), cette dernière, étant exprimée de façon constitutive par les plaquettes au repos, ne semblent point influencer par l'activation cellulaire, le nombre de plaquettes les exprimant à leur surface demeurant inchangée.

L'étape finale associée à la formation d'un thrombus est sans contredit l'agrégation plaquettaire. Alors que les protéines adhésives possédant la séquence RGD, soit principalement le fibrinogène, s'associent à la conformation active de la GPIIb/IIIa, l'agrégation plaquettaire s'amorce grâce à la formation de ponts peptidiques reliant les plaquettes les unes aux autres. De plus, la liaison de la molécule de fibrinogène à la GPIIb/IIIa active déclenche les voies de signalisation *outside-in*, celles-ci étant responsables de l'accroissement de la réactivité plaquettaire en réponse à un stimulus externe. Tel que démontré au sein de la figure 1A de l'article scientifique, même une petite concentration de thrombine équivalente à 0,01 U/mL induit le processus d'agrégation plaquettaire (50% d'augmentation de l'agrégation), alors qu'une réponse maximale peut être obtenue avec 0,025 U/mL (76.3%). Les résultats regroupés au sein des figures 1A et 1B concordent donc quant au choix de la concentration de thrombine (0,025 U/mL), à savoir que cette dernière induit une activation et agrégation plaquettaire maximale.

Le blocage de la GPIIb/IIIa par les antagonistes de cette molécule d'adhésion permet l'obtention d'une certaine inhibition de l'agrégation, sans toutefois influencer l'adhésion plaquettaire à la matrice sous-endothéliale. Étant impliqué dans les dernières étapes de l'agrégation plaquettaire, la GPIIb/IIIa représente donc une cible de choix pour plusieurs agents antithrombotiques, tels que l'abciximab, le tirofiban et le roxifiban. Tel que présenté au sein de la figure 2, le roxifiban semble représenter l'antagoniste de la GPIIb/IIIa le plus

efficace en ce qui concerne l'inhibition de l'agrégation plaquettaire induit par la thrombine. À une concentration de 100 nM, l'abciximab et le tirofiban réduisirent significativement et respectivement l'agrégation plaquettaire de  $45,8 \pm 8,6\%$  et  $51,9 \pm 5,8\%$ , alors qu'à la même concentration, le roxifiban surpassa leurs effets en inhibant l'agrégation de  $73,9 \pm 1,8\%$ .

Cependant, malgré le fait que les trois bloqueurs eurent des effets significatifs sur l'agrégation plaquettaire, ces derniers n'interférèrent aucunement au niveau de l'association des anticorps avec leurs molécules d'adhésion plaquettaires correspondantes, à l'exception près de la liaison du PAC-1, celle-ci ayant été complètement inhibée par l'abciximab, le tirofiban et le roxifiban (200 nM). Sachant que la molécule-cible de ces agents est la forme active de la GPIIb/IIIa, aucun de ceux-ci n'eût un effet significatif sur l'expression de la P-sélectine et de la GPIIIa, confirmant ainsi que ces trois antagonistes ne possèdent guère un effet inhibiteur spécifique envers l'activation plaquettaire. À une concentration de 100 nM, l'abciximab, le tirofiban et le roxifiban bloquèrent efficacement par encombrement stérique l'épitope de la GPIIb/IIIa active reconnue par l'anticorps PAC-1, réduisant ainsi significativement la liaison de cet anticorps à la GPIIb/IIIa active, à savoir 83%, 47% et 100 %, respectivement. Pourtant, le blocage total de la GPIIb/IIIa active n'induisit pas une inhibition complète de l'agrégation plaquettaire, suggérant ainsi que d'autres voies indépendantes de la GPIIb/IIIa pourraient être impliquées dans ce phénomène hémostatique.

