

Université de Montréal

**Étude du rôle régulateur de la lamine B1 dans l'activation
plaquettaire**

Base moléculaire de la thromboprotection observée dans le lupus
érythémateux disséminé chez les patients porteurs d'anticoagulants lupiques
et d'anti-lamine B1

par

Marie-Soleil Christin-Piché

Département de médecine

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de Docteur

en Sciences Biomédicales

Décembre, 2008

© MS Christin-Piché, 2008

Université de Montréal

Faculté de médecine

Cette thèse intitulée :

Étude du rôle régulateur de la lamine B1 dans l'activation plaquettaire

Base moléculaire de la thromboprotection observée dans le lupus érythémateux disséminé chez les patients porteurs d'anticoagulants lupiques et d'anti-lamine B1

présentée par :

Marie-Soleil Christin-Piché

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Richard Bertrand, président-rapporteur

Yves Raymond, directeur de recherche

Jean-Luc Sénécal, co-directeur

Claude Perrault, membre du jury

Joyce Rauch, examinateur externe

Daniel Lajeunesse, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les anticorps anti-phospholipides (aPL), tels que les anticoagulants lupiques (LAC), sont associés au développement récurrent de thromboses chez les patients atteints du lupus érythémateux disséminé (LED). Il a été observé que des titres élevés d'auto-anticorps anti-lamine B1 (anti-LB1), chez des patients porteurs de LAC, diminuent le risque de ces manifestations thrombotiques. Toutefois, la relation existant entre la lamine B1 (LB1), les anti-LB1 et la thromboprotection n'est toujours pas expliquée. Dans cette étude, nous avons donc cherché à comprendre comment la LB1 et les anti-LB1 induisent cette thromboprotection. Nous avons testé les effets d'anti-LB1 purifiés et de LB1 recombinante sur l'activation des cellules endothéliales et des plaquettes. Nous avons été en mesure de déterminer que la LB1, contrairement aux anti-LB1, possède une activité anti-plaquettaire. En effet, la LB1 réduit l'activation et l'agrégation plaquettaires *in vitro* et *in vivo*. Cette activité est due à une liaison directe de la LB1 aux plaquettes, suivie par une internalisation rapide dans des vésicules de clathrine. Par co-immunoprécipitation, nous avons découvert que la LB1 interagit avec le récepteur de l'insuline situé sur la membrane plaquettaire. La liaison de la LB1 à ce récepteur entraîne vraisemblablement son internalisation et l'inhibition d'une des cascades de signalisation normalement induite par le récepteur de l'insuline, menant éventuellement à l'inhibition des fonctions plaquettaires. L'ajout d'anti-LB1 purifiés dans nos expériences a permis d'augmenter de façon significative la persistance de la LB1 dans les plaquettes, une observation confirmée par la détection de LB1 uniquement dans les lysats de plaquettes prélevées chez des patients anti-LB1 positifs.

Nos résultats suggèrent que la LB1 prend part aux mécanismes régulateurs des processus d'hémostase chez des sujets sains et que la présence d'anti-LB1, chez les patients lupiques, prolonge la persistance de cet auto-antigène dans les plaquettes, les empêchant ainsi de s'activer. Ce mécanisme expliquerait la diminution du risque de thrombose chez les patients LAC positifs porteurs d'anti-LB1 circulants.

Mots-clés : Lupus érythémateux disséminé, auto-anticorps, anticoagulant lupique, anti-lamine B1, lamine B1, plaquettes, thrombose.

Abstract

Anti-phospholipid antibodies such as lupus anticoagulant antibodies (LAC) are associated with recurrent thrombotic events in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. However, the risk of thrombosis in LAC positive patients is markedly reduced in the presence of high titers of autoantibodies to lamin B1 (anti-LB1). To date, the implication of lamin B1 (LB1) and anti-LB1 in thromboprotection remains unclear. Our objective was to examine the mechanism whereby LB1 and anti-LB1 induced thromboprotection. Functional platelet and endothelial cell activation assays were used to determine the effects of recombinant LB1 and affinity purified anti-LB1 on these two cell types. LB1, contrarily to anti-LB1, was found to possess an intrinsic anti-platelet activity. This protein reduced the activation and aggregation of platelets *in vitro* and *in vivo*. This activity was likely due to the direct binding of LB1 to platelets, followed by its rapid internalization within clathrin coated-pits. Co-immunoprecipitation revealed that LB1 interacted with the insulin receptor located within the platelet membrane. The binding of LB1 to this receptor induced its internalization and inhibited at least one of the phosphorylation cascade stimulated by the receptor, which in turn inhibited platelet functions. The addition of affinity-purified anti-LB1 in our model markedly increased the persistence of LB1 within platelets, a finding supported by the detection of LB1 only in platelets from anti-LB1 positive SLE patients.

Our results suggest that LB1 regulates haemostasis in normal subjects. The presence of anti-LB1 in SLE patients prolongs the persistence of LB1 within platelets, thus possibly

preventing further platelet activation. This mechanism likely explains the reduced risk of thrombotic events in LAC positive SLE patients with circulating anti-LB1 autoantibodies.

Keywords: Systemic lupus erythematosus, autoantibodies, lupus anticoagulant, anti-lamin B1, lamin B1, platelets, thrombosis.

Table des matières

AVANT-PROPOS	XX
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	XX
2. HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	XXII
3. OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	XXIII
REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
1. SYSTÈME IMMUNITAIRE, TOLÉRANCE ET MALADIES AUTO-IMMUNES	1
2. LE LUPUS ÉRYTHÉMATEUX DISSÉMINÉ (LED)	8
2.1 <i>Manifestations cliniques du LED</i>	9
2.2 <i>Épidémiologie et démographie</i>	12
2.3 <i>Facteurs impliqués dans la fréquence du LED</i>	13
3. AUTO-ANTICORPS ET LED	17
3.1 <i>Spécificité des auto-anticorps</i>	19
3.2 <i>Auto-anticorps spécifiques au LED</i>	20
3.3 <i>Auto-anticorps non-spécifiques au LED, présents dans d'autres maladies auto-immunes</i>	23
4. LES PLAQUETTES	41
4.1 <i>Les granules</i>	43
4.2 <i>Mécanisme d'activation plaquettaire</i>	44
4.3 <i>Régulation des phénomènes d'hémostase</i>	49
4.4 <i>Récepteurs et activation plaquettaire</i>	50
4.5 <i>Les plaquettes et l'endocytose</i>	64
5. LES AUTO-ANTIGÈNES BIFONCTIONNELS	66
6. AUTO-ANTIGÈNES OU AUTO-ANTICORPS: À QUI LA FAUTE?	70
7. MODÈLE PROPOSÉ	72
OBJECTIFS GÉNÉRAUX DE LA THÈSE	74
MATÉRIEL ET MÉTHODES	75
1. PRODUCTION ET PURIFICATION DE LA LB1 ET DE SON FRAGMENT N-TERMINAL (NH ₂ -LB1)	75
1.1 <i>LB1</i>	75
1.2 <i>NH₂-LB1</i>	76
2. PATIENTS.....	77
3. ISOLATION DES PLAQUETTES HUMAINES.....	77
4. PURIFICATION DES AUTO-ANTICORPS ANTI-LB1.....	78
5. CYTOMÉTRIE EN FLUX	78
5.1 <i>Mesures d'activation des cellules endothéliales</i>	78

5.2 Mesures d'activation plaquettaire.....	79
5.3 Liaison de la LB1 aux plaquettes	80
6. AGRÉGOMÉTRIE	80
7. MESURE DE LA SÉCRÉTION DU TXA ₂	81
8. DÉTECTION DE LA LB1 À PARTIR DE SURNAGEANTS DE CELLULES EN APOPTOSE	81
8.1 Neutrophiles	81
8.2 Cellules endothéliales.....	82
9. MODÈLE DE THROMBOSE INDUITE PAR LE CHLORURE DE FER	82
10. LIAISON DE LA LB1 AUX PLAQUETTES	83
10.1 ELISA cellulaire ou "Cell-based ELISA"	83
10.2 Immunofluorescence et microscopie confocale.....	84
10.3 Microscopie électronique	85
11. CO-IMMUNOPRÉCIPITATION.....	87
12. LIAISON ENTRE LA LB1 ET UN PEPTIDE RECOMBINANT DE LA CHAÎNE β DU RÉCEPTEUR DE L'INSULINE DÉTECTÉE PAR ELISA	87
13. SODIUM DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE) ET IMMUNOBUVARDAGE	88
14. ANALYSES STATISTIQUES	90
RÉSULTATS.....	91
1. EFFET DE LA LB1 ET DES ANTI-LB1 SUR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES ET LES PLAQUETTES.....	91
1.1 La LB1 et les anti-LB1 sont sans effet sur l'activation endothéliale.....	91
1.2 La LB1 diminue l'activation plaquettaire tandis que les anti-LB1 sont sans effet....	92
1.3 La LB1 diminue l'agrégation plaquettaire tandis que les anti-LB1 sont sans effet...	95
1.4 La LB1 diminue la sécrétion de TxA ₂	102
2. LA LB1 EST LIBÉRÉE PAR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES ET LES NEUTROPHILES EN APOPTOSE.....	104
3. LA LB1 DIMINUE LA FORMATION D'UN THROMBUS ARTÉRIEL DANS UN MODÈLE <i>IN VIVO</i> DE THROMBOSE CHEZ LE RAT	109
4. LA LB1 SE LIE AUX PLAQUETTES ET EST INTERNALISÉE AU MOMENT DE L'ACTIVATION..	110
4.1 La LB1 est internalisée dans les plaquettes par l'intermédiaire des vésicules de clathrine.....	118
5. LA LB1 INTERAGIT AVEC LE RÉCEPTEUR DE L'INSULINE	120
5.1 La LB1 module une cascade de phosphorylation déclenchée par l'IR	129
6. LES ANTI-LB1 SONT SANS EFFET SUR L'INHIBITION, CAUSÉE PAR LA LB1, DE LA CASCADE DE PHOSPHORYLATION DÉCLENCHÉE PAR L'IR.....	132
7. LA LB1 INTERNALISÉE DISPARAÎT RAPIDEMENT DES PLAQUETTES SAUF EN PRÉSENCE D'ANTI-LB1 PURIFIÉS.....	135
8. LA LB1 EST PRÉSENTE DANS LES PLAQUETTES DE PATIENTS LUPIQUES POSSÉDANT DES ANTI-LB1	137

DISCUSSION	140
1. LA LB1 ET LES ANTI-LB1 SONT SANS EFFET SUR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES. PAR CONTRE, LA LB1 POSSÈDE UN EFFET ANTI-PLAQUETTAIRE, CONTRAIREMENT AUX ANTI-LB1	141
2. LA LB1 EST LIBÉRÉE PAR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES ET LES NEUTROPHILES EN APOPTOSE	144
3. LA LB1 DIMINUE LA FORMATION D'UN THROMBUS ARTÉRIEL DANS UN MODÈLE DE THROMBOSE CHEZ LE RAT	145
4. LA LB1 SE LIE AUX PLAQUETTES ET EST INTERNALISÉE AU MOMENT DE L'ACTIVATION DANS DES VÉSICULES DE CLATHRINE	146
5. LA LB1 INTERAGIT AVEC L'IR ET MODULE L'UNE DE SES CASCADES DE PHOSPHORYLATION	149
6. LA LB1 EN PRÉSENCE D'ANTI-LB1, PERSISTE DANS LES PLAQUETTES	151
7. MODÈLE PROPOSÉ	153
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	157
1. CONCLUSIONS	157
2. QUESTIONS POUR DES ÉTUDES ULTÉRIEURES	158
ANNEXE.....	161
1. MATÉRIEL ET MÉTHODES SUPPLÉMENTAIRES	161
1.1 <i>Clonage, production et purification des fragments de la LB1: LB1-Coil et LB1-COOH</i>	161
1.2 <i>Production et purification</i>	162
2. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	164
2.1 <i>La LB1 complète est essentielle pour obtenir une activité anti-plaquettaire maximale</i>	164
2.2 <i>L'albumine humaine et les IgG humains purifiés agissent de la même façon que la NH2-LB1 et les anti-LB1 purifiés</i>	168
2.3 <i>Les radeaux lipidiques sont enrichis dans les plaquettes dans les fractions 3 et 4 correspondant aux couches de 15 et 20% sucrose</i>	168
2.4 <i>La LB1 module le plus fortement la phosphorylation de la chaîne-β du récepteur de l'insuline</i>	168
BIBLIOGRAPHIE.....	194

Liste des tableaux

Tableau II: Principaux auto-anticorps détectés dans le LED	18
Tableau III: Critères diagnostiques du SAP.....	26
Tableau IV: Méthodes de détection des anticorps anti-phospholipides.....	29
Tableau V: Fréquence de thromboses chez les patients atteints du LED selon la présence de certains auto-anticorps circulants.....	39
Tableau VI: Agonistes physiologiques des plaquettes.....	45
Tableau VII: Récepteurs à la surface des plaquettes.....	51
Tableau VIII: Médicaments anti-plaquettaires	59

Liste des figures

Figure 1: Mécanismes d'action possibles des aPL.....	31
Figure 2: Localisation de la lamina nucléaire.....	35
Figure 3: Structure d'un dimère de lamines.....	36
Figure 4: Patron d'immunofluorescence indirecte d'anti-LB1 sur des cellules HEp-2.....	38
Figure 5 : Morphologie simplifiée d'une plaquette humaine	42
Figure 6: Réactions de base de l'activation plaquettaire	46
Figure 7: Mécanismes de signalisation utilisant les récepteurs couplés aux protéines G.....	53
Figure 8: Cibles des médicaments anti-plaquettaires	58
Figure 9: Mécanisme de signalisation du récepteur de l'insuline dans les plaquettes.....	63
Figure 10: La LB1 est sans effet sur l'expression des molécules d'adhésion VCAM, E-sélectine et ICAM.....	93
Figure 11: La LB1 diminue l'externalisation de la P-sélectine tandis que les anti-LB1 sont sans effet.....	94
Figure 12: La LB1 diminue l'activation plaquettaire	96
Figure 13: La LB1 diminue l'agrégation plaquettaire	99
Figure 14: Les anti-LB1 ne diminuent pas l'effet anti-plaquettaire de la LB1.....	101
Figure 15: La LB1 inhibe l'agrégation plaquettaire induite par le TRAP-4 dans du PRP humain et de rat.....	103
Figure 16: La LB1 inhibe la sécrétion de TxA ₂ en interférant avec les voies de signalisation induites par la PKCδ.....	105
Figure 17: La LB1 est libérée par des cellules en apoptose.....	108
Figure 18: La LB1 diminue la formation de thrombus dans la carotide des rats.....	111
Figure 19: La LB1 se lie aux plaquettes activées	113
Figure 20: La LB1 se lie aux plaquettes activées et est internalisée.....	114
Figure 21: La LB1 se lie aux plaquettes à un stade spécifique d'activation.....	117
Figure 22: La LB1 se lie aux plaquettes pendant une courte période de temps suivant l'activation par la thrombine.....	119
Figure 23: La LB1 est internalisée dans des vésicules de clathrine.....	121

Figure 24: La lamine B1 (LB1) réagit avec une protéine de 95 kDa.....	124
Figure 25: La LB1 interagit avec la chaîne- β du IR.....	127
Figure 26: La LB1 inhibe la phosphorylation d'IRS-1, PI3K, Akt-1, GSK et Tau	130
Figure 27: Les anti-LB1 accentuent l'effet inhibiteur de la LB1 sur la phosphorylation de: IR, de la PKC δ , de l'Akt-1, de MEK et de p38	133
Figure 28: La présence d'anti-LB1 augmentent la persistance de la LB1 dans les plaquettes	136
Figure 29: La LB1 est présente dans les lysats plaquettaires de patients atteints du LED et possédant des anti-LB1	139
Figure 30: Hypothèse quant à la fonction de la LB1 extracellulaire chez des individus sains	155
Figure 31: Hypothèse quant au rôle thromboprotecteur des anti-LB1 chez les patients atteints du LED.....	156
Figure Annexe 1: Production, purification et effet des fragments coil-LB1 et COOH-LB1 sur l'activation plaquettaire.	166
Figure Annexe 2: L'albumine humaine et des IgG humains purifiés ne diminuent pas l'agrégation plaquettaire.....	170
Figure Annexe 3: Les radeaux lipidiques sont enrichis dans les plaquettes dans les fractions 3 et 4 correspondant aux couches de 15 et 20% sucrose	172
Figure Annexe 4: La LB1 module le plus fortement la phosphorylation de la chaîne- β du récepteur de l'insuline.	173

Liste des abréviations

aa	Acide aminé
AC	Adénylate cyclase
ACR	American College of Rheumatology
ADP	Adénosine diphosphate
AMP	Adénosine monophosphate
aCL	Anticorps anti-cardiolipine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALS	Syndrome de lymphoprolifération auto-immune
ANA	Anticorps anti-nucléaire
Anti-LB1	Anti-lamine B1
Anti-PCNA	Anti-proliferating cell nuclear antigen
Anti-RNP	Anti-protéine ribosomale P
Anti-topo I	Anticorps anti-ADN topoisomérase I
APC	Cellule présentatrice d'antigène
aPL	Anti-phospholipide
APS-1	Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy
β 2-GP1	β 2-glycoprotéine 1
BCR	Récepteur de lymphocyte B
CENP	Protéine centromérique
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPM	Chimiluminescence par minute
Da	Dalton
DAG	Diacylglycérol
DC	Cellule dendritique
DILE	Drug induced lupus erythematosus

DM-2	Diabète de type 2
DO	Densité optique
dsDNA	ADN double-brin
EBV	Virus d'Epstein-Barr
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Fas L	Fas ligand
FITC	Fluorescéine
GP	Glycoprotéine
GPCR	G-protein coupled receptor
HBSS	Hanks balanced salt solution
HEp-2	Human epithelioma pharynx N°2
HLA	Human leukocyte antigen
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL	Interleukine
INF	Interféron
IP	Inositol phosphate
IPEX	Immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
IR	Récepteur de l'insuline
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
IV	Intra veineux
KDa	Kilo Daltons
LAC	Anticoagulant lupique
LB	Lymphocyte B
LB1	Lamine B1
LED	Lupus érythémateux disséminé
LT	Lymphocyte T

MAPK	MAP kinase
mARN	ARN messenger
Min	Minutes
NOD	Non-obese diabetic
PAR	Protease activated receptor
PE	Phycoérythrine
PGE	Prostaglandine
PGI	Prostacycline
PIP	Phosphatidylinositol phosphate
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
Plt	Plaquettes
PTK	Protéine tyrosine kinase
SAP	Syndrome anti-phospholipide
SCCS	Surface connected canalicular system
SDS	Sodium dodecyle sulfate
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline avec du Tween
TCR	Récepteur de lymphocyte T
TF	Tissue factor
Topo I	ADN topoisomérase I
TP	Temps de prothrombine
tPA	Tissue plasminogen activator
Treg	Lymphocyte T régulateur
TTO	Temps d'occlusion (time to occlusion)
TTPA	Temps de thromboplastine partielle activée
TxA ₂	Thromboxane A ₂

VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VDRL	Venereal disease research laboratory
UV	Rayons ultraviolets

*À mes fistons, mes amours,
Mathias et Émile*

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mes directeur et co-directeur de recherche, Dr Yves Raymond et Dr Jean-Luc Senécal, pour leur mentorat tout au long de ces années d'études ainsi que pour leur support financier ayant rendu ce projet possible. Au cours de ces années, j'ai particulièrement apprécié leurs conseils judicieux, leur enthousiasme et la grande latitude qu'ils m'ont toujours accordée.

J'aimerais aussi remercier le Dr Yahye Merhri, le Dr Guy Rousseau et le Dr Denis Girard, de précieux collaborateurs qui ont manifesté de l'intérêt envers mon projet de recherche et qui m'ont permis d'effectuer certaines expériences dans leurs laboratoires respectifs. Je tiens aussi à remercier Pierre Fortier et Daniel Yacoub pour leur aide précieuse au niveau expérimental.

Merci à Nathalie Brassard pour sa participation directe à mon projet de recherche. Merci à Isabelle Clément pour son support technique et sa bonne humeur qui a rendu les journées de travail toujours agréables.

Merci à mes collègues et amis qui m'ont aidé, conseillé et fait rigoler tout au long de ce projet. Ils ont sans aucun doute su garder une atmosphère des plus sympathiques dans le laboratoire. J'aimerais remercier particulièrement Julie Arcand qui a toujours accepté d'effectuer des prises de sang en mon nom. La douceur avec laquelle elle accomplissait cette tâche m'a certainement permis de garder bien des donneurs. Je voudrais également remercier mes collègues post et pré docteurs, Mélanie Dieudé, Jill Hénault, Geneviève Robitaille et Julie Arcand pour leur collaboration et leur support moral infaillible. Je suis heureuse que ces études m'aient donné la chance de les rencontrer. Merci également à Monique Bernard,

Martin Paradis, Mélanie Tremblay, Martial Koenig, Marianne Raymond et Karine Beauchemin pour leur aide, leur amabilité et leur gentillesse.

J'aimerais de plus témoigner ma reconnaissance aux FRSQ et IRSC pour leur support financier, sans lequel cette recherche n'aurait pas été possible.

En terminant, je tiens à exprimer ma reconnaissance à ma famille. Tout d'abord à mes parents, Pierre et Marie-Christine, pour leur support constant et leurs encouragements au cours de ces cinq années d'études. Finalement, je remercie mon conjoint Philippe, qui a cru en moi et partagé ma passion ainsi que mes deux fils, Mathias et Émile, qui ont su, par leur constante bonne humeur, me faire relativiser les échecs auxquels tout scientifique est constamment confronté. Ma famille reste de loin l'élément le plus excitant et le plus gratifiant de toutes mes expériences!

Avant-propos

1. Introduction générale

Le processus de coagulation est maintenu en équilibre grâce à des boucles de rétrocontrôle positives et négatives impliquant des réseaux complexes de signalisation, parmi lesquels une quantité impressionnante de molécules entrent en jeu. Chez des sujets sains, les plaquettes sont activées et recrutées vers des sites de blessures vasculaires où un caillot se forme par l'intermédiaire d'interactions d'autres plaquettes avec la paroi vasculaire. L'activation plaquettaire entraîne l'adhésion, l'agrégation et le recrutement de nouvelles plaquettes. L'interruption d'une ou de plusieurs fonctions plaquettaires peut entraîner divers problèmes de santé comme des troubles hémophiles ou thrombotiques.

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est la maladie auto-immune la plus fréquemment associée au syndrome anti-phospholipide (SAP). Le SAP est une maladie auto-immune définie par la présence d'auto-anticorps anti-phospholipides (aPL) dans le plasma de patients souffrant de thromboses et/ou de complications liées à des grossesses. Les aPL font partie d'une famille hétérogène d'auto-anticorps qui peuvent, entre autres, augmenter l'activation et l'agrégation plaquettaire (Forastiero et al., 1998; Joseph et al., 2001; Espinola et al., 2002; Pierangeli et al., 2004; Bidot et al., 2005). Parmi les aPL détectés chez les patients lupiques, la présence d'anticoagulants lupiques (LAC) représente le plus grand facteur de risque favorisant le développement des thromboses artérielles ou veineuses (Somers et al., 2002). Le fait qu'environ 50% des patients possédant des LAC ne développent jamais de thrombose suggère cependant que d'autres facteurs pourraient moduler l'effet des

LAC (Somers et al., 2002). Il a été démontré que des patients lupiques positifs pour la présence de LAC et possédant des titres élevés d'auto-anticorps dirigés contre l'auto-antigène nucléaire lamine B1 (anti-LB1) ont beaucoup moins de chance de développer des thromboses que des patients LAC positifs ne possédant pas ces anti-LB1 (Senécal et al., 1999). La présence d'anti-LB1 semble annuler le risque pro-thrombotique élevé associé aux LAC, suggérant ainsi que les anti-LB1 pourraient être associés à une thromboprotection (Dieudé et al., 2002). L'implication des complexes LB1/anti-LB1 dans la thromboprotection n'est toutefois pas encore expliquée à ce jour (Senécal et al., 1999).

La LB1, une protéine faisant partie de la grande famille des filaments intermédiaires, entre dans la composition de la lamina, située sur la face interne de la membrane nucléaire, qui joue un rôle critique dans l'organisation de la chromatine, la réplication de l'ADN et la transcription des gènes (Broers et al., 2006). Certains auto-antigènes intracellulaires ont récemment été retrouvés à la surface de différentes cellules et dans le milieu extracellulaire. Dans de telles conditions, ces auto-antigènes jouent un rôle biologique complètement différent de celui leur étant attribué à l'intérieur des cellules (Wells et al., 1997; Hasan et al., 1998; Mor-Vaknin et al., 2002; Podor et al., 2002; Boilard et al., 2003; Hénault et al., 2006; Robitaille et al., 2007). Par exemple, il a été démontré que la vimentine et les cytokératines prennent part à des mécanismes thrombo-inflammatoires lorsqu'elles sont situées à l'extérieur des cellules (Wells et al., 1997; Hasan et al., 1998; Mor-Vaknin et al., 2002; Podor et al., 2002). Récemment, un groupe de recherche a identifié la LB1 à la surface des neutrophiles apoptotiques (Moisan and Girard, 2006). La fonction de cette LB1 extracellulaire n'est cependant pas connue. Puisque la LB1 fait partie de la famille des filaments intermédiaires, il serait envisageable que la LB1 extracellulaire, accompagnée ou non de ses auto-anticorps,

prenne part aux mécanismes thrombo-inflammatoires, tout comme la vimentine et les cytokératines.

À l'aide de techniques de laboratoire, il est maintenant possible d'identifier les intervenants des mécanismes de coagulation avec lesquels une protéine interagit. L'identification de ces interactions pour la LB1 ou les complexes LB1/anti-LB1 pourrait nous aider à comprendre le mécanisme par lequel les patients anti-LB1 positifs sont protégés contre les thromboses.

2. Hypothèses de recherche

Sachant que les patients anti-LB1 positifs sont protégés contre les thromboses et que des auto-antigènes intracellulaires, faisant partie de la famille des filaments intermédiaires, sont impliqués dans des mécanismes thrombo-inflammatoires, nous avons émis l'hypothèse de recherche suivante: la LB1, les anti-LB1 ou les complexes LB1/anti-LB1 sont impliqués dans les mécanismes de régulation des thromboses.

Nos hypothèses spécifiques sont :

1. La LB1, les anti-LB1 ou les complexes LB1/anti-LB1 interagissent avec un intervenant impliqué dans la coagulation.
2. La LB1, les anti-LB1 ou les complexes LB1/anti-LB1 modulent l'activité de cet intervenant.

3. La LB1, les anti-LB1 ou les complexes LB1/anti-LB1 permettent aux patients anti-LB1 positifs d'être protégés contre les thromboses grâce à la modulation de l'activité de cet intervenant.

3. Objectifs de recherche

Les objectifs généraux de recherche de cette étude sont :

1. Identifier l'intervenant de la coagulation avec lequel la LB1, les anti-LB1 ou les complexes LB1/anti-LB1 interagissent.
2. Définir les rôles joués par la LB1, les anti-LB1 ou les complexes LB1/anti-LB1 dans les mécanismes d'hémostase.
3. Élucider le mécanisme d'action de la LB1, des anti-LB1 ou des complexes LB1/anti-LB1.
4. Expliquer la thromboprotection dont jouissent les patients anti-LB1 positifs.

Revue de la littérature

1. Système immunitaire, tolérance et maladies auto-immunes

La nature même de la vie implique que l'existence de chaque être vivant soit constamment menacée. Afin de survivre, les organismes ont développé au cours de l'évolution, un arsenal élaboré de mesures protectrices appelées collectivement réponse immunitaire.

Cette réponse immunitaire se divise en deux grandes classes: la réponse immunitaire innée ou la réponse immunitaire acquise. La réponse innée procure la première ligne de défense contre plusieurs substances étrangères qui n'ont pas été modifiées avec le temps. Elle est constituée de cellules et de molécules spécialisées non-spécifiques qui répondent rapidement à des stimuli. En revanche, la réponse innée n'est pas efficace contre tous les pathogènes. La réponse acquise, quant à elle, procure une défense plus diversifiée, requérant une adaptation antigénique pour être efficace. Bien que plus lente que la réponse innée, la réponse acquise a l'avantage de cibler spécifiquement l'agent pathogène et de générer une réponse mémoire protégeant contre une ré-infection avec ce même pathogène.

Les cellules effectrices impliquées dans la réponse acquise sont les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT), chacun arborant des récepteurs spécifiques: les récepteurs des lymphocytes B (BCR) et ceux des lymphocytes T (TCR). Ces récepteurs

peuvent reconnaître une multitude d'antigènes différents, fournissant à l'organisme une protection contre la majorité des pathogènes qu'il rencontrera au cours de sa vie.

Normalement, la réponse acquise est dirigée contre des antigènes étrangers, n'appartenant pas au soi. L'interaction de forte affinité entre une molécule étrangère et son récepteur spécifique induit l'activation d'un lymphocyte et provoque son expansion clonale. Ces lymphocytes, devenus spécifiques, peuvent alors migrer dans les tissus infectés, provoquer l'inflammation et contribuer à l'élimination de la source antigénique étrangère. Une fois leur travail accompli, la majorité des lymphocytes spécifiques disparaîtront et l'inflammation se résorbera.

Toutefois, lorsqu'une réponse immunitaire acquise se développe anormalement contre un antigène du soi, les cellules effectrices s'attaquent alors aux tissus de l'organisme en question. Comme il est impossible pour l'organisme d'éliminer l'antigène reconnu, la réponse immunitaire est alors soutenue ce qui provoque une inflammation chronique des tissus. Cette réponse est dite auto-immune.

Pour se prémunir contre les réactions auto-immunes, le système immunitaire a développé plusieurs stratégies, contribuant toutes à rendre le système tolérant aux antigènes du soi, empêchant ainsi le développement d'une réponse auto-immune. Parmi ces stratégies, on retrouve des mécanismes de surveillance des cellules auto-réactives productrices d'auto-anticorps, que l'on retrouve normalement chez tout individu en santé. Pour assurer le contrôle de lymphocytes auto-réactif, le système procède d'abord à la sélection négative, qui consiste à éliminer les lymphocytes T hautement auto-réactifs dans le thymus et les lymphocytes B reconnaissant des antigènes multivalents dans la

moelle osseuse (Sprent and Kishimoto, 2002; Halverson et al., 2004). Ces mécanismes de contrôle étant cependant imparfaits, on retrouve quand même un certain nombre de cellules auto-réactives dans tous les organismes. Pour assurer le contrôle de lymphocytes B auto-réactifs, le système immunitaire peut alors procéder à l'édition de leurs récepteurs (ou receptor editing) en effectuant une recombinaison VDJ afin de changer leurs spécificités et les rendre inaptes à la reconnaissance des antigènes du soi (Halverson et al., 2004). Quant aux lymphocytes T auto-réactifs, s'ils réussissent à survivre, ils pourront être contrôlés par une sous-population de LT, appelée LT régulateurs (Treg), possédant des propriétés suppressives/régulatrices (Becker et al., 2006). Lorsque ces mécanismes ne fonctionnent pas, les lymphocytes peuvent aussi devenir anergiques, c'est-à-dire incapables de répondre à une activation. Pour les lymphocytes B cette inactivation fonctionnelle se produit suite à la reconnaissance d'un antigène en absence de lymphocyte T auxiliaire ou de niveaux adéquats de médiateur d'activation. Pour les lymphocytes T, cette inactivation survient suite à la reconnaissance d'un antigène en absence de niveaux adéquats de molécules de co-stimulation (Schwartz, 2003). De plus, les mécanismes d'apoptose et de phagocytose des corps apoptotiques permettent au système immunitaire d'éliminer la majorité des auto-antigènes disponibles en les rendant inaccessibles aux cellules autoréactives restantes.

Bien que les mécanismes décrits ci-haut induisent la tolérance chez un individu sain, il n'en reste pas moins que le système immunitaire de tout individu en santé puisse produire des cellules auto-réactives et des anticorps dirigés contre des antigènes du soi. Lorsque ces cellules sont produites en faible quantité et qu'elles sont de faible avidité, elles semblent avoir un rôle important à jouer dans le maintien de l'homéostasie.

Toutefois, lorsqu'elles sont produites en grande quantité et qu'elles sont de forte affinité, elles déclenchent une réponse immunitaire qui peut conduire au développement de différentes maladies auto-immunes (Powell and Black, 2001; Poletaev and Osipenko, 2003).

Près de 50 maladies auto-immunes ont été identifiées à ce jour. Même si ces maladies sont souvent perçues comme étant rares, il a été établi qu'environ 3 % de la population américaine en souffrent et qu'elles constituent une cause importante de la mortalité observée chez les femmes entre 10 et 50 ans (Cooper and Stroehla, 2003). Les causes de l'auto-immunité restent encore inconnues. Le bris de la tolérance et l'activation des lymphocytes auto-réactifs sont généralement considérés comme étant le fruit d'une interaction complexe entre des facteurs génétiques et environnementaux. En dépit de cette complexité, l'auto-immunité implique clairement des prédispositions génétiques puisqu'un certain degré de concordance des maladies auto-immunes est observé chez des jumeaux monozygotes. À titre d'exemple, le taux de concordance chez les jumeaux monozygotes est de 40% pour le diabète de type 1 (Knip et al., 2005) et de 15% pour l'arthrite rhumatoïde (Silman et al., 1993), deux maladies auto-immunes parmi les plus répandues.

De nombreux progrès ont été effectués dans l'identification de polymorphismes génétiques associés aux maladies auto-immunes les plus connues. Plusieurs de ces polymorphismes mettent en lumière le rôle central que les LT ont à jouer dans le bris de la tolérance. Dans la plupart des cas, le plus grand facteur de risque génétique associé à l'auto-immunité est conféré par le locus *HLA* (human leukocyte antigen) qui code pour les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH), responsables de la présentation des antigènes aux LT (Anaya et al., 2006; Atassi and Casali, 2008). D'autres gènes exprimés

dans les LT ont également été pointés du doigt comme étant associés à certaines maladies auto-immunes (Anaya et al., 2006; Atassi and Casali, 2008). Des polymorphismes fonctionnels se présentant généralement sous forme de "polymorphisme nucléotidique" ou SNP, peuvent également nuire aux fonctions de molécules clés impliquées dans l'immunorégulation et contribuer au développement de l'auto-immunité. Une liste non exhaustive, ne comprenant pas les *CMH*, des loci génétiques qui affectent la prédisposition aux maladies auto-immunes les plus connues, telles que le lupus, l'arthrite rhumatoïde, le diabète de Type 1 et la sclérose en plaque, comprend: *CTLA-4*, codant pour une molécule impliquées dans la fonction des Treg et l'activation des lymphocytes T; *PTPN22*, codant pour des protéines tyrosines phosphatases; *NALP1*, codant pour une molécule impliquée dans l'inflammation; *STAT4*, codant pour une molécule de signalisation requise dans l'activité des cellules Th17; *FCRL3*, codant pour une molécule ressemblant au récepteur Fc et utilisée comme activateur des lymphocytes B; *Bim*, dont une déficience chez les souris mène à des problèmes d'apoptose et éventuellement à l'auto-immunité; et finalement, les gènes codant pour les récepteurs de l'interleukine 2 et 7 (Mackay et la., 2008). Toutefois, les mécanismes par lesquels des polymorphismes dans ces gènes ou ceux du *CMH* prédisposent à l'auto-immunité sont mal compris, principalement parce qu'ils ne sont pas suffisants pour causer l'auto-immunité.

Bien que la majorité des maladies auto-immunes soit reconnue comme étant multifactorielle, il existe quelques exemples de pathologies dites monogéniques et indépendantes de facteurs environnementaux. L'étude de ces maladies, où un seul gène est responsable du dérèglement auto-immun, permet une meilleure identification et

compréhension des mécanismes de tolérance centrale et périphérique impliqués dans la pathogenèse des maladies auto-immunes. Jusqu'à ce jour, trois maladies auto-immunes monogéniques ont été identifiées : 1) "l'autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy" (APS1); 2) "*immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*" (IPEX); et 3) le syndrome de lymphoprolifération auto-immune (ALS). L'APS1 est causée par une mutation dans le gène *AIRE*, impliqué dans la sélection négative des lymphocytes T dans le thymus (DeVoss and Anderson, 2007). Les études effectuées avec les patients atteints de l'APS1 démontrent l'importance des mécanismes de tolérance contrôlés dans le thymus. Les patients souffrants de l'IPEX, quant à eux, ont un dérèglement du gène *FOXP3* impliqué dans le développement des fonctions des Treg (Fontenot et al., 2003; DeVoss and Anderson, 2007). L'étude de cette maladie a permis aux chercheurs d'améliorer leurs connaissances et leur compréhension des Treg dans le maintien de la tolérance. Finalement l'ALS, dans la majorité des cas, est dû à une mutation dans les gènes *FAS*, *FAS ligand* ou *caspase 10*, tous impliqués dans l'apoptose des lymphocytes (Worth et al., 2006a; DeVoss and Anderson, 2007). Les études effectuées sur cette maladie ont permis de souligner l'importance des mécanismes d'apoptose lors d'une réponse immunitaire et d'observer les conséquences d'erreurs dans ces mécanismes.

Tel que mentionné précédemment, la grande majorité des maladies auto-immunes est probablement due à une susceptibilité génétique combinée à des facteurs environnementaux. Parmi ces facteurs, il est connu que certains agents infectieux peuvent causer ou aggraver une maladie auto-immune. En théorie, les mécanismes par lesquels un micro-organisme peut activer des cellules auto-réactives se divisent en deux catégories: ceux qui sont antigènes spécifiques et ceux qui sont antigènes non spécifiques. Les

mécanismes antigènes spécifiques reposent principalement sur le concept de mimétisme moléculaire. Ce concept soutient qu'une réponse auto-immune serait enclenchée suite à une réponse immunitaire normale contre un peptide étranger ayant des similarités avec un antigène du soi. Ces similitudes seraient suffisantes pour causer une activation des lymphocytes auto-réactifs, dirigés contre des protéines du soi, et provoquer le début d'une maladie auto-immune (Soulas et al., 2005; Fujinami et al., 2006; Atassi and Casali, 2008). Les mécanismes antigènes non spécifiques, quant à eux, sont nombreux et on les regroupe sous le terme "bystander activation" ou activation de voisinage (Soulas et al., 2005; Fujinami et al., 2006). Ces mécanismes impliqueraient que des lymphocytes auto-réactifs, toujours présents en petite quantité chez tout individu, seraient stimulés par des cellules présentatrices d'antigènes (APC) fortement activées lors d'une infection par un pathogène. Par exemple, une infection dans un organe particulier entraînerait la migration d'APC portant des auto-antigènes dans les ganglions lymphatiques périphériques, permettant ainsi aux lymphocytes auto-réactifs de reconnaître leur cible. Ces lymphocytes activés migreraient ensuite vers les tissus de l'organe cible, causant leur destruction. Cette théorie a gagné beaucoup d'intérêt ces dernières années principalement à cause d'études effectuées sur des modèles animaux de maladies auto-immunes, tels que la souris "Non-obese diabetic" (NOD) et la souris EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis; modèle murin pour la sclérose en plaque) (Fujinami et al., 2006).

D'autres facteurs environnementaux tels que des médicaments, des produits chimiques et des métaux lourds ont également été pointés du doigt en ce qui a trait au développement de maladies auto-immunes. Tout comme pour les autres facteurs

mentionnés précédemment, les mécanismes physiologiques menant à la perte de tolérance engendrée par ces produits ne sont pas bien compris.

Il est donc clair que l'ampleur et la spécificité d'une réponse auto-immune, l'endroit où elle est induite, la présence de certains facteurs externes ainsi que la prédisposition génétique, sont tous des facteurs déterminant une issue pathologique possible. Une meilleure connaissance du système immunitaire en général aidera certainement à l'amélioration de la compréhension des mécanismes auto-immuns.

2. Le lupus érythémateux disséminé (LED)

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est l'archétype des maladies auto-immunes systémiques. Cette maladie est caractérisée par des dommages aux tissus conjonctifs de plusieurs organes, accompagnés par divers symptômes systémiques correspondants. Les causes de cette maladie ne sont pas bien connues mais, comme pour la majorité des maladies auto-immunes, elles impliquent une interaction complexe de facteurs génétiques et environnementaux.

La première utilisation du terme lupus dans la littérature remonte au 10^{ème} siècle de notre ère (Mallavarapu and Grimsley, 2007). À cette époque, l'apparence de certains patients lupiques, dont le visage présentait une dermatose, a fait naître le mythe des loups-garous. Ces gens étaient craints puisqu'ils possédaient soi-disant le pouvoir de se transformer en animaux (Blotzer, 1983). Ce n'est pas avant les années 1870, avec Moriz Kaposi, que les symptômes de cette maladie commencèrent à être véritablement identifiés et différenciés de ceux provoqués par la tuberculose (Mallavarapu and Grimsley, 2007).

Le nom lupus érythémateux disséminé, qui englobe les symptômes cardiaques, pulmonaires, rénaux et cutanés associés à la maladie, fut suggéré en 1894 par Sir William Osler (Mallavarapu and Grimsley, 2007).

2.1 Manifestations cliniques du LED

Le LED peut se présenter sous des formes extrêmement variables, allant d'une simple atteinte cutanée locale à des formes plus sévères, où non seulement la peau, mais aussi un ou plusieurs organes internes sont atteints. Le vaste éventail de symptômes pouvant être associés au LED en fait une maladie souvent difficile à diagnostiquer. Il s'agit de plus d'une maladie qui évolue et, au moment des premières consultations, les symptômes requis pour être diagnostiqué comme étant lupique peuvent être absents. Ces symptômes peuvent apparaître et disparaître spontanément et ils s'apparentent souvent à ceux observés dans d'autres maladies. Le lupus est polymorphe et particulier à chaque individu, sexe et classe d'âge (Rahman et Isenberg, 2008).

Les premiers critères diagnostiques pour le LED ont été établis en 1971 (Canoso and Cohen, 1979). À cette époque, un patient devait présenter 4 des 14 symptômes identifiés pour être diagnostiqué. En 1982, les critères diagnostiques ont été révisés afin d'inclure les résultats des nouveaux tests sérologiques (ANA et anti-dsDNA) effectués pour le dépistage (Tableau I) (Tan et al., 1982). Deux éléments, le phénomène de Raynaud et la calvitie ont été retirés de la liste originale datant de 1971. Les critères de 1982 ont été revus en 1997 (Hochberg, 1997) et approuvés par l'American College of Rheumatology (ACR). Aujourd'hui, afin qu'un patient soit considéré atteint du LED, il

doit présenter, simultanément ou successivement, au moins quatre des symptômes décrits dans le Tableau I.

Tableau I. Critères diagnostiques du LED identifiés par l'ACR^a
1. Éruption sur le visage en ailes de papillon
2. Éruption du lupus discoïde
3. Photosensibilité
4. Ulcération buccales ou nasopharyngées
5. Polyarthrite non érosive
6. Pleurésie ou péricardite
7. Néphropathie: protéinurie, cylindrurie
8. Crises comitiales ou psychose
9. Atteintes hématologiques: anémie hémolytique, leucopénie, lymphopénie ou thrombocytopénie
10. Anomalies immunologiques: anti-dsDNA natifs, anti-sm, antiphospholipides (taux anormaux d'IgG ou d'IgM anti-cardiolipines; test positif pour des anticoagulants lupiques (LA)) ou fausse sérologie syphilitique positive
11. Présence d'un taux élevé d'anticorps antinucléaires
^a <i>Quatre critères sont nécessaires pour établir le diagnostic.</i>

Le lupus peut se révéler par des manifestations spécifiques ou systémiques telles que la fièvre, la fatigue ou la perte de poids. Presque tous les organes ou systèmes peuvent être atteints : la peau, les articulations, les reins, les poumons, les membranes séreuses, les systèmes nerveux, vasculaire, gastro-intestinal, ophtalmologique et hémato-lymphatique. Les manifestations cutanées et musculo-squelettiques sont présentes chez la majorité des patients atteints du LED et peuvent précéder les autres symptômes de plusieurs années.

Environ 95% des patients souffrent de troubles articulaires, tels que l'arthrite et l'arthralgie, alors que 85% présentent des anomalies plus ou moins sévères au niveau de la peau (Rothfield et al., 2006).