De plus, tel que présenté au sein de la figure 5 de la contribution originale, l'abciximab, le tirofiban et le roxifiban ne semblèrent pas induire d'effets délétères au niveau de la liaison des plaquettes aux neutrophiles. Préconisant un blocage de l'axe GPIIb/IIIa plaquettaire -- fibrinogène -- Mac-1 neutrophilique, ces agents ne réussirent point à inhiber significativement les interactions adhésives entre plaquettes et neutrophiles suivant une stimulation plaquettaire à la thrombine (0,025 U/mL) et ce, même à une concentration équivalente à 200 nM, cette dernière ayant été préalablement démontré comme suffisante afin d'inhiber totalement les fonctions adhésives de la GPIIb/IIIa

active. Cependant, l'usage d'un inhibiteur fonctionnel de la P-sélectine, soit le clone WASP 12.2 de Zymed, parvint à bloquer significativement cette même adhésion des plaquettes aux neutrophiles et ce, à raison d'une concentration de 2 mg/mL, suggérant ainsi une implication prédominante de la P-sélectine, comparativement à la GPIIb/IIIa active, au niveau des interactions plaquettes-neutrophiles. Conséquemment, l'inhibition modeste des liaisons plaquettes-neutrophiles, obtenue lors de l'ajout de certains antagonistes, découle probablement de l'inhibition du recrutement secondaire des plaquettes à la surface des neutrophiles, plutôt que d'un effet direct des agents au niveau des contacts plaquettes-neutrophiles <sup>62</sup>.

L'absence d'inhibition complète au niveau de l'agrégation plaquettaire (inhibition maximale équivalente à 75%), comparativement à l'inhibition complète de la liaison de l'anticorps PAC-1 (près de 100%), suggère ainsi que d'autres voies indépendantes de la GPIIb/IIIa pourraient être impliquées dans l'agrégation plaquettaire. Récemment, le groupe de recherche du Dr Gabriel Romo démontrèrent que les plaquettes roulent sur un endothélium activé et exprimant la P-sélectine et ce, grâce à leurs molécules d'adhésion GPIb<sub>α</sub> issues du complexe GPIb/IX <sup>23</sup>. De plus, une nouvelle étude proposa également la présence de PSGL-1 à la surface des plaquettes activées, ce dernier représentant le seul ligand de haute affinité connu pour la P-sélectine <sup>63</sup>. Ensemble, ces résultats de recherches indiquent que les plaquettes activées pourraient interagir les unes avec les autres par l'entremise de leurs P-sélectine et PSGL-1, ou encore avec des plaquettes à l'état basal grâce à leurs P-sélectine et GPIb/IX. L'importance de ces mécanismes de liaison au sein de l'agrégation plaquettaire demeurent néanmoins incertaine, celle-ci requérant un approfondissement scientifique supplémentaire. Des résultats préliminaires encourageants ont d'ailleurs été obtenus en laboratoire (données non-présentées), ceux-ci démontrant que le blocage de la P-sélectine accroît l'inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par les antagonistes de la GPIIb/IIIa.

En somme, l'activation plaquettaire et l'agrégation assurent un rôle capital au sein de la pathophysiologie de la thrombose artérielle et des diverses complications cliniques découlant d'une intervention transluminale percutanée coronarienne. Ainsi, cette étude souligne l'importance de divers phénomènes, tels que 1) l'utilisation de thrombine amplifie l'expression de la P-sélectine et induit l'activation de la GPIIb/IIIa causant ainsi l'agrégation des plaquettes, et ce sans toutefois modifier l'expression de la GPIIIa; 2) l'antagoniste roxifiban demeure l'inhibiteur de la GPIIb/IIIa le plus efficace au niveau de l'agrégation plaquettaire; 3) l'abciximab, le tirofiban et le roxifiban bloquent complètement la liaison de l'anticorps PAC-1 à la forme active de la GPIIb/IIIa, sans cependant influencer la P-sélectine et la GPIIIa; 4) l'inhibition de la GPIIb/IIIa active n'induit point une inhibition complète de l'agrégation plaquettaire et finalement, 5) les inhibiteurs de la GPIIb/IIIa n'affectent pas la liaison des plaquettes aux neutrophiles, alors que le blocage de la P-sélectine inhibe complètement cette liaison.

## **5. Conclusion**

En conclusion, les résultats présentés à la section précédente indiquent que les effets des antagonistes du GPIIb/IIIa sur l'agrégation plaquettaire ne sont point reliés à l'inhibition de l'activation plaquettaire. De plus, le présent ouvrage approuve, suite à l'étude des précédents résultats, l'hypothèse de départ, celle-ci suggérant que d'autres voies indépendantes de la GPIIb/IIIa, telles que la P-sélectine, pourraient également s'inscrire comme participantes importantes au niveau de l'agrégation plaquettaire.

## **6. Références**

1. Tortora GJ, Grabowski SR, Parent J-C. *Principes d'anatomie et de physiologie*. 7e ed. Montréal: Centre Éducatif et Culturel (CEC); 1993.
2. Anon. A new blood corpuscle. *Lancet*. 1882;i: 111-112.
3. Mueller M-R, Salat A, Pulaki S. The platelet page. URL: <http://www.akh-wien.ac.at/biomed-research/htx/platweb1.htm>; 1996.
4. Marieb EN. *Anatomie et physiologie humaines*. 2e ed. Montréal: Éditions du Renouveau Pédagogique Inc.; 1993.
5. Shattil SJ, Ginsberg MH. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology - - integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest*. 1997;100:1-5.
6. Smyth SS, Joneckis CC, Parise LV. Regulation of vascular integrins. *Blood*. 1993;81:2827-2843.
7. Smith C, Estavillo D, Emsley J, Bankston LA, Liddington RC, Cruz MA. Mapping the collagen-binding site in the I domain of the glycoprotein Ia/IIa (Integrin alpha-2-beta-1). *J Biol Chem*. 1999;275:4205-4209.
8. Nurden AT, Nurden P. A review of the role of platelet membrane glycoproteins in platelet-vessel wall interaction. *Baillière's Clinical Haematology*. 1993;6:653-690.
9. Estavillo D, Ritchie A, Diacovo TG, Cruz MA. Functional analysis of the recombinant glycoprotein Ia/IIa (Integrin alpha-2-beta-1) I domain that inhibits platelet adhesion to collagen and endothelial matrix under flow conditions. *J Biol Chem*. 1999;274:35921-35926.
10. Monnet E, Fauvel-Lafève F. A new platelet receptor specific to type III collagen. *J Biol Chem*. 2000;275:10912-10917.
11. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69:11-25.



12. Calvette JJ. Platelet integrin GPIIb/IIIa: structure-function correlations. An update and lessons from other integrins. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999;29-38.
13. Topol EJ, Byzova TV, Plow EF. Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet.* 1999;353:227-231.
14. Chong PH. Glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in the management of cardiovascular diseases. *Am J Health-Syst Pharm.* 1998;55:2363-2386.
15. Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med.* 1995;332(23):1553-1559.
16. Coller BS. Potential non-glycoprotein IIb/IIIa effects of abciximab. *Am Heart J.* 1999;138 (Suppl):S1-S5.
17. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 1996;88:3259-3287.
18. Jang Y, Lincoff M, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:1591-1601.
19. Malik AB. Endothelial cell interactions and integrins. *New Horizons.* 1993;1:37-51.
20. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest.* 1993;91:379-387.
21. Furie B, Furie BC. P-selectin induction of tissue factor biosynthesis and expression. *Haemostasis.* 1996;26:60-65.
22. Cummings RD. Structure and function of the selectin ligand PSGL-1. *Braz J Med Biol Res.* 1999;32:519-528.
23. Romo G, Dong J-F, Schade A. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med.* 1999;190:803-813.
24. Newman P. The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;714:165-174.
25. Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS. Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6:695-704.
26. Moroi M, Jung SM. Integrin-mediated platelet adhesion. *Front Biosci.* 1998;3:d719-728.