Parmi les autres symptômes, les néphropathies tiennent probablement le troisième rang avec une moyenne de 50% des patients atteints (Wang et al., 1997; Rothfield et al., 2006). Bien que seulement la moitié des patients souffrent de néphrites lupiques, des études d'immunofluorescence démontrent que des dépôts de complexes immuns sont présents dans la majorité des glomérules rénaux étudiés, suggérant une déficience dans la clairance de tels complexes. La complication la plus grave associée à la néphrite lupique est la sclérose des reins, causant à plus long terme l'insuffisance rénale. Parmi les autres symptômes associés au LED, on retrouve: les péricardites, menant parfois à un *infarctus du myocarde*; les pleurésies, pouvant être associées à de l'*hypertension artérielle pulmonaire*, à des embolies pulmonaires répétées, à un essoufflement ou même à des hémorragies intra-pulmonaires; les neuropathies, se manifestant parfois par des maux de tête, des *convulsions*, des troubles optiques, des dépressions ou des mouvements anormaux irrépressibles; les douleurs abdominales liées à un *infarctus mésentérique* ou à une *hépatomégalie*, une inflammation de la rate, des ganglions lymphatiques ou des glandes parotides; l'anémie, la lymphopénie ou la thrombocytopénie et, finalement, l'augmentation du risque de thrombose.

L'espérance de vie des patients atteints du LED a considérablement augmenté depuis les années 1950 (Merrell and Shulman, 1955). À cette époque, 50% des patients survivaient 5 ans après le diagnostic alors qu'aujourd'hui au moins 93% des patients y parviennent; on observe même que 80 à 92% des patients survivent plus de 10 ans (Abu-

Shakra et al., 1995; Alarcon et al., 2002; Gladman and Urowitz, 2007). Lorsque les patients décèdent du LED, les causes principales de mortalité sont le lupus actif, les infections et les thromboses (Cervera et al., 1993; Doria and Briani, 2008).

Bien que plusieurs améliorations aient été obtenues au cours des dernières années en ce qui concerne le taux de survie des patients atteints du LED, le pronostic de la maladie à long terme reste variable. Avec le temps, des complications reliées à la maladie ou aux traitements peuvent survenir. Il reste également beaucoup d'améliorations à faire pour accroître la qualité de vie de ces patients (Jump et al., 2005).

2.2 Épidémiologie et démographie

Les résultats des études épidémiologiques sur le LED varient grandement selon la population étudiée et la période durant laquelle l'étude a été faite. Parmi la population nord-américaine, la prévalence du lupus serait d'environ 1:2 500 habitants alors que dans la population noire en général, ce nombre monterait à 1:500 habitants (Johnson et al., 1995). Aux États-Unis, le nombre total de patients atteints du lupus excéderait les 250 000. Les études sur des populations américaines font état d'incidence de 1,51 nouveaux cas par 100 000 habitants pour la période s'échelonnant de 1950 à 1979 et de 5,56 nouveaux cas par 100 000 habitants pour la période couvrant les années 1980 à 1992 (Uramoto et al., 1999). Ces données peuvent refléter une augmentation réelle de l'incidence et de la prévalence du LED dans le temps due à des facteurs environnementaux. Cependant, il est probable que cette augmentation provienne plutôt d'une amélioration de la sensibilité des méthodes diagnostiques depuis le début des années 70 et qu'ainsi des formes moins sévères de lupus soient maintenant

diagnostiquées (D'Cruz et al., 2007). Une revue de 32 études sur l'incidence et la prévalence du LED dans différents pays a récemment démontré l'augmentation de cette maladie spécialement dans la population noire des Antilles (Danченко et al., 2006).

D'un point de vue démographique, le LED est reconnu depuis longtemps pour être une maladie affectant plus de femmes que d'hommes avec un ratio moyen variant entre 7:1 et 10:1, suggérant une influence des hormones sexuelles sur la fréquence de la maladie (D'Cruz et al., 2007; Cervera, 2006). La présence d'hormones féminines ou l'absence d'hormones masculines protectrices pourraient augmenter la prédisposition au LED (Mason and Isenberg, 2005). On ne comprend toutefois pas bien le lien entre le sexe et la maladie.

Le LED se développe généralement chez des individus âgés entre 20 et 30 ans. Cette maladie n'est cependant pas restreinte à ce groupe d'âge et peut être diagnostiquée dès l'enfance ainsi que chez des individus âgés de plus de 50 ans (Cervera et al., 1993; Rothfield et al., 2006).

2.3 Facteurs impliqués dans la fréquence du LED

2.3.1 Facteurs environnementaux

L'exposition au soleil représente le facteur environnemental le plus connu pour exacerber le LED. Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer un tel phénomène. Tous convergent vers l'idée que les rayons UV provoquent différents dommages à l'ADN ainsi qu'à certaines cellules, favorisant ainsi la présentation de

nouveaux antigènes qui permettront ensuite à certains lymphocytes de devenir auto-réactifs. D'autres facteurs, tels que la présence de silice (Parks et al., 2002) ou de mercure (Parks and Cooper, 2006), ont également été rapportés comme causes de l'augmentation du LED chez certaines personnes fortement exposées à ces produits.

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) a également été identifié comme facteur pouvant influencer la fréquence du LED. Ce virus peut résider dans les LB et interagir avec eux. Une forte prépondérance de LB mémoires infectés avec l'EBV est observée chez certains patients atteints du LED (Gross et al., 2005). Ces cellules sont généralement présentes en plus grand nombre chez des patients présentant des poussées actives de lupus (Gross et al., 2005). Ces observations n'indiquent toutefois pas nécessairement un rôle déterminant de l'EBV dans le LED. Le dérèglement immunitaire engendré par la maladie pourrait tout aussi bien causer l'expression aberrante de l'EBV observée. Cependant, des études effectuées chez un modèle de souris démontrent qu'une exposition directe à la protéine nucléaire antigénique 1 (EBNA-1), présente dans l'EBV, peut provoquer la production d'auto-anticorps associés au LED (anti-Sm et anti-dsDNA), suggérant une implication de l'EBV dans le développement du lupus (Sundar et al., 2004). Le paradoxe reste que 90% de la population adulte est infectée par l'EBV alors que la fréquence du LED demeure beaucoup plus faible. Cette dernière observation renforce la nature multifactorielle de la pathogenèse de cette maladie.

Une maladie semblable au lupus, le "Drug induced lupus erythematosus (DILE)", peut aussi être induite par certains médicaments comme la procaïnamide (*antiarythmique*), l'hydralazine (vasodilatateur) et la quindine (*antiarythmique*). Les patients souffrant de ce lupus induit développent généralement des symptômes au niveau

de la peau et des articulations. Par contre, une atteinte au niveau neurologique et rénale est généralement rare (Rubin, 2002).

Bien que différents facteurs environnementaux soient directement associés au développement du LED, la grande majorité des cas ne présentent aucun historique d'exposition à ces facteurs de risque.

2.3.2 Facteurs génétiques

Le taux de concordance du LED chez les jumeaux monozygotes est d'environ 25% alors qu'il est de 2% chez les jumeaux dizygotes; cette observation démontre l'importance des facteurs génétiques dans le développement de cette maladie (Deapen et al., 1992). Plusieurs gènes impliqués dans l'apparition du lupus ont été identifiés jusqu'à ce jour. C'est le cas de certains gènes codant pour le CMH de classe II. Ces gènes, *HLA DR*, *DQ* et *DP*, codent pour des molécules exprimées sous forme d'hétérodimères à la surface de plusieurs types cellulaires incluant les LB, les LT activés et les cellules dendritiques (DC). Ces hétérodimères sont requis pour la reconnaissance d'antigènes étrangers par les LT qui, par la suite, coordonneront une réponse immunitaire adéquate. Ils peuvent aussi être responsables de la présentation d'antigènes du soi et augmenter le risque de développer des maladies auto-immunes telles que le LED.

Il a été observé que les Européens caucasiens possédant certains allèles des gènes *HLA (DR-B1, DR2, DR3)* avaient 2 à 3 fois plus de chances de développer le LED que d'autres personnes (Schur, 1995; Wakeland et al., 2001; Namjou et al., 2007). Les études effectuées sur des populations non-caucasiennes n'ont cependant pas rapporté d'associations aussi convaincantes. Elles ont toutefois déterminé que les allèles *DR/DQ*

étaient associés à des profils d'auto-anticorps même s'ils n'étaient pas directement impliqués dans le développement ou les manifestations cliniques du LED.

Parmi les autres gènes, dont certains allèles ou polymorphismes ont été associés au LED, il y a ceux codant pour les constituants de la voie précoce du système complémentaire (C1q, C2, C4), pour certains interférons (Sigurdsson et al., 2005), pour un ou plusieurs récepteurs Fc (Wu et al., 1997) et pour la poly-ADP ribosyl transférase (Graham et al., 2001). Plusieurs autres polymorphismes ont été identifiés dans des familles où plus d'un membre est atteint du lupus. Ces informations sont toutefois moins documentées.

Certains loci, nommés *Sle 1*, *Sle 2* et *Sle 3*, associés au développement du LED ont également été identifiés chez les souris lupiques (Morel et al., 2000; Wakeland et al., 2001). Ces loci contiennent des gènes impliqués respectivement dans la perte de tolérance aux auto-antigènes nucléaires, dans l'hyperactivité des LB et le dérèglement des LT. Ces loci contiennent des gènes similaires à ceux retrouvés sur le chromosome 1 humain, qui a lui-même été associé au lupus. Des gènes semblables ou des familles de gènes pourraient donc être responsables de la susceptibilité à l'auto-immunité systémique, à la fois chez la souris et chez l'homme.

Ces différentes données appuient le rôle d'une composante génétique dans le développement du LED. Les gènes mentionnés auraient ainsi une influence dans la susceptibilité d'un individu à développer le lupus plutôt qu'un rôle direct dans la pathogenèse de la maladie.

3. Auto-anticorps et LED

Presque tous les patients atteints du LED possèdent des auto-anticorps. Dans certains cas, ces auto-anticorps peuvent même être présents plusieurs années avant l'apparition de la maladie (Arbuckle et al., 2003). Certains, hautement spécifiques au LED, reconnaissent des auto-antigènes intra-nucléaires et sont associés à des phénotypes distincts de la maladie (Tableau II). Ces auto-anticorps constituent donc des outils utiles pour le diagnostic et le pronostic de la maladie. Leur origine et leur rôle potentiel dans la pathogenèse du LED restent cependant à clarifier.

La présence d'auto-anticorps chez presque tous les patients atteints du LED suggère que les mécanismes menant à leur production sont liés à ceux impliqués dans le développement de la maladie. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer leur production: **1)** le mimétisme moléculaire; **2)** la relocalisation d'antigènes intracellulaires; **3)** la modification d'auto-antigènes.

Le mimétisme moléculaire peut survenir lors d'une infection où le pathogène responsable possède un ou des épitopes similaires à un auto-antigène. Le système immunitaire produit alors des anticorps contre ce pathogène, qui peuvent avoir des réactions croisées avec des protéines de l'hôte. Ainsi, comme nous l'avons déjà mentionné, une infection à l'EBV pourrait être une source de production d'auto-anticorps chez les patients atteints du LED (Sundar et al., 2004; Gross et al., 2005). Une production d'auto-anticorps peut également survenir suite à la relocalisation à la surface cellulaire d'antigènes du soi normalement séquestrés à l'intérieur des cellules. Certaines situations

physiologiques, telles que l'apoptose, peuvent engendrer une telle présentation d'auto-antigènes (Martelli et al., 2001).

Tableau II. Principaux auto-anticorps détectés dans le LED

<i>Antigènes</i>	<i>Fréquence (%)</i>	<i>Effets cliniques</i>	<i>Références</i>
<i>Auto-anticorps spécifiques au LED</i>			
<i>ADN double brin (dsDNA)</i>	70-80	Atteintes de la peau, néphrites	<i>(Borg et al., 1990; Bootsma et al., 1995; (Shen et al., 1998))</i>
<i>Sm</i>	10-30	Atteintes des systèmes nerveux et rénal	<i>(Janwityanuchit et al., 1993; Alba et al., 2003)</i>
<i>Anti-protéine ribosomale P</i>	15	Atteintes des systèmes nerveux et rénal; hépatosies	<i>(Schneebaum et al., 1991)</i>
<i>PCNA</i>	3-5	Atteintes des systèmes nerveux et rénal*; thrombocytopénie*	<i>(Fritzler et al., 1983; Takasaki et al., 2002; Beyne-Rauzy et al., 2005)</i>
<i>Auto-anticorps non-spécifiques au LED et pouvant être présents dans d'autres maladies auto-immunes</i>			
<i>CIq</i>	40-50	Néphrites	<i>(Moroni et al., 2001; Oelzner et al., 2003)</i>
<i>Chromatine</i>	50-90	Néphrites	<i>(Burlingame et al., 1994; Chabre et al., 1995; Burlingame, 2004)</i>
<i>Histone</i>	40 -100	Surtout présents pour les cas de DILE	<i>(Shen et al., 1998)</i>
<i>Ro</i>	30-40	Photosensibilité, système rénal, bloc cardiaque congénital	<i>(Buyon and Clancy, 2003)</i>
<i>La</i>	15-20	Bloc cardiaque congénital	<i>(Buyon and Clancy, 2003)</i>
<i>Nucléosome</i>	60-90	Néphrites, photosensibilité	<i>(Amoura et al., 2000)</i>
<i>NMDA</i>	33-50	Lupus neuropsychiatrique	<i>(Lapteva et al., 2006; Yoshio et al., 2006)</i>
<i>Phospholipides</i>	20-30	Thromboses, fausses-couches	<i>(Somers et al., 2002a; Galli et al., 2003)</i>
<i>Lamines A, B, C</i>	≈80	Thromboprotection pour les anti-lamine B1	<i>(Senécal and Raymond, 1992; Senécal et al., 1999; Dieudé et al., 2002)</i>
<i>Ku</i>	10	Phénomène de Raynaud et arthralgie	<i>(Mimori, 2002)</i>
<i>RNAP II</i>	9-14	Atteintes de la peau, néphrites, sérosites	<i>(Sato et al., 1994)</i>
<i>α-actinine</i>	20	Néphrites	<i>(Mason et al., 2004; Becker-Merok et al., 2006; Renaudineau et al., 2007)</i>

*Résultats controversés

L'un des éléments morphologiques caractéristiques de l'apoptose est l'importante condensation à la fois du noyau et du cytoplasme, qui entraîne une diminution significative du volume cellulaire. Par la suite, la membrane cytoplasmique bourgeonne, conduisant à la formation de corps apoptotiques qui renferment une partie du cytoplasme et/ou de l'ADN (Martelli et al., 2001). Des auto-antigènes, normalement intracellulaires, peuvent alors être exprimés à la surface des corps apoptotiques (Casciola-Rosen et al., 1994). Parmi ces antigènes, nous retrouvons le Ro52, le Ro60, la La et la phosphatidylsérine (Reed et al., 2007; Zwaal et al., 2005; Levine et al., 1999), contre lesquels des auto-anticorps sont produits. De plus, la relocalisation de ces auto-antigènes, normalement séquestrés à l'intérieur de la cellule, fournit des cibles potentielles pour les auto-anticorps (Dieker et al., 2004).

L'apoptose engendre également le clivage ou la modification de certaines protéines, telles que la lamine B1 (Wilson et al., 2001) et la Topo 1 (Casiano et al., 1996), qui peut conduire à l'exposition d'épitopes cryptiques. Ces nouveaux épitopes pourraient également contribuer dans certains cas à l'immunogénicité des auto-antigènes (Casiano et al., 1996; McRae et al., 1995) et conduire à la production d'auto-anticorps.

3.1 Spécificité des auto-anticorps

Comme nous l'avons déjà mentionné, la plupart des auto-anticorps impliqués dans le LED sont associés à des manifestations cliniques particulières. Cette association demeure l'un des aspects les plus intrigants de la maladie.

Pour dépister la présence d'auto-anticorps dans les séra de patients lupiques, on utilise l'immunofluorescence indirecte, sur un substrat de cellules nucléées standardisé notamment, avec les cellules HEp-2. Différents patrons de fluorescence peuvent ainsi être détectés, reflétant l'hétérogénéité des auto-anticorps présents. Les patrons de fluorescence se divisent en trois catégories: nucléaire (homogène, centromérique, tachetée ou périphérique), nucléolaire et cytoplasmique, qui peuvent tous être observés chez les patients lupiques.

3.2 Auto-anticorps spécifiques au LED

Le nombre élevé d'auto-anticorps dans le sérum de patients atteints du LED est rapporté depuis plus de 35 ans. Certains de ces auto-anticorps sont spécifiques au LED et comptent pour 70 à 90% des auto-anticorps détectés dans la maladie. Bien que les résultats divergent parfois en ce qui concerne la spécificité de chacun de ces auto-anticorps, la majorité des chercheurs s'entendent pour dire qu'il existe quatre auto-anticorps spécifiques au LED: les anti-ADN double brin (anti-dsDNA), les anti-Sm, les anti-protéines ribosomales P (RNP) et les anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Chacun de ces auto-anticorps est associé à un phénotype particulier du LED.

3.2.1 Anti-dsDNA

Les anti-dsDNA se retrouvent chez plus de 70% des patients atteints du LED et sont spécifiques à 95% pour cette maladie. Ils apparaissent rapidement au début du lupus et peuvent même précéder l'apparition des symptômes de plusieurs années (Arbuckle et al., 2003; Arbuckle et al., 2001). Dans certains cas, les niveaux d'anti-dsDNA suivent

l'activité du LED bien que chez certains patients ils demeurent élevés, sans poussée apparente (Miller et al., 1981; Ho et al., 2001; Horák et al., 2001). Ces auto-anticorps sont principalement associés aux néphrites lupiques, caractérisées par l'inflammation des capillaires dans les glomérules.

3.2.2 *Anti-Sm*

Les anti-Sm, souvent associés aux anti-RNP (ribosomal nuclear protein), sont dirigés contre 7 protéines (B/B', D1, D2, D3, E, F, G) constituant le complexe de ribonucléoprotéines (snRNP). Il semble que le terme Sm, attribué à ces auto-anticorps, provienne d'un patient nommé Smith. Ces auto-anticorps sont présents chez 5 à 30 % (Tan et al., 1982) des patients atteints du lupus et leur fréquence est plus élevée dans la population noire (Grennan et al., 1977; ter Borg et al., 1990). Étant donné leur haute spécificité pour le lupus, ils constituent un outil diagnostique fiable et font partie de la liste des critères sérologiques de l'ACR pour identifier le LED (Tan et al., 1982). Contrairement aux anti-dsDNA, les anti-Sm ne précèdent pas l'arrivée des symptômes associés au LED de plusieurs années. Lorsque ces auto-anticorps sont détectés chez des individus asymptomatiques, l'arrivée du lupus survient généralement dans l'année qui suit.

Les anti-Sm sont souvent associés à l'activité et à la sévérité des complications rénales associées au LED (bien que des problèmes au niveau du système nerveux central aient aussi été observés chez certains patients possédant ces auto-anticorps). Comme pour les anti-dsDNA, les anti-Sm semblent suivre l'évolution de la maladie: plus les niveaux d'anti-Sm sont élevés, plus les exacerbations du LED sont prononcées (Barada et al., 1981; Gripengberg et al., 1991; Martínez-Cordero et al., 1992). D'ailleurs, la présence

d'anti-dsDNA et d'anti-Sm chez un patient augmente l'activité de la maladie et les probabilités de développer une néphrite lupique sévère (Alba et al., 2003). Ces auto-anticorps peuvent aussi faire suite à une infection au virus EBV par mimétisme moléculaire (Dillner et al., 1984).

3.2.3 *Anti-RNP*

Les protéines ribosomales P0, P1 et P2 sont situées dans la sous-unité 60S du ribosome. Les anti-RNP reconnaissent plusieurs épitopes communs à ces 3 protéines. Ils sont observés chez 7 à 36% des patients atteints du LED selon les populations étudiées (Teh et al., 1994; Arnett et al., 1996). Bien que les résultats soient contestés par certaines études récentes, ils semblent généralement associés aux manifestations neuropsychiatriques dans le LED (Bonfa et al., 1987; Teh and Isenberg, 1994). Ces auto-anticorps sont hautement spécifiques au lupus et peuvent être utilisés comme outil diagnostique (Lyons et al., 2005).

3.2.4 *Anti-PCNA*

La PCNA est une protéine impliquée dans la réplication cellulaire. Les anti-PCNA sont présents chez 3 à 5% (Miyachi et al., 1978; Takasaki Y, 1984) des patients lupiques et n'ont pas encore été détectés dans d'autres maladies auto-immunes (Tan, 1989; Hsu et al., 2006). Ils peuvent cependant être présents chez des personnes souffrant d'hépatites B ou C (Hsu et al., 2006). Bien que peu présents dans la population lupique en général, ils peuvent être utiles dans le diagnostic du LED étant donné leur spécificité. Il a été rapporté que les patients possédant des anti-PCNA souffraient de problèmes rénaux, nerveux et de thrombocytopénie (Fritzler et al., 1983; Takasaki et al., 2002). Ces études

ont cependant été contestées par certains groupes de chercheurs (Beyne-Rauzy et al., 2005).

3.3 Auto-anticorps non-spécifiques au LED, présents dans d'autres maladies auto-immunes

Outre les auto-anticorps spécifiques au LED, il existe des auto-anticorps dont la présence, quoique non exclusive au LED, est tout de même associée au lupus (Tableau II). Ces auto-anticorps peuvent aussi se retrouver dans d'autres maladies auto-immunes systémiques telles que la sclérodermie, l'arthrite rhumatoïde, le syndrome de Sjögren, les dermatomyosites/polymyosites ou le syndrome anti-phospholipide. Ils ont pour cibles une variété hétéroclite d'antigènes nucléaires, cytoplasmiques, membranaires ou extracellulaires. Bien que leur utilité dans le diagnostic et le pronostic reste souvent à déterminer, ces auto-anticorps peuvent tout de même fournir plusieurs informations non négligeables. Dans le cadre de cette revue, nous ne décrivons que trois des douze auto-anticorps non-spécifiques retrouvés dans le Tableau II, soit les anti-Ro, les anti-phospholipides et les anti-lamine B1. Une revue des différents auto-anticorps retrouvés dans le LED et des manifestations cliniques qui leur sont associées, est disponible dans les documents suivants: (von Mühlen and Tan, 1995; Mimori, 1999; Lyons et al., 2005).

3.3.1 Anti-Ro

Ro (ou SSA) désigne une protéine associée à l'ARN. Les auto-anticorps anti-Ro se retrouvent chez environ un quart des patients lupiques et sont souvent associés à la présence d'anti-dsDNA. Cependant, en l'absence d'auto-anticorps anti-dsDNA, il est plus probable qu'ils soient associés à un syndrome de Sjögren primitif (dont les symptômes

comprennent la sécheresse des yeux et de la bouche ainsi qu'une tuméfaction des parotides) ou à une forme particulière de lupus nommée lupus cutané subaigu, qui se manifeste par une éruption cutanée photosensible. Lorsque les anti-Ro sont associés au LED, ils sont souvent le signe d'une maladie peu sévère. Les grossesses de mères porteuses d'auto-anticorps anti-Ro nécessitent cependant une attention particulière puisque dans environ 1% des cas, elles se terminent par un bloc cardiaque congénital de l'enfant, sans qu'on puisse le prédire (Buyon et al., 2004).

3.3.2 *Anti-phospholipides (aPL)*

Les anti-phospholipides comportent un groupe d'auto-anticorps hétérogènes détectés par "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA) ou par des essais fonctionnels de coagulation (Levine et al., 2002). Les trois principaux aPL, en raison de leur implication clinique, sont: les anti-cardiolipines (aCL), les anticorps anti- β 2-Glycoprotéine 1 (anti- β 2-GPI) et les anticoagulants lupiques (LAC).

Le premier anticorps antiphospholipide fut découvert en 1906 chez des patients atteints de syphilis (Wassermann et al., 1906). L'antigène reconnu par cet anticorps fut identifié plus tard comme étant la cardiolipine, un phospholipide mitochondrial (Pangborn, 1941). La réaction entre l'anticorps aCL et son antigène est devenue la base du VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), le test de dépistage de la syphilis encore utilisé aujourd'hui (Haserick and Long, 1952). Le dépistage en masse de la syphilis a permis, avec les années, d'identifier un sous-groupe de malades atteints du LED, testant positif au VDRL mais sans évidence d'infection par la syphilis. Un test de dosage d'anticorps anti-cardiolipines par radio-immunoessai, beaucoup plus sensible que le VDRL, fut disponible dès 1983 grâce à Harris et ses collègues (Harris et al., 1983). Ce

test a permis de démontrer que la présence d'anticorps anti-cardiolipines et de tests VDRL faussement positifs chez les patients souffrant du LED étaient associés à la survenue de thromboses (Harris et al., 1983). C'est à ce moment que le syndrome anti-phospholipides (SAP) fut décrit et caractérisé.

La fréquence du SAP dans la population générale est inconnue, mais on estime que de 1 à 5% des personnes jeunes et en bonne santé possèdent des aPL (Petri, 2000). La présence d'aPL a surtout été étudiée chez les patients atteints du LED dont 15 à 34% possèdent un LAC (Love and Santoro, 1990; Cervera et al., 1993), 12 à 30% des aCL (Cervera et al., 1993; Merkel et al., 1996) et 38% les deux types d'aPL (Chopra et al., 2002). Il a été estimé qu'environ 50% des patients lupiques qui possèdent des aPL développeront des thromboses sur une période d'observation de vingt ans (Asherson et al., 1989; Alarcón-Segovia et al., 1992; Vianna et al., 1994). La présence de LAC (Wahl et al., 1997), une histoire médicale comportant déjà des thromboses (Finazzi et al., 1996; Schulman et al., 1998) ainsi qu'un taux élevé d'aCL sont les facteurs les plus fréquemment associés au risque de développer ultérieurement des thromboses (Alarcon-Segovia et al., 1989; Escalante et al., 1995; Finazzi et al., 1996; Levine et al., 1997). Le SAP est une maladie auto-immune caractérisée par la présence d'auto-anticorps aPL et par au moins une manifestation clinique, les plus communes étant des thromboses ou des pertes fœtales récurrentes (Tableau III). Ce syndrome peut survenir seul (syndrome antiphospholipide primaire) ou en association (syndrome anti-phospholipide secondaire) avec une autre maladie des tissus conjonctifs, telles que le LED. Les manifestations cliniques du SAP, qu'il soit primaire ou secondaire, sont toutes liées à la formation de thromboses. Ces thromboses peuvent survenir de façon inattendue aussi bien dans les

artères que dans les veines de tout organe ainsi que dans les petits vaisseaux tels que les artérioles, capillaires et veinules (Levine et al., 2002).

Tableau III : Critères diagnostiques du SAP (adapté de Wilson et al., 1999; Miyakis et al., 2006)

Le diagnostic du SAP nécessite au moins un critère clinique et un critère de laboratoire

Critères cliniques

1. Thrombose vasculaire: Un ou plusieurs épisodes de thromboses artérielles, veineuses ou des petits vaisseaux
2. Complication de grossesse:
 - a) Au moins une mort fœtale sans malformation après la 10^e semaine de gestation
 - b) Au moins une naissance prématurée avant la 34^e semaine d'un nouveau-né de morphologie normale
 - c) Au moins 3 avortements spontanés consécutifs avant la 10^e semaine, non expliqués par des anomalies anatomiques, hormonales ou caryotypiques des deux parents

Critères de laboratoire

1. Présence d'anticorps aCL de type IgG ou IgM dans le plasma, détectés à deux reprises espacées d'au moins 12 semaines
2. Présence d'un LAC dans le plasma, détectés à deux reprises espacées d'au moins 12 semaines
3. Présence d'anti-β2-GP1 de type IgG ou IgM dans le plasma (à des titres > 99 percentile), détectés à deux reprises espacées d'au moins 12 semaines

Un faible taux d'anticorps anti-β2-GPI, aCL IgA, aCL IgG ou IgM ainsi que la présence d'anticorps dirigés contre d'autres phospholipides ne sont pas inclus dans les critères de laboratoire

Actuellement, un seul événement clinique thrombotique ou obstétrical associé à deux épisodes détectant la présence d'aPL de type LAC ou aCL, à six semaines d'intervalle, permet de retenir le diagnostic d'un SAP (Lockshin et al., 2000). Les autres

manifestations du SAP qui ne sont pas spécifiques à la maladie, telles que la thrombocytopénie, ne sont pas prises en compte. Les critères préliminaires de classification pour le SAP, nommés les critères de Sapporo, sont présentés dans le Tableau III (Wilson et al., 1999). Ces critères de classification ont une sensibilité de 71% et une spécificité de 98% (Lockshin et al., 2000).

3.3.2.1 Les aCL, les anti- β 2-GPI et les LAC

Au début des années 1990, deux groupes de chercheurs découvrent que certains anticorps aCL requièrent la présence de la glycoprotéine β 2-GP1, une protéine plasmatique liant les phospholipides, pour se lier à la cardiolipine. Cette caractéristique est observée seulement chez les patients souffrant du LED ou du SAP (Galli et al., 1990; McNeil et al., 1990; Hunt et al., 1992). La liaison entre les aCL et la cardiolipine observée lors des tests de dépistage chez les patients souffrant de syphilis ou d'une autre infection est au contraire inhibée par la présence de la β 2-GPI. À la lumière de ces observations, un des critères diagnostiques du SAP devint la présence d'aCL réagissant au complexe cardiolipine/ β 2-GP1 (Wilson et al., 1999). Le rôle physiologique de la β 2-GPI est inconnu, mais il s'agirait d'un anti-coagulant naturel vu son habilité à lier les phospholipides, inhibant ainsi l'activation de certaines voies de la coagulation (Schousboe, 1980; Schousboe, 1985; Nimpf et al., 1986; Nimpf et al., 1987; Schousboe, 1988). La présence d'anticorps anti- β 2-GPI n'est pas encore reconnue comme un critère du SAP, mais est associée au développement de thromboses (Viard et al., 1992; Cabral et al., 1996; Carreras et al., 2000) (Tableau IV).

Les LAC, quant à eux, ont initialement été découverts comme facteurs plasmatiques perturbant certains tests de coagulation de patients lupiques. Malgré leur nom "d'anticoagulants", les LAC ne sont pas responsables d'hémorragies, mais bien de thromboses. Les LAC ont été définis en 1983 par un comité international comme: "anticoagulants qui prolongent le temps de thromboplastine partielle activée (TTPA) et parfois le temps de prothrombine (TP) d'un plasma normal, mais qui n'inactivent, de façon spécifique, aucun des facteurs de coagulation connus" (Harris et al., 1983). Cette définition fait l'objet de controverse en raison de l'absence de standardisation des techniques d'hémostase et de la diversité des phospholipides disponibles. En fait, une activité anticoagulante est suggérée s'il y a une prolongation du temps de coagulation dans des tests standardisés faisant intervenir des phospholipides. Si cette anomalie survient lors d'un test de dépistage des LAC, on doit alors en vérifier la cause. Pour ce faire, on ajoute, au plasma testé, du plasma normal qui corrigera la prolongation du temps de coagulation due à un déficit en facteurs de coagulation. Si le plasma normal ne peut corriger le temps de coagulation, on associe alors le problème à la présence d'un inhibiteur (Brandt et al., 1995; Triplett, 1999; Wilson et al., 1999) (Tableau IV).

Il n'existe pas encore d'association claire entre des manifestations cliniques spécifiques du SAP et un sous-groupe particulier d'aPL. En général, les aCL sont plus fréquents que les LAC mais ces derniers sont plus déterminants dans l'augmentation du risque de thromboses (Levine et al., 2002). Comme les patients peuvent s'avérer négatifs pour un anticorps et positifs pour un autre, de multiples tests pour la détection des aPL doivent être effectués (Levine et al., 2002).

Tableau IV: Méthodes de détection des anticorps anti-phospholipides (adapté de Levine et al., 1999)	
Anti-cardiolipines (aCL)	ELISA sur plaques recouvertes de cardiolipine et de β 2-GPI. La fixation des aCL dus à un SAP est dépendante de la présence de β 2-GPI alors qu'elle est inhibée si les aCL sont dus à une infection.
Anti- β2-GPI	ELISA sur plaques recouvertes de β 2-GPI d'origine humaine.
Anticoagulants lupiques (LAC)	<p>Prolongation du temps de coagulation par au moins un test phospholipide dépendant</p> <p>Incapacité de corriger le temps de coagulation <i>in vitro</i> en ajoutant du plasma de patient sain</p> <p>Correction du temps de coagulation <i>in vitro</i> en ajoutant des phospholipides en excès.</p>

3.3.2.2 Mécanismes d'action des antiphospholipides (aPL)

Les phospholipides sont composés d'une molécule de glycérol combinée à deux acides gras estérifiés ainsi qu'à un groupe phosphodiester lié à une chaîne de type alcool polarisée. Cette dernière structure varie, déterminant ainsi l'état ionique de la molécule. Les phospholipides phosphatidylcholine, sphingomyéline et phosphatidyléthanolamine sont neutres. La phosphatidylsérine, l'acide phosphatidique, le phosphatidylinositol et les cardiolipines sont par contre anioniques. La structure phospholipidique des phospholipides détermine leur situation dans la membrane cellulaire. Dans des conditions physiologiques normales, les phospholipides anioniques se retrouvent sur le versant interne des membranes. À ce jour, l'identité des phospholipides ou des "phospholipid

binding protein" contre lesquels les aPL sont dirigés n'est toujours pas connue. Ils ne semblent toutefois pas réagir contre les phospholipides des cellules intactes et une perturbation membranaire serait nécessaire à leur liaison. D'ailleurs, il est connu que certains aPL peuvent réagir contre les plaquettes activées et les cellules apoptotiques exposant leurs phospholipides anioniques à la surface cellulaire (Levine et al., 2002)

Des études effectuées sur des animaux supportent clairement un rôle pathogénique pour les aPL, mais les mécanismes menant au développement des thromboses chez les patients atteints du SAP demeurent toujours inconnus (Hanly, 2003). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les aPL induisent les thromboses (Fig.1, p.30). Une première hypothèse implique que les aPL pourraient moduler les fonctions de certaines "phospholipid binding protein" impliquées dans la régulation de la coagulation. Certaines des fonctions pouvant être affectées par les aPL incluent les fonctions régulatrices de la protéine C (anticoagulant), de la prothrombine, de l'annexine V (inhibiteur de la coagulation) et du facteur tissulaire ainsi qu'une inhibition de la fibrinolyse (Wurm, 1984; Oosting et al., 1993; Rand et al., 1997; Roubey, 2000).

Plusieurs études ont également analysé l'interaction des anti- β 2-GPI avec les cellules endothéliales. La liaison directe de ces anticorps sur les cellules endothéliales est facilitée, *in vivo*, par l'exposition des phosphatidylsérines lors de l'apoptose (Bombeli et al., 1997). *In vitro*, on a également constaté que l'annexine II, le récepteur de l'activateur du plasminogène à la surface des cellules endothéliales, jouait aussi un rôle de récepteur pour la β 2-GPI (Ma et al., 2000). La liaison des anti- β 2-GPI à la surface des cellules endothéliales réduit le métabolisme de la prostacycline et augmente l'activation des

cellules endothéliales en stimulant la sécrétion de cytokines et l'expression de certaines molécules d'adhésion, telles que la E-sélectine, l'ICAM-1 et la VCAM-1 (Simantov et al., 1995b; Del Papa et al., 1997; Meroni et al., 2000). Étant donné que l'activation des cellules endothéliales constitue une étape importante dans la coagulation, l'interaction des aPL avec ces cellules pourrait être un des mécanismes pathogéniques menant aux manifestations cliniques du SAP (Fig.1).

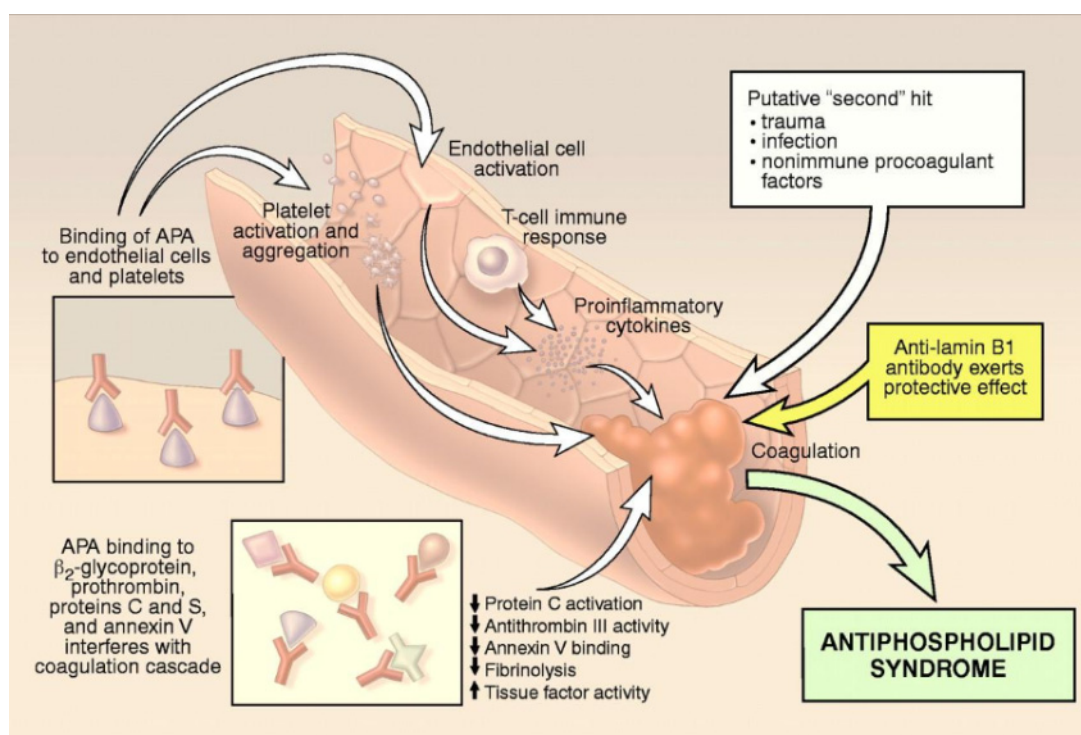


Figure 1: Mécanismes d'action possibles des aPL (Hanly, 2003)

Les aPL pourraient se lier aux phospholipides présents sur les cellules endothéliales et les plaquettes et induire leur activation. Une augmentation de la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires s'en suivrait ce qui aiderait à promouvoir la coagulation. Une liaison directe des aPL aux facteurs de coagulation serait également possible. Un deuxième signal ("second hit"), tel qu'une blessure vasculaire, des facteurs pro-coagulants non-immunologiques ou encore la présence d'une infection conduisant à la production de cytokines, pourrait aussi être requis pour induire les thromboses. Des facteurs tels que les anti-LB1, pourraient s'avérer être protecteurs et contrebalancer l'effet des aPL.

Les oxydants, et plus particulièrement les ox-low density lipoprotein (ox-LDL), reconnus par certains aPL, pourraient également causer des blessures à l'endothélium. Il est bien connu que ces molécules sont importantes dans le développement de l'athérosclérose. Les ox-LDL sont normalement ingérées par les macrophages provoquant leur activation et la sécrétion de substances variées endommageant l'endothélium (Ames, 1994). Les aCL sont souvent présents en association avec les auto-anticorps anti-ox-LDL. De plus, dans certains cas, ils peuvent réagir contre les ox-LDL, ce qui suggère que les aCL peuvent reconnaître les phospholipides oxydés et/ou les protéines liant ces phospholipides (Vaarala et al., 1993), et promouvoir un état pro-coagulant.

Selon certaines recherches les aPL pourraient également augmenter l'activation et l'agrégation plaquettaires (Khamashta et al., 1988). Ces aPL semblent avoir des effets sur des plaquettes légèrement activées ou endommagées, présentant leurs phospholipides anioniques, alors qu'ils ne réagissent pas contre celles qui sont au repos (Campbell et al., 1995). Il a été démontré que les aPL peuvent augmenter l'expression de certaines glycoprotéines membranaires retrouvées sur les plaquettes, telles que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, qui sont directement impliquées dans l'agrégation plaquettaire (Espinola et al., 2002b). Ces auto-anticorps sont d'ailleurs capables d'induire la formation d'un thrombus dans des modèles *in vivo* de thrombose chez le rat et le hamster (Jankowski et al., 2003; Pierangeli et al., 2007). La présence d'aPL corrèle également avec la détection accrue dans l'urine du 11-DH thromboxane B₂, le métabolite stable du thromboxane A₂ (TxA₂), molécule libérée par les plaquettes lors de leur activation qui potentialise leur agrégation et leur activation par boucle de rétrocontrôle positif (Martinuzzo et al., 1993; Forastiero et al.,

1998). La phosphorylation de la p38 MAP kinase (MAPK) est en partie responsable de la libération de ce composé (Vega-Ostertag et al., 2004). Une augmentation dans la phosphorylation de cette kinase a d'ailleurs été observée sur des plaquettes traitées avec des aPL. Les aPL pourraient donc directement interagir avec les plaquettes par l'intermédiaire de leurs phospholipides ou de leurs récepteurs membranaires, provoquant leur activation et entraînant la formation de thrombus (Lutters et al., 2003; Shi et al., 2006) (Fig.1).

Il n'est pas exclu que d'autres facteurs jouent un rôle déterminant dans le développement de thromboses associées au SAP. La présence d'aPL ainsi que celle d'un deuxième événement pourraient être requises pour observer les manifestations cliniques du SAP (Fig.1). Bien que cette théorie reste spéculative, une blessure au niveau de l'endothélium ou encore la présence d'une infection amenant la production de cytokines, pourraient constituer des événements favorisant un état pro-coagulant (Hanly, 2003). À l'inverse, certains facteurs pourraient être protecteurs et contrebalancer l'effet des aPL.

Récemment, la présence d'auto-anticorps anti-lamine B1 (anti-LB1) a été associée à une diminution du risque de thromboses artérielles et veineuses chez les patients porteurs de LAC et atteints du LED (Senécal et al., 1999; Dieudé et al., 2002). Ces auto-anticorps semblent inhiber l'effet pro-thrombotique des LAC, mais le mécanisme par lequel cette protection est conférée reste inconnu.

3.3.3 Anti-Lamine B1

En 1987, une protéine acide de 67 kDa, associée à l'enveloppe nucléaire est rapportée comme étant la cible d'auto-anticorps chez des patients atteints du LED (Reeves et al., 1987). Le patron d'immunofluorescence de ces anticorps sur des lames

HEp-2 étant nucléaire/périphérique, un patron préalablement associé à la présence d'anti-dsDNA, on suggère d'abord l'ADN comme cible antigénique. La résistance de cet antigène à la Dnase et aux détergents non-ioniques nous amène par contre à rejeter cette hypothèse. La protéine antigénique est finalement identifiée comme étant la lamine B1 (LB1) et l'anticorps correspondant est appelé anti-LB1 (Guilly et al., 1987; Reeves et al., 1987).

3.3.3.1 *Les lamines*

Les lamines sont les principales protéines constituant la lamina nucléaire, réseau filamenteux juxtaposé à la face nucléoplasmique de l'enveloppe nucléaire (Fig.2). Elles font partie de la grande famille des filaments intermédiaires et sont en étroite relation avec l'hétérochromatine, située en périphérie nucléaire, et de nombreuses protéines associées à la matrice nucléaire. Elles possèdent la structure caractéristique des filaments intermédiaires, soit un domaine central hydrophobe par lequel se fait la formation de dimères et deux domaines globulaires terminaux (Fig.3, p.36). De par leur composition, le seul rôle longtemps attribué aux lamines a été celui de structure ou de "squelette" nucléaire. On sait aujourd'hui qu'un groupe de lamines est distribué à l'intérieur du nucléoplasme, que leur association-dissociation est nécessaire lors de la mitose cellulaire, et qu'elles interagissent avec de nombreuses protéines nucléaires. Elles jouent ainsi plusieurs rôles dans des phénomènes cruciaux tels que la transcription, l'organisation de la chromatine et des pores nucléaires, l'ancrage des protéines à la membrane nucléaire ou encore la réplication de l'ADN (Dechat et al., 2008).

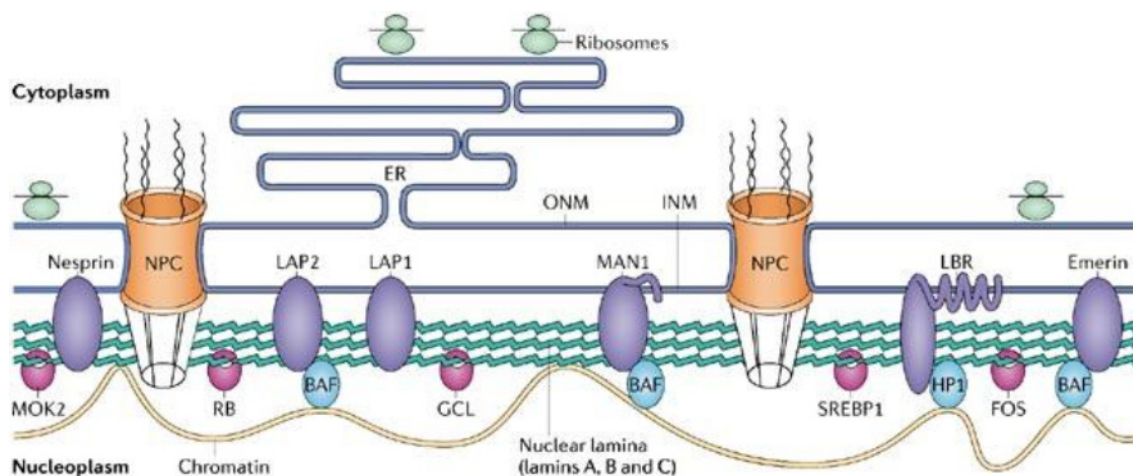


Figure 2: Localisation de la lamina nucléaire (Capell and Collins, 2006)

La lamina, constituée des lamines A, B et C, est située sur la face nucléoplasmique de l'enveloppe nucléaire. Elle est en étroite relation avec l'hétérochromatine et de nombreuses protéines associées à la matrice nucléaire.

Il existe deux types de lamines dans les cellules mammifères: les lamines de type A, comprenant les lamines A et C dont le point isoélectrique est plutôt neutre, ainsi que les lamines de type B, comprenant les lamines B1 et B2, qui sont plutôt acides. Les lamines de type A apparaissent plus tardivement dans le développement et sont codées par le gène *LMNA*, composé de 12 exons et codant pour quatre transcrits obtenus par épissage alternatif (Lin and Worman, 1993). Les lamines A et C sont les deux isoformes majeures (Capell and Collins, 2006; Worman and Bonne, 2007). Les lamines B, indispensables à la survie cellulaire (Vergnes et al., 2004), sont codées par deux gènes distincts, *LMNB1* et *LMNB2*, et sont exprimées à tous les stades du développement (Hoger et al., 1990).

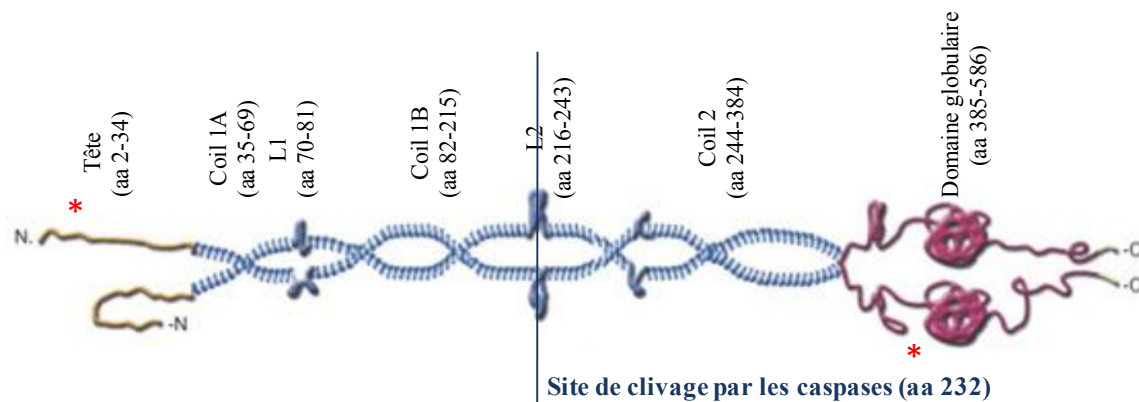


Figure 3: Structure d'un dimère de lamines (adapté de Mattout et al., 2006)

Les lamines possèdent trois sous-domaines et deux têtes globulaires contenant les sites de phosphorylation (*) nécessaires à la dissociation des lamines.

La structure secondaire des lamines comprend une région centrale de 350 acides aminés formée par 3 sous-domaines hydrophobes en hélice alpha (1A, 1B, 2), séparés les uns des autres par des "linker domains" (L1, L2). Cette région en bâtonnet est hautement conservée et donne à la molécule sa rigidité fibrillaire. Elle lui permet également de procéder à la formation de dimères en super hélice par l'enroulement de deux molécules parallèles (motif coiled-coil; Herrmann et al., 2007). Les séquences des extrémités N et C terminales sont au contraire très variables et possèdent les domaines de phosphorylation nécessaires à la dissociation des lamines (Fig.3). L'extrémité C terminale forme un domaine globulaire et porte le signal de localisation nucléaire (aa 415-420). Elle contient également un motif CaaX, dont les trois derniers acides aminés sont clivés, permettant une isoprénylation du résidu cystéine nécessaire au positionnement de la lamine sur la face interne de l'enveloppe nucléaire. À l'état déphosphorylé, les lamines forment des filaments tétramériques par des associations latérales de dimères. Ces tétramères, qui

édifient la lamina, se dissocient au cours de la mitose lorsque les lamines sont phosphorylées par des kinases, permettant alors le désassemblage de la membrane nucléaire (Herrmann et al., 2007).

De nombreuses mutations dans le gène *LMNA*, codant pour les lamines de type A, sont connues pour être liées à au moins 9 pathologies humaines, regroupées sous le terme de "laminopathies". Ces affectations ne sont pas associées aux lamines de type B dont le knock-out murin est létal chez l'embryon (Mariette et al., 1993). Les laminopathies présentent une grande variabilité clinique tant au point de vue de la diversité des tissus affectés (de manière isolée ou combinée, ou plus systémique), qu'au niveau de la sévérité du phénotype (allant d'une atteinte moyenne à létale dans les premières semaines ou mois de vie) (Capell et al., 2006; Worman and Bonne, 2007).

3.3.3.2 Les anti-LB1: caractéristiques et dépistage

Tout comme pour les anti-dsDNA (Klinman et al., 1993) et les anti-La (Sato et al., 1996), les anti-LB1 semblent être d'origine oligoclonale chez un patient donné, c'est-à-dire qu'ils sont issus d'un nombre restreint de clones (Mariette et al., 1993). Ils peuvent reconnaître les cinq épitopes distincts de la LB1 identifiés à ce jour, dont quatre se situent dans la région centrale hautement conservée de la LB1 (Chou and Reeves, 1992). Les anti-LB1 ne sont pas identiques d'un patient à un autre. Avec le temps, ils peuvent subir des mutations somatiques qui modifient leur spécificité. Les patients lupiques, initialement positifs pour la présence d'anti-LB1, le restent généralement tout au long de la maladie suggérant un renouvellement continu de la réponse auto-immune, quoiqu'on

rapporte également des exemples de patients chez qui les anti-LB1 sériques disparaissent après un certain temps (Dieudé, communication personnelle).

La détection des anti-LB1 dans les séra de patients se fait par immunofluorescence ou par technique ELISA. Leur présence est caractérisée par un patron d'immunofluorescence nucléaire indirecte plus intense au niveau de la périphérie (patron d'immunofluorescence en anneau ou "rim pattern", Fig. 4). Par ELISA, des titres d'anti-LB1 sont considérés comme étant élevés lorsque la moyenne de la densité optique obtenue dépasse de 4 déviations standards celle des contrôles normaux (Dieudé et al., 2002).

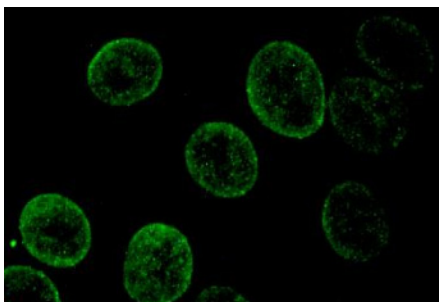


Figure 4: Patron d'immunofluorescence indirecte d'anti-LB1 sur des cellules HEP-2

Le patron d'immunofluorescence des auto-anticorps anti-LB1 sur des cellules HEP-2 est caractérisé par une fluorescence en forme d'anneau autour du noyau cellulaire que l'on appelle "rim pattern".

3.3.3.3 Effet thromboprotecteur des anti-LB1

Les anti-LB1 sont présents chez environ 17 % des patients atteints du LED (Dieudé et al., 2002). Ils peuvent aussi être détectés chez des individus normaux ou atteints d'autres maladies auto-immunes (Senécal and Raymond, 1992; Dieudé et al., 2002). Des titres élevés d'anti-LB1 corrént souvent avec la présence de LAC, de

thrombocytopénie, de neutropénie et d'anémie (Senécal et al., 1999; Dieudé et al., 2002). Tel que mentionné précédemment, une large étude multicentrique a permis à notre laboratoire de démontrer la relation entre la présence d'anti-LB1 et la protection contre les thromboses veineuses et artérielles. Lors de cette étude, il a été déterminé que le rôle protecteur des anti-LB1 était lié à la présence de LAC. Une combinaison des deux auto-anticorps chez les patients atteints du LED et du SAP favorisait la diminution du risque prothrombotique associé aux LAC. En effet, la fréquence de thromboses rapportée chez les patients possédant des LAC et des anti-LB1 était de 22,7% alors qu'elle était de 50% chez les patients possédant des LAC sans anti-LB1 (Tableau V). Cette diminution significative du risque de thromboses ne s'appliquait que chez les patients possédant des anti-LB1 et des LAC. Une diminution du risque de thrombose était observée chez les patients possédant d'autres auto-anticorps associés au SAP tels que les anti- β 2-GPI ou les aCL, mais n'était pas significative. Ces statistiques suggèrent que les anti-LB1 jouent un rôle protecteur contre les thromboses chez les patients possédant des LAC (Dieudé et al., 2002).

Tableau V: Fréquence de thromboses chez les patients atteints du LED selon la présence de certains auto-anticorps circulants (adapté de Dieudé et al., 2002)

Auto-anticorps	Fréquence de thromboses (%)
<i>LAC⁺ anti-LB1⁻</i>	50,0
<i>LAC⁺ anti-LB1⁺</i>	22,7
<i>LAC⁻ anti-LB1⁻</i>	25,5
<i>LAC⁻ anti-LB1⁺</i>	20,8
<i>aCL/anti-β2-GPI⁺ anti-LB1⁻</i>	32,6
<i>aCL/anti-β2-GPI⁺ anti-LB1⁺</i>	25,0
<i>aCL/anti-β2-GPI⁻ anti-LB1⁻</i>	22,3
<i>aCL/anti-β2-GPI⁻ anti-LB1⁺</i>	18,8

À ce jour, les anti-LB1 sont les seuls marqueurs connus associés à un meilleur pronostic pour les patients souffrant du LED et du SAP. Il ne semble pas exister d'autres exemples d'auto-anticorps associés à une protection contre les thromboses. Cependant, il est connu que certains auto-anticorps naturels peuvent jouer un rôle protecteur contre différents pathogènes. Ils font partie de la première ligne de défense du système immunitaire et ainsi du concept grandissant de l'auto-immunité protectrice (Baumgarth et al., 2005).

Le mécanisme par lequel les anti-LB1 diminuent le risque de thromboses demeure inconnu. Les corps apoptotiques formés lors de l'apoptose sont une cible importante pour plusieurs auto-anticorps. Une hypothèse selon laquelle les anti-LB1 bloqueraient l'effet pro-coagulant connu des blebs apoptotiques (Casciola-Rosen et al., 1994; Levine et al., 1999; Rosen and Casciola-Rosen, 1999), en se liant à la LB1 exposée à leur surface, a été étudiée. Cette hypothèse impliquait que la LB1, comme plusieurs autres auto-antigènes, soit exprimée à la surface des corps apoptotiques. Cependant, lors de l'apoptose de tous les types cellulaires étudiés, la LB1 n'a pas été détectée sur la face externe de la membrane cellulaire des corps apoptotiques (Dieudé et al., 2002). Elle était plutôt séquestrée à l'intérieur de ces structures, inaccessible aux anti-LB1 circulants (Dieudé et al., 2002). Ces résultats suggèrent alors que les anti-LB1 jouent leur rôle protecteur à d'autres niveaux dans les phénomènes associés à la coagulation. Puisque les cellules endothéliales ainsi que les plaquettes jouent un rôle crucial dans les mécanismes de coagulation, les anti-LB1 pourraient interagir avec l'un ou l'autre de ces deux candidats.

4. Les plaquettes

Les plaquettes sanguines sont produites par les mégacaryocytes dans la moelle osseuse. Un mégacaryocyte peut produire de 1000 à 3000 plaquettes d'une durée de vie de 7 à 12 jours. Un compte plaquettaire normal se situe entre 150 et 400 millions de plaquettes/mL. Les plaquettes mesurent de 2 μm à 4 μm de diamètre, sont de forme discoïde et possèdent une membrane plasmique formée d'une double couche de phospholipides. À l'intérieur de cette membrane, un réseau de microtubules et de filaments d'actine et de myosine, constituant une partie du cytosquelette, assure le maintien de la forme des plaquettes. Lors de l'activation plaquettaire, le cytosquelette des plaquettes subit un réarrangement, permettant ainsi un changement de forme et l'émission de pseudopodes. Les plaquettes sont anucléées et contiennent différents granules (granules denses ou granules α) dont le contenu est sécrété lors de l'activation *via* un système canaliculaire (surface connected canalicular system, SCCS) ouvert sur l'extérieur (discuté dans la prochaine section). Ce système, formé d'invaginations de la membrane plasmique, permet un échange de substances de l'intérieur vers l'extérieur ou l'inverse. Ce système fournit également la quantité de membrane nécessaire aux plaquettes pour grossir lors de l'activation lorsque leur ratio surface:volume augmente. Les plaquettes possèdent de plus un système de membrane non connecté à la surface appelé système tubulaire dense. Ce système s'apparente au réticulum endoplasmique retrouvé dans les autres cellules et sert de réservoir aux ions Ca^{2+} dont le relâchement est essentiel pour l'activation plaquettaire. Il joue aussi un rôle important dans la synthèse de la prostacycline et du TxA_2 (décrit à la section 4.2). On retrouve également dans ces cellules

des grains de glycogène et des mitochondries qui fournissent de l'énergie aux plaquettes (Michelson, 2006) (Fig. 5).

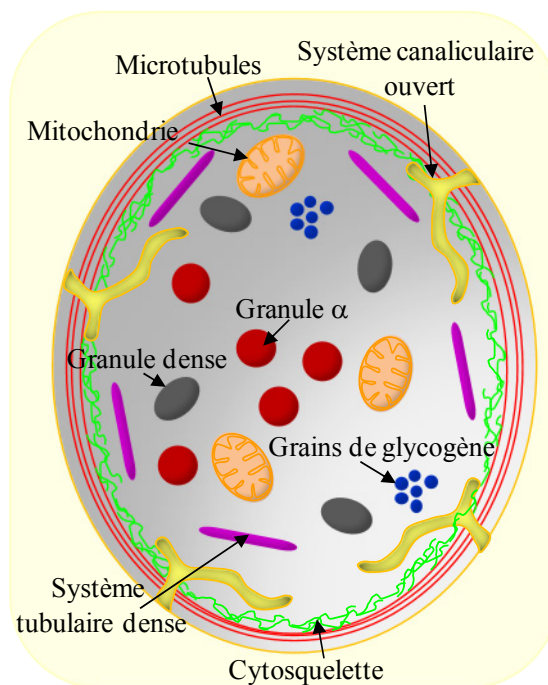


Figure 5 : Morphologie simplifiée d'une plaquette humaine

Une plaquette humaine au repos est de forme discoïde. Elle possède une membrane externe constituée d'une double couche de phospholipides. Sous-jacent, siège un réseau de microtubules, maintenant la forme des plaquettes, intimement lié au cytosquelette largement formé de filaments d'actine et de myosine. La plaquette possède un système canaliculaire ouvert vers l'extérieur. Ce système est constitué d'importantes invaginations de la membrane plasmique qui permettent à la plaquette de grossir rapidement lors de l'activation. La plaquette possède aussi dans son cytoplasme un système tubulaire dense et des granules qui libèrent leur contenu lors de l'activation, ainsi que des mitochondries et des grains de glycogène.

La membrane plaquettaire possède des récepteurs pour un certain nombre de molécules. Certains de ces récepteurs sont fonctionnels, mais n'entrent pas en contact avec leurs ligands respectifs en temps normal. Ils reconnaissent plutôt des molécules qui

circulent sous une forme inadaptée ou qui ne se retrouvent pas dans leur environnement immédiat. D'autres récepteurs ne sont fonctionnels qu'après l'activation plaquettaire. Les récepteurs membranaires des plaquettes sont situés dans la double couche de phospholipides, dont la distribution est asymétrique. Les phospholipides pro-coagulants sont séquestrés sur la face interne de la membrane de telle sorte qu'il leur est normalement impossible de fixer les facteurs de coagulation présents dans le sang (Michelson, 2006).

4.1 Les granules

Une des propriétés particulières des plaquettes réside dans le fait qu'après leur activation, elles expriment de nouveaux récepteurs à leur surface, par intégration des membranes granulaires à la membrane plasmique. Les granules constituent le principal réservoir intracellulaire de protéines destinées à être libérées au cours de l'hémostase primaire. Ce sont des structures sphériques ou allongées entourées d'une membrane. Les granules contiennent des protéines plaquettaires spécifiques synthétisées par le mégacaryocyte, et des protéines captées par le mégacaryocyte, identiques à celles retrouvées dans le plasma (albumine, facteur V, facteur de von Willebrand (vWF), etc). La membrane des granules contient entre autres l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, la P-sélectine (CD62P ou GMP 140) et la p53 lysosomiale (CD63), qui sont toutes des protéines externalisées à la surface plaquettaire lors de l'activation. La P-sélectine et le CD63 servent d'ailleurs de marqueurs d'activation plaquettaire. La P-sélectine, glycoprotéine de la membrane des granules α , est aussi exprimée par les granules denses plaquettaires ainsi que par les

cellules endothéliales activées. Elle interagit avec la surface des leucocytes ou des cellules endothéliales par l'intermédiaire du "P selectin glycoprotein ligand-1" (PSGL-1). La fonction du CD63 reste toujours mal comprise. Cette molécule pourrait être impliquée dans la réorganisation de la membrane plaquettaire et dans les mécanismes de signalisation survenant lors de l'activation (Michelson, 2006). Le rôle de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ sera présenté en détail dans la section 4.2.

4.2 Mécanisme d'activation plaquettaire

À l'état de repos, les plaquettes circulent librement dans les vaisseaux sanguins et peuvent être activées par des composantes du sang ou de la paroi vasculaire (Tableau VI). L'activation des plaquettes joue un rôle bénéfique dans l'hémostase normale, contribuant à l'arrêt du saignement par la formation d'un caillot au site d'une blessure. Elle peut toutefois conduire à la formation d'un thrombus artériel, amas plaquettaire qui obstrue un vaisseau sanguin. Un thrombus artériel, est généralement appelé "caillot blanc" en raison de sa composition largement formée de plaquettes et de fibrine, contrairement au thrombus veineux, appelé aussi "caillot rouge", qui lui est riche en globules rouges emprisonnés dans le réseau de fibrine. Un thrombus artériel se développe généralement suite à des anomalies vasculaires, telle que l'athérosclérose, tandis qu'un thrombus veineux se produit généralement suite à un changement dans la composition du sang et/ou la paroi vasculaire, qui réduit ou abolit le flux sanguin. Des facteurs génétiques et environnementaux, tels que la présence d'anticorps anti-phospholipides, peuvent contribuer à la formation des deux types de thrombi.

La formation d'un thrombus s'observe en réponse à une lésion vasculaire lorsque les plaquettes réagissent par une succession de phénomènes biochimiques rapides et de modifications cellulaires conduisant à la formation d'un thrombus largement constitué d'agrégats plaquettaires. L'interaction plaquettes-vaisseaux comporte une phase d'adhésion, d'étalement, de sécrétion, d'agrégation et d'activité coagulante, faisant toutes partie de ce qu'on appelle l'activation plaquettaire (Fig.6, p.46).

Tableau VI: Agonistes physiologiques des plaquettes		
Agonistes	Récepteurs	Effecteurs
<i>Thrombine</i>	PAR-1 PAR-4 et PAR-3 GP1b α , GPV	GPCR couplé aux protéines G α q, 12 et i GPCR couplés aux protéines G α q Récepteurs liés au cytosquelette et PTK
<i>ADP</i>	P2Y ₁ P2Y ₁₂	GPCR couplé aux protéines G α q GPCR couplé aux protéines G α i2
<i>Collagène</i>	GPVI $\alpha_2\beta_1$	IgG-like couplé au PTK Intégrines liées au cytosquelette et PTK
<i>Thromboxane A₂</i>	TP α TP β	GPCR couplés aux protéines G α q
<i>Épinéphrine</i>	α -AR	GPCR couplés aux protéines Gi
<i>Sérotinine</i>	5-HTR	GPCR couplés aux protéines Gq

Lors d'une lésion, l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium est due à l'interaction d'une protéine multimérique présente dans le plasma, le vWF, avec la glycoprotéine 1b, elle-même en complexe avec les glycoprotéines GPV et GPIX. Le

complexe GP Ib-V-IX est exprimé de façon constitutive à la surface des plaquettes au repos. Il ne se lie au vWF qu'après l'interaction de ce dernier avec la matrice sous-endothéliale. Cette interaction entraîne un changement de conformation du vWF qui est nécessaire pour lier le complexe. Cette liaison entraîne, par la portion cytoplasmique du complexe GP Ib-V-IX, une activation des filaments d'actine des plaquettes permettant leur contraction, leur changement de forme ainsi que la formation de pseudopodes. Les plaquettes peuvent alors s'arrêter et se fixer au site de la lésion (Michelson, 2006).

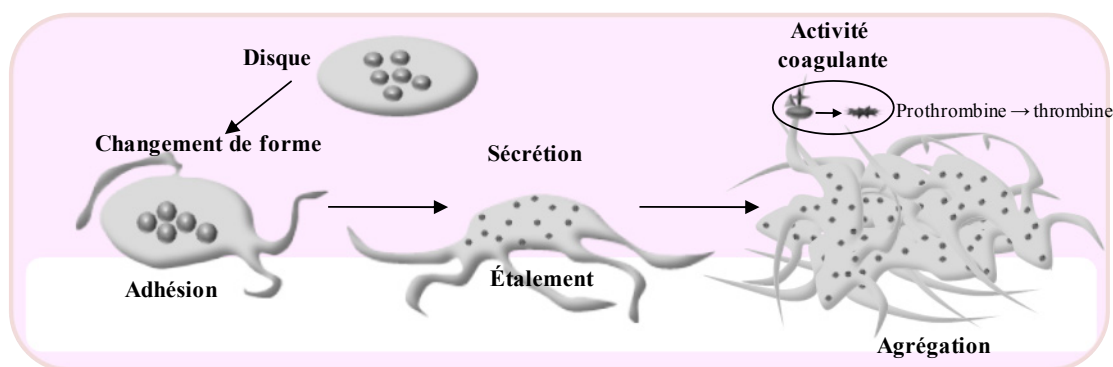


Figure 6 : Réactions de base de l'activation plaquettaire

Le contact des plaquettes avec la matrice sous-endothéliale provoque l'adhésion et l'activation des plaquettes. Elles changent de forme pour devenir circulaires, grossissent et étalent des pseudopodes. Les granules plaquettaire migrent vers la surface et relâchent leur contenu suite à la fusion des membranes granulaire et plasmique. Des seconds messagers, tels que l'ADP, sont alors relâchés et agissent sur des boucles de rétrocontrôle positives pour augmenter l'activation plaquettaire. En parallèle, les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ changent de conformation, ce qui contribue à l'agrégation plaquettaire. Un réseau de fibrine se forme à travers ce processus, ce qui stabilise l'agrégat plaquettaire. Le complexe de la prothrombinase se forme également à la surface des plaquettes activées afin de convertir la prothrombine en thrombine.

Il est à noter que les plaquettes peuvent aussi interagir directement avec le collagène de la matrice sous-endothéliale par l'intermédiaire de leur récepteur GPVI. Une telle interaction permet d'envoyer des signaux aux plaquettes qui favoriseront le relâchement d'ADP et de TxA₂. Ces deux molécules sont des activateurs secondaires puissants et des agents agrégeants qui contribuent au recrutement des plaquettes naïves au niveau de la lésion vasculaire ainsi qu'à l'amplification du thrombus plaquettaire (Michelson, 2006).

Il existe également d'autres récepteurs d'adhésion. Il s'agit principalement des intégrines, molécules transmembranaires à deux sous-unités α et β qui permettent la liaison des plaquettes au fibrinogène ($\alpha_{IIb}\beta_3$), au collagène ($\alpha_2\beta_1$) et à la fibronectine ($\alpha_5\beta_1$) (Michelson, 2006).

Après l'adhésion, les plaquettes sont activées par le collagène de la matrice sous-endothéliale et par la thrombine générée à la surface des plaquettes pendant le processus d'activation plaquettaire. Les plaquettes interagissent avec le collagène via l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ et avec la thrombine via des récepteurs spécifiques. La thrombine active les plaquettes par l'intermédiaire de protéines G couplées au récepteur de la thrombine (PAR), ce qui déclenche les cascades de phosphorylation décrites dans la section 4.4.1. L'activation plaquettaire entraîne la contraction des microtubules et la dégranulation. Les granules denses fusionnent d'abord avec la membrane et libèrent leur contenu. Les granules α , quant à eux, fusionnent en larges vacuoles et libèrent leur contenu par le système canaliculaire ouvert sur l'extérieur. Certains des constituants libérés, tels que

l'ADP et le TxA_2 , amplifient le phénomène d'activation, renforcent l'adhésion et aident à consolider l'agrégat plaquettaire (Michelson, 2006).

L'activation plaquettaire entraîne en parallèle un changement de conformation de l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (connue aussi sous le nom de complexe GPIIb-IIIa), qui peut alors fixer le fibrinogène. Le fibrinogène, étant une protéine multimérique, peut se fixer simultanément sur les intégrines $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ de deux plaquettes différentes. Cette propriété favorise la formation de ponts entre les plaquettes qui s'agrègent. De plus, la fixation du fibrinogène sur les intégrines $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ entraîne leur polymérisation ce qui déclenche des signaux intracellulaires qui induisent eux aussi l'activation des plaquettes. Ce processus contribue à la production de TxA_2 , à la contraction des microtubules et à la dégranulation (Michelson, 2006).

L'activation plaquettaire déclenche finalement l'activité pro-coagulante plaquettaire. En effet, lors du processus d'activation, la bicouche des phospholipides de la membrane plaquettaire subit un réarrangement: les phospholipides pro-coagulants (essentiellement la phosphatidylsérine), situés sur la face interne de la membrane, se retrouvent sur la face externe, exposés au contact du sang (phénomène de "flip-flop"). Les facteurs de coagulation peuvent alors se fixer sur la membrane plaquettaire et former des complexes enzymatiques qui permettent la production de thrombine. Cette dernière peut transformer le fibrinogène soluble dans le sang en un réseau solide, la fibrine, qui stabilisera l'agrégat plaquettaire (Michelson, 2006).

4.3 Régulation des phénomènes d'hémostase

Afin de contrôler la cascade de coagulation et d'éviter la formation d'un thrombus, il existe sur les plaquettes des récepteurs d'inhibiteurs plaquettaires naturels, tels que le récepteur de la prostacycline (PGI₂). La PGI₂ est produite de façon continue par les cellules endothéliales. Sa production augmente lors de l'activation de ces cellules et lorsque des agonistes, tels que des cytokines ou des facteurs de croissance, sont présents. La PGI₂ est une molécule multifonctionnelle qui bloque l'activation, la sécrétion et l'agrégation des plaquettes, induit la relaxation des cellules musculaires lisses et limite l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales. Elle se lie à la surface plaquettaire, ce qui conduit à l'activation de l'adénylate cyclase (AC), responsable de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc exerce une action inhibitrice sur les plaquettes en contrôlant le taux intracellulaire de calcium: une élévation du taux d'AMPc favorise l'incorporation du calcium dans le système tubulaire dense des plaquettes, diminuant ainsi les taux cytosoliques de calcium et, par le fait même, le déclenchement des cascades de signalisation menant à l'activation plaquettaire (Michelson, 2006).

Les cellules endothéliales prennent également part au processus de fibrinolyse qui permet la dissolution progressive de la fibrine formée au niveau d'une brèche, empêchant ainsi l'extension d'un thrombus. Les cellules endothéliales synthétisent l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) ainsi que son inhibiteur, le "plasminogen activator inhibitor" de type 1 (PAI-1) qui s'associent rapidement en complexe pour rendre le tPA en circulation inefficace. Toutefois, lorsque la fibrine se forme, elle expose des structures

pour lesquelles le tPA a une forte affinité; le tPA se fixe alors à la fibrine plutôt qu'au PAI-1 et échappe à l'inhibition. Le plasminogène, qui se fixe également à la fibrine peut alors se transformer en plasmine à l'aide du tPA situé à proximité. La plasmine, appelée aussi fibrinolysine, hydrolyse la fibrine en fragments par le processus de fibrinolyse, facilitant ainsi la reperméabilisation des vaisseaux obstrués par des caillots de fibrine. La fibrinolyse est donc localisée là où elle est nécessaire (Michelson, 2006).

En résumé, l'hémostase est un processus localisé et autocontrôlé, garantissant à la fois l'obstruction rapide des brèches vasculaires et le maintien de la perméabilité des vaisseaux.

4.4 Récepteurs et activation plaquettaire

La membrane des plaquettes est équipée de récepteurs spécifiques pour des molécules qui servent d'activateurs plaquettaires (Tableau VII). Ces activateurs, appelés aussi agonistes ou inducteurs, ne pénètrent pas la membrane plaquettaire. Ils se lient plutôt à leurs récepteurs spécifiques ce qui déclenche des événements de transduction membranaire et permet ainsi la transmission du signal d'activation à l'intérieur de la cellule et l'obtention des réponses physiologiques appropriées.

Les voies d'activation diffèrent selon les agonistes, i.e. selon les récepteurs. Les récepteurs de la thrombine, du TxA₂ et de l'ADP, sont tous des protéines à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G, appelés aussi GPCR (G-protein coupled receptor). Les récepteurs d'adhésion quant à eux, comme les intégrines $\alpha_2\beta_1$ qui lient le collagène, induisent des voies d'activation impliquant des tyrosines kinases. Dans les

deux cas, la liaison d'un agoniste à son récepteur déclenchera des signaux nécessaires à l'activation plaquettaire.

Tableau VII: Récepteurs à la surface des plaquettes		
Famille protéique des récepteurs	Principaux récepteurs plaquettaires	Principaux ligands
Protéines riches en leucines	GPIb-IX-V	vWF, thrombine, P-sélectine, Mac-1
Intégrines de type $\beta 3$ Intégrines VLA	$\alpha_{IIb}\beta_3$, GPIIb-IIIa $\alpha_v\beta_3$ $\alpha_2\beta_1$, VLA-2 $\alpha_5\beta_1$, VLA-5 $\alpha_6\beta_1$, VLA-6	Fibrinogène, fibronectine, vitronectine, vWF Vitronectine, fibrinogène, TSP, vWF Collagène Fibronectine Laminine
Récepteurs avec des domaines immunoglobulines	GPVI/ Fc γ , p62 Fc γ RIIa PECAM-1	Collagène IgG Interaction homotypique
Récepteur à 7 domaines transmembranaires	PAR-1 PAR-4 P2Y ₁ P2Y ₁₂ Récepteurs du TxA ₂ Récepteur du PAF	Thrombine Thrombine ADP ADP TxA ₂ PAF
Sélectine	P-sélectine, GMP-140	Interaction avec les leucocytes
Tétraspandine	P24 P2X ₁ CD63	Associé à $\alpha_{IIb}\beta_3$, Fc γ RIIa, CD36 ADP
Autres récepteurs	GPIV, GPIIb	TSP, collagène

GP, glycoprotéine; vWF, facteur von Willebrand; VLA, «very late activation antigen»; PAR, «protease activated receptor»; TxA₂, thromboxaneA₂; PAF, «Platelet Activating Factor»; TSP, thrombospondine.

4.4.1.1 Mécanismes de signalisation des protéines G

Tous les activateurs mènent éventuellement à une augmentation de la libération de thrombine, de TxA_2 et d'ADP. Les principales voies de signalisation des protéines G finissent donc toutes par être activées, peu importe l'agoniste ayant stimulé les plaquettes au départ. La présence de ces nombreuses boucles de rétrocontrôle positives a d'ailleurs longtemps masqué les rôles individuels de chacune des protéines G dans l'activation plaquettaire.

La sous-unité $G\alpha_q$ module l'action des phospholipases C (PLC) possédant une isoforme β . La liaison de l'agoniste à son récepteur provoque l'association de la sous-unité α au GTP qui se dissocie alors du dimère $\beta\gamma$ pour se lier à la PLC (Offermanns, 2006). L'activation de la PLC mène à la production de molécules appelées "second messengers", respectivement l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG). Ces molécules vont alors propager et amplifier le signal initié par le récepteur et stimuler à leur tour de nouveaux effecteurs. Les canaux calciques et les protéines kinase C (PKC) sont les principaux effecteurs des IP3 et du DAG. L'augmentation de calcium cytosolique permet l'activation d'autres phospholipases. C'est le cas notamment de la phospholipase A_2 (PLA₂) responsable de la libération de l'acide arachidonique de la membrane. Cet acide gras est métabolisé en TxA_2 qui participe à l'amplification de l'activation plaquettaire. Les PKC, quant à elles, sont impliquées dans des réactions de phosphorylation qui permettent une réorganisation du cytosquelette dans son ensemble (Michelson, 2006). Ces événements sont cruciaux dans l'activation plaquettaire en permettant aux plaquettes de changer de forme, de s'étaler et d'émettre leurs pseudopodes (Fig.7, p.53).

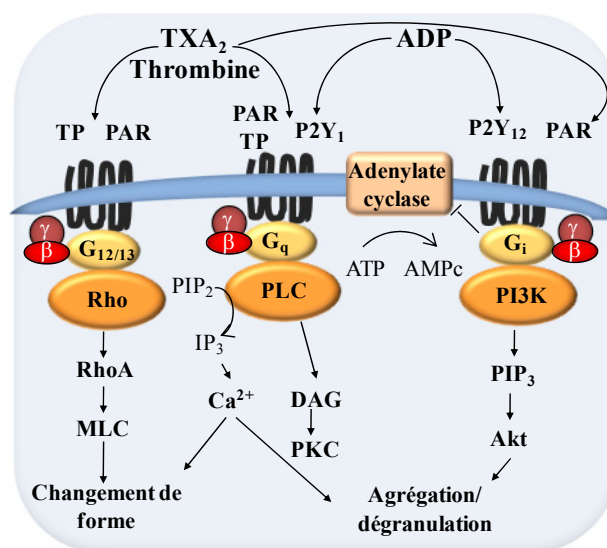


Figure 7: Mécanismes de signalisation utilisant les récepteurs couplés aux protéines G

La thrombine, l'ADP et le TxA₂, trois agonistes plaquettaire, déclenchent des cascades de signalisation par l'intermédiaire des récepteurs couplés aux protéines G. Sur des plaquettes au repos, les récepteurs de la thrombine (PAR), de l'ADP (P2Y₁₂ et P2Y₁) et du TxA₂ (TP) sont associés aux protéines G hétérotrimériques αβγ, avec la sous-unité α maintenue dans une conformation inactive (liée à la GDP). L'activation des plaquettes par les agonistes est déclenchée par le relâchement de la GDP qui est remplacée par la GTP cytosolique. La sous-unité α change alors de conformation, se dissociant des sous-unités Gβγ. Les sites actifs des sous-unités Gα et Gβγ se libèrent et peuvent interagir avec des effecteurs se situant en aval. La signalisation à travers les protéines G fait également augmenter les niveaux de calcium cytosolique essentiels à l'activation plaquettaire, et fait diminuer la synthèse de l'AMPc, inhibant normalement l'activation plaquettaire.

La sous-unité Gα_{12/13} est impliquée dans la régulation de plusieurs mécanismes de signalisation dont ceux comprenant les Rho/Rho-kinases. Ces protéines semblent jouer un rôle majeur dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Hart et al., 1998; Fukuhara et al., 2001). La sous-unité Gα_i, quant à elle, régule l'AC, responsable de la production d'AMPc, qui inhibe les fonctions plaquettaire et régule également les

phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K), responsables de la production du phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP₃) (Clapham et Neer, 1997). Le PIP₃ active un éventail important de molécules effectrices incluant la protéine kinase B (PKB ou Akt-1) (Vanhaesebroeck et al., 2001; Cantley, 2002) (Fig.7).

Les GPCR possédant différents ligands, tels que la thrombine, l'ADP et le TxA₂, ne sont pas couplés aux mêmes types de sous-unités G α . Ainsi, ils induisent différentes voies d'activation (Brass et al., 1992; Hung et al., 1992; Bernatowicz et al., 1996; Kahn et al., 1999).

4.4.1.1 Récepteurs de la thrombine

La thrombine est une protéase multifonctionnelle qui possède des propriétés à la fois pro-coagulantes et anti-coagulantes. Le précurseur inactif (pro-thrombine) de cette protéine est synthétisé dans le foie et relâché dans la circulation où il possède une demi-vie d'environ 72 heures. La conversion de la pro-thrombine en thrombine requiert la présence de calcium et l'assemblage, à la surface d'une membrane de phospholipides telle que celle retrouvée chez les plaquettes, du complexe de la prothrombinase, formé de la prothrombine, du facteur Xa et du facteur Va (Heemskerk et al., 2002). Lorsque la thrombine est active, elle peut se lier aux plaquettes, provoquant ainsi leur activation.

L'activation des plaquettes par la thrombine se produit par l'intermédiaire de certains GPCR. Ces récepteurs, nommés PAR (protease activated receptor) (Coughlin, 2005), sont couplés aux sous-unités G α_q , G $\alpha_{12/13}$ et G α_i , (Offermanns et al., 1994; Klages et al., 1999). Parmi les quatre PAR connus, seul le PAR-2 n'est pas activé par la thrombine. Les PAR-1 et PAR-4 sont retrouvés chez l'humain, tandis que les PAR-3 et PAR-4 ont été identifiés chez la souris (Kahn et al., 1998; Kahn et al., 1999). Les PAR

possèdent un mécanisme d'action particulier. La thrombine se lie au récepteur par un site spécifique et le clive, démasquant une nouvelle extrémité N-terminale qui agit comme peptide agoniste interne. Du fait de son clivage, ce récepteur est à usage unique.

L'activation des plaquettes par la thrombine fait intervenir les PAR de manière différente chez l'homme et la souris. Les récepteurs PAR-1 et PAR-4, présents sur les plaquettes humaines, sont activables indépendamment l'un de l'autre. La majorité de la signalisation engendrée par la thrombine passe par le récepteur PAR-1, chez l'humain puisqu'il est activé par une faible concentration de thrombine. En raison de sa plus faible affinité pour la thrombine, PAR-4 est activé à plus forte concentration (Brass et al., 1992; Hung et al., 1992; Bernatowicz et al., 1996; Kahn et al., 1998). En revanche, PAR-3 et PAR-4, présents sur les plaquettes de souris, sont tous deux nécessaires à l'activation de ces cellules (Nakanishi-Matsui et al., 2000; Sambrano et al., 2001; Hamilton et al., 2004).

Une plaquette humaine possède environ 1500-2000 PAR-1 dont les 2/3 sont exprimés à la surface des plaquettes au repos. Le reste des récepteurs est concentré dans le système canaliculaire ouvert vers l'extérieur. Une activation des plaquettes à la thrombine clive la majorité des PAR-1 qui sont par la suite internalisés et relâchés via des microparticules.

La liaison de la thrombine à ses récepteurs provoque la phosphorylation de plusieurs molécules effectrices, une augmentation dans les niveaux de calcium intracytosolique et la suppression de la synthèse d'AMPc. Éventuellement, une réorganisation du cytosquelette ainsi que l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ont lieu, deux étapes importantes dans l'activation plaquettaire.

4.4.1.2 Récepteurs de l'ADP

L'ADP est entreposée dans les granules denses et libérée lors de l'activation plaquettaire pour ensuite se lier à son récepteur à la surface des plaquettes, agissant ainsi comme médiateur d'une boucle de rétrocontrôle positive. Lorsque l'ADP est ajoutée *in vitro* à des plaquettes, il cause la sécrétion de TxA₂, la phosphorylation de plusieurs molécules effectrices, une augmentation du taux de calcium cytosolique, le changement de forme des plaquettes, l'agrégation plaquettaire, la dégranulation et l'inhibition de la formation d'AMPc. *In vitro* l'ADP seul est toutefois un activateur peu puissant de la voie des PLC dans les plaquettes humaines. Elle requiert la présence d'autres activateurs, tels que la thrombine, pour produire un effet maximal.

Les plaquettes humaines expriment à leur surface deux récepteurs distincts pour l'ADP, nommés P2Y₁ et P2Y₁₂ (Gachet, 2006; Murugappa and Kunapuli, 2006). Ces deux récepteurs font partie des GPCR et doivent être tous les deux présents pour que les plaquettes répondent complètement à l'ADP (Jin and Kunapuli, 1998; Pulcinelli et al., 1998; Jantzen et al., 1999). Le récepteur P2Y₁ est couplé à une protéine de type G α_q (Hechler et al., 1998; Savi et al., 1998) et est responsable de l'activation des phospholipases C, qui produisent de l'inositol triphosphate (IP₃) à partir du phosphatidylinositol 2-phosphate (PIP₂). La protéine G α_q est également responsable de la production et de la libération du calcium cytosolique du système tubulaire dense des plaquettes. Pendant ce processus, les protéines kinase C sont activées. Le récepteur P2Y₁₂, quant à lui, est couplé à une protéine de type G α_i (Ohlmann et al., 1995; Jin and Kunapuli, 1998; Pulcinelli et al., 1998; Jantzen et al., 1999; Jantzen et al., 2001), et

inhibe la formation d'AMPc pour permettre le déclenchement du processus d'activation plaquettaire.

4.4.1.3 Récepteur du TxA₂

Tout comme l'ADP, le TxA₂ se comporte comme un médiateur de boucle de rétrocontrôle positive lors de l'activation plaquettaire. Il est produit à partir de l'acide arachidonique par l'action de la cyclooxygénase-1 et de la thromboxane synthétase. L'action du TxA₂ demeure très localisée puisqu'il possède une courte demi-vie, étant rapidement hydrolysé en thromboxane B₂, un produit inactif. Le récepteur du TxA₂ est couplé aux sous-unités G α_q et G $\alpha_{12/13}$ (Knezevic et al., 1993; Offermanns et al., 1994; Djellas et al., 1999). Des souris déficientes pour le récepteur du TxA₂ ont un temps de saignement plus long que la normale et ne peuvent former d'agrégats plaquettaires stables (Thomas et al., 1998).

D'autres agonistes sont nécessaires au bon fonctionnement des récepteurs du thromboxane. En effet, ces récepteurs ne sont pas couplés directement à des protéines G α_i et sont donc incapables d'inhiber l'action de l'AC. Pour promouvoir l'activation et l'agrégation plaquettaire, les récepteurs du thromboxane requièrent donc l'aide d'autres récepteurs, tels que ceux de l'ADP, capables d'induire l'inhibition de l'AC.

4.4.1.4 Autres récepteurs couplés aux protéines G

Il existe d'autres agonistes, tels que l'épinéphrine et la sérotonine, qui utilisent des GPCR pour activer les plaquettes. Toutefois, contrairement à la thrombine, l'ADP et le TxA₂, ces activateurs sont faibles et semblent servir principalement de potentialisateurs aux réponses des plaquettes à d'autres stimuli (Michelson, 2006).

4.4.1.6 Inhibiteurs de GPCR et médicaments anti-plaquettaires

Deux types de médicaments anti-plaquettaires sont actuellement disponibles pour contrôler les événements thrombotiques. Le premier sert surtout à réduire la formation de thrombus chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires. Il peut aussi être administré de façon prophylactique pour diminuer les risques de thromboses artérielles (Meadows and Bhatt, 2007). Les cibles principales de ce premier type de médicaments sont des molécules impliquées dans l'activation et l'agrégation plaquettaires (Fig.8, Tableau VIII).