27. Ruggeri ZM. Mechanism initiating platelet thrombus formation. *Thrombosis Haemostasis*. 1997;78:611-616.
28. Saelman EUM, Nieuwenhuis KH, Hese KM, de Groot PG. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa. *Blood*. 1994;83:1244-1250.
29. Jung SM, Moroi M. Signal-transducing mechanism involved in activation of the platelet collagen receptor integrin alpha2-beta1. *J Biol Chem*. 1999;275:8016-8026.
30. Ruf A, Morgenstern E. Ultrastructural aspects of platelet adhesion on subendothelial structures. *Semin Thromb Hemostasis*. 1995;21:119-122.
31. Ruf A, Patscheke H, Morgenstern E. Role of internalization in platelet activation induced by collagen fibers - differential effects of aspirin, cytochalasin D, and prostaglandin E1. *Thrombosis Haemostasis*. 1991;66:708-714.
32. Dale GL, Alberio L. Platelet-collagen interactions: membrane receptors and intracellular signalling pathways. *Eur J Clin Invest*. 1999;29:1066-1076.
33. Andrews RK, Shen Y, Gardiner EE, Dong J-f, López JA, Berndt MC. The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. *Thrombosis Haemostasis*. 1999;82:367-364.
34. Andrews R, Berndt M. Adhesion-dependent signalling and the initiation of haemostasis and thrombosis. *Histol Histopathol*. 1998;13:837-844.
35. Holmsen H. Platelet secretion and energy metabolism. In: Company JBL, ed. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Third ed. Philadelphia; 1994:524-545.
36. Levy-Toledano S, Maclouf J, Bryckaert M, Rosa J-P. Les voies de signalisation plaquettaire: peut-on les "séquencer" ? *Hématologie*. 1998;5:350-359.
37. Lévy-Toledano S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a 'hierarchy' ? *Haemostasis*. 1999;29:4-15.

38. Levy-Toledano S. Quelques schémas concernant la signalisation plaquettaire. Notes de Cours 1999. France.
39. Shattil SJ. Signaling through platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thrombosis Haemostasis*. 1999;82:318-325.
40. Colman RW, Cook JJ, Niewiarowski S. Mechanisms of platelet aggregation. In: *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Third Edition ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1994:508-523.
41. Jackson SP, Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest*. 2000;105:783-791.
42. Ruggeri ZM. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thrombosis Haemostasis*. 1993;70:119-123.
43. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood*. 1996;88:1525-1541.
44. Frojmovic MM. Platelet aggregation in flow: differential roles for adhesive receptors and ligands. *Am Heart J*. 1998;135:S119-S131.
45. Faint RW. Platelet-neutrophil interactions: their significance. *Blood Reviews*. 1992;6:83-91.
46. Brown KK, Henson PM, Maclouf J, Moyle M, Ely JA, Worthen GS. Neutrophil-platelet adhesion: relative roles of platelet P-selectin and neutrophil beta-2 (CD18) integrins. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;18:100-110.
47. Xiao Z, Thérroux P, Frojmovic M. Modulation of platelet-neutrophil interaction with pharmacological inhibition of fibrinogen binding to platelet GPIIb/IIIa receptor. *Thromb Haemost*. 1999;81:281-285.
48. Cecil RL, Bennett JC, Plum F. *Cecil Textbook of Medicine*. 20th ed: W.B. Saunders Company; 1996.
- 48A. van Kooyk Y, van Vliet SJ, Figdor CG. The actin cytoskeleton regulates LFA-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes. *J Biol Chem*. 1999;274(38):26869-26877.