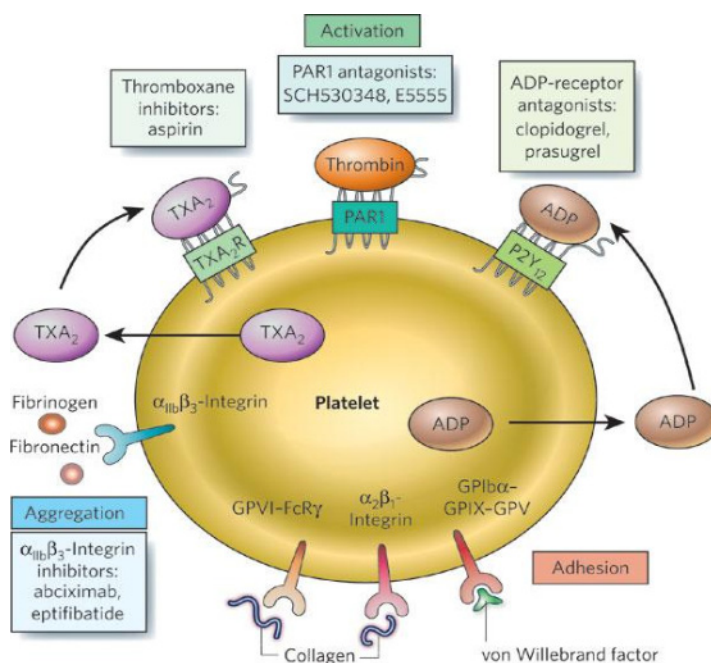


Figure 8 : Cibles des médicaments anti-plaquettaires (Mackman, 2008)

Les plaquettes possèdent plusieurs récepteurs de surface impliqués dans leur activation (vert), leur adhésion (rouge) et leur agrégation (bleu). Les ligands pour les différents récepteurs sont montrés. Les médicaments dirigés contre les plaquettes ainsi que leurs cibles sont identifiés. Les cibles incluent: la TxA₂, le PAR-1, le P2Y₁₂ et l'intégrine α_{IIb}β₃.

Tableau VIII: Médicaments anti-plaquettaires (Mackman, 2008)

<i>Inhibiteurs de cyclooxygénases</i>	<p>L'aspirine, utilisée depuis plus de 40 ans, est le médicament anti-plaquettaire le plus communément prescrit. Elle inhibe la cyclooxygénase 1 (COX-1) requise pour la synthèse du TxA₂. L'aspirine réduit le risque d'un infarctus du myocarde chez les patients à risque (Mackman, 2008). Elle n'est toutefois pas sans risque et peut causer des ulcères d'estomac ainsi que des saignements (Berger et al., 2006; Hennekens et al., 2006).</p> <p>Des études récentes sur des inhibiteurs de COX-2, tels que le Rofecoxib (Vioxx) et le Valdecoxib (Bextra), ont démontré qu'inhiber les mauvaises COX pouvait conduire à une augmentation significative du risque d'infarctus du myocarde ainsi que des crises cardiaques. Les résultats de ces études ont provoqué le retrait de ces médicaments du marché (Grosser et al., 2006).</p>
<i>Antagonistes des récepteurs de l'ADP</i>	<p>Le Clopidogrel, ayant pour cible le récepteur P2Y₁₂, est le médicament le plus utilisé dans cette catégorie. Il est utilisé pour traiter les patients atteints de syndromes coronaires aigus (Yusuf et al., 2001). Il peut aussi être administré aux patients subissant une intervention coronaire percutanée. Le Prasugrel est un autre médicament retrouvé dans cette catégorie (Wiviott, 2007; Gachet, 2005; Sabatine et al., 2005).</p>
<i>Inhibiteurs des récepteurs PAR</i>	<p>Deux antagonistes des PAR-1, E5555 et SCH530348, sont présentement en phase II d'essais cliniques (Meadows and Bhatt, 2007).</p>
<i>Inhibiteurs d'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$</i>	<p>Des inhibiteurs d'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ sont conçus pour réduire l'agrégation plaquettaire en inhibant la liaison des plaquettes activées au fibrinogène ou à d'autres ligands. Ces inhibiteurs, tels que l'Abciximab, sont employés pour le traitement à court terme des patients atteints de syndromes coronaires aigus qui subissent des interventions coronaires percutanées. L'utilisation à long terme de ces inhibiteurs augmente toutefois le risque de mortalité (Kong et al., 1998).</p>

Aucun médicament bloquant l'adhésion des plaquettes au collagène ou au vWF et donc l'adhésion des plaquettes aux vaisseaux sanguins, n'est présentement disponible (Meadows and Bhatt, 2007; Oney et al., 2007; Gibbins, 2004). De tels inhibiteurs sont toutefois en cours de développement. En théorie, l'inhibition de l'adhésion plaquettaire pourrait dérégler le rôle des plaquettes lors de la première étape de la coagulation et augmenter le risque de saignement.

Un autre type de médicament vise la dégradation de la fibrine qui stabilise normalement la structure d'un thrombus. Ces médicaments appelés "clot busters", sont des activateurs de fibrinolyse parmi lesquels nous retrouvons notamment le tPA et la streptokinase. Le succès de ces médicaments repose essentiellement sur la vitesse à laquelle ils sont administrés aux patients suite à un accident thrombovasculaire (Lord, 2007).

4.4.2 Récepteurs signalant par l'intermédiaire des tyrosines et sérines/thréonines kinases

Les récepteurs couplés à des tyrosines kinases, tels que les récepteurs pour le collagène $\alpha_2\beta_1$ ou GPVI/Fc γ , utilisent des voies d'activation plaquettaire différentes de celles utilisées par les GPCR. Les tyrosines kinases peuvent, elles aussi, mener à l'activation des PLC et des PKC ainsi qu'à l'augmentation du calcium cytosolique (Gibbins, 2004). Les tyrosines et les sérines/thréonines kinases constituent des familles d'enzymes, souvent associées à des récepteurs membranaires ayant en commun la propriété de phosphoryler respectivement des résidus tyrosine, sérine ou thréonine sur des molécules effectrices. Elles peuvent elles-mêmes être contrôlées par des tyrosines ou des sérines/thréonines phosphatases. Elles activent ou inhibent certaines voies de signalisation dans différents types cellulaires tels que les plaquettes. Il est connu que ces

molécules jouent un rôle important dans les mécanismes de signalisation impliqués lors de l'activation plaquettaire. Les cascades de phosphorylation en jeu dans ces mécanismes sont cependant loin d'être complètement connues, l'identification de ces kinases étant difficile à cause de leur faible quantité (Meadows and Bhatt, 2007).

Des tyrosines kinases de la famille Src ont été identifiées dans les plaquettes (src, fyn, lyn, fgr, yes). Certaines d'entre elles sont impliquées dans les mécanismes de signalisation induits par les récepteurs GPIb-V-IX, GPVI ainsi que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, et peuvent moduler les molécules effectrices entrant dans la signalisation des GPCR (Gibbins, 2004). D'autres tyrosines kinases telles que Syk, Fak, Pyk2, Jak2, Tyk2, Btk et Tec ont également été identifiées dans les plaquettes (Michelson, 2006). Ces protéines semblent aussi impliquées dans la signalisation des récepteurs mentionnés ci-haut, démontrant que plusieurs molécules peuvent agir sur les mêmes effecteurs.

4.4.3 Récepteur de l'insuline

Le récepteur de l'insuline est constitué de deux paires de sous-unités: deux sous-unités transmembranaires β ayant une activité enzymatique de protéine kinase et deux sous-unités α à la surface de la membrane cellulaire assurent la fixation de l'insuline (Youngren, 2007). L'ensemble des 4 sous-unités est de forme cylindrique et appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase tous composés de plusieurs domaines fonctionnellement distincts (Youngren, 2007). Peu de choses sont encore connues sur le récepteur de l'insuline dans les plaquettes bien qu'il ait déjà été identifié comme étant fonctionnel à leur surface (Hajek et al., 1979; Falcon et al., 1988; López-Aparicio et al.,

1992). Chez des individus sains, il a été suggéré par certains que l'insuline supprimerait les fonctions plaquettaires (Ferreira et al., 2004).

La fixation de l'insuline à ses sous-unités α modifie leur conformation, ce qui lève l'inhibition qu'elles exercent sur les sous-unités β . Ce changement provoque l'activation des sous-unités β capables de se phosphoryler mutuellement au niveau de résidus tyrosines (Youngren, 2007). Les sites de fixation de l'ATP et de plusieurs substrats sont alors dégagés, permettant ainsi la phosphorylation de protéines cytoplasmiques dont les molécules "insulin receptor substrate" (IRS) et l'enzyme Shc. En parallèle, l'ensemble ligand-récepteur est internalisé, le ligand dégradé et un taux variable de récepteurs est recyclé (Youngren, 2007) (Fig.9, p.61).

Il existe deux grandes voies de signalisation intracellulaire médiant l'action de l'insuline. Les molécules Shc, qui se lient à la sous-unité β , sont à la base de la première voie. Les Shc activées initient une cascade de phosphorylation stimulant une suite de kinases qui aboutit à l'activation des MAP kinases p38 et ERK 1/2. L'autre voie de signalisation utilise les IRS, qui comprennent un domaine de liaison à la phosphotyrosine permettant leur fixation sur la tyrosine 960 (ou 1146) de la sous-unité β . Une fois phosphorylé, l'IRS-1 stimule à son tour d'autres enzymes dont la PI3K. Les PI3K jouent un rôle critique dans les mécanismes de signalisation associés à la régulation des fonctions plaquettaires (Zhang et al., 1996; Hirsch et al., 2001; Watanabe et al., 2003). Elles peuvent : 1) activer les voies de signalisation de MEK, ERK et p38 (Kojima et al., 2001; Saklatvala et al., 1996), reconnues pour leur rôle dans le relâchement de TxA₂ dans les plaquettes (Yacoub et al., 2006); 2) activer les voies de signalisation du complexe GPIb-V-IX (Li et al., 2001; Li et al., 2006); 3) participer à l'activation et l'agrégation

plaquettaire. Elles interviennent également dans la régulation de l'Akt-1, une molécule effectrice clé impliquée dans différentes fonctions plaquettaires (Chen et al., 2004; Woulfe et al., 2004; Stojanovic et al., 2006; Yin et al., 2008). Cette molécule peut réguler la molécule GSK3 dont la phosphorylation intervient directement dans l'agrégation plaquettaire et semble moduler la réorganisation du cytosquelette en interagissant avec la protéine associée au microtubule Tau (Barry et al., 2003) (Fig.9, p.61).

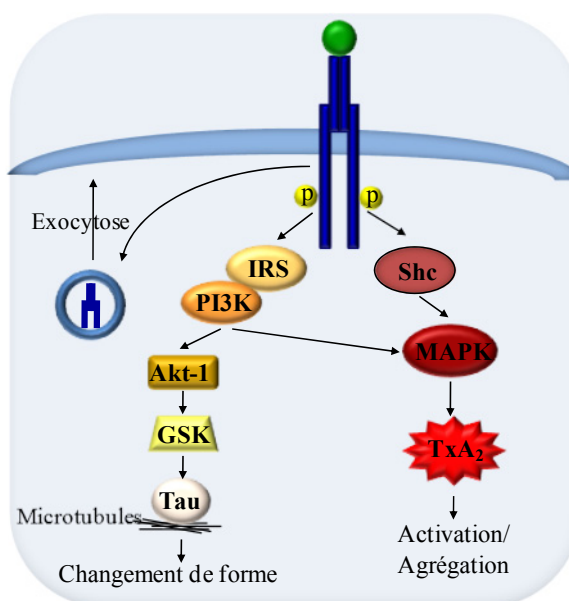


Figure 9: Mécanisme de signalisation du récepteur de l'insuline dans les plaquettes

La liaison de l'insuline sur son récepteur mène à l'autophosphorylation des sous-unités β et la phosphorylation sur les résidus tyrosine de l'IRS ou d'autres intermédiaires de signalisation tels que Shc. L'IRS phosphorylé sert de site de liaison pour d'autres protéines. La PI3-kinase s'active lors de sa liaison à l'IRS ce qui mène à la production de phosphatidylinositol et éventuellement à l'activation de l'Akt-1 qui interagit avec la GSK. La GSK interagit avec plusieurs autres protéines telles que la protéine associée aux microtubules Tau. La signalisation par la Shc quant à elle, activera la cascade de signalisation impliquant Ras/MAP Kinases qui mène à la sécrétion de TxA_2 .

4.5 Les plaquettes et l'endocytose

En plus d'intervenir dans les processus d'hémostase, certaines études suggèrent que les plaquettes peuvent répondre à différents stimuli, tels qu'une exposition à des complexes antigène/anticorps et des molécules du système du complément (Humphrey and Jaques, 1955; Manohar et al., 1967), en sécrétant des agents antibactériens (Weksler and Nachman, 1971). Selon ces études, les plaquettes pourraient avoir un rôle à jouer dans les réponses du système immunitaire. Ces études sont cependant contestées (White, 2005) et le rôle précis des plaquettes dans les défenses immunitaires est loin d'être clair.

Il est connu que les plaquettes peuvent interagir avec certaines bactéries (Fitzgerald et al., 2006) qui induisent l'activation plaquettaire. L'adhésion initiale des bactéries aux plaquettes peut survenir directement ou, plus communément, avec l'aide de protéines plasmatiques qui jouent un rôle de pont entre les protéines bactériennes et les récepteurs plaquettaires (intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou GPIb) (Fitzgerald et al., 2006). Cette interaction semble toutefois insuffisante pour déclencher l'activation plaquettaire; un anticorps circulant, spécifique à un antigène bactérien, est requis pour enclencher la signalisation par l'intermédiaire du récepteur Fc γ RIIa. Ce récepteur, caractérisé comme étant le récepteur de la phagocytose chez les neutrophiles et les macrophages humains, permet l'endocytose de complexes antigènes/anticorps par les phagocytes. Dans les plaquettes humaines, le regroupement des récepteurs Fc γ RIIa à la surface membranaire induit l'activation plaquettaire, accompagnée du changement de forme, de la dégranulation et de l'agrégation via la PI3K (Chacko et al., 1996; Gratacap et al., 1998; Barkalow et al., 2003). Ces récepteurs pourraient aussi être impliqués dans l'internalisation et la concentration de certaines molécules, telles que des anticorps et des antigènes seuls ou en

complexes, dans les plaquettes (White et al., 1996; Worth et al., 2006b). Bien que la raison et le mécanisme pour et par lesquels les plaquettes peuvent accomplir une telle fonction restent peu connus, il est suggéré que ce processus leur permette de participer à la clairance des complexes immuns retrouvés dans plusieurs maladies auto-immunes telles que le LED (Worth et al., 2006b).

La voie principale de l'endocytose dans la majorité des cellules utilise les vésicules de clathrine, présentes aussi dans les plaquettes (Morgenstern, 1982; Behnke, 1989, 1992; Klinger, 1994; Klinger and Klüter, 1995). Ces structures sont impliquées dans la capture de substances physiologiques telles que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Nurden et al., 1999), le vWF (Klinger and Klüter, 1995) et le fibrinogène (Klinger and Klüter, 1995). L'internalisation d'un récepteur quelconque, tel que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, dans les vésicules de clathrine est un processus hautement contrôlé et très dynamique survenant rapidement après la formation de ces vésicules. Suite à la liaison d'un ligand à son récepteur, une activation s'ensuit par la phosphorylation du récepteur et le recrutement de vésicules de clathrine (Wolfe and Trejo, 2007). Une fois internalisée, la vésicule de clathrine fusionne avec des endosomes, où une dissociation ligand-récepteur s'effectue, favorisant la réintégration du récepteur dans la membrane plasmique. Ce processus se produit rapidement, de telle sorte que la majorité des récepteurs puissent lier un nouveau ligand en moins de 20 min.

Des mécanismes d'internalisation clathrine-dépendants ont déjà été caractérisés dans les plaquettes. Ils semblent entre autres impliqués, du moins en partie, dans l'internalisation des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$. Vu l'importance des mécanismes clathrine-dépendants dans plusieurs types cellulaires, ils pourraient être impliqués dans

l'internalisation de complexes immuns observés dans les plaquettes et participer ainsi à leur élimination chez les patients atteints de maladies auto-immunes (Worth et al., 2006b; Alpers et al., 1991; Yuzawa et al., 1993).

5. Les auto-antigènes bifonctionnels

Les auto-antigènes forment un groupe très restrictif d'antigènes du soi capables d'induire une réponse immunitaire acquise. Les raisons expliquant que ces antigènes, qui représentent en tout moins de 4% de tous les antigènes cellulaires, soient plus susceptibles que les autres de causer un bris de la tolérance sont encore en grande partie inconnues. De récentes études ont toutefois mis en lumière une qualité propre à plusieurs auto-antigènes qui pourrait expliquer leur propension à induire l'auto-immunité (Marshak-Rothstein and Rifkin, 2007).

La plupart des maladies auto-immunes sont associées à la présence de dommages cellulaires sur des tissus en particulier (ex. cartilages des jointures pour l'arthrite rhumatoïde). Ces dommages peuvent causer la libération, dans le milieu extracellulaire, ou l'exposition, à la surface cellulaire, de certains auto-antigènes, par des cellules en nécrose, en apoptose ou en nécrose secondaire. Depuis environ une quinzaine d'années, plusieurs chercheurs ont rapporté que de tels auto-antigènes ainsi libérés peuvent occuper des fonctions biologiques tout autres que celles leur étant normalement attribuées lorsqu'ils sont présents à l'intérieur des cellules. Certains de ces auto-antigènes, lorsque relâchés dans l'environnement extracellulaire, semblent même posséder une activité pathogène qui peut contribuer à l'apparition de maladies auto-immunes (Oppenheim et

al., 2005; Howard, 2006). En effet, il a été démontré que la protéine extracellulaire "high mobility group 1 protein" (HMGB1) est capable d'initier des processus d'inflammation, de promouvoir l'angiogénèse et de stimuler la migration de cellules adhérentes, telles que les cellules musculaires lisses (Lotze and Tracey, 2005; Yang et al., 2005; Mitola et al., 2006). De plus, la protéine histidyl-tRNA (hisAS) synthétase et l'asparaginy-tARN synthétase (asnAS), deux enzymes contre lesquelles près de 25% des patients atteints de polymyosite et de dermatomyosite développent des auto-anticorps, peuvent induire la migration des leucocytes et avoir des fonctions pro-inflammatoires. Ces enzymes, normalement impliquées dans la formation d'aminoacyl-tARN, peuvent activer les récepteurs chimiotactiques CCR3 et CCR5 lorsqu'elles sont relâchées dans le milieu extracellulaire (Howard et al., 2002). Récemment, il a été démontré que plusieurs autres auto-antigènes, associés à des maladies auto-immunes différentes, possèdent des qualités chimiotactiques similaires à l'hisAS et l'asnAS (Howard, 2005; Howard, 2006). Notre laboratoire a d'ailleurs démontré que la DNA topoisomérase 1 (topo) (Hénault et al., 2006) et la CENP-B (Robitaille et al., 2007), deux auto-antigènes nucléaires associés à la sclérodémie, se liaient respectivement à la surface des fibroblastes (Hénault et al., 2006) et des cellules musculaires lisses pulmonaires (Robitaille et al., 2007) lorsqu'ils étaient libérés dans le milieu extracellulaire. Dans le cas de la topo, cette liaison recrutait des anti-topo de patients sclérodermiques et stimulait l'adhésion ainsi que l'activation des monocytes (Hénault et al., 2006). Cette activation pourrait être à la source de la production de facteurs de croissance qui stimulent la fibrose, le symptôme majeur observé chez les patients sclérodermiques possédant des anti-topo. Dans le cas de la CENP-B, la liaison de l'auto-antigène sur les cellules musculaires lisses provoquait la

migration des cellules et stimulait la sécrétion de cytokines/chémokines pro-inflammatoires, ce qui pourrait contribuer à l'hypertension pulmonaire artérielle observée chez les patients sclérodermiques possédant des anti-CENP-B (Robitaille et al., 2007).

D'autres auto-antigènes, quant à eux, tels ceux faisant partie de la famille des filaments intermédiaires, semblent occuper des rôles régulateurs lorsqu'ils sont relâchés dans l'environnement. Ces auto-antigènes ne sont pas associés au développement de maladies auto-immunes. Parmi ceux-ci, la vimentine (Mor-Vaknin et al., 2002; Podor et al., 2002; Moisan and Girard, 2006) et les cytokératines (Hasan et al., 1998; Boilard et al., 2003) ont été détectées dans le milieu extracellulaire ou à la surface de différentes cellules où elles occupaient des fonctions biologiques toutes autres que celles leur étant normalement attribuées à l'intérieur des cellules.

La vimentine forme le filament intermédiaire de classe III le plus exprimé (Herrmann et al., 2007). Lorsque cette protéine est externalisée, elle peut jouer plusieurs rôles régulateurs. À la surface des LT apoptotiques, elle interagit avec la PLA₂ et contrôlerait ainsi la sécrétion d'acide arachidonique (Boilard et al., 2003). Les macrophages activés ainsi que les cellules endothéliales ont été récemment identifiés en tant que cellules sécrétrices de vimentine dans le milieu extracellulaire (Mor-Vaknin et al., 2002). La vimentine sécrétée par les macrophages semble impliquée dans certaines fonctions immunologiques telles que la production de métabolites oxydatifs et la destruction de pathogènes bactériens (Mor-Vaknin et al., 2002). La fonction de la vimentine sécrétée par les cellules endothéliales demeure toutefois inconnue. À la surface des plaquettes activées, la vimentine pourrait être impliquée dans les mécanismes de

fibrinolyse en interagissant avec la vitronectine et le complexe tPA/PAI (Podor et al., 2002).

Les filaments intermédiaires de type cytokératine sont également exprimés à la surface de plusieurs types cellulaires tels que les cellules endothéliales et les hépatocytes (Wells et al., 1997). Lorsqu'elles sont externalisées, ces protéines interagissent avec plusieurs facteurs hémostatiques tels que: 1) le kininogène (Hasan et al., 1998), qui libère le peptide vasoactif bradykinine stimulant la synthèse de prostacycline et le dégagement de tPA par les cellules endothéliales; 2) le plasminogène et le tPA (Hembrough et al., 1996), impliqués dans la fibrinolyse; 3) le complexe thrombine-antithrombine (Wells et al., 1997), responsable de l'inactivation de la thrombine. La cytokératine 1, exprimée à la surface des cellules endothéliales, pourrait de plus être impliquée dans l'assemblage et l'activation du système kallikreine/kinine qui contrebalance le système rénine/angiotensine en diminuant la pression sanguine, prévenant ainsi les thromboses (Shariat-Madar et al., 2002).

La LB1 a elle aussi récemment été détectée à la surface des neutrophiles apoptotiques (Moisan and Girard, 2006). Lors d'une recherche antérieure, notre laboratoire avait mis en évidence la présence de cette protéine à l'intérieur des corps apoptotiques des cellules endothéliales en apoptose. Elle a de plus été retrouvée dans le milieu extracellulaire de lymphoblastes en apoptose (Schiller et al., 2007). On sait que dans certaines conditions (ex. déficience ou saturation des mécanismes phagocytaires), les corps apoptotiques perdurent et se lysent, déversant leur contenu dans le milieu extracellulaire. On parle alors de "nécrose secondaire" ou d'apoptose tardive. La présence

de LB1 dans le milieu extracellulaire de lymphoblastes en apoptose suggère qu'elle provienne d'un tel type d'apoptose. Il n'est pas exclu que la LB1 puisse être déversée, par un phénomène semblable, des corps apoptotiques des cellules endothéliales. La présence de LB1 dans le milieu extracellulaire soulève toutefois des questions quant à son rôle physiologique, une fois qu'elle est libérée dans l'environnement.

6. Auto-antigènes ou auto-anticorps: à qui la faute?

Tel que mentionné préalablement, la majorité des patients atteints du LED possèdent des auto-anticorps. La présence de certains de ces auto-anticorps, dirigés contre des auto-antigènes intracellulaires, est souvent essentielle pour l'évaluation des patients atteints de maladies auto-immunes systémiques. Plusieurs auto-antigènes ont d'ailleurs été incorporés dans les critères diagnostiques de certaines maladies auto-immunes (Hochberg, 1997; Vitali et al., 2002). Bien qu'ils soient souvent associés à l'activité de différentes maladies auto-immunes (ter Borg et al., 1990) et qu'ils soient corrélés à des manifestations cliniques particulières dans le LED, leur rôle dans la pathophysiologie du LED et les raisons pour lesquelles ils sont toujours dirigés contre les mêmes auto-antigènes ne sont cependant pas bien comprises. À la lumière des nouvelles études effectuées sur les auto-antigènes bifonctionnels, ne serait-il pas possible que les auto-anticorps **ET** les auto-antigènes aient un rôle à jouer dans la pathogenèse des maladies auto-immunes?

Il est de plus en plus clair que certains auto-anticorps, tels que les anti-dsDNA, les aPL, les anti-Ro/La et les RNP ont un rôle à jouer dans la pathogenèse du LED. À ce jour cinq grands mécanismes ont été proposés pour expliquer le rôle direct des auto-anticorps

dans la pathogenèse du LED: **1)** ils pourraient se lier directement à leur cible et exercer leur effet pathogène, en bloquant le rôle physiologique de cette cible, en empêchant sa liaison avec d'autres protéines ou en l'opsonisant, ce qui conduirait à sa destruction et à l'activation des processus d'inflammation (Lefkowitz and Gilkeson, 1996; Orth et al., 1996; Macchi et al., 1997; Oshiro et al., 1997; Bordron et al., 1998; Berden et al., 1999; Dorner et al., 2000; Ghirardello et al., 2000; Chan et al., 2002; Chen et al., 2003; Jang and Stollar, 2003; Xue et al., 2003); **2)** ils pourraient se lier à des protéines circulantes pour former des complexes immuns qui se déposeraient éventuellement dans les organes cibles et entraîneraient l'activation de la réponse inflammatoire (Cooley et al., 1999; Crowson and Magro, 2001; Rekvig and Nossent, 2003); **3)** ils pourraient se lier à des protéines circulantes qui se fixeraient par la suite à leur cible, ce qui entraînerait l'activation de la réponse immunitaire (Hanly et al., 1996; Takeda et al., 1999; Boes et al., 2000; Hanly, 2003); **4)** ils pourraient se lier à des protéines immobilisées sur des membranes et activer la cascade du complément ainsi que la réponse inflammatoire (Holers, 2004); **5)** ils pourraient finalement pénétrer à l'intérieur des cellules cibles et affecter certaines fonctions intracellulaires, induire l'apoptose ou encore devenir cytotoxiques en activant la destruction des cellules par les composantes du complément (Deng et al., 2000; Lefkowitz and Gilkeson, 1996; Yanase et al., 1997; Sun et al., 2001).

Tous ces mécanismes soutiennent l'hypothèse d'un rôle pathologique des auto-anticorps dans le LED, mais qu'en est-il des auto-antigènes? Tel que mentionné, certains auto-antigènes semblent capables de se lier spécifiquement à certains types cellulaires, de recruter les auto-anticorps correspondants et de stimuler ainsi la migration et la production de cytokines provoquant ou amplifiant certaines maladies auto-immunes. Ces

observations se rapportent toutefois à des auto-antigènes associés à des auto-anticorps qualifiés de pathogènes. Qu'en est-il toutefois des auto-anticorps caractérisés comme étant protecteurs, tels que les anti-LB1? Ces auto-anticorps ont été associés à une diminution du risque de thromboses chez des patients atteints du LED et possédant des LAC, faisant naître l'idée que les anti-LB1, contrairement à la majorité des auto-anticorps étudiés, sont protecteurs et non pathogènes. Puisque d'autres auto-antigènes "pathogènes" accompagnés ou non de leurs auto-anticorps respectifs initient ou contribuent aux symptômes observés dans des maladies auto-immunes, la LB1 pourrait elle aussi prendre part à l'évolution du SAP associé au LED. Contrairement aux autres auto-antigènes bifonctionnels observés dans la sclérodermie, qui sont nocifs, la LB1, accompagnée des anti-LB1, jouerait plutôt un rôle protecteur en réduisant le risque de thrombose. La relation qui existe alors entre les anti-LB1, la LB1 et la thromboprotection reste à démontrer.

7. Modèle proposé

Globalement, les dernières études présentées suggèrent que certaines molécules de la famille des filaments intermédiaires peuvent être impliquées dans la régulation des mécanismes thrombo-inflammatoires lorsqu'elles sont libérées dans le milieu extracellulaire. Les neutrophiles ainsi que les cellules endothéliales sont d'importants joueurs dans les réponses inflammatoires et le développement de thromboses par leurs interactions avec les plaquettes. La présence, dans des conditions particulières, de LB1 à la surface ou dans le milieu extracellulaire de ces cellules, nous permet de croire que cette

molécule pourrait prendre part aux mécanismes de régulation existant pour prévenir les thromboses. Le relâchement de LB1 dans le milieu extracellulaire la rendrait alors disponible pour interagir avec différents intervenants tels que les plaquettes ou les cellules endothéliales. En interagissant avec ces cellules, la LB1 pourrait, tout comme les cytokératines ou la vimentine, prendre part au mécanisme de régulation des thromboses. Les patients possédant des auto-anticorps anti-LB1 pourraient avoir en circulation des complexes anti-LB1/LB1 qui augmenteraient cet effet et les protégeraient contre un risque accru de thromboses. Cette hypothèse serait en accord avec les nouvelles études stipulant que certains auto-antigènes et non certains auto-anticorps sont à la base de conditions physiologiques observées dans des maladies auto-immunes (Marshak-Rothstein and Rifkin, 2007; Robitaille et al., 2007; Howard, 2006; Henault et al., 2006; Oppenheim et al., 2005; Howard, 2005) et fournirait une explication quant à la corrélation observée entre les anti-LB1 et la thromboprotection.

À la lumière de ces informations, nous proposons donc l'hypothèse de travail suivante: la lamine B1 est relâchée par des cellules en apoptose et se lie à la surface d'un intervenant impliqué étroitement dans les processus de coagulation. En agissant ainsi, cet auto-antigène participe à la régulation de la cascade de coagulation. Chez les sujets possédant des anti-LB1 circulants, des complexes anti-LB1/LB1 se forment, ce qui entraîne une augmentation de l'activité de la LB1 et une protection accrue contre les thromboses dont souffrent les patients atteints du SAP.

Objectifs généraux de la thèse

Cette thèse avait pour but d'évaluer le potentiel thromboprotecteur de la LB1, des anti-LB1 et des complexes anti-LB1/LB1. En premier lieu, nous voulions déterminer si les anti-LB1, la LB1 ou les complexes anti-LB1/LB1 modulaient l'activation des principaux intervenants cellulaires dans la formation d'un caillot sanguin, soit: les cellules endothéliales ou les plaquettes. Par la suite, nous voulions vérifier si ces mêmes molécules pouvaient interagir directement avec la surface cellulaire des cellules endothéliales ou des plaquettes. Finalement, nous voulions caractériser les mécanismes par lesquels la liaison de ces molécules pouvait contribuer à la thromboprotection.

Matériel et méthodes

1. Production et purification de la LB1 et de son fragment N-terminal (NH₂-LB1)

1.1 LB1

Pour exprimer la LB1 complète, nous avons utilisé les techniques déjà décrites par Dieudé et al. (2002). En résumé, nous avonsensemencé les bactéries BL21 (DE3) (Stratagene, La Jolla, CA), portant le plasmide pET19b-LB1 codant pour la LB1 complète, dans du milieu *Luria Bertani* (LB) additionné de carbénicilline (100 µg/ml, Sigma, St-Louis, MO). Les cultures de départ ont été incubées pendant la nuit à 25°C. Les cultures de nuit ont par la suite été diluées 1:25 dans du milieu frais, puis incubées à 32°C jusqu'à l'atteinte d'une densité optique (DO, 600 nm) d'environ 0,6. Les bactéries ont finalement été induites à 32°C avec 0,7 mM d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, Sigma) pendant 2 heures, puis centrifugées et congelées en culots à -80°C.

Nous avons par la suite purifié la LB1 avec de la résine Ni-NTA (Novagen, Madison, WI) à partir d'un gramme de culot bactérien. Pour ce faire, les bactéries ont été resuspendues dans 20 mL de tampon d'extraction (BD Pharmingen, Mississauga, ON), 40 unités de DNase (Sigma) et 20 mg de lysozyme. Elles ont ensuite été incubées à la température de la pièce pendant 10 min avant d'être soniquées. Le lysat cellulaire obtenu a ensuite été centrifugé à 20 000 x g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant a été récupéré, versé sur 3 mL de résine Ni-NTA et incubé pendant 20 min à la température de la pièce. La résine a par la suite été lavée avec 80 mL de tampon B1 (0,5 M NaCl, 0,05 M sodium phosphate et 25 mM imidazole, pH 8,0) et 120 mL de tampon B2 (0,5 M NaCl, 0,05 M

sodium phosphate et 50 mM imidazole, pH 8,0). Finalement, la LB1 a été éluée avec 50 mL d'une solution constituée de 0,5 M NaCl, 0,05 M sodium phosphate et 250 mM imidazole, pH 8,0. La concentration finale de la LB1 a ensuite été ajustée à 0,25 µg/mL à l'aide de concentrateurs Centricon (Millipore, Billerica, MA) et le tampon d'entreposage a été changé pour du tampon HBSS-complet (Hanks balanced salt solution: 138 mM NaCl, 5 mM KCL, 0,81 mM MgSO₄, 0,34 mM Na₂HPO₄, 0,4 mM KH₂PO₄, 1,3 mM CaCl₂, 4,2 mM NaHCO₃, 5,6 mM glucose et 10 mM HEPES). La pureté de la protéine purifiée a ensuite été évaluée par gel 10 % SDS-PAGE.

1.2 NH₂-LB1

Le fragment N-terminal tronqué de la LB1 (NH₂-LB1, 25 kDa) a été obtenu grâce à l'insertion, à l'aide d'un synthétiseur de gènes (Operon Technologies Alamed, CA), d'un codon stop (TAA) à la position 232 de la chaîne d'aa. La NH₂-LB1 a ensuite été insérée dans le vecteur d'expression pET19b (Novagen) et transformée dans des bactéries *E. coli* BL21 (DE3) afin de pouvoir l'exprimer. La production et la purification de la NH₂-LB1 s'est faite de la même façon que pour la LB1 complète à l'exception de quelques modifications. Pour ce faire, nous avons utilisé un culot bactérien de 0,2 gramme resuspendu dans 4 mL de tampon d'extraction, 40 unités de DNase et 0,2 mg de lysozyme. Le lysat cellulaire obtenu, suite à la sonication et la centrifugation du culot bactérien, a été versé sur 2 mL de résine Ni-NTA. La résine a ensuite été lavée avec du tampon B1, B2 et 0,5 M NaCl, 0,05 M sodium phosphate, 100 mM imidazole, pH 8,0. La protéine récupérée par élution a été concentrée et changée de tampon, tel que décrit pour la LB1 complète.

2. Patients

Nous avons fait appel à trois femmes atteintes du LED, âgées respectivement de 36, 59 et 84 ans, qui possédaient des IgG anti-LB1 au moment de leur diagnostic. Ces femmes font partie d'une cohorte canadienne-française comptant 112 patients lupiques, qui avaient été préalablement testés, par ELISA, pour la présence d'anti-LB1 dans leurs séra (Dieudé et al., 2002). Les trois patientes étaient LAC positives mais n'avaient pas d'historique de thrombose. Des échantillons de leurs séra, prélevés et congelés (-80°C) tout au long de leurs années de suivi médical, ont été utilisés pour la purification par affinité d'anti-LB1. Cent mL de sang ont également été prélevés chez ces patientes afin d'en purifier les plaquettes pour les analyser. Au moment de ce prélèvement, un échantillon de sérum a été conservé pour tester la présence d'anti-LB1.

3. Isolation des plaquettes humaines

Des prises de sang ont été effectuées sur des sujets sains et volontaires, n'utilisant pas de médicaments interférant avec les fonctions plaquettaires depuis au moins 10 jours. Des prises de sang ont également été effectuées sur des patients atteints du LED, tel que décrit précédemment. Le sang veineux a été prélevé dans des tubes contenant de l'acide citrate dextrose. Le plasma riche en plaquettes (PRP), récupéré suite à une centrifugation de 15 min à 500 x g à la température de la pièce, a été centrifugé de nouveau pendant 10 min à 800 x g. Le culot de plaquettes a ensuite été resuspendu dans du tampon HBSS pH 6,5, complété avec 0,4 mM EDTA (HBSS-EDTA) et 1 µM de prostaglandine (PGE). Finalement, les plaquettes furent centrifugées à 520 x g pendant 8 min et resuspendues

dans du tampon HBSS-complet, pH 7,4. Le compte plaquettaire fut ensuite ajusté en fonction des expériences.

4. Purification des auto-anticorps anti-LB1

Les IgG anti-LB1 ont été purifiés à partir de sera de patients atteints du LED à l'aide de la trousse Aminolink Plus Immobilization Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA) par chromatographie d'affinité avec de la LB1 immobilisée sur des colonnes. La concentration finale d'IgG anti-LB1 fut déterminée avec la trousse Easy-Titer Human IgG Assay Kit (Pierce, Wolburn, MA) et variait de 77,8 à 91,4 ng/ μ L. L'activité des anti-LB1 fut toujours vérifiée avant chaque expérience par immunobuvardage sur de la LB1 immobilisée sur membrane de nitrocellulose.

5. Cytométrie en flux

5.1 Mesures d'activation des cellules endothéliales

Des cellules endothéliales humaines de cordon ombilical (HUVEC; Cambrex, Walkerville, MD), utilisées au passage 4, ont été cultivées dans du milieu EGM-2MV (Cambrex) à 37°C avec 5% de CO₂ dans des plaques de culture 150 mm jusqu'à confluence. Ces cellules ont ensuite été incubées avec des concentrations croissantes de LB1, de NH₂-LB1 ou d'anti-LB1 purifiés en présence ou en absence de thrombine (8 unités/mL) et de polymixine B (7 μ g/mL) pendant 8 heures à 37°C, 5% de CO₂. Elles ont ensuite été récoltées avec 0,2% trypsine-EDTA à 37°C pendant 3 min puis incubées avec des anticorps fluorescents dirigés contre l'ICAM-1 (anti-ICAM- fluorescéine (FITC),

R&D system, Minneapolis, MN), la VCAM-1 (anti-VCAM- phycoérythrine (PE), BD Biosciences, San Diego, CA) ou la E-sélectine (anti-E-sélectine cytochrome, BD Biosciences), pendant 30 min à la température de la pièce. Nous avons mesuré la perméabilité cellulaire avec du 7-amino-actinomycine D afin que les cellules perméables ne soient pas incluses dans notre analyse. Dix mille événements ont été comptabilisés avec un FACScan (BD Bioscience) et analysés avec le programme CellQuest.

5.2 Mesures d'activation plaquettaire

Des plaquettes non-activées (25×10^6) ont été incubées avec 200 $\mu\text{g/mL}$ d'IgG de chèvre (Sigma) pendant 15 min afin de bloquer les interactions non-spécifiques. Les plaquettes ont ensuite été incubées avec des concentrations croissantes¹ de LB1, de NH₂-LB1, d'anti-LB1 purifiés ou de complexes anti-LB1/LB1 à un ratio molaire de 1:1 (0,2 μg de LB1 pour 0,45 μg d'anti-LB1 incubé pendant 1 heure à la température de la pièce) avant d'être activées avec 0,05 unité/mL de thrombine (Sigma) ou 2 $\mu\text{g/mL}$ de collagène (Chronolog, Havertown, PA) pendant 5 min. Les plaquettes ont ensuite été lavées avec du HBSS-complet (trois centrifugations à 220 x g pendant 3 min) avant d'être fixées à 4°C pendant 30 min avec 4% de PFA. Les plaquettes ont été lavées de nouveau, puis incubées soit avec un anti-CD62-PE (1:50, BD Pharmingen), un anti-CD63 PE (1:7, BD Pharmingen) ou un anti-PAC1-FITC (1:10, BD Pharmingen) pendant 20 min en absence de lumière. La fluorescence a ensuite été détectée avec un FACScan et analysée avec le programme CellQuest. Ces expériences ont été répétées avec 5 donneurs de plaquettes.

¹ Des quantités équivalentes (μg pour μg) et équimolaires (mM pour mM) de NH₂-LB1 et de LB1 ont produit des résultats similaires. Les expériences utilisant des quantités équivalentes des 2 protéines ne seront donc que présentées.

5.3 Liaison de la LB1 aux plaquettes

Des plaquettes non-activées (1×10^6) ont été bloquées, tel que décrit précédemment puis, activées avec 0,05 unité/mL de thrombine durant des périodes de temps variables (0", 5", 15", 30" ou 1') avant d'être fixées avec 2% de paraformaldéhyde pendant 1 heure à 25°C. Les échantillons ont ensuite été lavés 3 fois puis incubés avec 0,2 µg de LB1/ 10^6 plaquettes pendant 10 min. Les plaquettes ont été lavées de nouveau puis incubées pendant 30 min avec un sérum anti-LB1 de cochon d'Inde, GP5, produit contre de la LB1 recombinante (Dieudé et al., 2002), à une concentration de 1:50. Suite à trois lavages, les échantillons ont été incubés avec un anti-cochon d'Inde-Alexafluor 488 (1:200) pendant 30 min dans le noir, lavés, puis analysés en cytométrie en flux.

6. Agrégométrie

L'agrégation plaquettaire a été mesurée avec un agrégomètre à 4 canaux (Chronolog, Havertown, PA). Du PRP, ou des plaquettes isolées diluées dans du HBSS-complet, ont été incubés pendant 5 min à 37°C, dans des cuvettes de verre contenant des concentrations variables de LB1, d'anti-LB1 purifiés, de NH₂-LB1 ou de complexes anti-LB1/LB1 à un ratio molaire de 1:1. Les échantillons ont ensuite été placés dans l'agrégomètre avec une agitation constante de 1000 rpm. Nous avons ensuite ajouté les agonistes aux concentrations suivantes: 0,1 unité/mL de thrombine, 1 µM de phorbol myristate acétate (PMA; Chronolog), 2 µg/mL de collagène (Chronolog), 5 µM de thrombin activating peptide 1 (TRAP-1; Chronolog) ou 125 µM de thrombin activating peptide 4 (TRAP-4; Chronolog). L'agrégation plaquettaire a été mesurée pendant 5 min. Ces expériences ont été répétées avec 5 donneurs de plaquettes différents.

7. Mesure de la sécrétion du TxA₂

Des plaquettes non-activées (250×10^6) ont été incubées avec de la LB1 ou de la NH₂-LB1 à des concentrations variant de 100 à 300 ng/10⁶ plaquettes. Ces plaquettes ont ensuite été stimulées à 37°C avec 0,05 unité/mL de thrombine pendant 5 min avant que la réaction soit interrompue en ajoutant un volume équivalent de 10 mM d'EDTA et 10 µM d'indométhacine. La solution de plaquettes a ensuite été centrifugée à 3000 x g pendant 5 min à 4°C. La quantité de thromboxane B₂, le métabolite stable du TxA₂, a été mesurée avec une trousse d'immunoessais (Assay Designs Inc, Ann Arbor, MI), en suivant les recommandations du fabricant. Cette expérience fut répétée avec 3 donneurs différents.

8. Détection de la LB1 à partir de surnageants de cellules en apoptose

8.1 Neutrophiles

À partir de sang veineux prélevé sur des sujets sains volontaires, des neutrophiles ont été isolés dans le laboratoire du Dr Denis Girard (INRS-Santé, Pointe-Claire) par sédimentation au Dextran, suivi d'une centrifugation sur du Ficoll-Paque en suivant les recommandations du fabricant (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Baie d'Urfé, Qc). La viabilité cellulaire (>98%) des échantillons a été évaluée par bleu de trypan et la pureté (>98%) par cytologie. Les neutrophiles isolés ont été cultivés dans du RPMI 1640-HEPES-P/S (Invitrogen, Carlsbad, CA), complété avec 5% de sérum autologue. L'apoptose spontanée des neutrophiles a été induite par une incubation des cellules à 37°C, 5% de CO₂ pendant 24 heures. Nous avons récupéré et centrifugé le milieu de culture afin de retirer les cellules mortes avant de le congeler à -80°C. Les protéines dans

les surnageants de neutrophiles ont ensuite été séparées sur des gels de 8% SDS-PAGE puis, la présence de LB1 a été détectée par immunobuvardage avec l'anti-LB1 GP5. Des surnageants de neutrophiles frais non-apoptotiques ont été utilisés comme contrôles.

8.2 Cellules endothéliales

L'apoptose de HUVEC (Cambrex) a été induite par la privation de facteurs de croissance tel que décrit par Hénault et al. (2006). En résumé, les cellules ont été cultivées dans du milieu sans sérum pendant 72 heures puis, l'apoptose a été confirmée par l'expression de surface de la phosphatidylsérine en cytométrie en flux à l'aide d'un anti-annexine V-FITC (BD Biosciences). Les surnageants de plusieurs HUVEC apoptotiques ont été combinés puis, centrifugés à 20 000 x g pendant 15 min à 4°C pour en retirer les cellules mortes. Les surnageants ont ensuite été concentrés 20 fois à l'aide de concentrateurs possédant une limite de poids moléculaire de 5 kDa (VivaScience, Hannover, Allemagne), puis séparés sur des gels de 8% SDS-PAGE. La présence de LB1 dans ces surnageants a été détectée par immunobuvardage avec l'anti-LB1 GP5. Des lysats cellulaires de HUVEC non-apoptotiques ainsi que de la LB1 recombinante ont été utilisés comme contrôles.

9. Modèle de thrombose induite par le chlorure de fer

Toutes les expériences de thrombose induite ont été effectuées en accord avec le comité d'éthique de l'hôpital Sacré-Cœur de Montréal. Quatorze rats Sprague-Dawley mâles, pesant de 350 à 450 g, ont été injectés de façon intramusculaire avec de la kétamine (50 mg/kg) et de la xylazine (5 mg/kg). L'anesthésie fut ensuite induite par une administration continue de 1% d'isoflurane puis, l'artère carotide et la veine jugulaire

droite ont été dénudées. Un cathéter a alors été introduit dans la veine jugulaire pour permettre l'injection de LB1 ou de tampon HBSS-complet (véhicule). Une sonde pulse Doppler (Transonic, Ithaca, NY) mesurant le débit sanguin a été placée autour de la carotide pour déterminer le temps d'occlusion du vaisseau (TTO). Suite à une période de stabilisation de 15 min, une dose de 2 mg/kg de LB1 ou de volume équivalent de HBSS-complet a été administré IV pendant 30 sec. Cinq min plus tard, une thrombose au niveau de la carotide fut induite par la méthode du chlorure de fer développée par Kurz et al. (1990). Pour ce faire, un coton tige enduit d'une solution de chlorure de fer à 50% fut placé sur la carotide pendant 3 min. La formation du thrombus a été évaluée en fonction de la réduction du débit sanguin dans la carotide. Lorsque le sang ne pouvait plus passer dans le vaisseau nous avons considéré qu'une occlusion complète avait eu lieu. Le temps requis pour obtenir cette occlusion a été déterminé comme étant le TTO.

10. Liaison de la LB1 aux plaquettes

10.1 ELISA cellulaire ou "Cell-based ELISA"

Des plaques de 96 puits en polystyrène (Immulon 2HB) ont été recouvertes avec $2,5 \times 10^6$ plaquettes/puit. Une quantité croissante de LB1 (de 0 à $1 \mu\text{g}$) a été incubée dans chacun des puits pendant 5 min puis, les plaquettes ont été activées ou non avec 0,05 unité/mL de thrombine pendant 3 min. Chacune des plaques a ensuite été centrifugée à $220 \times g$ pendant 5 min et les surnageants ont été aspirés afin de retirer toute LB1 non-liée. Ces plaquettes furent ensuite fixées avec avec 2% de paraformaldéhyde et perméabilisées avec 0,5% de Triton X-100. Les puits ont finalement été bloqués avec du PBS-1% BSA,

incubés pendant 1 heure avec un anti-CD61 de souris (1:500, BD Pharmingen) ou l'anti-LB1 GP5 (1:500) puis, lavés avec du PBS-0,5% T20. Les plaques ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire de chèvre (1:5000) couplé à de la peroxydase de raifort (HRP), un anti-souris HRP (1:5000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) ou un anti-cochon d'Inde HRP (1:5000; Jackson ImmunoResearch) pendant 1 heure. L'activité de la peroxydase a été détectée avec une solution de 0,8 mg/mL d'*o*-phénylénédiamine diluée dans un tampon contenant 92 mM de citrate de sodium, 8 mM d'acide citrique pH 6,0 et 0,006% d'H₂O₂ pendant 10 min à la température de la pièce et à la noirceur. Après l'arrêt de la réaction avec une solution de 2 M H₂SO₄, la densité optique a été mesurée à 490 nm avec un lecteur de plaque MRX revelation (Dyex, Chantilly, VA).

10.2 Immunofluorescence et microscopie confocale

Un million de plaquettes furent incubées avec 0,2 µg de LB1 dans une plaque 12 puits pendant 2 min à 25°C. Les plaquettes ont ensuite été activées pour des périodes de temps variables (entre 15" et 20') avec 0,05 unité/mL de thrombine puis ont été centrifugées à 220 x g pendant 5 min. Les surnageants ont été aspirés pour retirer toute LB1 non-liée. Les plaquettes furent par la suite resuspendues dans du HBSS-complet, fixées avec 2% de paraformaldéhyde, déposées sur des lamelles de verre et centrifugées à 220 x g pendant 5 min. Le surnageant fut une fois de plus aspiré avant que les plaquettes soient perméabilisées avec 0,1% Triton X-100, bloquées pendant 2 heures avec du HBSS-complet 1% BSA et incubées pendant une heure avec un anti-LB1 L5 (9 µg/mL, Zymed, San Francisco, CA) et un anti-CD61 de lapin (1:250, RDI, Flander, NJ). Les anticorps primaires liés ont été révélés avec des IgG anti-souris, couplés au

fluorochrome Alexafluor 488 (1:200), et des IgG anti-lapin, couplés à de la rhodamine (0,5 µg/mL, Molecular Probes, Eugen, OR), avant d'être observés à 63X sous un microscope au laser confocal Zeiss 510. Les données recueillies ont finalement été analysées avec le programme Zeiss LSM 5 Image Browser (Zeiss, Toronto, ON).

Afin d'analyser la persistance de la LB1 ou des complexes anti-LB1/LB1 dans les plaquettes, de la LB1 et des auto-anticorps anti-LB1 de deux patients lupiques, purifiés par affinité, ont été incubés à un ratio molaire de 1:1 pendant une heure. La LB1 et les complexes anti-LB1/LB1 ont ensuite été incubés avec des plaquettes ($1 \times 10^6/4$ µL) pendant 2 min. Les plaquettes furent activées avec de la thrombine (0,05 unité/mL) durant des périodes de temps variables (0", 30", 1', 2', 5', 10' ou 20') puis, traitées tel que mentionné précédemment pour la microscopie confocale.

10.3 Microscopie électronique

Cinq cents millions de plaquettes ont été incubées avec de la LB1 à une concentration de $0,2 \mu\text{g}/10^6$ plaquettes pendant 2 min à 25°C, activées avec 0,05 unité/mL de thrombine et centrifugées à $220 \times g$ pendant 5 min avant de retirer le surnageant pour enlever toute LB1 non-liée. Les plaquettes ont ensuite été resuspendues dans du HBSS-complet contenant 0,5% glutaraldéhyde et 2% paraformaldéhyde pendant 1 heure à 25°C. Suite à la fixation, les échantillons ont été lavés 3 fois et incubés à 0°C pendant 1 heure dans du PBS contenant 50 mM chlorure d'ammonium et 3,5% sucrose. Les échantillons ont par la suite été lavés trois fois dans du sodium cacodylate 0,1 M, 3,5% sucrose, pH 7,2. Afin de procéder à l'enrobage dans de la résine d'acrylique LR white (Marivac, Ville St-Laurent, Qc), les échantillons ont été déshydratés dans

différentes solutions d'éthanol (0%, 70%, 90%, 95% et 100%) à raison de 15 min d'incubation pour chacune des solutions. L'infiltration fut ensuite menée avec une solution de 100% éthanol/LR White à un ratio de 1:1 pendant 60 min à 22°C. Lors de la polymérisation finale, de la résine fraîche a été ajoutée aux échantillons, avant de procéder à une incubation de 24 heures à 50°C.

À partir des blocs de résine, des coupes ultra-minces ont été effectuées puis, montées sur des grilles-250 de nickel. Ces grilles ont été rincées sur 3 gouttelettes d'eau distillée entre chacun des traitements suivants: 7 min dans une solution 1% acide périodique, 3 min dans une solution 1% sodium métapériodate et 5 min dans une solution 1% sodium borohydrure. Les grilles furent ensuite bloquées pendant 30 min dans une solution 1% ovalbumine avant d'être incubées pendant 18 heures à 22°C avec les anticorps primaires: anti-clathrine de chèvre (1:1000; Sigma) et anti-LB1 de cochon d'Inde (1:50). Suite à trois rinçages dans du Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris-HCL pH 7,4, 150 mM NaCl), les grilles ont été exposées pendant 5 min à du tampon GAR (1% BSA, 0,5% T20, 0,05M Tris-HCL) puis, ont été incubées avec leurs anticorps secondaires respectifs (anti-chèvre d'âne (1:30) et anti-cochon d'Inde d'âne (1:30), Jackson ImmunoResearch) pendant 2 heures à 22°C. Les grilles ont ensuite été rincées dans du TBS, exposées pendant 1 min à une solution 1% glutaraldéhyde, rincées une fois de plus dans du TBS et exposées pendant 2 min à une solution 2% citrate de plomb. Les grilles ont enfin été observées à 30,0 K avec un microscope JEM-1200EX (JEOL, Chantilly, VA).

11. Co-immunoprécipitation

Pour réaliser les co-immunoprécipitations, nous avons utilisé la trousse de Sigma Protein G immunoprecipitation kit. Deux cent cinquante millions de plaquettes ont été incubées avec de la LB1 à une concentration de $0,2 \mu\text{g}/10^6$ plaquettes pendant 2 min à 25°C , activées pendant 2 min avec $0,05$ unité/mL de thrombine et centrifugées à $220 \times g$ pendant 5 min. Les surnageants ont ensuite été aspirés pour retirer toute LB1 non-liée et les plaquettes ont été lavées trois fois dans du HBSS-complet avant d'être resuspendues et soniquées dans ce même tampon. Nous avons ensuite ajouté $495 \mu\text{L}$ de tampon IP, $25 \mu\text{L}$ d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (Roche) et 1:50 d'anti-récepteur d'insuline (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) à la solution de plaquettes et l'avons laissée incuber pendant 18 heures à 4°C . La suite des manipulations fut accomplie en suivant les recommandations du fabricant. Les protéines immunoprécipitées ont finalement été séparées sur des gels SDS-PAGE et analysées par immunobuvardage avec l'anti-LB1 GP5 (1:333) et un anti-cochon d'Inde couplé à de la HRP (1:7000; Jackson ImmunoResearch).

12. Liaison entre la LB1 et un peptide recombinant de la chaîne β du récepteur de l'insuline détectée par ELISA

Une plaque de 96 puits en polystyrène fut enduite avec des quantités variables de LB1 (0-300 ng) pendant 18 heures à 4°C . Les puits ont ensuite été lavés avec une solution de PBS-0,5% T20, bloqués avec du PBS-BSA 1% pendant 2 heures puis incubés pendant 1 heure 30 min avec 100 ng de peptide recombinant de la chaîne β du récepteur de

l'insuline (Abnova, Huissen, Netherlands) ou 100 ng de protéine GST. Suite à trois lavages avec du PBS-0,5% T20, les protéines recombinantes fixées à la LB1 ont été détectées avec un anticorps anti-GST couplé à de la HRP (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Royaume-Uni) à une concentration de 1:1000. Entre chacune des incubations, les puits ont été lavés avec du PBS-0,5% T20. La liaison a été révélée avec 8 mg/mL d'*o*-phénylénédiamine, tel que décrit précédemment.

13. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) et immunobuvardage

Pour les électrophorèses en système continu, nous avons suivi le protocole standard de Laemmli en utilisant les appareils Mini Protean® 3 cell (Bio-Rad, CA). Les gels de 8% à 10% de polyacrylamide, ayant servi pour la migration des lysats cellulaires et des protéines, ont été équilibrés dans la solution de transfert (31 mM Tris-HCL pH 8,75, 240 mM glycine, 20% méthanol). Les protéines ont ensuite été transférées de manière wet ou dry. Les membranes ont été colorées préalablement au rouge Ponceau S (3% acide trichloroacétique, 3% acide sulfosalicylique et 2% Ponceau S) afin de s'assurer de l'efficacité du transfert.

Les sites non-spécifiques des membranes de nitrocellulose ont été bloqués avec une solution Tris-HCL additionnée de 5% lait écrémé en poudre et de 0,5% Tween-20 pendant 2 heures à la température de la pièce. Les anticorps primaires ont ensuite été incubés avec les membranes pendant 1 heure à la température de la pièce, aux dilutions mentionnées. Après trois lavages de 5 min avec du TBS-Tween (TBST, variant de 0,1 à 0,5%), les membranes ont été incubées pendant une heure avec les anticorps secondaires

respectifs, tous conjugués à la HRP. Les membranes ont finalement été incubées 5 min avec le substrat SuperSignal® West Pico Chemiluminescent (Pierce) et exposée à des films BioMax XAR de Kodak (NY).

Pour les essais de phosphorylation, les anticorps isoformes-spécifiques et phospho-spécifiques, dirigés contre PKC δ , MEK1/2, ERK1/2 et p38 MAPK, provenaient de Cell Signaling Technology. Les plaquettes ont été stimulées à la thrombine (0,05 unité/mL) en présence de tampon HBSS-complet, de NH₂-LB1 ou de LB1; la réaction fut interrompue par l'ajout de tampon SDS-Laemmli. Les protéines ont ensuite été analysées par immunobuvardage.

Les anticorps isoformes-spécifiques et pan-spécifiques dirigés contre IR^{Y1146}, IRS-1^{Y1170}, PI3K^{T458/T199}, Akt-1 (PKB)^{S473}, GSK α ^{S21}, GSK β ^{S9} et Tau^{S720} provenaient de Kinexus (Vancouver, BC). Les plaquettes ont été stimulées à la thrombine (0,05 unité/mL) en présence de tampon HBSS-complet ou de LB1 pour le temps indiqué et furent ensuite préparées selon les recommandations de Kinexus. Les échantillons ont ensuite été analysés chez Kinexus. Ce service utilise une technologie basée sur l'immunobuvardage qui génère un profil d'identification unique pour chacun des échantillons testés. La technologie permet d'évaluer les variations de chimioluminescence entre les échantillons et donc de vérifier la différence d'expression ou de phosphorylation d'une protéine dans le temps, suite à un traitement. Les résultats fournis par la compagnie contenaient les immunoblots des protéines testées et les valeurs de chimioluminescence émise par minute (CPM) pour chacune des bandes correspondantes à ces protéines.

Pour les essais de phosphorylation impliquant les complexes anti-LB1/LB1, les anticorps isoformes-spécifiques, dirigés contre PKC δ , MEK1/2 et p38 MAPK, provenaient de Kinexus. Les plaquettes ont été stimulées à la thrombine (0,05 unité/mL) en présence de tampon HBSS-complet ou de complexes anti-LB1/LB1 dans un ratio molaire de 1:1 pour le temps indiqué et furent ensuite préparées selon les recommandations de Kinexus. Les échantillons ont ensuite été analysés chez Kinexus.

Pour la détection de la LB1 dans les lysats plaquettaires, les plaquettes (1×10^9) de 3 patients lupiques anti-LB1 positifs et de 3 sujets sains ont été lysées dans du tampon SDS-Laemmli. Les protéines ont ensuite été analysées par immunobuvardage avec l'anti-LB1 GP5.

14. Analyses statistiques

Pour un même individu, les réponses à différents traitements furent comparées par des analyses de variance avec le Bonferroni t test. Les variations entre les groupes composés de différents individus furent, quant à elle, analysées avec le test de Tukey, par une analyse de variance.

Résultats

1. Effet de la LB1 et des anti-LB1 sur les cellules endothéliales et les plaquettes

Puisque les cellules endothéliales et les plaquettes jouent un rôle crucial dans les processus d'hémostase, elles sont toutes deux des cibles potentielles de la LB1 ou des anti-LB1. Pour vérifier cette hypothèse, des essais fonctionnels d'activation de cellules endothéliales et de plaquettes ont été effectués en présence de LB1 recombinante ou d'anti-LB1 purifiés par affinité.

1.1 La LB1 et les anti-LB1 sont sans effet sur l'activation endothéliale

L'activation des cellules endothéliales est associée à l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion telles que l'ICAM, la VCAM-1 et la E-sélectine. Ces molécules de surface sont souvent détectées par cytométrie en flux et une modulation de leur expression reflète l'état d'activation des cellules endothéliales. Nous savions déjà que les anti-LB1 seuls étaient sans effet sur l'activation endothéliale (Dieudé, M. communication personnelle, résultats non-présentés) puisqu'ils étaient incapables de moduler l'expression des molécules d'adhésion ci-haut mentionnées. Des résultats semblables ont été obtenus avec la LB1 seule. Bien qu'une faible diminution dans l'expression de la VCAM ait été observée chez les cellules traitées à la LB1, aucune différence significative dans l'expression de la VCAM, de la E-sélectine et de l'ICAM n'a été mesurée à la surface d'HUVEC activées en présence de LB1, en comparaison avec des HUVEC activées seules (Act) ou activées en présence de LB1 tronquée (NH₂-LB1, expliqué dans la section

suivante) (Fig.10). La polymyxine B seule était sans effet sur l'activation des cellules endothéliales. Ces résultats suggèrent que la LB1 ne module pas l'activation des cellules endothéliales.

1.2 La LB1 diminue l'activation plaquettaire tandis que les anti-LB1 sont sans effet

Plusieurs changements surviennent dans les plaquettes suite à une exposition à des agonistes solubles. Parmi ceux-là, mentionnons l'externalisation de la P-sélectine, un marqueur d'activation normalement situé dans les granules α . Afin d'analyser l'effet de la LB1 et des anti-LB1 sur l'activation plaquettaire, des plaquettes, pré-incubées ou non avec de la LB1 ou des anti-LB1 à des molarités équivalentes, ont été stimulées par la thrombine, puis analysées par cytométrie en flux pour mesurer la présence de P-sélectine à leur surface. Tel qu'observé à la Fig.11, la LB1, contrairement aux anti-LB1, diminue l'externalisation de la P-sélectine à la surface des plaquettes activées. Une concentration variant de 0,2 à 0,25 μg de LB1/ 10^6 plaquettes semble suffisante pour obtenir une diminution significative de l'activation plaquettaire. Cet effet est aboli lorsqu'une forme tronquée de LB1 (NH₂-LB1), possédant seulement la partie N-terminale de la protéine, est utilisée (Fig.11). Puisque ce fragment est exprimé et purifié de la même façon que la LB1 entière, il a été utilisé comme contrôle négatif pour toutes les expériences. Il est à noter que de l'albumine humaine (HSA), possédant un poids moléculaire équivalent à celui de la LB1, et des IgG humains purifiés furent également utilisés comme contrôles dans toutes les expériences présentées, à l'exception de celles effectuées par la compagnie Kinexus (voir p.133-138). Puisque dans tous les cas la HSA et la NH₂-LB1, ainsi que les anti-LB1 et les IgG humains purifiés, produisaient des résultats similaires sur les

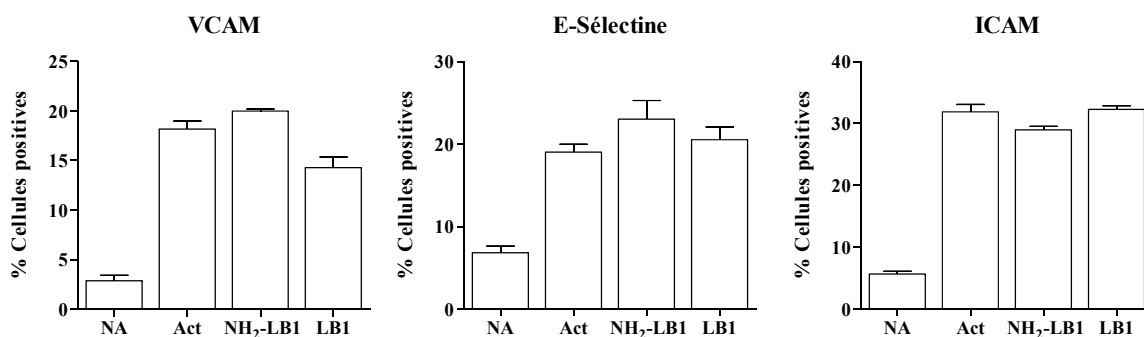


Figure 10: La LB1 est sans effet sur l'expression des molécules d'adhésion VCAM, E-sélectine et ICAM

Des cellules HUVEC furent traitées avec du tampon HBSS-complet, de la LB1 ou de la NH₂-LB1, puis activées avec 8 unités/mL de thrombine en présence de polymyxine B. L'expression des molécules VCAM, E-sélectine et ICAM fut mesurée par cytométrie en flux. Les résultats sont représentatif de trois expériences indépendantes ($n=3$) effectuées sur des cellules endothéliales dont la moyenne du pourcentage de cellules positives pour chacune de ces molécules \pm SEM sont compilées dans l'histogramme. *NA=Non-activées et traitées avec du HBSS-complet, Act=Activées et traitées avec du HBSS-complet.*

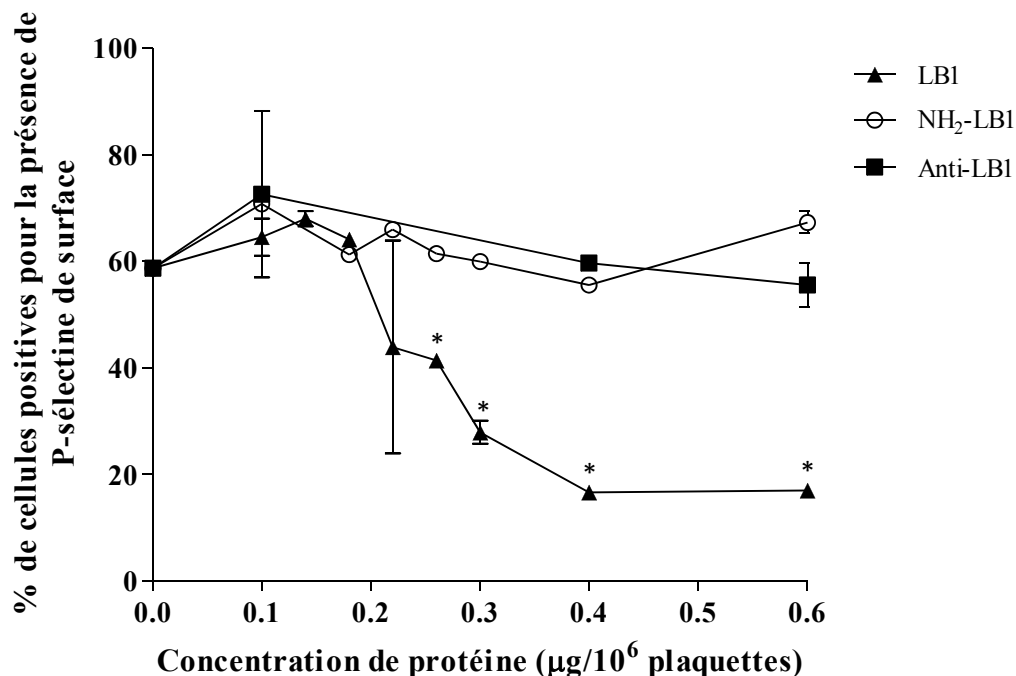


Figure 11: La LB1 diminue l'externalisation de la P-sélectine tandis que les anti-LB1 sont sans effet

Des plaquettes humaines isolées furent traitées avec différentes concentrations de LB1 ou d'anti-LB1. Les plaquettes furent activées avec 0,05 unité/mL de thrombine. L'externalisation de la P-sélectine fut mesurée par cytométrie en flux. Les pourcentages moyens de P-sélectine de surface \pm SEM sont compilés dans le graphique. Les expériences furent répétées sur les plaquettes de 3 sujets distincts ($n=3$). *, $p < 0,05$ = significativement différents des valeurs du groupe contrôle NH₂-LB1.

différentes cellules utilisées (exemple en Annexe-2), les résultats obtenus avec la HSA et les IgG humains purifiés ne seront pas présentés pour faciliter la lecture des graphiques.

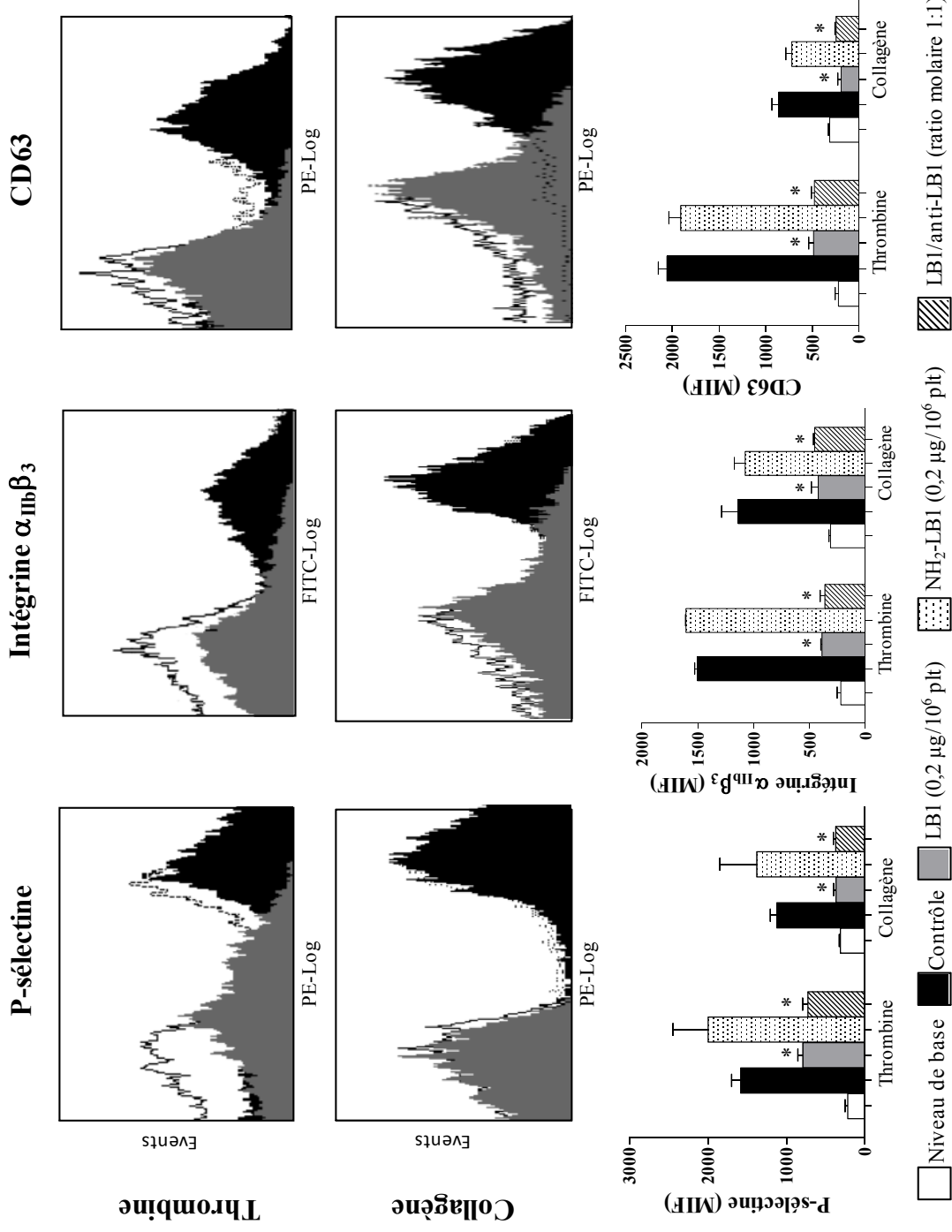
L'effet de la LB1 sur l'externalisation de la P-sélectine suggère qu'elle possède des propriétés inhibitrices sur l'activation plaquettaire. Cependant, outre l'externalisation de la P-sélectine, plusieurs autres changements se produisent à la surface des plaquettes lors de leur activation. La redistribution à la surface cellulaire du CD63, normalement situé dans les lysosomes, ainsi que le passage de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ d'une conformation inactive à une conformation active, pour lui permettre de lier son ligand, font aussi partie de ces changements (Michelson, 2006). Afin de vérifier si l'activité de la LB1 se limitait à l'inhibition de l'externalisation de la P-sélectine, des études de cytométrie en flux furent entreprises pour mesurer les niveaux de CD63 et d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ actifs à la surface de plaquettes activées, pré-incubées avec de la LB1 ($0,2 \mu\text{g}/10^6$ plaquettes). Tel qu'observé à la Fig.12, l'externalisation du CD63 tout comme celle de la P-sélectine, ainsi que l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, induites par le collagène ou la thrombine, sont inhibées par la LB1. L'ajout d'anti-LB1, dans des rapports de molarité de 1:1, 2:1 et 3:1 (rapport de 2:1 et 3:1 non-présentés) avec la LB1, ne modifie pas l'effet de l'auto-antigène sur l'activation plaquettaire.

1.3 La LB1 diminue l'agrégation plaquettaire tandis que les anti-LB1 sont sans effet

L'activation prélude à l'agrégation plaquettaire, étape essentielle de formation d'un caillot sanguin. Plusieurs voies d'activation induites par différents agonistes permettent

Figure 12: La LB1 diminue l'activation plaquettaire

Des plaquettes humaines (plt) isolées furent traitées avec de la LB1 ou du NH₂-LB1 (0,2 µg/10⁶ plt) avant d'être activées avec 0,05 unités/mL de thrombine ou 2 µg/mL de collagène. L'externalisation de la P-sélectine et du CD63, ainsi que l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ furent mesurées par cytométrie en flux. Les tracés de recouvrement (*blanc*, activation basale; *gris*, LB1; ligne *pointillée*, NH₂-LB1) sont exprimés sous forme d'intensité de fluorescence et sont représentatifs des données moyennes obtenues lors des expériences effectuées sur les plaquettes de 3 sujets distincts ($n=3$). Les moyennes d'intensité de fluorescence et les SEM sont compilées dans le graphique. *, $p < 0,05$ = significativement différents des valeurs du groupe contrôle (plaquettes activées). La présence d'anti-LB1 purifiés à une molarité équivalente (1:1) n'a pas inhibé l'effet de la LB1.

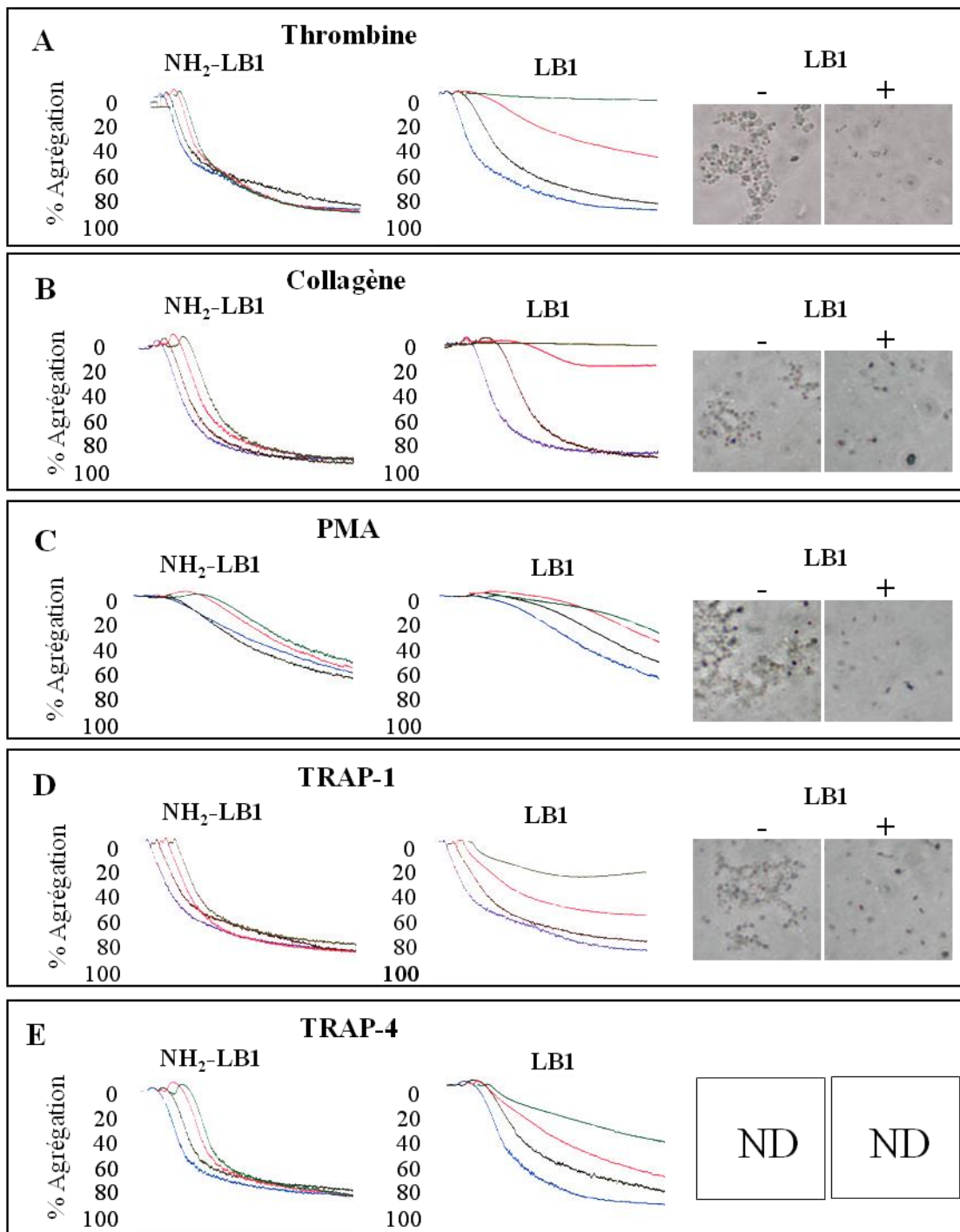


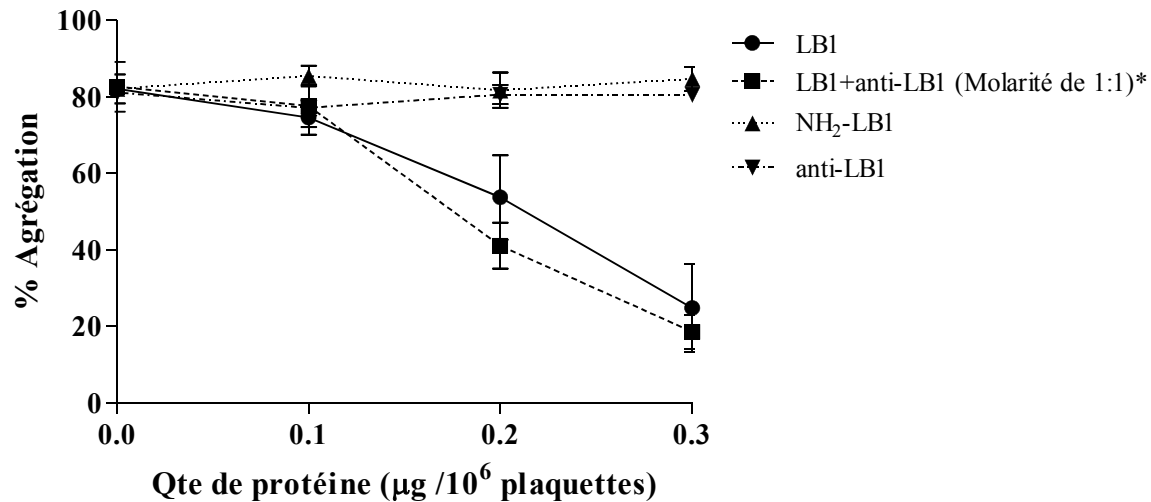
aux plaquettes de s'associer. Le blocage de l'une ou l'autre de ces voies peut empêcher la formation d'un agrégat. L'effet de la LB1 sur l'agrégation plaquettaire induite par différents agonistes fut donc étudié pour déterminer la ou les voies d'activation inhibées par l'auto-antigène. La thrombine, le collagène, le phorbol myristate acétate (PMA), le "Thrombin PAR-1 activating peptide" (TRAP-1) et le "Thrombin PAR-4 activating peptide" (TRAP-4), induisant tous des voies distinctes d'activation plaquettaire, ont été utilisés. Tel qu'observé à la Fig.13, la LB1 retarde et diminue l'agrégation des plaquettes en présence de tous les agonistes testés, à une concentration de $0,2 \mu\text{g}$ de LB1/ 10^6 plaquettes, contrairement à la NH_2 -LB1. À une concentration de $0,1 \mu\text{g}/10^6$ plaquettes, la LB1 retarde mais ne diminue pas l'agrégation plaquettaire finale stimulée par chacun des agonistes. Lorsque $0,3 \mu\text{g}$ de LB1/ 10^6 plaquettes est utilisé, on observe une inhibition complète de l'agrégation plaquettaire provoquée par la thrombine ou le collagène. Bien qu'à cette concentration l'inhibition des agonistes PMA, TRAP-1 et TRAP-4 ne soit pas complète, l'agrégation plaquettaire reste nettement diminuée par la LB1, un effet maintenu en présence d'anti-LB1 à un ratio molaire de 1:1 (Fig.14). Les anti-LB1 seuls, sont toutefois sans effet sur l'agrégation plaquettaire stimulée par la thrombine (Fig.14).

Pour déterminer si la LB1 gardait toujours ses propriétés anti-plaquettaires dans un milieu physiologique contenant les facteurs de coagulation, nous avons répété les expériences d'agrégométrie sur du plasma riche en plaquettes (PRP) humain et de rat. L'intérêt de faire des expériences en parallèle sur du PRP humain et de rat est de comparer les doses nécessaires pour obtenir une inhibition d'activation plaquettaire, permettant plus aisément d'utiliser ultérieurement un modèle animal pour étudier les propriétés anti-thrombotiques de la LB1. Nous avons utilisé le TRAP-4 comme agoniste

Figure 13: La LB1 diminue l'agrégation plaquettaire

Des plaquettes humaines isolées furent traitées avec différentes concentrations de LB1 ou de NH₂-LB1 avant d'être activées avec **(A)** 0,1 unité/mL de thrombine; **(B)** 2 µg/mL de collagène; **(C)** 1 µM de PMA; **(D)** 5 µM de TRAP-1; **(E)** 125 µM de TRAP-4. Les tracés d'agrégation plaquettaire sont représentatifs de 4 expériences indépendantes, effectuées sur les plaquettes de sujets distincts. Les photos de droite représentent des plaquettes, traitées (+) ou non-traitées (-) avec 0,2 µg de LB1/10⁶ plaquettes et stimulées pendant 2 min avec l'agoniste indiqué. *ND: non-disponible, — 0 µg/10⁶ plaquettes, — 0,1 µg/10⁶ plaquettes, — 0,2 µg/10⁶ plaquettes, — 0,3 µg/10⁶ plaquettes.*





* La quantité de protéine se réfère à la LB1

Figure 14: Les anti-LB1 ne diminuent pas l'effet anti-plaquettaire de la LB1

La présence de complexes anti-LB1/LB1 a le même effet sur l'agrégation plaquettaire que la LB1 seule. Des plaquettes humaines isolées furent traitées avec différentes concentrations de LB1, de NH₂-LB1, d'anti-LB1 ou de LB1 en présence d'anti-LB1 (LB1+anti-LB1) à un ratio molaire de 1:1 avant d'être activées avec de la thrombine (0,1 unité/mL). Les résultats présentés sont représentatifs de 2 expériences ($n=2$) effectuées sur les plaquettes de sujets distincts dont les moyennes de pourcentage d'agrégation \pm variation sont compilées dans le graphique.

en raison de sa capacité à induire l'activation plaquettaire dans le plasma humain et de rat. Nous avons observé que la LB1 diminue l'agrégation plaquettaire induite par le TRAP-4 chez l'homme et le rat (Fig.15). Chez l'homme, la LB1 semble cependant moins efficace sur du PRP (Fig.15A) que sur des plaquettes lavées (Fig.13). Une concentration de 0,3 μg de LB1/ 10^6 plaquettes est requise pour obtenir une désagrégation plaquettaire partielle avec du PRP. Chez le rat, on observe une situation différente. Une dose de 0,05 μg de LB1/ 10^6 plaquettes est suffisante pour inhiber l'agrégation plaquettaire (Fig.15B). Cette dose est quatre fois moins élevée que celle requise chez l'humain (0,2 μg de LB1/ 10^6 plaquettes, Fig.13) pour obtenir une inhibition sur des plaquettes isolées. Chez le rat, l'effet de la LB1 s'apparente à celui causé par un antagoniste connu, le peptide GR144053 (Fig.15C), qui est un inhibiteur de l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (Matsuno et al., 1999). En effet, la moyenne du pourcentage d'agrégation chez des plaquettes activées à la thrombine, suite à une incubation avec le peptide GR ou de la LB1 est réduit de façon similaire et significative, comparativement à ceux des contrôles (Ctl: 46.0 ± 2.08 ; GR: 24.67 ± 14.15 ; LB1: 27.67 ± 3.9 ; NH₂-LB1: 43.33 ± 6.0).

1.4 La LB1 diminue la sécrétion de TxA₂

Le TxA₂ est libéré lors de l'activation plaquettaire et se lie à son récepteur, à la surface des plaquettes, où il agit en tant qu'agent agrégeant extrêmement puissant (Michelson, 2006). L'effet de la LB1 sur l'activation et l'agrégation plaquettaire, pourrait également être dû en partie au dérèglement des boucles de rétrocontrôles positives essentielles au recrutement et à l'activation des plaquettes nouvellement arrivées dans un thrombus en formation. Une pré-incubation des plaquettes avec de la LB1, suivi de leur

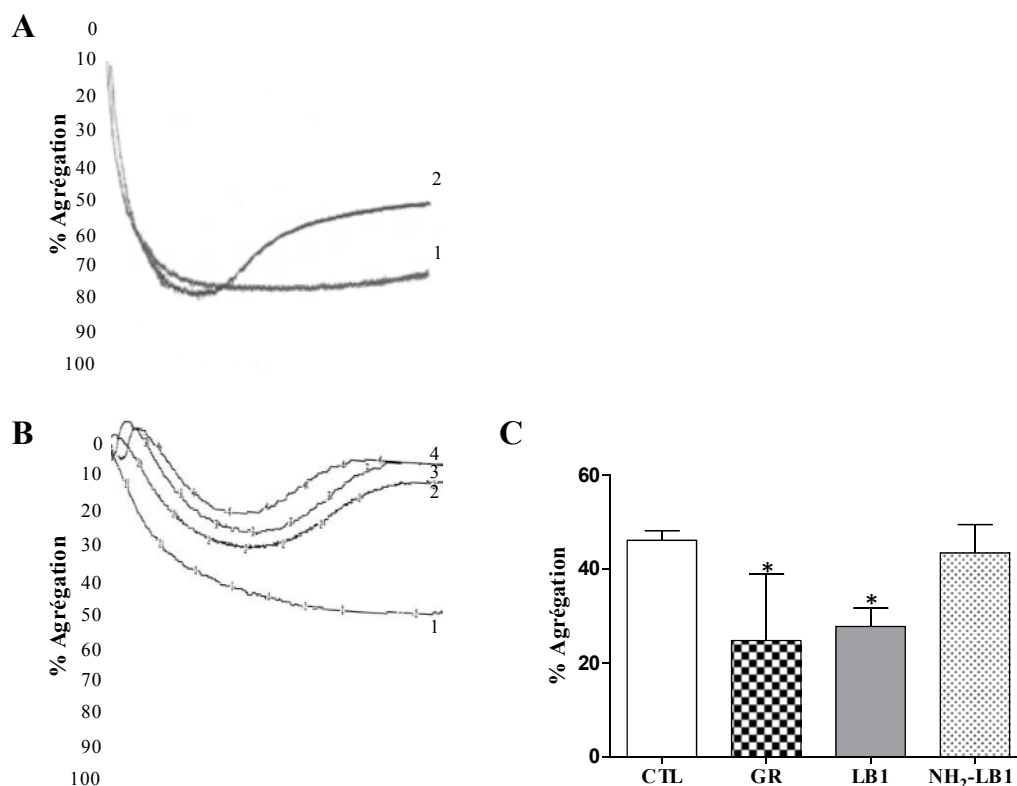


Figure 15: La LB1 inhibe l'agrégation plaquettaire induite par le TRAP-4 dans du PRP humain et de rat

(A) Du PRP humain fut traité avec $0,3 \mu\text{g}/10^6$ plaquettes (plt) avant d'être stimulé avec $125 \mu\text{M}$ de TRAP-4. $1=0 \mu\text{g}/10^6 \text{ plt}$, $2=0,3 \mu\text{g}/10^6 \text{ plt}$. (B) Du PRP de rat fut traité avec différentes concentrations de LB1 et stimulé avec $100 \mu\text{M}$ de TRAP-4. $1=0 \mu\text{g}/10^6 \text{ plt}$, $2=0,05 \mu\text{g}/10^6 \text{ plt}$, $3=0,1 \mu\text{g}/10^6 \text{ plt}$, $4=0,2 \mu\text{g}/10^6 \text{ plt}$. Le tracé d'agrégométrie est représentatif de 4 expériences effectuées sur 4 sujets distincts. (C) Du PRP de rats fut traité avec 40 ng de GR 144053, de la LB1 ou de la NH₂-LB1 à une concentration de $0,05 \mu\text{g}/\text{mL}$ et fut stimulé avec $100 \mu\text{M}$ de TRAP-4. Les expériences furent effectuées sur les plaquettes de 4 sujets distincts ($n=4$) dont les moyennes de pourcentage d'agrégation et les SEM sont compilées dans l'histogramme. *, $p < 0,1$ par rapport aux valeurs du groupe contrôle. GR=inhibiteur d'agrégation plaquettaire.

activation par la thrombine, nous a permis de constater que la sécrétion de TxA₂ est diminuée significativement et ce, de façon dose-dépendante, en présence de l'auto-antigène ($p < 0,005$). La NH₂-LB1, quant à elle, est sans effet (Fig.16A).