- 48B. Diaz-Gonzalez F, Gonzalez-Alvaro I, Campanero MR, Mollinedo F, del Pozo MA, Munoz C, Pivel JP, Sanchez-Madrid F. Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Invest.* 1995;4:1756-1765.
- 48C. Zouki C, Beauchamp M, Baron C, Filep JG. Prevention of in vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J Clin Invest.* 1997;100(3):522-529.
49. Neumann F-J, Zohlnhofer D, Fakhoury L, Ott I. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leukocyte interaction and surface expression of the leukocyte integrin Mac-1 in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:1420-1426.
50. Mousa SA, Khurana S, Forsythe MS. Comparative in vitro efficacy of different platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists on platelet-mediated clot strength induced by tissue factor with use of thromboelastography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1162-1167.
51. Madan M, Berkowitz SD, Tchong JE. Glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade. *Circulation.* 1998;98:2629-2635.
52. Nurden AT, Poujol C, Durrieu-Jais C, Nurden P. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors, basic and clinical aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2835-2840.
53. Vaharian A, Garbarz E. "Antiplaquettaires" modernes dans l'angor instable. *Arch Mal Coeur Vais.* 1996;89:1521-1526.
54. Holmes MB, Sobel BE, Schneider DJ. Variable responses to inhibition of fibrinogen binding induced by tirofiban and eptifibatide in blood from healthy subjects. *Am J Cardiol.* 1999;84:203-207.
55. Matsumoto Y, Marukawa K, Okumura H, Adachi T, Tani T, Kimura Y. Comparative study of antiplatelet drugs in vitro: distinct effects of cAMP-elevating drugs and GPIIb/IIIa antagonists on thrombin-induced platelet responses. *Thromb Res.* 1999;199:19-29.

56. Jackson G. Tirofiban - spinning the data from the fact to hype. *Brit J Clin Pract.* 1997;51:131-132.
57. Lincoff AM, Califf RM, J. TE. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:1103-1115.
58. Cazes E, Nurden P, Nurden AT. Abciximab binding to glycoprotein IIb-IIIa and protein tyrosine phosphorylation in human platelets. *Blood.* 1999;93:4019-4020.
59. Hoekstra WJea. Potent, orally active GPIIb/IIIa antagonists containing a nipecotic acid subunit. Structure-activity studies leading to the discovery of RWJ-53308. *J Med Chem.* 1999;42:5254-5265.
60. Kereiakes DJ. Oral blockade of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor: fact or fancy ? *Am Heart J.* 1999;138.
61. Collier BS. Monitoring platelet GPIIb/IIIa antagonist therapy. *Blood Coagulation and Fibrinolysis.* 1999;10:S81-S86.
62. Rinder, Bonan, Rinder, Ault, Smith. Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood.* 1991;78:1730-1737.
63. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med.* 2000;191:1413-1422.

## **7. Remerciements**

J'aimerais tout d'abord remercier sincèrement mon directeur de recherche, le docteur Yahye Merhi, pour m'avoir permis de m'installer au sein de son équipe de recherche, ainsi que pour m'avoir dévoué temps et compréhension tout au long de ce projet de maîtrise.

De plus, j'aimerais attribuer un merci tout spécial à l'assistant de recherche du laboratoire, M. Jean-François Théorêt, qui, grâce à son talent scientifique, sut me faciliter, à de nombreuses reprises, la compréhension de divers principes théoriques et la réalisation de multiples expérimentations.

Je désirerais également exprimer ma sincère gratitude envers toute l'équipe d'étudiants, d'employés et de chercheurs de l'Institut de Cardiologie de Montréal, principalement Dr Jean-Guy Bienvenu et Dr Danielle Libersan, dont leur dévouement surpassa grandement les limites de simples collègues de travail.

Enfin, j'aimerais remercier et saluer l'indéfectible attention et encouragement que m'apporta ma mère tout au long de mes années d'études, et sans qui ce désir d'apprendre et de connaître m'aurait été malheureusement inconnu.

À vous tous, et à bien d'autres,  
Merci !