Il est bien établi que la PKC δ ainsi que ses effecteurs MEK, ERK et p38 sont essentiels à la sécrétion de TxA₂ stimulée par la thrombine et le collagène (Yacoub et al., 2006). Une pré-incubation des plaquettes avec de la LB1 diminue également la phosphorylation de PKC δ , MEK1/2, ERK 1/2 et p38 MAPK alors que la NH₂-LB1 reste sans effet sur ces réactions de phosphorylation (Fig.16B). Ces résultats suggèrent donc que la LB1 peut empêcher le recrutement et l'activation de nouvelles plaquettes en interférant avec la phosphorylation des voies de signalisation impliquant la PKC δ , menant ainsi à l'abolition de la sécrétion de TxA₂.

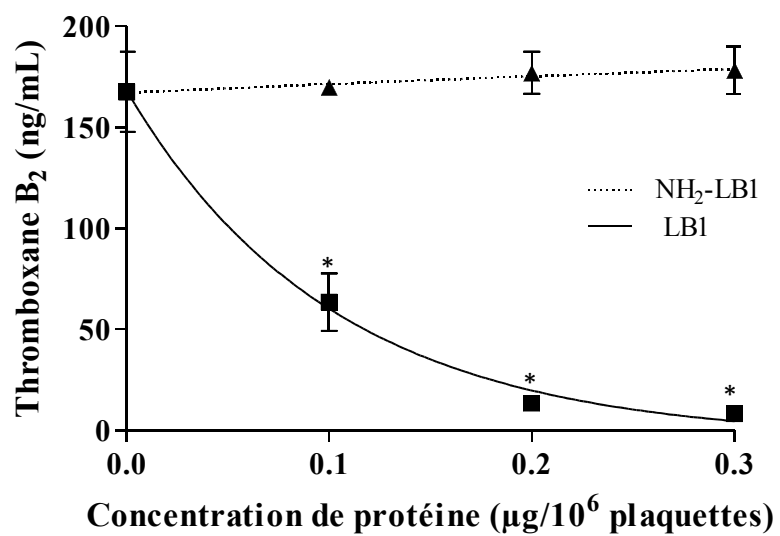
2. La LB1 est libérée par les cellules endothéliales et les neutrophiles en apoptose

Dans la majorité des types cellulaires la LB1 est exclusivement présente dans le noyau (Wilson et al., 2001). La présence d'anti-LB1 chez certains patients lupiques indique toutefois qu'elle a dû être disponible à l'extérieur de la cellule pour stimuler la production de tels anticorps. En cours d'apoptose, des auto-antigènes nucléaires, tels que la LB1, peuvent être relâchés dans le milieu extracellulaire ou redistribués à la surface de certaines cellules, telles que les neutrophiles (Moisan and Girard, 2006). Il est bien connu que les neutrophiles et les cellules endothéliales sont impliqués dans le développement de thromboses via des interactions directes ou indirectes avec les plaquettes (Afshar-

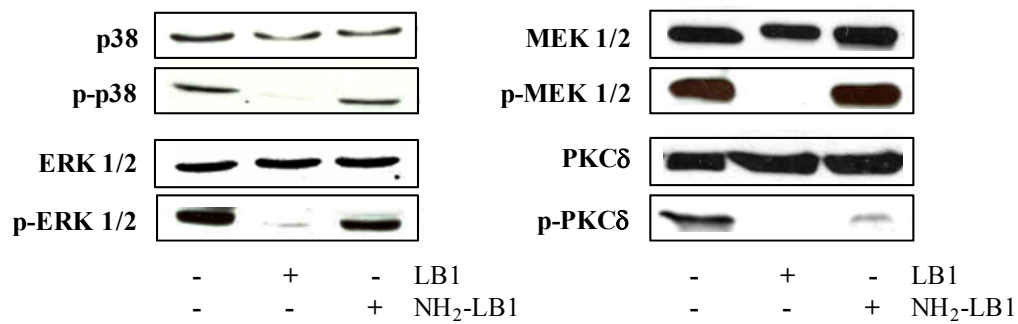
Figure 16: La LB1 inhibe la sécrétion de TxA₂ en interférant avec les voies de signalisation induites par la PKC δ

(A) La LB1 a diminué la sécrétion de TxA₂, de façon dose-dépendante, pour les plaquettes activées avec 0,05 unité/mL de thrombine. La NH₂-LB1 n'a eu aucun effet. Le graphique est représentatif de 3 expériences indépendantes. * $P < 0,005$. (B) La LB1 inhibe la phosphorylation de la PKC δ , ERK1/2 et p38. Les plaquettes furent incubées avec 0,2 μ g de LB1/10⁶ plaquettes et furent ensuite stimulées avec de la thrombine pendant 2 min. Des lysats plaquettaires totaux furent ensuite séparés sur des gels SDS-PAGE et soumis à un immunobuvardage avec les anticorps phospho-spécifiques et pan-spécifiques. Les expériences furent effectuées sur les plaquettes de 3 sujets distincts ($n=3$) dont les moyennes de concentration de TxB₂ et les SEM sont compilées dans le graphique. *, $p < 0,05$ = significativement différents des valeurs du groupe contrôle NH₂-LB1.

A



B



Kharghan and Thiagarajan, 2006; McGregor et al., 2006; von Hundelshausen and Weber, 2007; Si-Tahar et al., 1997; Goel et Diamond, 2001). La libération de LB1 par ces cellules, au cours de l'apoptose, serait une source *in vivo* de LB1 extracellulaire, disponible pour agir sur les plaquettes. Le surnageant de neutrophiles et de cellules endothéliales (HUVEC) apoptotiques fut donc recueilli et testé par immunobuvardage pour déceler la présence de LB1. L'apoptose des neutrophiles fut induite par une incubation des cellules à 37°C, pendant 24 heures. Dans de telles conditions, les neutrophiles entrent en apoptose spontanément. L'apoptose endothéliale, quant à elle, fut induite par la privation de facteurs de croissance dans le milieu de culture de HUVEC, pendant 72 heures. Dans de telles conditions, l'apoptose induite dans plus de 90% des cellules est tardive, i.e. une nécrose secondaire, favorisant la libération du contenu cellulaire. Nous avons constaté que la LB1 est bien présente dans le surnageant de neutrophiles (Fig.17B) et de cellules endothéliales (Fig.17A) en apoptose, alors qu'elle est absente du surnageant de cellules non-apoptotiques. La LB1 libérée par les cellules endothéliales apoptotiques est présente sous forme de fragments de 47 et de 25 kDa, suite à l'action des caspases (Fig.17A), contrairement à celle libérée par les neutrophiles apoptotiques. La différence de temps existant entre l'induction de l'apoptose chez les neutrophiles (24 heures) et chez les cellules endothéliales (72 heures) pourrait être à l'origine des variations de clivage observées chez les deux types cellulaires. Un lysat de cellules endothéliales non apoptotiques, qui possèdent de la LB1 non clivée à 67 kDa, ainsi que de la LB1 recombinante complète furent utilisés comme contrôles positifs.

Afin de vérifier si la LB1 extracellulaire a les mêmes propriétés que la LB1 recombinante, le surnageant de neutrophiles apoptotiques fut ajouté à une préparation de

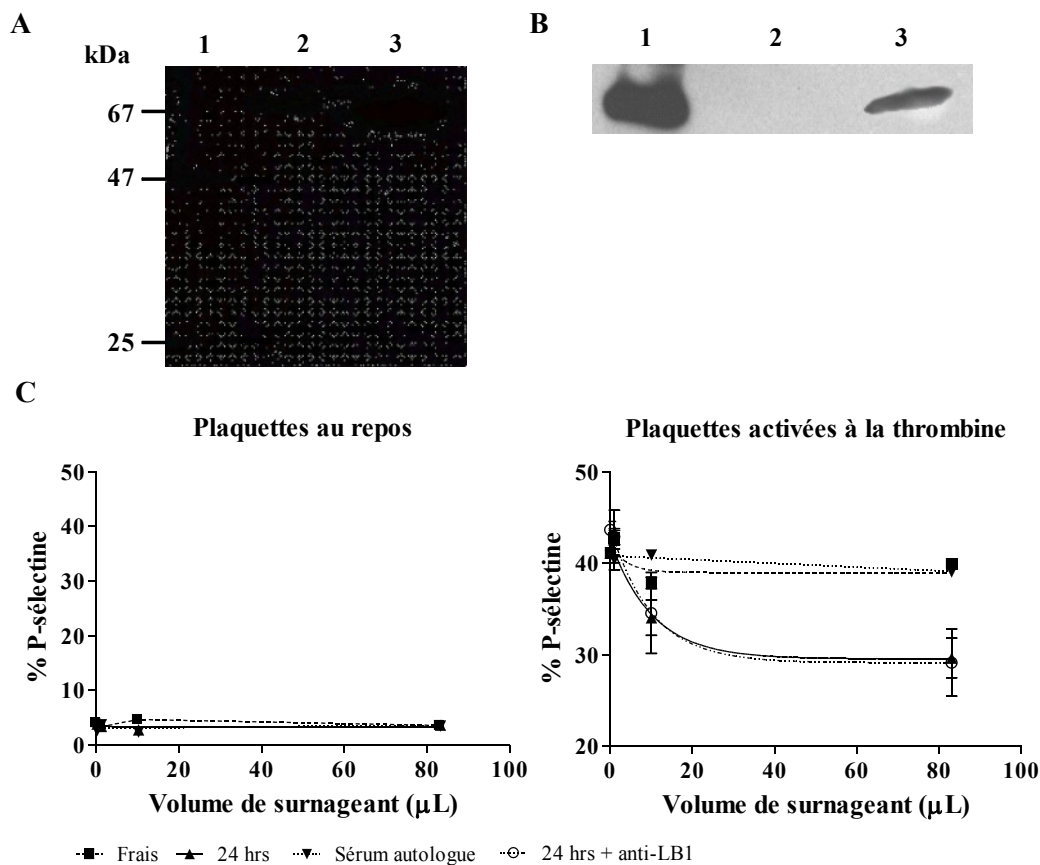


Figure 17: La LB1 est libérée par des cellules en apoptose

(A) Les cellules endothéliales (HUVEC) libèrent de la LB1 dans le milieu extracellulaire lorsqu'elles sont en apoptose tardive ou nécrose secondaire. 1= surnageant d'HUVEC en apoptose; 2=Lysat de HUVEC fraîches; 3=LB1 recombinante. Les flèches indiquent la position des fragments de la LB1 à 47 et 25 kDa (B) La LB1 est relâchée par les neutrophiles en apoptose. 1=LB1 recombinante; 2=surnageant de neutrophiles frais; 3=surnageant de neutrophiles apoptotiques. (C) Le surnageant de neutrophiles apoptotiques diminue l'externalisation de la P-sélectine à la surface des plaquettes activées. Les expériences furent effectuées sur les plaquettes de 2 sujets distincts ($n=2$) dont les moyennes de pourcentage de P-sélectine de surface et les variations sont compilées dans le graphique.

plaquettes au repos. Les plaquettes furent ensuite activées à la thrombine et l'activation plaquettaire, à travers l'expression de surface de la P-sélectine, fut mesurée. Une diminution dose-dépendante de l'externalisation de la P-sélectine s'est produite chez les plaquettes exposées au surnageant de neutrophiles en apoptose contenant de la LB1 (Fig.17C). Pour les plaquettes incubées avec du surnageant de neutrophiles frais ou du sérum autologue, aucune variation dans l'externalisation de la P-sélectine n'a été observée (Fig.17C). Ces résultats suggèrent que la LB1 présente dans le surnageant de neutrophiles apoptotiques, inhibe l'activation plaquettaire. Cette hypothèse reste toutefois à confirmer. L'effet de d'autres surnageants de cellules apoptotiques, tels que ceux des cellules endothéliales, doit également être testé sur l'activation plaquettaire.

3. La LB1 diminue la formation d'un thrombus artériel dans un modèle *in vivo* de thrombose chez le rat

Un modèle de thrombose artérielle chez le rat, induite par le chlorure de fer, (Kurz et al., 1990) permet de vérifier l'efficacité de divers agents anti-thrombotiques. Il a été largement utilisé par d'autres groupes de recherche pour induire des dommages sévères à l'endothélium et causer l'occlusion des vaisseaux. Une exposition au FeCl_3 cause une blessure à l'endothélium exposant ainsi la matrice sous-endothéliale. Les plaquettes peuvent alors réagir avec le collagène et le vWF par l'entremise de leurs GPIb-V-IX et leurs intégrines $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (Furie et Furie, 2005). La diminution de l'agrégation plaquettaire induite par le collagène suite à une incubation avec la LB1 implique que l'auto-antigène

pourrait altérer l'interaction entre les plaquettes et cet agoniste. Si tel était le cas, la LB1 pourrait alors moduler la formation d'un thrombus induit par le chlorure de fer. Des études effectuées sur la carotide de rats (traités ou non à la LB1) exposée au FeCl₃, nous ont permis de démontrer cette hypothèse. Nous avons constaté que chez les rats pré-traités avec du tampon HBSS-complet, i.e. le véhicule, le traitement de la carotide avec une solution de 50% de FeCl₃ produit dans 90% des cas une obstruction complète du vaisseau sanguin après 60 min (Fig.18A). Le temps moyen d'occlusion (TTO) du vaisseau, désigné comme étant le temps nécessaire pour obtenir une occlusion complète du vaisseau, est de $23 \pm 2,4$ min (Fig.18B). Un thrombus stable se forme dans la carotide, bloquant ainsi le flux sanguin. Une occlusion stable se forme également chez 70% des rats traités avec 2 mg/kg de LB1 (Fig.18A) mais elle prend plus de temps à se former en présence de l'auto-antigène (TTO $34 \pm 3,5$ min, Fig.18B). Chez environ la moitié des rats traités à la LB1, nous avons de plus observé qu'un petit caillot sanguin se formait au début du traitement, pour ensuite se détacher, reflétant l'instabilité des caillots sanguins en présence de LB1. Afin d'attribuer à la LB1 l'effet anti-thrombotique observé, l'absence d'activité de la NH₂-LB1 devra être démontrée *in vivo*.

4. La LB1 se lie aux plaquettes et est internalisée au moment de l'activation

Le fait que la LB1 diminue l'activation et l'agrégation plaquettaires *in vitro* implique qu'elle doit interagir directement ou indirectement avec les plaquettes. Une exposition des plaquettes à de la LB1 dans des plaques ELISA nous a permis de démontrer que l'auto-antigène interagissait physiquement avec les plaquettes (Fig.19).

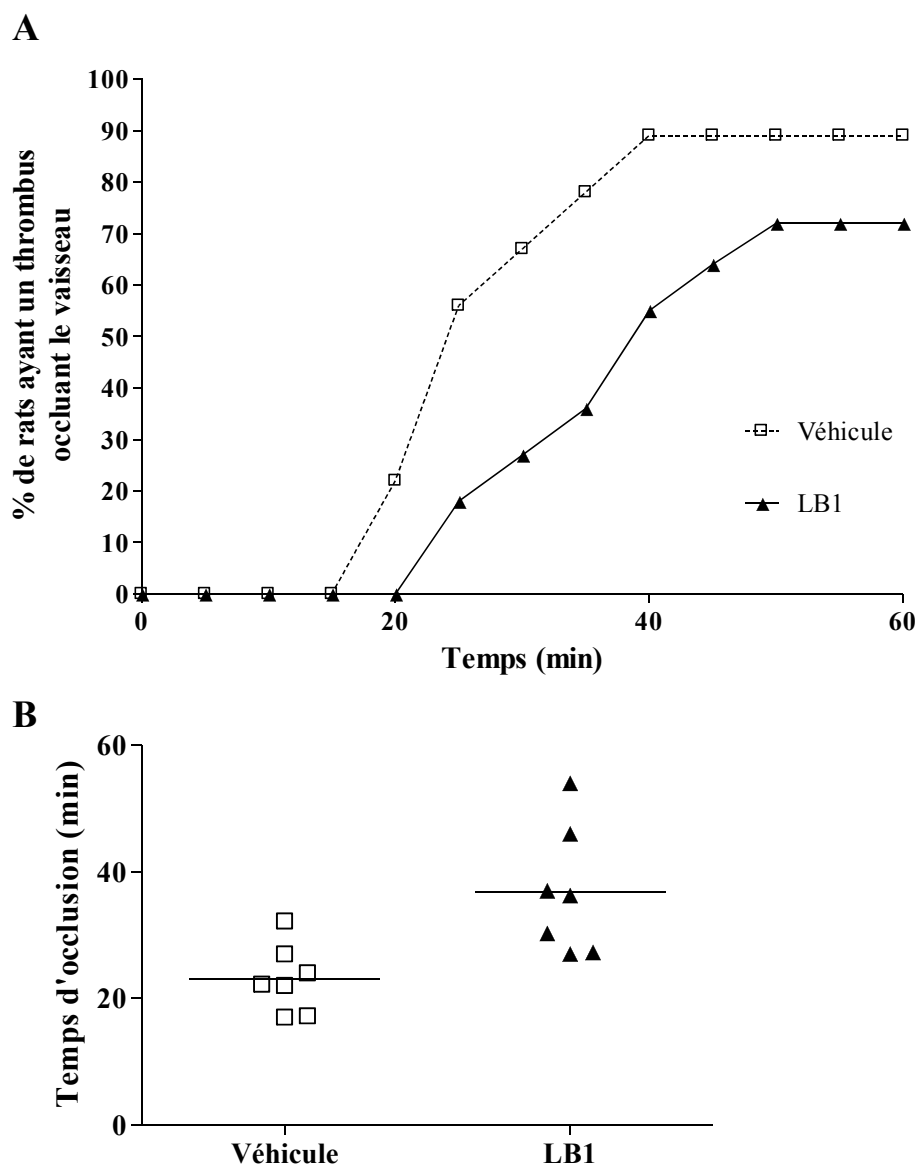


Figure 18: La LB1 diminue la formation de thrombus dans la carotide des rats

(A) Le traitement de la carotide des rats avec du FeCl_3 produit une occlusion complète après 60 min chez 90 % des animaux traités avec le véhicule, comparativement à 70% des animaux traités avec 2mg/kg de LB1. (B) Le temps d'occlusion était augmenté chez les rats traités à la LB1 (2 mg/Kg) comparativement à ceux traités avec le véhicule. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM ($p = 0,02$, $n = 7$).

Puisque les plaquettes ne possèdent pas de noyau, la LB1 est considérée comme étant absente de ces cellules, un fait que nous avons confirmé par l'absence de liaison de l'anti-LB1 GP5 sur des plaquettes perméabilisées (Fig.19A). Des plaquettes purifiées furent déposées dans le fond d'une plaque ELISA puis exposées à des concentrations croissantes de LB1. La LB1 liée aux plaquettes fut par la suite détectée à l'aide de l'anti-LB1 GP5. Tel qu'observé à la Fig.19B, la LB1 se lie de façon dose-dépendante aux plaquettes perméabilisées activées à la thrombine, alors qu'elle n'interagit que faiblement avec les plaquettes perméabilisées n'ayant pas été activées. La liaison maximale de la LB1 sur les plaquettes activées se produit à une concentration de $0,2 \mu\text{g}$ de LB1/ 10^6 plaquettes (Fig.19B).

La liaison de la LB1 fut ensuite confirmée par immunofluorescence confocale. Un anticorps anti-CD61 fut utilisé pour marquer les plaquettes. Tel qu'observé à la Fig.20A, suite à une activation à la thrombine, la fluorescence due à la LB1 (verte) est localisée à l'intérieur des plaquettes, c'est à dire majoritairement incluse par la fluorescence du CD61 (rouge). À l'aide de coupes optiques horizontales d'une plaquette doublement marquée pour la LB1 et le CD61 (Fig.20B), on observe que la fluorescence due à la LB1 est située sous la membrane plasmique et distribuée de façon non-homogène dans différentes régions du cytoplasme. Cette fluorescence apparait souvent en petits amas pouvant s'apparenter à des vésicules. La liaison de la LB1 est spécifique puisque les anticorps anti-LB1 seuls ne se lient pas aux plaquettes (Fig.20A). Aucune liaison significative de la LB1 n'est décelée sur les plaquettes non-perméabilisées, qu'elles soient activées ou au repos (Fig.20C), confirmant que la liaison de la LB1 est intracellulaire et

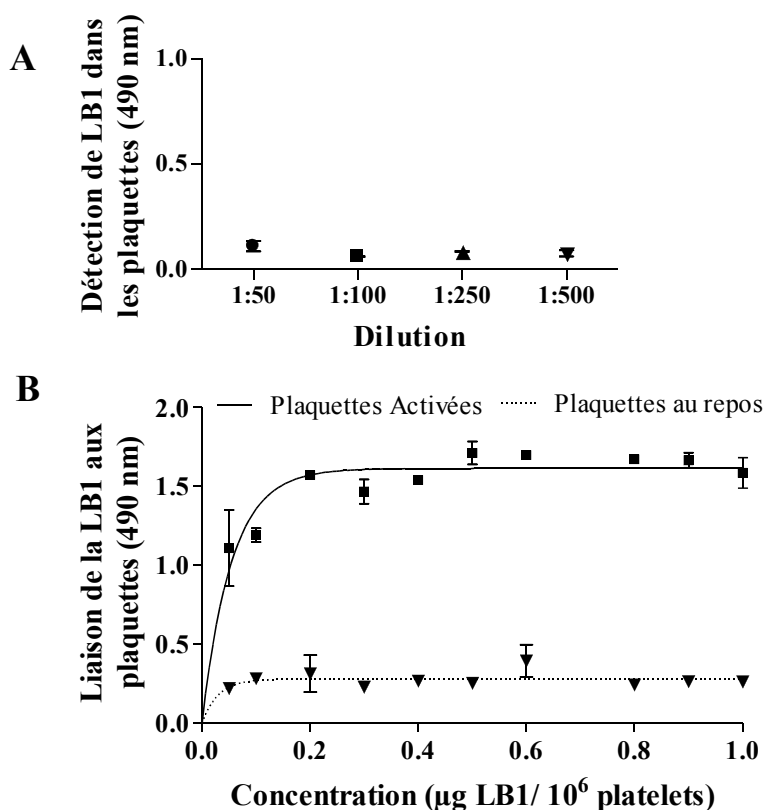
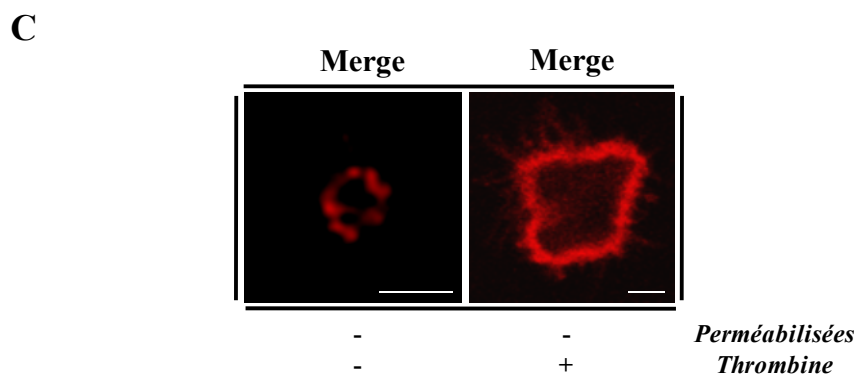
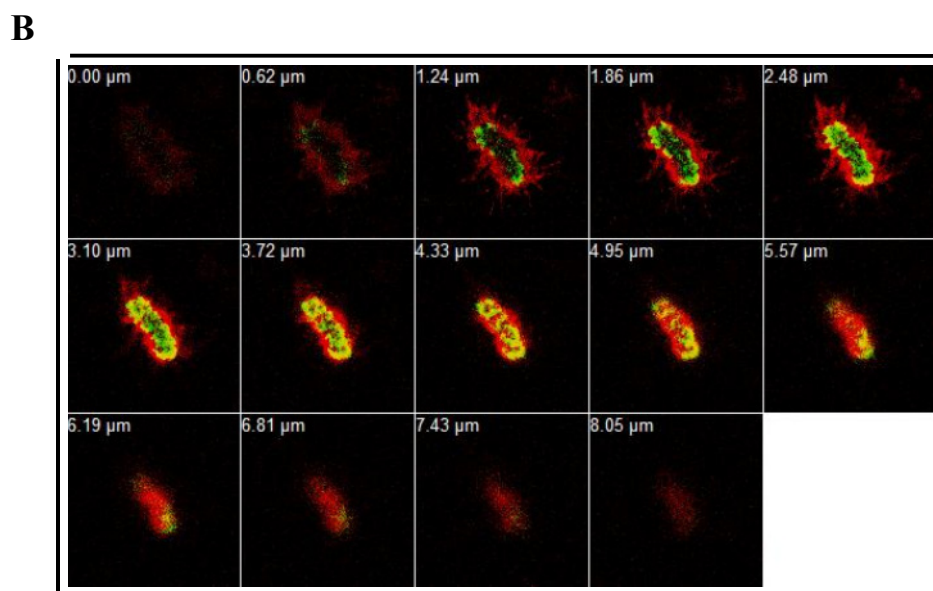
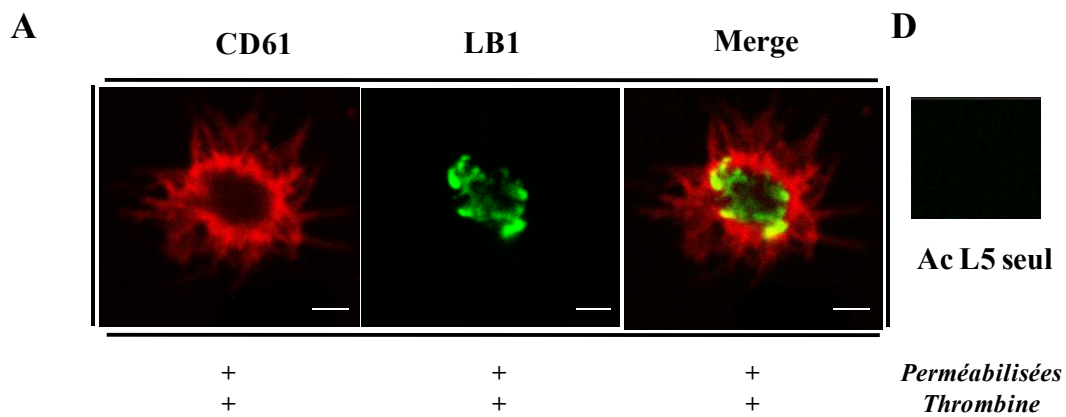


Figure 19: La LB1 se lie aux plaquettes activées

(A) La LB1 est absente des plaquettes. Des plaquettes furent déposées au fond de plaques ELISA puis fixées et perméabilisées avant d'être incubées avec l'anti-LB1 GP5 et un anticorps secondaire. (B) La LB1 se lie fortement aux plaquettes activées et faiblement aux plaquettes non-activées. Des plaquettes furent déposées au fond de plaques ELISA puis incubées avec de la LB1 avant d'être activées (■) ou non (▼) avec de la thrombine. Elles furent ensuite lavées, fixées et perméabilisées avant d'être incubées avec l'anti-LB1 GP5. Les valeurs de DO augmentent avec la concentration de LB1 pour atteindre un plateau autour de 0,2 µg de LB1/10⁶ plaquettes. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM et sont représentatives de 3 expériences indépendantes effectuées en triplicatas.

Figure 20: La LB1 se lie aux plaquettes activées et est internalisée

Des plaquettes non-perméabilisées et non-fixées furent toutes traitées avec 0,2 µg de LB1/10⁶ plaquettes puis furent activées à la thrombine (0,05 unité/mL). Les plaquettes furent ensuite lavées, fixées et perméabilisées avant d'être incubées avec un anticorps monoclonal anti-LB1 L5 (vert), pour détecter la présence de LB1 liée, et un anticorps anti-CD61 (rouge) pour délimiter les plaquettes. **(A)** La LB1 se lie aux plaquettes activées. **(B)** Coupes optiques horizontales d'une même plaquette démontrant que la LB1 se lie sous la membrane plasmique. **(C)** La LB1 ne lie pas les plaquettes non perméabilisées, activées ou non à la thrombine. **(D)** Les anticorps anti-LB1 seuls ne lient pas les plaquettes. Traits = 3 µM.



que cette localisation ne peut être vue qu'en perméabilisant les plaquettes à l'étape de l'incubation avec les anticorps primaires.

Les plaquettes perméabilisées mais non-activées ou à un stade tardif d'activation sont incapables de lier la LB1 (résultats non-présentés). Ces résultats suggèrent que la LB1 est internalisée lors du processus d'activation plaquettaire, mais qu'une fois les plaquettes trop activées, la LB1 devient incapable de lier sa cible. L'intervalle de temps pendant lequel la LB1 pourrait se lier aux plaquettes serait donc de courte durée. Des études de cytométrie en flux viennent appuyer cette hypothèse. Des plaquettes purifiées, activées durant différentes périodes de temps variant entre 5 secondes et 1 min, furent fixées et exposées à de la LB1. La LB1 de surface fut ensuite détectée en cytométrie en flux à l'aide de l'anticorps GP5. Nous avons constaté que l'intervalle de temps pendant lequel la LB1 peut se lier aux plaquettes est de courte durée. Une activation de 15 secondes semble optimale à la liaison de la LB1 (Fig.21). Sur des plaquettes activées pendant 15 secondes, la liaison de la LB1 est le double de celle observée sur des plaquettes aux repos ou activées pendant plus de 30 secondes.

L'externalisation de la P-sélectine à la surface plaquettaire se produit en moins de 1 min suite à l'activation des plaquettes avec des agonistes stimulant les récepteurs de la thrombine (Flaumenhaft et al., 2005). La suppression de l'externalisation de la P-sélectine par la LB1 implique que l'auto-antigène doive rapidement se lier aux plaquettes activées, être internalisée et inhiber les plaquettes avant que les marqueurs d'activation ne se rendent à la surface. Des études d'immunofluorescence, effectuées sur des plaquettes

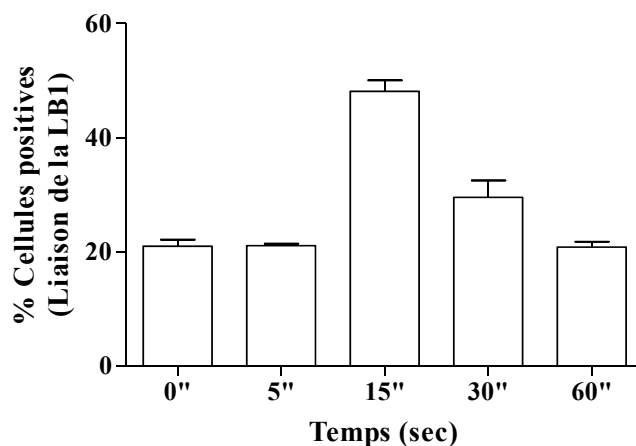


Figure 21: La LB1 se lie aux plaquettes à un stade spécifique d'activation

La LB1 se lie à la surface plaquettaire pendant une courte période, entre 15 et 30 sec, au tout début de l'activation plaquettaire. Des plaquettes furent activées avec de la thrombine (0,05 unité/mL) pour les périodes indiquées, puis fixées et lavées. Elles ont ensuite été incubées avec de la LB1 à une concentration de $0,3 \mu\text{g}/10^6$. La présence de LB1 à la surface plaquettaire fut révélée avec l'anti-LB1 GP5 par cytométrie en flux. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 expériences indépendantes ($n=3$) dont les moyennes de plaquettes liant la LB1 \pm SEM sont présentées.

incubées avec de la LB1 puis activées, perméabilisées et marquées avec des anticorps dirigés contre la LB1 et la P-sélectine, nous ont permis de démontrer qu'une telle situation se produisait réellement. Nous avons constaté que la LB1 se lie préférentiellement aux plaquettes possédant de la P-sélectine sur la face interne de la membrane plasmique (Fig.22A). La P-sélectine de ces plaquettes semble située à proximité de la membrane plasmique et non transloquée à la surface (Fig.22B). Les plaquettes pour lesquelles les granules α , contenant la P-sélectine, ont déjà fusionné avec la membrane ne semblent cependant pas être en mesure d'internaliser la LB1 (Fig.22C). Ces résultats confirment ceux obtenus en cytométrie en flux. Les plaquettes au repos de même que celles trop activées, ayant libéré le contenu de leurs granules, sont incapables de lier la LB1.

4.1 La LB1 est internalisée dans les plaquettes par l'intermédiaire des vésicules de clathrine

Les vésicules de clathrine sont souvent impliquées dans la translocation d'un ligand de l'extérieur vers l'intérieur d'une cellule (Dell'Angelica, 2001). L'internalisation de la LB1 dans les plaquettes, puis sa concentration dans des structures s'apparentant à des vésicules laisse supposer que l'auto-antigène pourrait utiliser un tel mécanisme pour pénétrer dans les plaquettes. Un double marquage de LB1 et de clathrine, effectué en microscopie électronique sur des plaquettes contenant de la LB1 internalisée, nous a permis de vérifier cette hypothèse. Tel qu'observé à la Fig.23, les molécules de clathrine (grains d'or de 12 nm) colocalisent fréquemment avec la LB1 (grains d'or de 6 nm) en amas dans les régions du cytoplasme apparaissant plus denses en microscopie

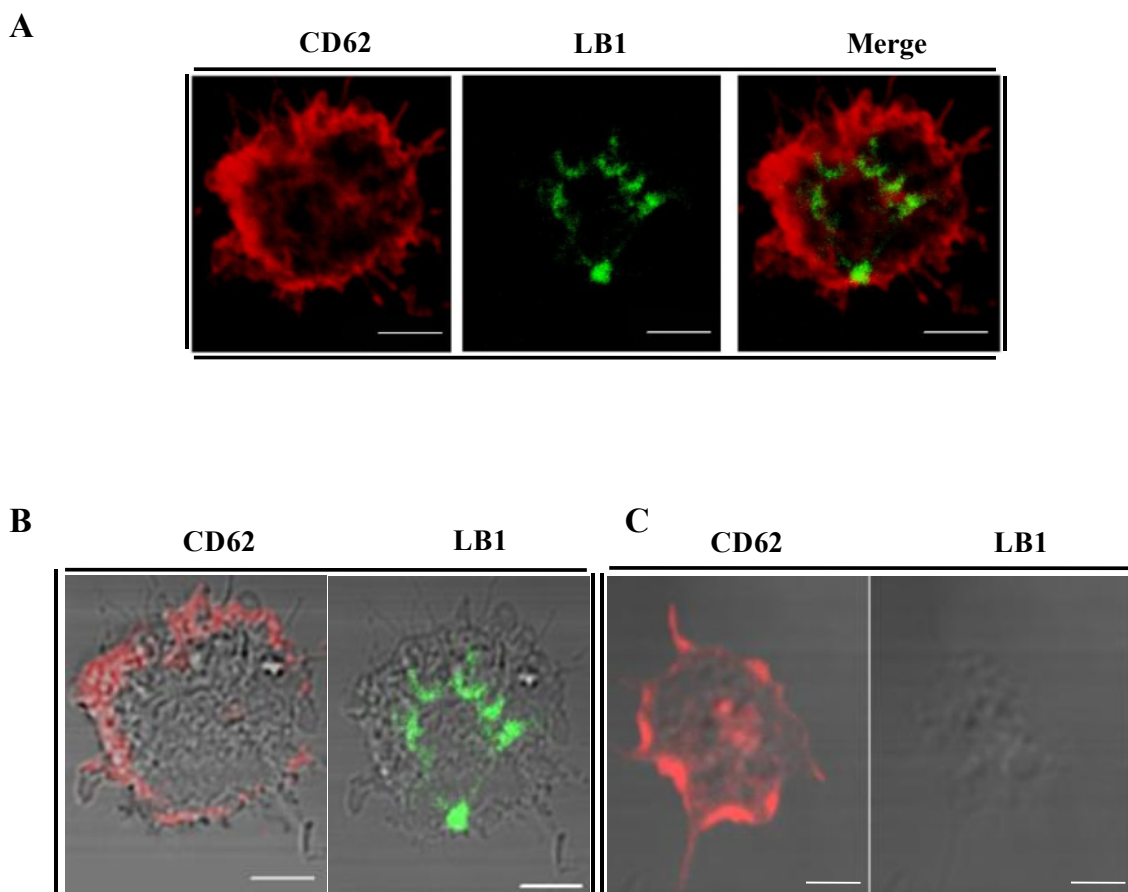


Figure 22: La LB1 se lie aux plaquettes pendant une courte période de temps suivant l'activation par la thrombine

(A) et (B) La LB1 se lie aux plaquettes où la P-sélectine n'est pas encore externalisée. (C) La LB1 est incapable de lier les plaquettes où la P-sélectine se trouve à la surface, prête à être libérée. Les plaquettes furent traitées de la même façon que pour les autres expériences de microscopie confocale (Fig.20) avant d'être incubées avec un anti-LB1 monoclonal (vert) et un anti-CD62 (rouge) utilisé comme marqueur d'activation. Les images présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Trait = 3 μ m.

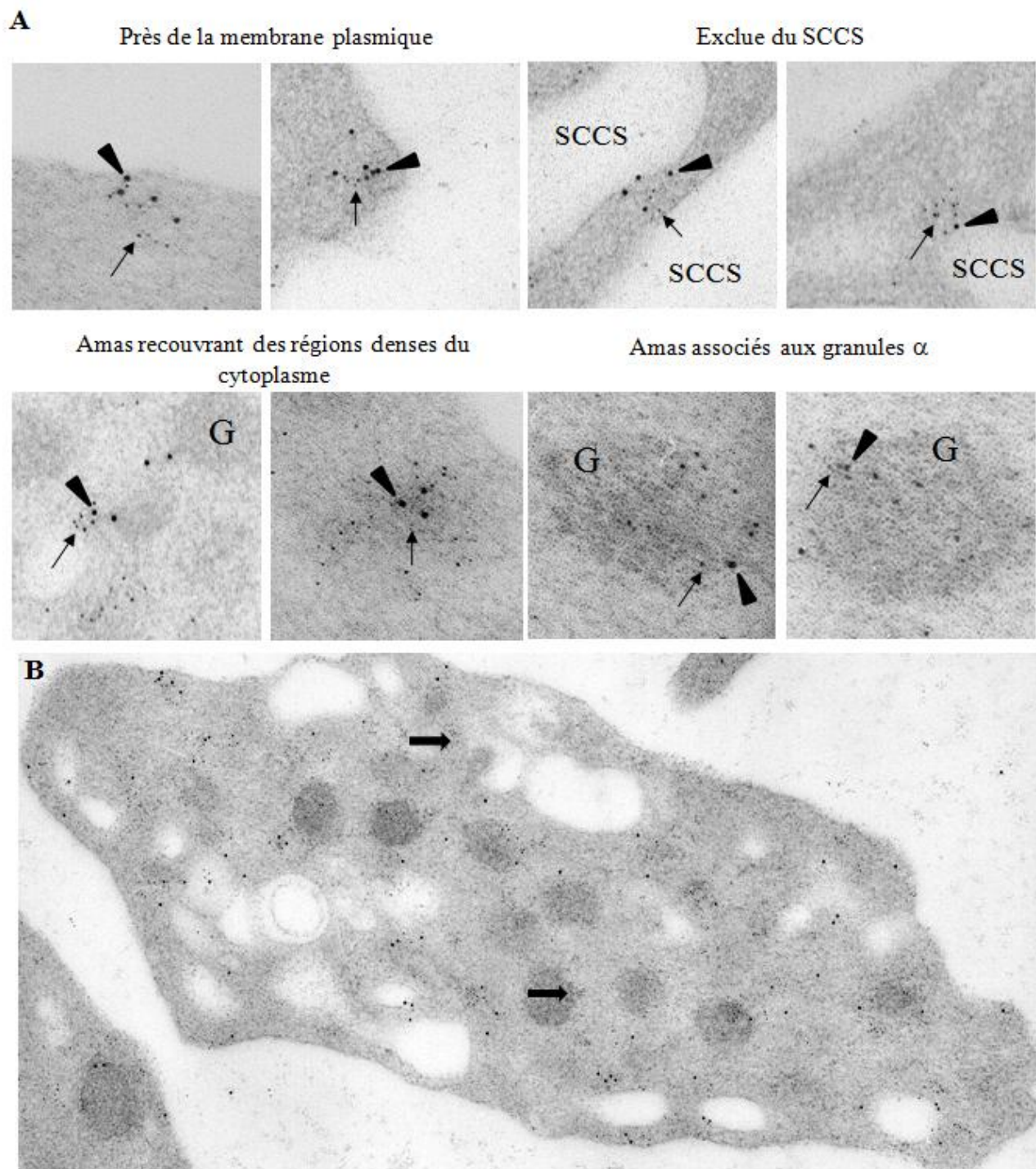
électronique (Fig.23A). La LB1 et la clathrine colocalisent également sur le pourtour de la membrane plasmique ainsi que dans certains granules α (Fig.23A). Aucune colocalisation n'est par contre observée dans le système canaliculaire ouvert vers l'extérieur (SCCS). Les anticorps couplés aux grains d'or étaient spécifiques puisqu'aucune réaction croisée entre les anticorps secondaires ne fut observée lors d'incubations témoins. Nous avons également constaté qu'environ 25% des grains de LB1 ne colocalisent avec aucun grain de clathrine (Fig.23B). Cette absence de colocalisation stérique; 2) Les points de non-colocalisation reflètent des endroits dans la coupe d'une plaquette où aucune molécule de clathrine n'est disponible pour lier son anticorps respectif; 3) La LB1 présente où aucune molécule de clathrine n'est visible a pénétrée dans les plaquettes par un mécanisme clathrine-indépendant, ce qui impliquerait qu'au moins deux mécanismes distincts participeraient à l'internalisation de la LB1.

5. La LB1 interagit avec le récepteur de l'insuline

Les résultats présentés jusqu'à maintenant suggèrent que la liaison de la LB1 aux plaquettes s'effectue sur un antigène extracellulaire internalisé par un mécanisme clathrine-dépendant. Un fractionnement membranaire des plaquettes nous a permis de caractériser la cible de la LB1. Les fractions soluble (cytosol) et insoluble (membranes) ont été séparées sur des gels de SDS-polyacrylamide, transférées sur des membranes de nitrocellulose et exposées à de la LB1. La liaison de la LB1 à une protéine présente dans ces fractions fut ensuite détectée à l'aide de l'anti-LB1 GP5 et de l'anticorps secondaire approprié. Nous avons constaté que la LB1 réagit avec une protéine possédant un poids

Figure 23: La LB1 est internalisée dans des vésicules de clathrine

(A) La LB1 (grains d'or de 6 nm, flèche fine) colocalise avec les molécules de clathrine (grains d'or de 12 nm, têtes de flèche) dans les plaquettes. Les plaquettes furent traitées de la même façon que pour la microscopie confocale puis furent enrobées dans de la résine LR White. La colocalisation de la LB1 avec la clathrine est observée près de la membrane plasmique, sur des régions denses du cytoplasme et dans les granules α (G). La LB1 est exclue du système canaliculaire ouvert vers l'extérieur (SCCS). **(B)** Environ 25% des molécules de LB1 internalisées ne colocalisent pas avec les vésicules de clathrines (flèches). Les résultats présentés sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.



moléculaire de 95 kDa, uniquement présente dans la fraction membranaire des plaquettes activées, i.e. la partie insoluble, les fractions des plaquettes non-activées étant non-réactives (Fig.24A). Cette protéine n'a pas été reconnue par la NH₂-LB1.

La distribution non homogène de la LB1 dans les plaquettes, tel qu'observé en immunofluorescence et en microscopie électronique (Fig.20-22), suggère que son récepteur est situé dans une région spécifique de la membrane plasmique. Parmi les microdomaines de la membrane cellulaire, on retrouve les radeaux lipidiques ou «lipid rafts». Ces radeaux lipidiques constituent des plateformes dynamiques de signalisation membranaire, composées de lipides tels le cholestérol, les glycolipides et les sphingolipides, ainsi que de protéines, majoritairement à ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Simons and van Meer, 1988; Brown and Rose, 1992; Simons and Ikonen, 1997). Il est connu que les radeaux lipidiques jouent un rôle important dans la signalisation des plaquettes (López et al., 2005). Pour vérifier la possibilité d'une association entre le récepteur membranaire de la LB1 et les radeaux lipidiques, nous avons procédé à leur isolement par ultra-centrifugation sur un gradient étagé de sucrose, à partir d'un lysat membranaire de plaquettes activées. Après centrifugation, les radeaux lipidiques sont enrichis dans les fractions 3 et 4, correspondant aux couches de 15 et 20 % sucrose, ce que nous avons confirmé par la détection du marqueur CD36 (Gousset et al., 2002), dans ces fractions (Annexe-3). Les radeaux lipidiques étant isolés, nous les avons séparés sur des gels de SDS-polyacrylamide, transférés sur des membranes de nitrocellulose et exposés à de la LB1. La liaison de la LB1 à une protéine présente dans les radeaux lipidiques fut ensuite détectée à l'aide de l'anti-LB1 GP5. Tel qu'observé à la Fig.24B, une protéine de 95 kDa, présente dans les

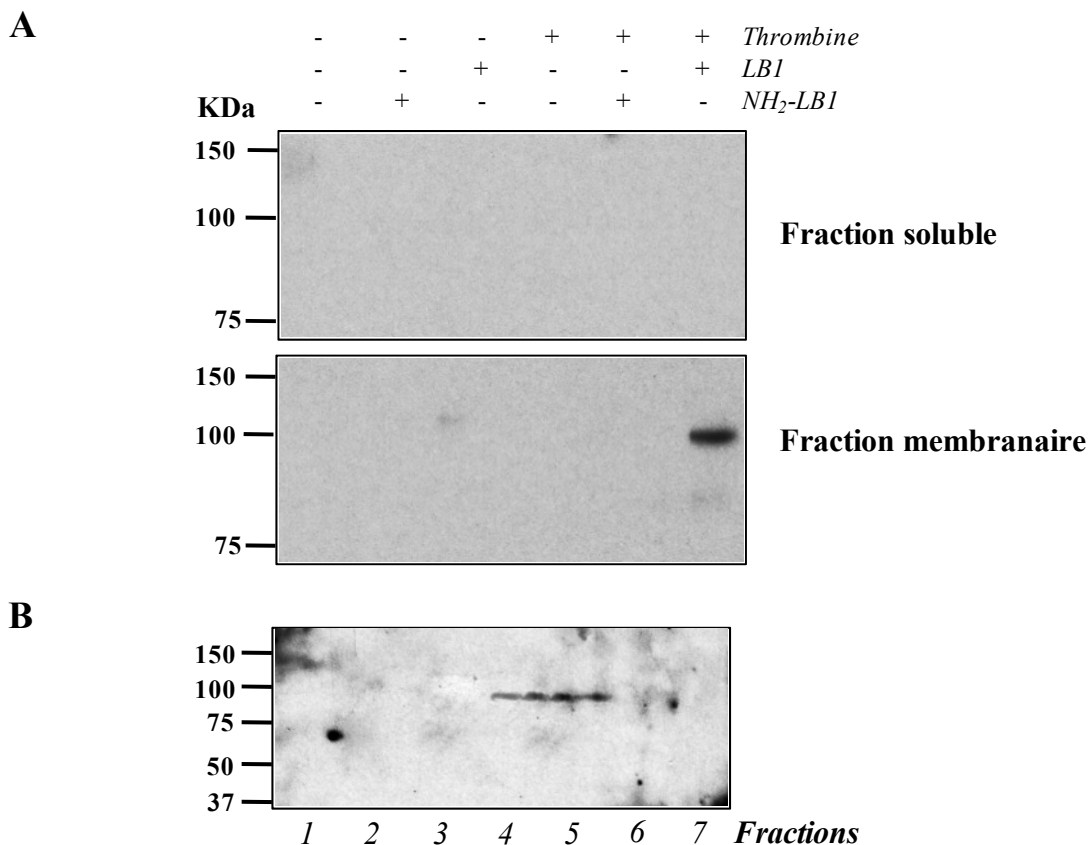


Figure 24: La lamine B1 (LB1) réagit avec une protéine de 95 kDa

(A) La LB1 réagit avec une protéine de 95 kDa située uniquement dans la portion membranaire des plaquettes. Des plaquettes humaines furent isolées, fractionnées à l'aide d'un tampon contenant des détergents et ultracentrifugées. Les fractions membranaires et solubles furent séparées par SDS-PAGE et analysées pour leur réactivité avec la LB1. (B) La LB1 réagit avec une protéine de 95 kDa associée en partie aux radeaux lipidiques. Des lysats plaquettaires furent séparés sur un gradient étagé de sucrose. Chacune des fractions fut récoltée puis séparée sur gels SDS-PAGE avant d'être analysée pour leur réactivité avec la LB1. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

fractions 4 et 5, réagit effectivement avec la LB1. Le poids moléculaire de cette protéine correspond à celui de la molécule observée à la Fig.24A, suggérant qu'il s'agit bien du même récepteur. Puisque cette protéine est présente dans les fractions 4 et 5, elle semble partiellement associée aux radeaux lipidiques retrouvés dans les fractions 3 et 4.

Afin d'identifier ce récepteur, nous avons utilisé un "Kinex™ antibody microarray" qui mesure les changements dans l'expression et la phosphorylation de 639 protéines dans des cellules ayant été exposées à des stimuli variés. Ces expériences nous ont révélé que la LB1 module le plus fortement la phosphorylation de la chaîne- β du récepteur de l'insuline (IR) (Annexe-4). L'IR a un poids moléculaire de 95 kDa, ce qui correspond à celui de la molécule identifiée dans les Fig.24A et 24B. Ce récepteur, déjà identifié dans les plaquettes, semble impliqué dans l'activation et l'agrégation plaquettaires (Ferreira et al., 2004; Ferreira et al., 2006). Il est internalisé par des mécanismes clathrine-dépendant (Paccaud et al., 1992; Ceresa et al., 1998), lorsqu'il n'est pas associé aux radeaux lipidiques et clathrine-indépendant lorsqu'il est associé à ces structures (McClain and Olefsky, 1988; Backer et al., 1991; Moss and Ward, 1991; Smith et al., 1998; Gustavsson et al., 1999).

Pour vérifier l'interaction directe de la LB1 avec l'IR, des plaquettes furent incubées avec de la LB1 ou de la NH₂-LB1, activées à la thrombine, puis lavées pour enlever toute LB1 qui ne se serait pas fixée aux plaquettes. Une co-immunoprécipitation utilisant un anti-IR dirigé contre la chaîne- β a permis de récupérer simultanément la chaîne- β du récepteur de l'insuline et la LB1, mais seulement à partir des plaquettes activées à la thrombine. Une interaction de ces deux protéines apparaît donc seulement

possible sur des plaquettes activées (Fig.25A). Lorsque les plaquettes furent activées à la thrombine avant d'être incubées avec la LB1, c'est-à-dire dans des conditions où la LB1 ne peut inhiber l'activation plaquettaire, aucune LB1 ne fut récupérée par co-immunoprécipitation (Fig.25A). Dans de telles conditions, l'IR ne semble plus disponible ou dans la bonne conformation pour lier la LB1. Aucune LB1 n'a été co-immunoprécipitée avec l'anti-IR dirigé contre la chaîne- β lorsque la LB1 fut incubée avec des plaquettes au repos ou lorsque des plaquettes activées furent incubées avec de la NH_2 -LB1 (Fig.25A).

La liaison directe entre la chaîne- β de l'IR et la LB1 fut vérifiée par ELISA. Des plaques ELISA ont été enduites avec de la LB1 puis incubées avec des concentrations croissantes d'un fragment peptidique de la chaîne- β de l'IR fusionné à la GST. La rétention des complexes fut par la suite détectée avec un anticorps anti-GST. Nous avons observé qu'une liaison saturable est obtenue pour la liaison de ces deux protéines (Fig.25B). La liaison semble spécifique puisqu'un signal minimal est détecté en absence de l'anticorps primaire, quand le peptide GST de la chaîne- β de l'IR est remplacé par de la GST seule ou lorsque la LB1 est remplacée par de la NH_2 -LB1 (Fig.25B). Ces résultats suggèrent donc que l'interaction de la chaîne- β de l'IR avec la LB1 est spécifique et qu'elle est due à une interaction protéine-protéine directe. Étant donné qu'un seul fragment d'IR a été testé jusqu'à maintenant, il est encore impossible de préciser si la LB1 interagit avec une seule portion du récepteur. Il n'est pas exclu qu'elle puisse interagir également, comme l'insuline, avec les chaînes α du IR.

Figure 25: La LB1 interagit avec la chaîne- β du IR

(A) Co-immunoprécipitation de la LB1 avec un anticorps anti-IR chaîne- β dans des lysats plaquettaires. Les protéines immunoprécipitées de plaquettes activées et non-activées, incubées ou non avec de la LB1 ou de la NH₂-LB1 ont été séparées par SDS-PAGE et analysées par immunobuvardage avec l'anti-LB1 GP5. Les expériences ont été répétées pour trois donneurs différents. *a* indique les plaquettes incubées avec de la LB1 pendant 2 min puis activées à la thrombine; *b* indique les plaquettes activées à la thrombine pendant 2 min et incubées ensuite avec de la LB1. La LB1 était co-immunoprécipitée avec l'anti-IR chaîne- β seulement dans les plaquettes incubées avec la LB1 et activées à la thrombine. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. **(B)** Interaction de la LB1 avec la chaîne- β de l'IR en ELISA. Les puits d'une plaque furent enduits avec 400 ng de LB1 purifiée (■) ou de NH₂-LB1 (▲) et incubés avec des quantités croissantes de fragments de la chaîne- β de l'IR couplé à de la GST ou avec de la GST seule (▼). Les fragments fixés à la LB1 furent détectés avec un anticorps anti-GST. La liaison de l'anti-GST seul sur la LB1 fut utilisée comme contrôle négatif (●). Les résultats présentés sont représentatifs de 3 expériences indépendantes dont les moyennes \pm SEM sont compilées dans le graphiques présenté. * $p < 0,05$ par rapport aux autres groupes.

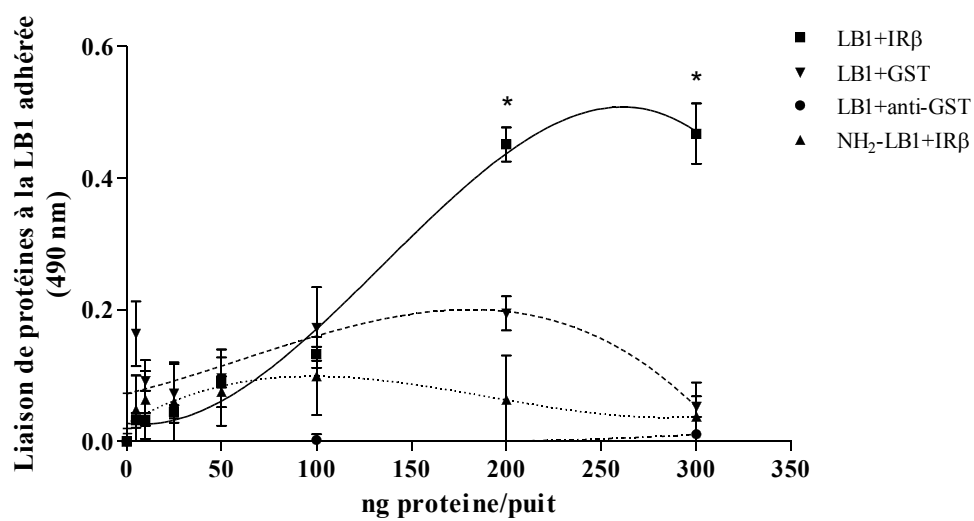
A

	-	+ ^a	-	+	+ ^b	+	Thrombine
	+	+ ^a	-	-	+ ^b	-	LB1
kDa	-	-	-	-	-	+	NH ₂ -LB1



^aLB1 ajoutée 2 min avant la thrombine

^bLB1 ajoutée 2 min après la thrombine

B

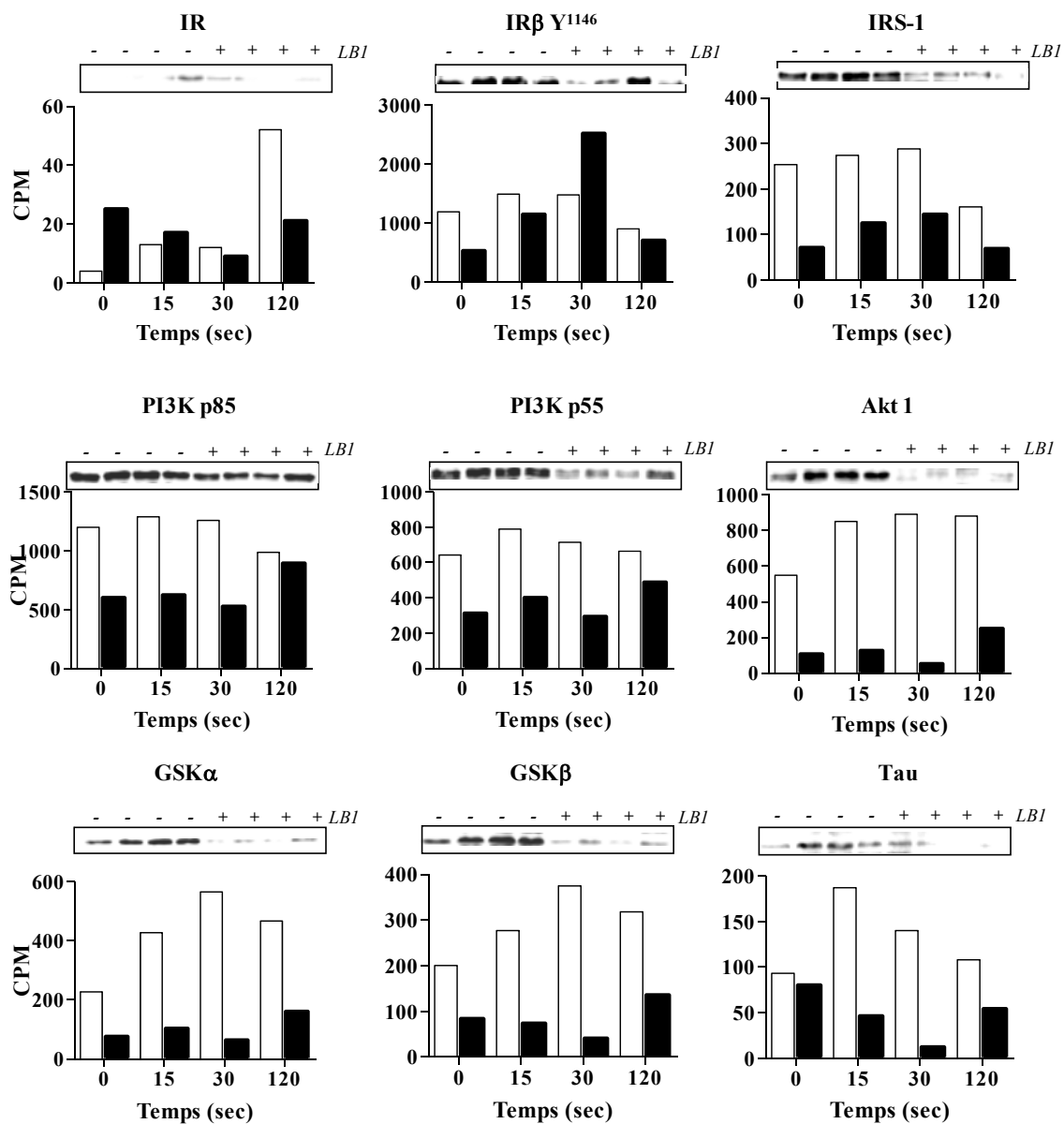
5.1 La LB1 module une cascade de phosphorylation déclenchée par l'IR

La liaison de l'insuline à son récepteur se produit sur la sous-unité α , induisant un changement conformationnel dans les sous-unités α et β , ce qui amène l'autophosphorylation du récepteur (Youngren, 2007). Les substrats de l'IR, tels que l'IRS, sont phosphorylés à leur tour ce qui permet leur association avec des effecteurs tels que la PI3K. Par l'intermédiaire de la phosphorylation d'autres molécules, la PI3K active l'Akt-1 qui interagit avec plusieurs molécules effectrices. Puisque nous avons observé une liaison directe entre la LB1 et la chaîne- β de l'IR, nous avons vérifié si la LB1 peut moduler la cascade de signalisation induite par ce récepteur. Nous avons découvert que la LB1 mime l'effet de l'insuline en induisant la phosphorylation du résidu Y¹¹⁴⁶ sur la chaîne β de l'IR (Fig.26). Cependant, la LB1 bloque la phosphorylation de toutes les autres molécules situées en aval: IRS-1, PI3K, Akt-1, GSK et Tau (Fig.26).

La phosphorylation de GSK3 est catalysée par plusieurs kinases, incluant Akt-1, et est reliée à plusieurs fonctions cellulaires telles que la modulation de la protéine Tau associée aux microtubules (Barry et al., 2003). Cette protéine fut identifiée dans les plaquettes et pourrait avoir un rôle à jouer dans la réorganisation du cytosquelette suite à l'activation plaquettaire. Le fait que la phosphorylation de GSK et de Tau soit inhibée dans les plaquettes ayant été incubées avec la LB1 (Fig.26) semble indiquer que la LB1 interfère ultimement avec le changement de forme des plaquettes.

Figure 26: La LB1 inhibe la phosphorylation d'IRS-1, PI3K, Akt-1, GSK et Tau

Les plaquettes furent incubées avec 0,2 µg de LB1/10⁶ plaquettes puis stimulées avec 0,05 unité/mL de thrombine pour la période indiquée. Les lysats plaquettaires furent séparés par gels SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage en utilisant les anticorps phospho-spécifiques ou pan-spécifiques indiqués. La phosphorylation relative fut déterminée par l'émission de chimioluminescence par min (CPM), représentée dans les histogrammes. □ Thrombine, ■ Thrombine + LB1. Les résultats sont représentatifs d'une expérience effectuée en duplicata.

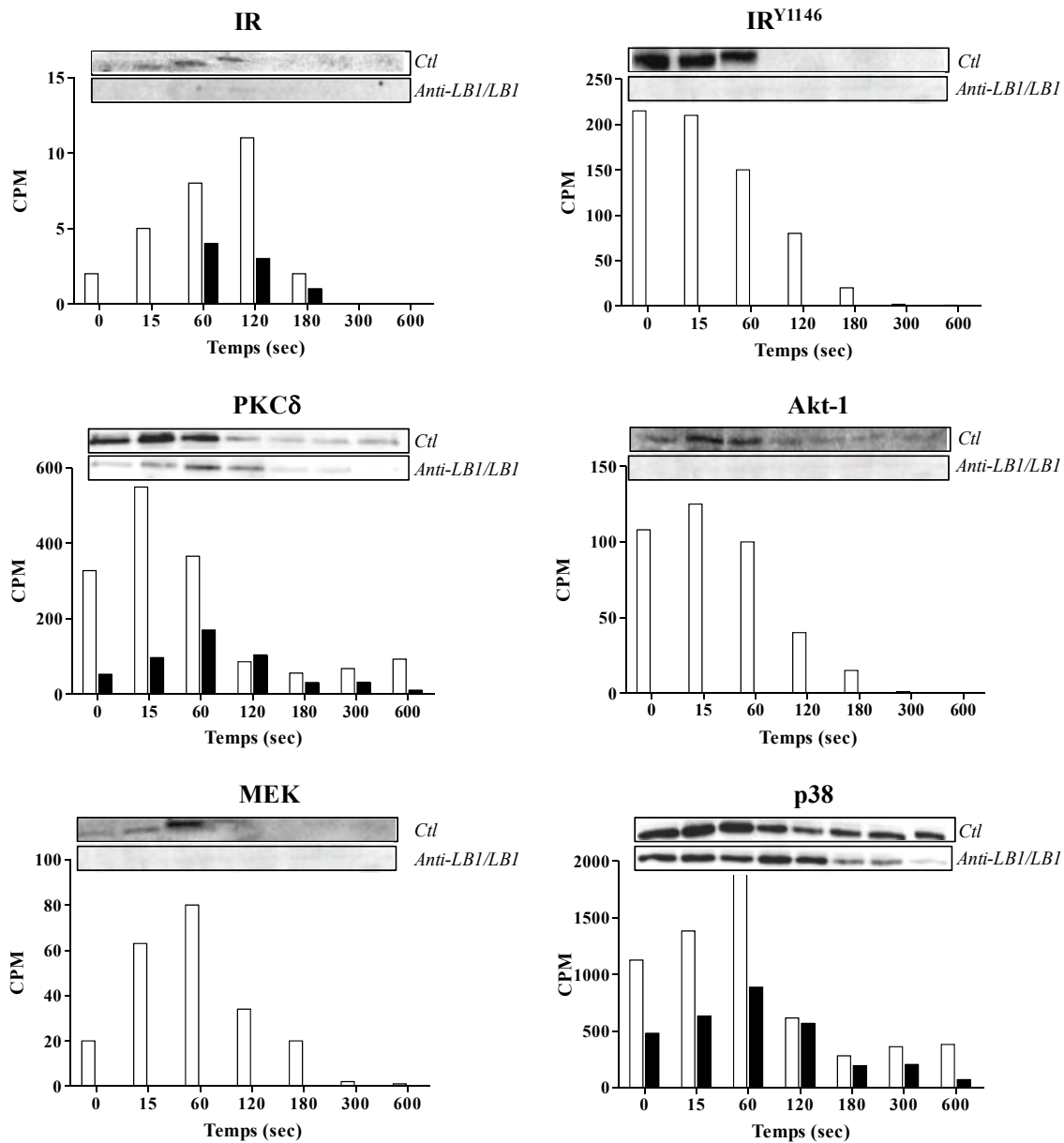


6. Les anti-LB1 sont sans effet sur l'inhibition, causée par la LB1, de la cascade de phosphorylation déclenchée par l'IR

La présence d'auto-anticorps chez les patients atteints de maladies auto-immunes altère la phosphorylation de différentes cascades de signalisation dans une variété de types cellulaires, dont les plaquettes. Généralement, ces auto-anticorps augmentent la phosphorylation des molécules de signalisation, ce qui conduit à un état d'activation cellulaire. La présence d'auto-anticorps anti-LB1 chez les patients lupiques souffrant d'un SAP corrèle cependant avec une diminution et non une augmentation du risque de thrombose. Puisque la LB1 semble inhiber l'activation plaquettaire en diminuant la phosphorylation de certaines molécules de signalisation dans les plaquettes, les anti-LB1, pour être toujours associés à une thromboprotection, devraient maintenir ou accentuer l'activité inhibitrice de l'auto-antigène. Des essais de phosphorylation en présence de LB1 et d'anti-LB1 ont permis de démontrer cette hypothèse. La phosphorylation de: IR, IR^{Y1146}, PKC δ , MEK, p38 et Akt-1 a été évaluée sur un intervalle de 10 min dans des plaquettes exposées à de la LB1 en présence d'anti-LB1. Tel qu'observé à la Fig.27, la phosphorylation de IR, IR^{Y1146}, PKC δ , MEK, p38 et Akt-1 est toujours inhibée dans les plaquettes exposées à de la LB1 en présence d'anti-LB1. La présence d'anti-LB1 semble cependant augmenter l'effet inhibiteur de la LB1 sur certaines molécules. La phosphorylation de IR, IR^{Y1146}, MEK et Akt-1 est presque complètement inhibée sur une période d'activation de 10 min. Les plaquettes semblent devenir complètement inaptes à répondre à un stimulus de thrombine en présence d'anti-LB1. Afin d'attribuer l'augmentation d'inhibition des cascades de phosphorylation testées aux anti-LB1, une

Figure 27: Les anti-LB1 accentuent l'effet inhibiteur de la LB1 sur la phosphorylation de: IR, de la PKC δ , de l'Akt-1, de MEK et de p38

Les plaquettes furent incubées avec de la LB1 en présence d'anti-LB1 à un ratio molaire de 1:1 puis stimulées avec 0,05 unité/mL de thrombine pour la période indiquée. Les lysats plaquettaires furent séparés par gels SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage en utilisant les anticorps phospho-spécifiques ou pan-spécifiques indiqués. La phosphorylation relative fut déterminée par l'émission de chimioluminescence par minute (CPM), représentée dans les histogrammes. □ Thrombine; ■ Thrombine + LB1/anti-LB1. Les résultats sont représentatifs d'une expérience effectuée en duplicata.



comparaison entre l'effet de la LB1 et celui des anti-LB1 accompagnés de LB1 devra être analysée dans une même expérience.

7. La LB1 internalisée disparaît rapidement des plaquettes sauf en présence d'anti-LB1 purifiés

Dans les hépatocytes, une dissociation du IR et de son ligand naturel, l'insuline, survient généralement entre 7 et 10 min après l'internalisation du récepteur et est suivie d'une dégradation rapide de l'insuline dans les endosomes (Backer *et al*, 1990). La liaison de la LB1 au IR impliquerait donc qu'une dégradation de l'auto-antigène devrait se produire moins de 10 min suivant l'internalisation du récepteur, advenant que le parcours du récepteur soit le même dans les hépatocytes et les plaquettes et qu'une similitude existe entre la demi-vie de l'insuline et de la LB1. Des études d'immunofluorescence, effectuées sur des plaquettes incubées avec de la LB1 ou de la LB1 en présence d'anti-LB1 (complexes anti-LB1/LB1) et activées à la thrombine pour des périodes de temps variables, nous ont permis de vérifier la durée de vie de la LB1 dans les plaquettes. Nous avons d'abord constaté que la fluorescence due à la présence de LB1 seule est faible et distribuée de façon homogène dans les plaquettes au repos. Après 30 secondes d'activation, la LB1 apparaît en amas dans le cytoplasme. Après 2 min d'activation, la LB1 semble se concentrer au centre des plaquettes, près de l'anneau constitué entre autres de microtubules qui se forme lors de l'activation plaquettaire et qui semble jouer un rôle dans la dégranulation et le changement de forme des plaquettes. Après 5 min d'activation, le signal de la LB1 redevient diffus pour ensuite disparaître complètement

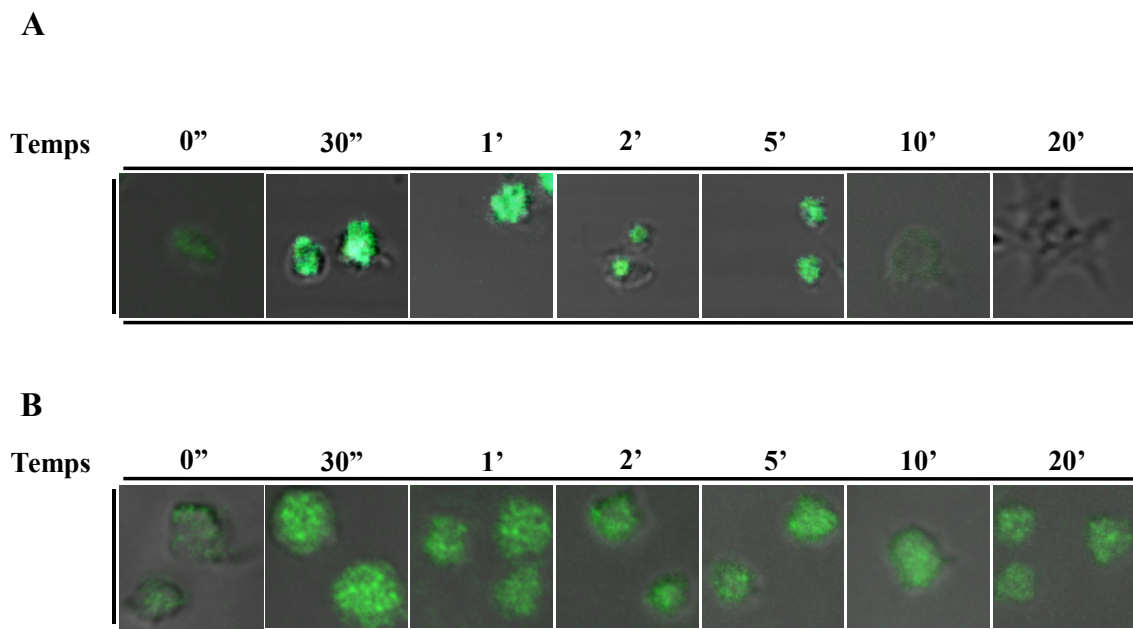


Figure 28: *La présence d'anti-LB1 augmentent la persistance de la LB1 dans les plaquettes*

Des plaquettes furent incubées avec $0,2 \mu\text{g}$ de LB1/ 10^6 plaquettes avec ou sans anti-LB1 à un ratio molaire de 1:1 puis furent activées avec $0,05$ unité/mL de thrombine pour le temps indiqué. Les plaquettes ont été lavées, fixées, perméabilisées et incubées avec l'anti-LB1 GP5. Les résultats d'immunofluorescence démontrent que **(A)** la LB1 disparaît des plaquettes après 10 min d'activation en absence d'anti-LB1. **(B)** En présence d'anti-LB1 purifiés, la LB1 est encore détectable après 20 min d'activation. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

après 10-20 min (Fig.28A). La LB1 semble donc rapidement clairée des plaquettes, ce qui pourrait entraîner un rétablissement des fonctions plaquettaires.

Le profil de fluorescence de la LB1 dans les plaquettes incubées avec l'auto-antigène en présence d'anti-LB1 est toutefois beaucoup plus persistant: il est toujours visible 20 min après l'activation, contrairement à celui de la LB1 seule qui disparaît entre 5 et 10 min après l'activation. La présence d'anti-LB1 semble stabiliser la LB1 intracellulaire, possiblement en prévenant son expulsion ou sa dégradation (Fig.28B). Morphologiquement, les plaquettes incubées avec la LB1 et les anti-LB1 ressemblent aux plaquettes au premier stade d'activation plaquettaire: elles sont rondes et ne possèdent pas de pseudopodes (Fig.28B). Il reste toutefois à démontrer si cette LB1 est toujours associée aux auto-anticorps ou si elle s'en dissocie une fois internalisée dans les plaquettes.

8. La LB1 est présente dans les plaquettes de patients lupiques possédant des anti-LB1

La LB1 pénètre dans les plaquettes puis inhibe leur activation avant d'en disparaître rapidement. En présence d'anti-LB1, la LB1 internalisée reste toutefois beaucoup plus longtemps à l'intérieur des plaquettes. Chez des patients lupiques porteurs d'anti-LB1, il serait donc possible que la LB1 persiste dans leurs plaquettes, ce qui préviendrait l'activation de ces plaquettes et protégerait les patients contre des événements thrombotiques. Afin de vérifier une telle hypothèse, nous avons analysé la présence de

LB1 dans les plaquettes de sujets sains et de patients lupiques possédant des anti-LB1. Tel qu'attendu, la LB1 n'est pas détectée dans les plaquettes des trois sujets sains testés (Fig.29A). Toutefois, nous avons constaté que de la LB1 est présente dans les trois lysats de plaquettes provenant de patients lupiques possédant des anti-LB1 (Fig.29A). La quantité de LB1 détectée par immunobuvardage dans les lysats de plaquettes semble correspondre en partie aux titres d'anti-LB1 détectés par ELISA (Fig.29B). La présence d'anti-LB1 dans les séra de patients lupiques pourrait donc effectivement modifier la clairance normale de la LB1 dans les plaquettes. Afin d'attribuer aux anti-LB1 la présence de LB1 dans les lysats de plaquettes de patients lupiques, l'absence de la LB1 dans les lysats de plaquettes de patients lupique anti-LB1 négatif devra être démontrée.

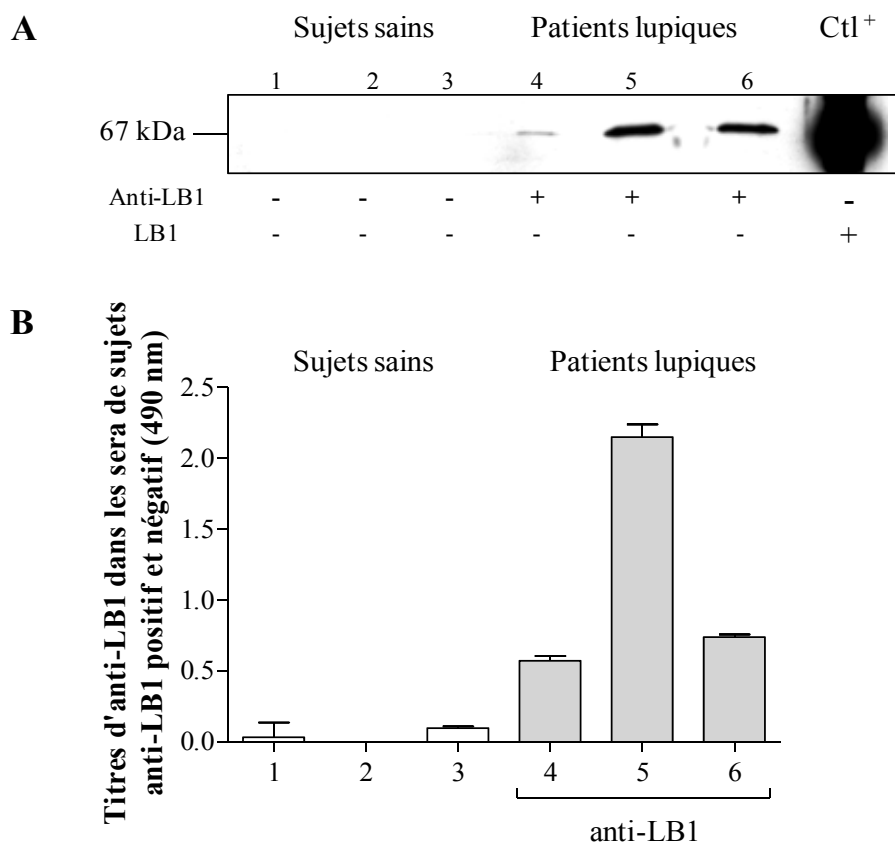


Figure 29: La LB1 est présente dans les lysats plaquettaires de patients atteints du LED et possédant des anti-LB1

(A) Des lysats plaquettaires de patients lupiques anti-LB1 positifs (anti-LB1⁺) et de sujets sains (anti-LB1⁻) ont été séparés sur des gels SDS-PAGE et transférés sur des membranes de nitrocellulose. Ces membranes ont par la suite été exposées à l'anti-LB1 GP5. De la LB1 recombinante purifiée fut utilisée comme contrôle positif. Les lysats plaquettaires des 3 patients lupiques anti-LB1⁺ contenaient de la LB1 (67 kDa), contrairement à ceux des 3 sujets sains. (B) La présence d'anti-LB1 dans les séras de patients lupiques et leur absence dans les séras de sujets sains fut confirmée par ELISA. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 expériences indépendantes dont les moyennes \pm SEM des valeurs de densités optiques sont compilées dans le graphique présenté.

Discussion

La présence d'aPL dans les séra de patients atteints du SAP représente un facteur de risque important pour le développement de thromboses. Le fait que les aPL ne puissent, à eux seuls, servir à prédire de façon précise le développement de thromboses chez les patients lupiques constitue cependant une des principales énigmes dans la pathophysiologie du SAP. En effet, malgré la présence d'aPL identiques, tous les patients lupiques ne développent pas de thrombose. Au cours d'une étude multicentrique, nous avons observé que des titres élevés d'auto-anticorps anti-LB1, présents chez 17.8% des 259 patients lupiques étudiés, étaient fortement associés à la présence de LAC (Dieudé et al., 2002). Paradoxalement, chez les patients lupiques LAC positifs et anti-LB1 positifs, on notait une fréquence de manifestations thrombotiques beaucoup moins élevée que chez les patients LAC positifs ne possédant pas ces anti-LB1 (Dieudé et al., 2002). La présence d'anti-LB1 annulerait le risque pro-thrombotique associé aux LAC, suggérant que les anti-LB1 sont thromboprotecteurs (Dieudé et al., 2002). La relation existant entre l'auto-antigène LB1, les auto-anticorps anti-LB1 et la thromboprotection reste toutefois inexplicée. Notre étude a été entreprise dans le but de comprendre l'implication de la LB1 et des anti-LB1 dans la protection contre les thromboses. Nous avons découvert qu'une diminution des fonctions plaquettaires, impliquées dans l'activation des plaquettes et dans la formation d'un thrombus, relevait plutôt de l'auto-antigène LB1 alors que les anti-LB1, associés en complexes à la LB1, jouaient un rôle indirect dans la thromboprotection en étant responsables de la persistance de la LB1 dans les plaquettes.

Nos résultats constituent la base moléculaire d'une explication de la thromboprotection, par les anti-LB1, observée chez les patients lupiques.

1. La LB1 et les anti-LB1 sont sans effet sur les cellules endothéliales. Par contre, la LB1 possède un effet anti-plaquettaire, contrairement aux anti-LB1

Plusieurs études ont déjà démontré que les aPL peuvent activer les cellules endothéliales (Simantov et al., 1995a; Pierangeli et al., 1999; Kaplanski et al., 2000) et les plaquettes (Khamashta et al., 1988; Martinuzzo et al., 1993; Campbell et al., 1995; Forastiero et al., 1998b; Espinola et al., 2002; Jankowski et al., 2003; Lutters et al., 2003; Vega-Ostertag et al., 2004; Shi et al., 2006; Pierangeli et al., 2007), ce qui contribue au développement de la thrombose. Une diminution de l'activation endothéliale ou plaquettaire pourrait, en théorie, améliorer le pronostic des patients souffrant du SAP. Nos résultats démontrent que ni les anti-LB1, ni la LB1 ne diminuent l'activation des cellules endothéliales. Par contre, la LB1 possède la capacité de diminuer à la fois l'activation et l'agrégation plaquettaires, un effet qui n'a pas été observé en présence d'anti-LB1 seuls. Suite à une exposition à la LB1, les plaquettes ne sont plus en mesure d'externaliser leurs P-sélectines et leurs CD63, de modifier la conformation de leurs intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et de s'agréger en réponse à plusieurs agonistes. L'effet anti-plaquettaire observé en présence de l'auto-antigène LB1 nous porte à croire que cette molécule, plutôt que les anti-LB1, serait le principal agent responsable de la thromboprotection décrite chez les patients lupiques.

Les granules plaquettaires contiennent plusieurs molécules, incluant des facteurs angiogéniques et de coagulation, des molécules d'adhésion, d'activation et d'inflammation, des cytokines et des intégrines, jouant toutes des rôles clés dans les processus d'hémostase, de thrombose et de remodelage vasculaire (Reed, 2004). L'importante réduction de l'externalisation des marqueurs granulaires de surface observée sur les plaquettes traitées à la LB1 démontre que cet auto-antigène peut diminuer substantiellement l'activation plaquettaire. La diminution de la P-sélectine de surface, entre autres, pourrait affecter la formation de complexes leucocytes-plaquettes ainsi que l'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales, réduisant ainsi leur capacité à former un caillot sanguin stable.

Le changement de conformation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est essentiel à l'agrégation plaquettaire. L'inhibition du changement de conformation de cette molécule par des inhibiteurs spécifiques, tel que l'Abciximab, est d'ailleurs utilisée pour prévenir la formation d'un thrombus chez des patients souffrant de syndromes coronaires aigus ou subissant une intervention coronaire percutanée (Lefkovits et al., 1995; Matzdorff et al., 2001; Day et al., 2004a). Lors de notre étude, effectuée chez l'humain et le rat, nous avons observé que la LB1 interfère avec l'agrégation plaquettaire, peu importe l'agoniste utilisé, suggérant ainsi qu'elle bloque une étape essentielle menant à l'agrégation, telle que le changement de conformation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Cependant, les inhibiteurs de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ sont très efficaces contre l'agrégation plaquettaire mais peu contre l'activation, tel que démontré par leur absence d'effet sur l'externalisation de la P-sélectine (Massberg et al., 2003; Day et al., 2004a). L'effet de la LB1 à la fois sur l'activation et l'agrégation plaquettaires, une caractéristique intéressante pour le

développement de molécules anti-plaquettaires, nous porte à croire qu'elle pourrait fonctionner différemment des inhibiteurs connus à ce jour. Une activation ou une agrégation plaquettaire persistante *in vivo* peut contribuer à la formation d'un thrombus. L'activation des plaquettes augmente leur interaction avec les leucocytes et les cellules endothéliales, facilitant la libération de médiateurs d'inflammation et de facteurs de croissance (Ishiwata et al., 1997; Serrano et al., 1997). Une agrégation plaquettaire persistante, quant à elle, mène à la formation et au développement de caillots stables, obstruant les vaisseaux sanguins. L'utilisation d'inhibiteurs d'intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$, en combinaison avec des inhibiteurs d'activation plaquettaire, fut déjà suggérée pour prévenir à la fois l'activation et l'agrégation plaquettaires, prévenant ainsi le développement de caillots (Scazziota et al., 2000; Day et al., 2004a). La capacité de la LB1 à réduire simultanément l'activation et l'agrégation plaquettaires laisse supposer qu'elle pourrait, dans un contexte physiologique, prendre part aux mécanismes régulateurs d'activation plaquettaires qui induisent la dégranulation et l'agrégation des plaquettes.

Les molécules MEK/ERK et p38 sont impliquées dans plusieurs voies de signalisation menant à l'activation des plaquettes. Leur phosphorylation peut être induite par une variété d'activateurs. Au cours de notre étude, nous avons démontré que la LB1 inhibe la phosphorylation de la PKC δ , empêchant à son tour la phosphorylation des molécules effectrices situées en aval, MEK/ERK et p38 MAPK. Ces molécules sont des régulateurs connus de la sécrétion de TxA₂, un puissant agoniste des plaquettes libéré lors de leur activation (Yacoub et al., 2006). L'inhibition de la phosphorylation de ces molécules par la LB1 entraîne d'ailleurs une inhibition de la sécrétion de TxA₂, ce qui

pourrait ultimement empêcher l'activation et le recrutement de nouvelles plaquettes aux sites de formation de caillots.

2. La LB1 est libérée par les cellules endothéliales et les neutrophiles en apoptose

La LB1 est une protéine normalement localisée sur la face interne de la membrane nucléaire et qui se retrouve séquestrée dans les corps apoptotiques (Dieudé et al., 2002). Au cours de l'apoptose, elle est clivée par la caspase-6 en deux fragments de 47 et de 25 kDa (Mevorach et al., 1998; Fishelson et al., 2001; Cocca et al., 2002).

Chez les patients lupiques, ainsi que chez certains modèles animaux du LED, l'apoptose des cellules endothéliales se produit simultanément dans plusieurs organes. Ces patients et ces animaux sont souvent incapables de procéder normalement à la clairance des corps et des cellules apoptotiques. Ce phénomène peut entraîner une saturation des mécanismes normaux d'élimination des cellules apoptotiques et, subséquemment, une dégénérescence de ces cellules vers une apoptose tardive ou une nécrose secondaire, qui conduit éventuellement à la libération de certains auto-antigènes intracellulaires (Mevorach et al., 1998).

Il est déjà connu que la LB1 peut être relâchée dans le milieu extracellulaire de lymphoblastes en apoptose et être présente à la surface de neutrophiles apoptotiques (Moisan and Girard, 2006; Schiller et al., 2007). Nous avons démontré que la LB1 pouvait de plus être libérée dans le milieu extracellulaire de cellules endothéliales en nécrose secondaire et celui de neutrophiles en apoptose. Nous avons constaté par la suite que cette LB1, présente dans le surnageant de neutrophiles en apoptose, pouvait diminuer

l'externalisation de la P-sélectine à la surface des plaquettes activées, tout comme la LB1 recombinante utilisée dans notre étude.

Ces observations nous portent à croire que certaines cellules sont en mesure de relâcher de la LB1 active dans le milieu extracellulaire. Dans le contexte du LED, la LB1 libérée par les cellules endothéliales en nécrose secondaire pourrait participer localement à l'inhibition de l'activation plaquettaire. D'autre part, dans un contexte physiologique normal, chez des sujets sains où les neutrophiles ou d'autres cellules entrent en apoptose, la LB1 pourrait devenir accessible aux plaquettes pendant une courte période de temps pour prendre part aux mécanismes régulateurs d'hémostase.

3. La LB1 diminue la formation d'un thrombus artériel dans un modèle de thrombose chez le rat

Nous avons confirmé les propriétés anti-thrombotiques de la LB1 à l'aide d'un modèle de thrombose chez le rat. Le modèle du chlorure de fer (FeCl_3) est une méthode éprouvée d'induction d'un thrombus artériel majoritairement constitué de plaquettes (Day et al., 2004; Fay et al., 1999; Kurz et al., 1990). Suite à l'altération de la paroi vasculaire de la carotide par le FeCl_3 , l'endothélium est dénudé, exposant le collagène sous-endothélial aux plaquettes (Day et al., 2004b). La liaison au collagène des intégrines $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ainsi que des complexes GPIb-V-IX et GPVI, situés à la surface des plaquettes, devient alors possible et entraîne l'activation plaquettaire. Lors de cette étape, la mobilisation du Ca^{2+} ainsi que la libération de l'ADP et du TxA_2 favorisent le

recrutement et l'activation de nouvelles plaquettes (Dubois et al., 2004), induisant l'accumulation de facteur tissulaire et le développement d'un caillot de fibrine (Furie and Furie, 2005). Dans notre étude, nous avons confirmé l'efficacité du FeCl₃ par l'obtention d'une occlusion rapide de la carotide chez les rats exposés au véhicule (HBSS-complet). Toutefois, un retard dans la formation d'un thrombus artériel est observé chez les rats traités à la LB1, malgré l'exposition au chlorure de fer, démontrant les propriétés anti-thrombotiques de la LB1. L'effet protecteur *in vivo* de l'auto-antigène LB1 proviendrait de sa capacité à interférer avec trois étapes clés, décrites *in vitro*, de la formation d'un thrombus induit par le FeCl₃: l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, l'externalisation de la P-sélectine et la sécrétion de TxA₂. Il reste toutefois à déterminer si la LB1 altère le fonctionnement de d'autres molécules impliquées dans la formation d'un thrombus induit par le FeCl₃, telles que les molécules des complexes GPIb-V-IX ou GPVI.

4. La LB1 se lie aux plaquettes et est internalisée au moment de l'activation dans des vésicules de clathrine

Nos résultats suggèrent que l'effet thromboprotecteur de la LB1 est dû à son interaction directe avec les plaquettes activées. La LB1 ne se lie en effet que faiblement aux plaquettes non-activées, reconnues à leur forme discoïde et à l'absence de pseudopodes. Par contre, elle lie fortement les plaquettes activées dans lesquelles elle est ensuite internalisée. Ces observations suggèrent que la LB1 traverse la membrane plasmique des plaquettes lors du processus d'activation. Le profil ponctué en petits amas de la LB1 à l'intérieur des plaquettes suggère de plus une association avec un

compartiment intracellulaire, tel que des vésicules. La LB1 n'est toutefois pas internalisée dans toutes les plaquettes activées. Les plaquettes à un stade tardif d'activation, reconnues souvent grâce à la présence de rotapodes, i.e. des pseudopodes fusionnés les uns aux autres et formant une structure en forme de couronne autour des plaquettes, semblent incapables de lier la LB1. La LB1 ne se fixerait donc aux plaquettes qu'au cours d'une courte période de l'activation plaquettaire. Cette hypothèse est soutenue par nos résultats de cytométrie en flux qui démontrent qu'une activation plaquettaire de 15 secondes est optimale pour la liaison de la LB1 à la surface plaquettaire. D'ailleurs, une activation de plus de 30 secondes réduit déjà de moitié la liaison de la LB1. Nous avons également observé en immunofluorescence que la LB1 se lie préférentiellement aux plaquettes en cours d'externalisation de leurs P-sélectines, i.e. aux plaquettes à un stade précoce de l'activation. L'activation plaquettaire semble donc nécessaire à la liaison et à l'internalisation de l'auto-antigène, mais lorsqu'elle est trop engagée cette interaction devient impossible. Un changement de conformation du récepteur de la LB1, semblable à celui observé pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, pourrait être essentiel à la liaison de l'auto-antigène. L'internalisation de ce récepteur suite à l'activation plaquettaire empêcherait ensuite la liaison de l'auto-antigène. Une telle situation impliquerait qu'une activation plaquettaire bien enclenchée ne permettrait pas à la LB1 d'agir. La LB1 bloquerait donc l'activation plaquettaire à un stade précoce sans toutefois être en mesure de l'arrêter une fois qu'elle est bien initiée. Cette caractéristique est intéressante dans une optique pharmaceutique. Elle conférerait à la LB1 une étroite fenêtre d'activité anti-plaquettaire, prévenant ainsi les complications de saignements souvent associées à certains médicaments connus. La LB1 s'avérerait donc utile dans la

prévention d'événements thrombovasculaires, tels ceux observés chez les patients souffrant du SAP, mais serait inefficace pour éliminer un caillot déjà formé.

Les vésicules jouent un rôle très important dans les phénomènes d'endocytose ainsi que de transport intracellulaire dans plusieurs types cellulaires, dont les plaquettes (Klinger, 1994; Klinger and Klüter, 1995; Nurden et al., 1999; Benmerah and Lamaze, 2007). L'endocytose s'effectue généralement à l'aide de vésicules de clathrine, bien que des mécanismes clathrine-indépendants puissent aussi participer à l'internalisation de différentes molécules (Hansen, 1993). Les protéines non-associées aux radeaux lipidiques utilisent habituellement la voie clathrine-dépendante pour leur internalisation. Parmi les récepteurs connus utilisant cette voie, nous retrouvons notamment la plupart des récepteurs pour les facteurs de croissance ainsi que les GPCR (Wolfe and Trejo, 2007; Benmerah and Lamaze, 2007). L'internalisation d'un récepteur via des vésicules de clathrine est un processus dynamique et fortement régulé qui se déroule généralement quelques secondes après la formation des vésicules (Wolfe and Trejo, 2007). Suite à la fixation du ligand, on assiste premièrement à la phosphorylation du récepteur puis à son recrutement dans des vésicules de clathrine. Ces vésicules sont alors internalisées puis fusionnées à des endosomes, où la dissociation du récepteur et de son ligand s'effectue. Cette dissociation permet ensuite la dégradation du ligand et la réintégration du récepteur à la membrane plasmique. Ce type d'endocytose se produit rapidement dans les plaquettes et sert à internaliser certains récepteurs ou protéines tels que le vWF.

Nos résultats suggèrent que la Lb1 est surtout internalisée par un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant. La cinétique d'internalisation de la Lb1 que nous avons observée suit bien ce modèle: la Lb1 est internalisée entre 15 et 30 secondes après le début de l'activation plaquettaire, elle se retrouve ensuite concentrée dans des

vésicules de clathrine situées à l'intérieur des plaquettes puis elle disparaît des plaquettes quelques minutes après son endocytose. Une petite proportion de LB1 internalisée dans les plaquettes se retrouve toutefois seule, sans molécules de clathrine à proximité. Une interférence entre les anticorps anti-LB1 et anti-clathrine ou l'absence de molécules de clathrine sur ces coupes pourraient expliquer cette absence de colocalisation. La LB1 pourrait aussi utiliser un mécanisme clathrine-indépendant pour son internalisation. Des mécanismes impliquant des cavéolines ont déjà été observés lors de l'internalisation de certaines protéines associées aux radeaux lipidiques, telles que les membres de la famille des kinases Src (Dorahy et al., 1996). Ces observations sont cependant controversées puisque la présence de cavéolines dans les plaquettes ne fait pas l'unanimité (Pestina et al., 1997). Les mécanismes d'internalisation clathrine-indépendants sont généralement liés à l'internalisation de récepteurs ou de molécules associés aux radeaux lipidiques et qui se retrouvent dans une fraction cellulaire insoluble par les détergents (Sargiacomo et al., 1996; Dorahy et al., 1996). Le fait que le récepteur de la LB1 se retrouve à la fois associé et non-associé aux radeaux lipidiques pourrait indiquer que plus d'un mécanisme d'internalisation de ce récepteur existent. Cette hypothèse reste toutefois à vérifier.

5. La LB1 interagit avec l'IR et module l'une de ses cascades de phosphorylation

Nous avons découvert que la LB1 interagit avec la chaîne- β du récepteur de l'insuline dont il existe environ 570 copies fonctionnelles dans chaque plaquette humaine (Hajek et al., 1979; Falcon et al., 1988; López-Aparicio et al., 1992). Chez des individus sains, l'insuline, tout comme la LB1, semble supprimer les fonctions plaquettaires

(Ferreira et al., 2004). Il a été observé que les plaquettes de patients atteints du diabète de type 2 (DM-2), qui possèdent une résistance à l'insuline, sont beaucoup plus réactives que celles de patients sains. Il est suggéré que chez ces patients, l'inhibition de l'activation plaquettaire, normalement causée par l'insuline, ne peut se produire en raison de leur résistance (Ferreira et al., 2006). Advenant la confirmation d'une telle hypothèse, le récepteur de l'insuline s'avérerait un acteur important dans la régulation de l'activation plaquettaire.

L'insuline se lie à son récepteur via la sous-unité α qui induit alors un changement conformationnel dans les sous-unités β (Youngren, 2007), conduisant à l'activation des tyrosines kinases intrinsèques (Youngren, 2007). L'IRS-1 est ensuite recruté et phosphorylé sur ses résidus tyrosine, permettant la régulation de différentes fonctions plaquettaires (Zhang et al., 1996; Hirsch et al., 2001; Li et al., 2001; Barry et al., 2003; Watanabe et al., 2003; Chen et al., 2004; Woulfe et al., 2004; Li et al., 2006; Yacoub et al., 2006; Youngren, 2007; Yin et al., 2008). La LB1 semble se lier avec le domaine extracellulaire de la chaîne- β . Une fois liée, la LB1 induit l'autophosphorylation de l'IR mais inhibe l'une des cascades de phosphorylation normalement initiées par l'insuline dès l'étape de phosphorylation de l'IRS-1. Cette molécule est responsable, directement ou indirectement, de la phosphorylation de PI3K, Akt-1, GSK et Tau. L'inhibition de la phosphorylation de l'IRS-1 par la LB1 entraîne donc l'inhibition de la phosphorylation de ces molécules. Ultiment, la sécrétion de TxA_2 , nécessaire à l'activation autocrine des plaquettes, ainsi que le réarrangement du cytosquelette, essentiel à l'agrégation plaquettaire, sont affectés, empêchant l'amplification de l'activation plaquettaire.

Nos résultats indiquent que les anti-LB1 ne semblent moduler d'aucune façon l'activité de la LB1. Ces auto-anticorps, purifiés chez trois patients différents, n'empêchent pas l'effet inhibiteur de la LB1 ni sur l'externalisation de la P-sélectine ni sur l'agrégation plaquettaire. De plus, ajoutés à la LB1 dans les expériences de signalisation, ils continuent à inhiber la phosphorylation de IR, PKC δ , Akt-1 et MEK sur une période de 10 min dans les plaquettes activées à la thrombine. Des études ont déjà démontré que certains auto-anticorps ont le pouvoir d'augmenter la phosphorylation de différentes molécules, stimulant ainsi des voies d'activation non-désirées qui peuvent, par exemple, augmenter la migration ou l'activation de certaines cellules (Pierangeli et al., 2004; Rubenstein and Diaz, 2006; Holmen et al., 2007; Makita et al., 2007; Svegliati et al., 2007). Ces auto-anticorps sont généralement définis comme étant pathogènes. À notre connaissance, il n'existe pas encore d'étude faisant mention d'auto-anticorps spécifiques, associés à une maladie auto-immune, qui soient associés à un phénomène protecteur comme la thromboprotection. La présence des anti-LB1 dans nos expériences n'interfère pas avec l'effet de la LB1, renforçant l'idée que l'auto-antigène est bel et bien responsable des effets inhibiteurs observés sur l'activation plaquettaire, dans notre modèle. Ceci va à l'encontre de ce qui se produit dans plusieurs autres maladies auto-immunes où un auto-anticorps se lie à son auto-antigène et bloque son effet physiologique.

6. La LB1 en présence d'anti-LB1, persiste dans les plaquettes

Dans les hépatocytes, l'insuline se lie au IR, est internalisée, dissociée de son récepteur et dégradé entre 7 et 10 min suivant son internalisation. Nous avons constaté

que la cinétique interne de la LB1 se rapprochait de celle de l'insuline. Une fois internalisée, la LB1 disparaît entre 5 et 10 min suivant l'activation des plaquettes. Toutefois, lorsque la LB1 est en présence d'anti-LB1, présumément en complexes, sa durée de vie à l'intérieur des plaquettes semble augmenter puisqu'elle est toujours détectée après 20 min d'activation à la thrombine. Les auto-anticorps anti-LB1 semblent stabiliser la présence de la LB1 et inhiber son exocytose ou sa dégradation.

D'autres auteurs ont déjà démontré l'internalisation de complexes immuns dans les plaquettes. L'effet ou le but d'une telle internalisation n'ont toujours pas été démontrés, mais certains ont suggéré qu'ils pourraient contribuer à la clairance des complexes immuns, en utilisant les plaquettes comme réservoir ou concentrateurs avant leur phagocytose (Worth et al., 2006b). En maintenant la LB1 dans les plaquettes, les anti-LB1 pourraient prolonger l'effet inhibiteur de l'auto-antigène sur les plaquettes, les rendant inaptes à répondre correctement aux stimuli d'activation. Toutefois, tel que proposé par Worth et ses collègues, l'accumulation de tels complexes dans les plaquettes pourrait éventuellement contribuer à leur destruction (Worth et al., 2006b). Il a d'ailleurs été documenté que la caractéristique la plus souvent associée à la présence d'anti-LB1 chez les patients lupiques, après la présence de LAC, était la thrombocytopénie (Senécal et al., 1999). La raison pour laquelle les patients porteurs d'anti-LB1 souffrent fréquemment de thrombocytopénie n'est pas connue. La clairance des plaquettes peut augmenter dans certaines conditions, telles que lors de changements de température, lorsqu'elles sont endommagées ou lorsqu'elles ne répondent plus à des stimuli. En temps normal, ceci permettrait d'éliminer des plaquettes incapables de répondre correctement à un stimulus.

La persistance de la LB1 internalisée dans les plaquettes en présence d'anti-LB1 fut confirmée chez les patients lupiques possédant des anti-LB1. En effet, la LB1 fut détectée uniquement dans les plaquettes de patients lupiques possédant des anti-LB1. La présence d'anti-LB1 augmenterait donc la persistance de la LB1 dans les plaquettes, rendant sa détection possible chez les patients anti-LB1 positifs. Par ailleurs, l'internalisation transitoire et la clairance rapide de la LB1 chez les sujets sains empêche sa détection. Les anti-LB1 joueraient donc un rôle indirect dans le phénomène de thromboprotection attribué à la LB1 en stabilisant la présence de la LB1 dans les plaquettes.

À notre connaissance, aucun auto-anticorps n'a encore été rapporté comme étant capable de prolonger la durée de vie d'un auto-antigène dans les cellules. Le mécanisme par lequel les anti-LB1 accomplissent ce travail dans les plaquettes n'est pas encore compris. Il est possible qu'ils interfèrent avec les processus normaux de recyclage des récepteurs associés aux vésicules de clathrine. À titre d'exemple, ils pourraient inhiber la fusion des vésicules de clathrine aux endosomes, empêchant ainsi la dissociation de la LB1 d'avec l'IR. Notre étude nous a permis d'apporter de nouvelles connaissances quand à l'implication des anti-LB1 sur la persistance de la LB1 dans les plaquettes; de nouvelles expérimentations seront cependant nécessaires pour élucider complètement ce phénomène.

7. Modèle proposé

Nos résultats nous ont amenés à élaborer le modèle de travail représenté aux figures 30 et 31. Suite à une blessure vasculaire, les cellules endothéliales, ainsi que d'autres cellules recrutées au site de blessure, entrent en apoptose. Lors de ce processus, la LB1

est redistribuée dans les corps apoptotiques et peut, sous certaines conditions, être relâchée et libérée dans le milieu extracellulaire, tel qu'observé pour d'autres auto-antigènes connus (Tricot et al., 2000; Dieudé et al., 2004; Winn and Harlan, 2005; Hénault et al., 2006; Robitaille et al., 2007; Tabas, 2007). Cette LB1 extracellulaire peut alors prendre part aux mécanismes régulateurs d'activation plaquettaire. Chez des individus sains, l'effet de cette LB1 n'est que transitoire, puisqu'elle est rapidement clairée des plaquettes (Fig.30). Par contre, chez des patients souffrant de troubles d'immunorégulation, tels les patients lupiques, une réponse auto-immune se développe, menant à une production importante d'auto-anticorps anti-LB1. Ces auto-anticorps lient la LB1 extracellulaire, formant des complexes immuns qui sont internalisés dans les plaquettes lors de leur activation. La LB1 ainsi fixée aux anti-LB1 persiste dans les plaquettes, prévenant ainsi leur réactivation. Dans le contexte du SAP où les aPL peuvent induire l'activation plaquettaire, les patients possédant des anti-LB1 seraient avantagés, puisque leurs plaquettes seraient moins réactives. La présence d'anti-LB1 chez les patients lupiques a donc un effet thromboprotecteur. Toutefois, les plaquettes anti-LB1/LB1 positives seraient retirées plus rapidement de la circulation, en raison de leur absence de réponse envers différents stimuli, contribuant ainsi à la thrombocytopénie observée *in vivo* chez les patients porteurs d'anti-LB1 (Senécal et al., 1999) (Fig.31).

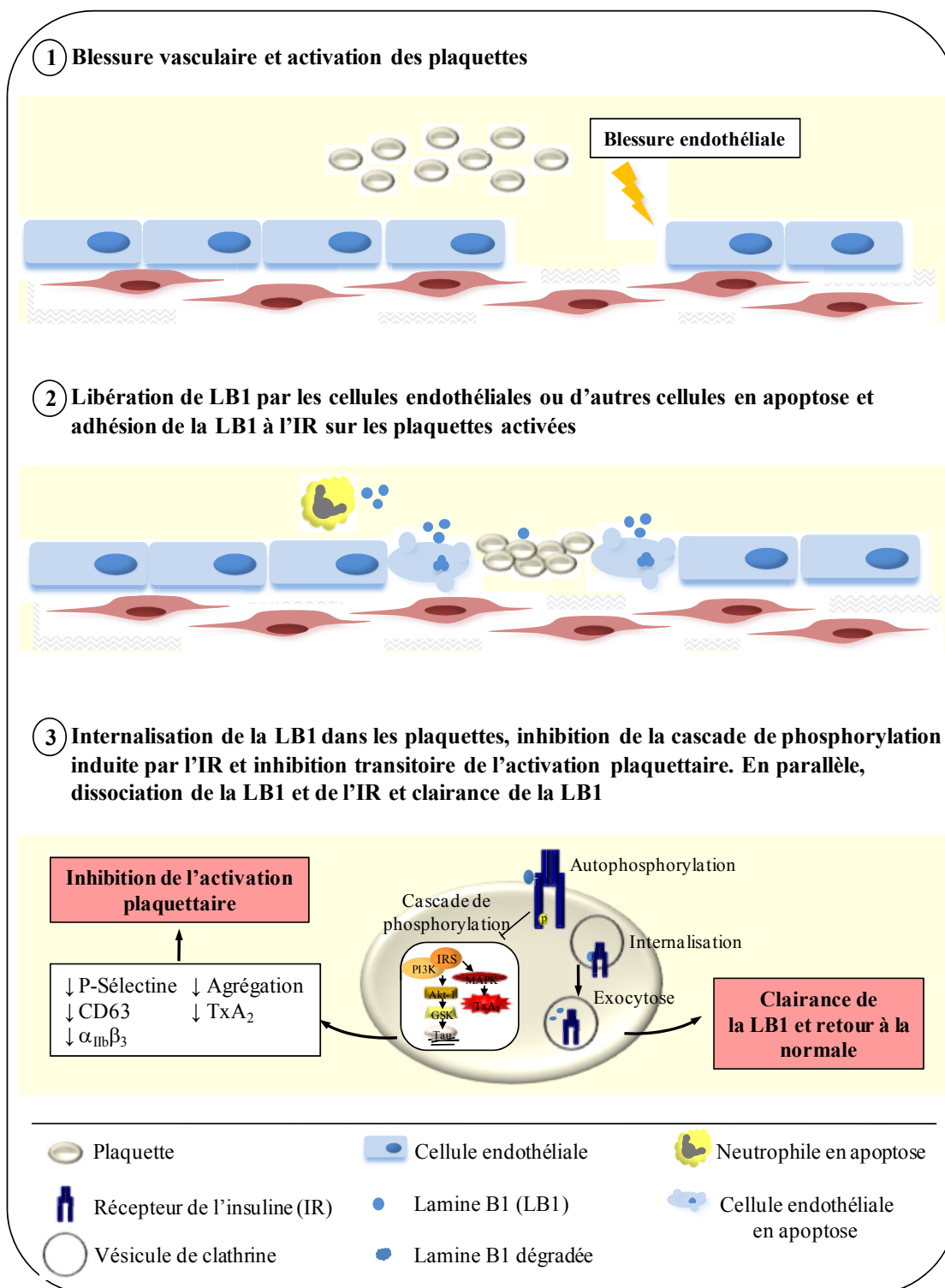


Figure 30: Hypothèse quant à la fonction de la LB1 extracellulaire chez des individus sains

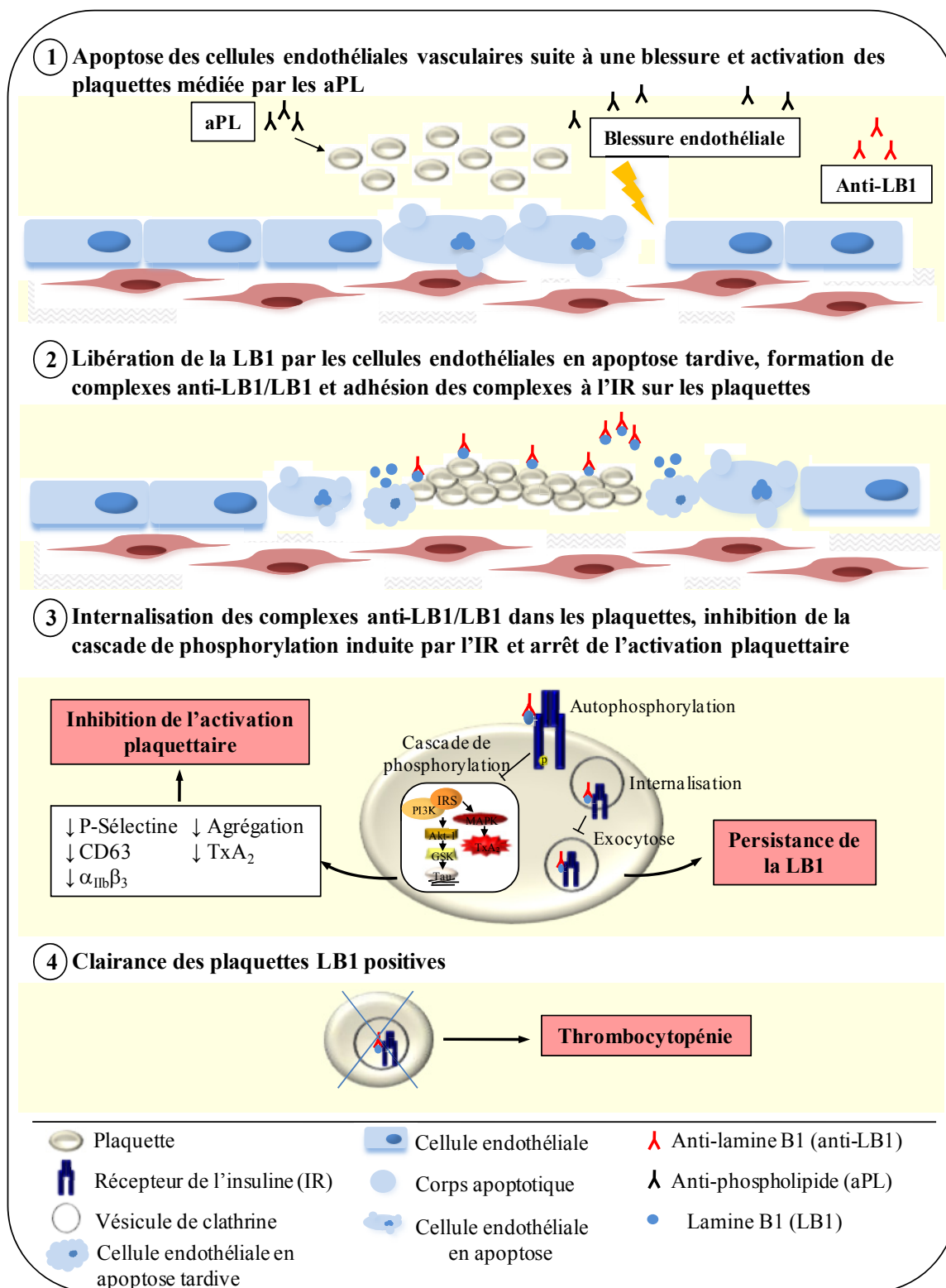


Figure 31: Hypothèse quant au rôle thromboprotecteur des anti-LB1 chez les patients atteints du LED

Conclusions et perspectives

1. Conclusions

L'étude présentée dans cette thèse avait pour buts d'identifier l'intervenant de la coagulation avec lequel la LB1 ou les complexes LB1/anti-LB1 interagissaient; de définir les rôles joués par la LB1 ou les complexes LB1/anti-LB1 dans les mécanismes d'hémostase; d'élucider le mécanisme d'action de la LB1 ou des complexes LB1/anti-LB1; d'expliquer la thromboprotection dont jouissent les patients anti-LB1 positifs. Nos résultats démontrent que la LB1 constitue l'agent responsable de l'inhibition de l'activation plaquettaire, en interagissant avec le récepteur de l'insuline, alors que les anti-LB1 jouent plutôt un rôle indirect dans la thromboprotection.

Bien qu'une corrélation étroite entre les titres sériques d'anti-LB1 et une protection contre les thromboses ait déjà été observée chez des patients lupiques souffrant d'un SAP, le rôle des anti-LB1 dans les mécanismes thromboprotecteurs restait à démontrer.

Notre étude nous a permis de démontrer que la LB1, une protéine intra-nucléaire impliquée dans l'organisation de la chromatine, la réplication de l'ADN et la transcription des gènes, peut être libérée par des cellules en apoptose et se lier spécifiquement à la surface des plaquettes par l'entremise du récepteur de l'insuline. Une fois liée aux plaquettes, la LB1 est internalisée et bloque la cascade de phosphorylation normalement initiée par le récepteur de l'insuline. Ce blocage inhibe alors l'activation plaquettaire, probablement en empêchant la réorganisation du cytosquelette et la sécrétion de molécules la potentialisant, telles que le TxA₂. Puisque l'activation

plaquettaire est essentielle à la formation d'un thrombus artériel, son inhibition, par la LB1, nous permet donc d'attribuer un rôle thromboprotecteur à cet auto-antigène. Cette observation nous laisse entrevoir la possibilité de développement de nouveaux agents anti-thrombotiques pour les patients atteints du SAP. Elle soulève également l'hypothèse d'un rôle actif de certains auto-antigènes dans les maladies auto-immunes.

Les résultats de notre étude nous ont de plus fourni des preuves quant au potentiel thromboprotecteur des anti-LB1 dans le LED. Ces auto-anticorps semblent en effet empêcher la clairance rapide de la LB1 internalisée dans les plaquettes, ce qui nous laisse croire qu'ils pourraient provoquer l'inhibition prolongée de l'activation plaquettaire. Cette observation nous a permis d'élaborer un modèle biologique décrivant comment les auto-anticorps anti-LB1 participeraient indirectement au mécanisme de thromboprotection.

2. Questions pour des études ultérieures

Bien que notre étude amène des réponses quant au rôle protecteur de la LB1 et des anti-LB1 dans le LED, d'autres recherches seront nécessaires afin de mieux comprendre l'ensemble des réactions impliquées. Les questions suivantes suscitent un intérêt particulier.

1. Est-ce que les plaquettes exposées à la LB1 réagissent normalement à un stimulus après la clairance de cet auto-antigène? La cinétique de la LB1 à l'intérieur des plaquettes étant maintenant établie, de nouvelles expériences pourraient être effectuées en

utilisant les techniques de mesure d'activation plaquettaire en cytométrie en flux ainsi qu'en agrégométrie. Des plaquettes ayant internalisé et clairé la LB1 pourraient être restimulées afin de comparer leurs réponses à celles des plaquettes non exposées à l'auto-antigène. Ces expériences seraient surtout intéressantes dans un contexte pharmaceutique afin de vérifier si l'effet de la LB1 est permanent ou transitoire.

2. Est-ce que les anti-LB1 empêchent les plaquettes de répondre à un stimulus à long terme et est-ce que cet état contribue à leur destruction? Nous avons démontré que les anti-LB1 sont responsables de la persistance de la LB1 dans les plaquettes. Est-ce qu'une telle persistance empêche les plaquettes de répondre à de nouveaux stimuli? Si tel était le cas, notre modèle biologique serait confirmé et les anti-LB1, chez les patients lupiques, serviraient à maintenir une partie des plaquettes à l'état de repos. Des plaquettes ayant internalisé de la LB1 et des anti-LB1 pourraient être restimulées afin de comparer leurs réponses à celle de plaquettes exposées à de la LB1 seule.

3. Est-ce que les plaquettes de patients souffrant du DM-2 sont inhibées par la LB1? Puisque les plaquettes de patients souffrant du DM-2 ne répondent pas correctement à une stimulation à l'insuline, il serait intéressant de vérifier si elles peuvent répondre à la LB1, qui semble utiliser le même récepteur que l'insuline. Si la LB1 est en mesure d'inhiber les plaquettes de patients diabétiques, en raison de sa capacité à lier un site actif différent de celui de l'insuline, i.e. la sous-unité β et non la sous-unité α , elle pourrait avoir le potentiel de réduire en partie les problèmes vasculaires souvent observés chez ces patients.

4. Est-ce que de nouveaux inhibiteurs du récepteur de l'insuline pourraient protéger les patients atteints du SAP contre les thromboses, tout en leur permettant de préserver leurs fonctions plaquettaires? Le développement d'inhibiteurs spécifiques de l'IR sera requis pour faire cette évaluation. Notre recherche nous a permis de découvrir un nouveau mécanisme de contrôle de l'activation plaquettaire. Des études plus approfondies sur la signalisation de l'IR dans les plaquettes pourraient éventuellement mener au développement de nouvelles molécules anti-plaquettaires utilisant la même voie d'entrée que la LB1 dans ces cellules.

Les maladies auto-immunes, comme le lupus, restent à ce jour mal comprises et les traitements disponibles pour ces maladies ne sont pas toujours efficaces. Pour la science, ces maladies restent un grand mystère et un grand défi. Notre étude s'inscrit dans le cadre de l'avancement de la recherche sur le lupus érythémateux disséminé et elle ouvre la porte à de nouvelles options thérapeutiques, plus ciblées, pour les patients lupiques. La possibilité de limiter certains symptômes associés à cette maladie améliorerait évidemment la qualité de vie de patients qui en ont grand besoin.

Annexe

1. Matériel et méthodes supplémentaires

1.1 Clonage, production et purification des fragments de la LB1: LB1-Coil et LB1-COOH

Afin de construire des vecteurs pour l'expression des protéines LB1-Coil et LB1-COOH fusionnées à la GST les séquences codant pour les deux fragments de la LB1, LB1-Coil (aa 232-384) et LB1-COOH (aa 385-586) ont été amplifiées par PCR à partir du gène synthétique codant pour le fragment M2 (portion C-terminale, aa 222-579) de la LB1, généré avec un synthétiseur de gène (Operon Technologies). Les amorces suivantes furent utilisées pour l'amplification: LB1-Coil-*Bam*HI (5'-ATCTAGGATCCATGGGCTCCGGGCGCCA-3'); LB1-Coil-*Not*I (3'-ATCTAGCGGCCGCTTCACCTTCTAATAACTTACGG-5'); LB1-COOH-*Bam*HI (5'-ATCTAGGATCCGAGGAACGTTTGAAATTGTCT-3'); LB1-COOH-*Not*I (3'-ATCTAGCGGCCGCCATAATAGCACAAGAACGGTT-5'). Le vecteur pET19bM2 a été mélangé au tampon PFU (Stratagene; 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Triton X-100 and 0,1 mg/ml BSA), 2 mM de chacun des déoxyribonucléosides triphosphates (dNTPs; Invitrogen), 0,5 µM de chacune des amorces, 1,25 unité d'enzyme PFU Turbo (Stratagene) et complété avec de l'eau DEPC à un volume de 25 µL. Le programme du PCR fut le suivant : dénaturation initiale (94°C, 3 min), dénaturation (94°C, 30 sec), hybridation (55°C, 30 sec), élongation (72°C, 1 min) et élongation finale (72°C, 7 min). L'amplification a été faite en 32 cycles. Les

fragments amplifiés furent digérés avec les enzymes *Bam*HI et *Not*I, mis sur gel d'agarose 1,8% Tris/Borate/EDTA, puis concentrés et purifiés avec des colonnes Qiaquick (Qiagen). Il furent ensuite insérés dans le vecteur pGEX-6P1 (Amersham) digéré. Les plasmides pGEX-LB1-Coil et pGEX-LB1-COOH furent finalement introduits dans des bactéries BL21 (DE3) (Stratagene) par choc thermique.

1.2 Production et purification

Les bactéries BL21 (DE3) portant le plasmide pGEX-LB1-Coil et pGEX-LB1-COOH codant pour des fragments de la LB1 furentensemencées dans du milieu *Luria Bertani* autoclavé, fraîchement additionné de carbénicilline (50 µg/ml, Sigma). Les cultures de départ furent incubées pendant la nuit à 30°C. Les cultures de nuit ont par la suite été diluées 1:200 dans du milieu frais, puis incubées à 37°C jusqu'à l'atteinte d'une densité optique (600 nm) d'environ 0,6. Les bactéries furent ensuite induites à 30°C avec 0,1 mM IPTG (Sigma) pendant 2 heures, pour produire les fragments de la LB1, puis furent centrifugées et congelées en culots à -80°C.

La LB1 a été purifiée avec de la résine glutathione sépharose 4B (Amersham) tel que décrit ci-dessous. Chaque culot bactérien fut resuspendu dans 20 mL de tampon ice cold PBS 1X, pH 7,3, 2 mg/mL de lysozyme et 1 mM de DTT en agitant pendant 20 min à 4°C. Le lysat cellulaire obtenu fut ensuite soniqué 4 fois 10 secondes et incubé pendant 15 min à 4°C avec 1 mL de 20% Triton X-100 (final 1%). Le lysat cellulaire fut par la suite centrifugé à 30 000 x g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant fut récupéré et filtré sur des filtres de 0,45 µM avant d'être versé sur 1 ml de résine glutathione et incubé pendant 1,5 heures à 4°C. Afin de ne conserver que notre protéine d'intérêt, la résine fut

lavée trois fois avec 20 mL de tampon PBS 1X-triton X-100. Finalement, la LB1 fut éluée 4 fois avec 750 μ L d'une solution constituée de 50 mM Tris-HCL, 10 mM glutathione réduite, pH 8,0. La concentration finale des fragments de la LB1 fut ensuite ajustée à 0,25 μ g/mL à l'aide de concentrateurs Centricon (Millipore, Billerica, MA) et le tampon d'entreposage fut changé pour du tampon HBSS-complet. La pureté des protéines purifiées fut ensuite évaluée par gel SDS-PAGE.

2. Résultats supplémentaires

2.1 La LB1 complète est essentielle pour obtenir une activité anti-plaquettaire maximale

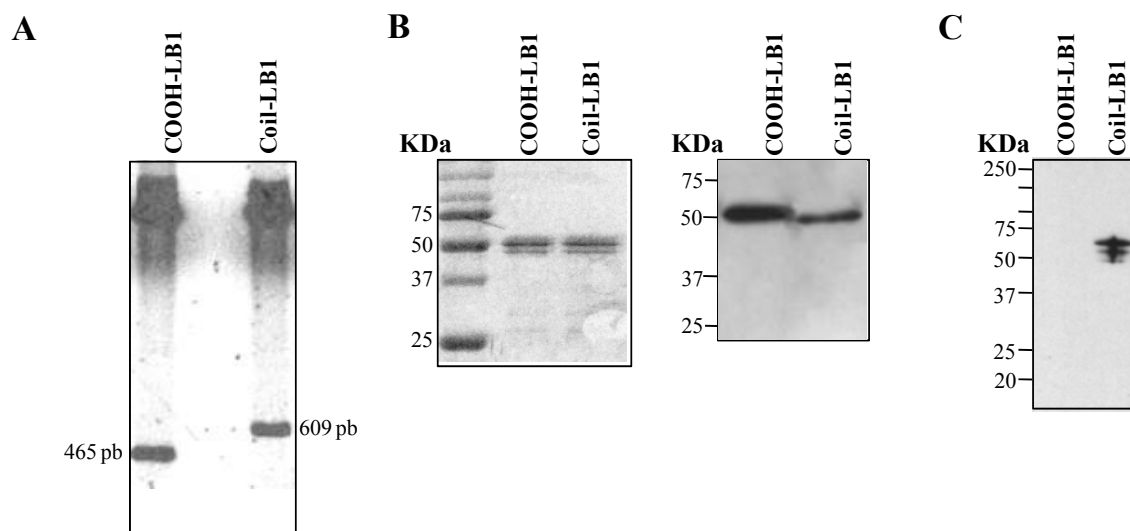
Afin de cartographier les régions actives de la LB1, quatre fragments ont été produits. Deux fragments correspondant respectivement à ceux produits lors du clivage de la LB1 pendant l'apoptose ont d'abord été construits (travail fait par Mme Nathalie Brassard). Ces fragments, un de 25 kDa situé dans la partie N-terminale de la protéine, et un de 47 kDa situé dans la partie C-terminale ont ensuite été testés pour leur activité anti-plaquettaire. Tel que mentionné précédemment, le fragment de 25 kDa (NH₂-LB1) était sans effet. Le fragment de 47 kDa étant peu soluble et extrêmement difficile à purifier, deux autres fragments, nommés COOH-LB1 (portion C-terminal du fragment de 47 kDa) et Coil-LB1 (portion N-terminale du fragment de 47 kDa et possédant la structure en hélice caractéristique des lamines) ont été produits. Ces fragments ont été construits pour posséder une tag GST afin d'augmenter leur solubilité et de faciliter leur purification. Tel que démontré à la Fig. Annexe 1A, suite au clonage deux clones, un de 609 paires de base, correspondant au fragment LB1-COOH et un de 465 paires de base, correspondant au fragment LB1-Coil ont été obtenus. Ces clones ont ensuite été insérés dans des bactéries BL21 pour produire les protéines d'intérêt. La purification des protéines nous a permis d'obtenir les deux fragments, sans contaminant, ayant des poids moléculaires avec la tag GST de 49,1 kDa pour le fragment COOH-LB1 et de 45,1 pour le fragment Coil-LB1 (Fig. Annexe 1B). Les protéines observées sur gel coloré au bleu de coomassie (Fig. Annexe 1B) réagissaient toutes deux avec un anticorps polyclonal anti-LB1 GP5, démontrant qu'il s'agissait bien de fragments de la LB1 (Fig. Annexe 1C). Afin de

différencier ces deux fragments et de s'assurer qu'ils correspondaient aux régions recherchées de la LB1 nous avons utilisé un deuxième anticorps, anti-filaments intermédiaires, ne reconnaissant que la région coil des filaments intermédiaires, contenu uniquement dans le fragment Coil-LB1. Tel qu'attendu, l'anticorps anti-filaments intermédiaires ne reconnaissait que le fragment Coil-LB1 (Fig. Annexe 1C).

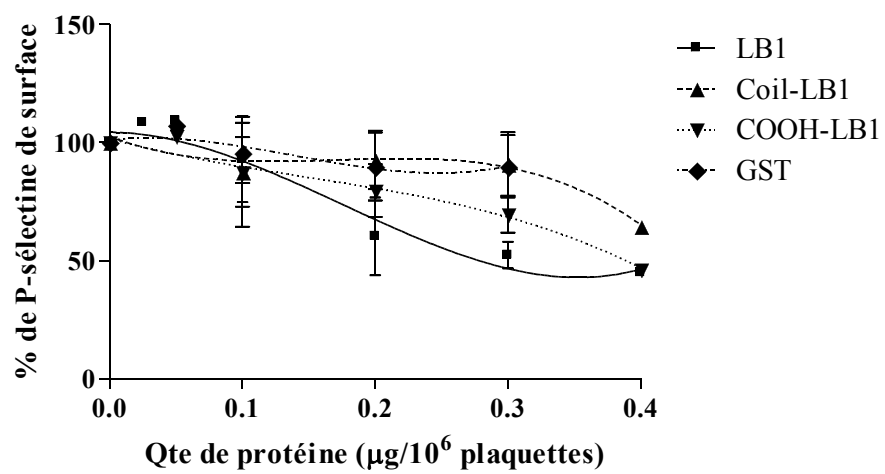
Ces fragments ont ensuite été utilisés dans des essais de cytométrie en flux pour mesurer leur activité anti-plaquettaire. L'externalisation de la P-sélectine à la surface des plaquettes en présence de LB1 ou de ses fragments a été testée. Les fragments COOH-LB1 et Coil-LB1 semblent tous deux diminuer l'externalisation de la P-sélectine bien que le fragment COOH semble plus efficace. Néanmoins, les deux fragments restent moins efficaces que la LB1 complète puisqu'une plus forte concentration de ces fragments est requise pour diminuer l'activité plaquettaire (Fig. Annexe 1D). Ces résultats suggèrent que l'activité de la LB1 est située dans la portion C-terminale de la protéine. Toutefois, l'activité anti-plaquettaire complète n'est observée qu'en présence de la protéine entière. Il est donc possible que la conformation de la protéine, qu'elle soit due à la LB1 entière ou à son fragment C-terminal complet (LB1-Coil + LB1-COOH), soit essentielle pour obtenir une activité anti-plaquettaire maximale.

Figure Annexe 1: Production, purification et effet des fragments coil-LB1 et COOH-LB1 sur l'activation plaquettaire.

(A) Deux clones, un de 609 pb, correspondant au fragment LB1-COOH et un de 465 pb, correspondant au fragment LB1-Coil ont été obtenus. (B) La purification des protéines nous a permis d'obtenir un fragment de 49.1 kDa (COOH-LB1) et un 45.1 kDa (Coil-LB1). L'anti-LB1 GP5 réagit contre ces deux fragments. (C) Un anti-filaments intermédiaires ne réagit que contre le fragment coil possédant la structure conservée des filaments intermédiaires. (D) Les deux fragments diminuent l'externalisation de la P-sélectine, mais semblent moins efficaces que la LB1 complète.



D



2.2 L'albumine humaine et les IgG humains purifiés agissent de la même façon que la NH₂-LB1 et les anti-LB1 purifiés.

L'albumine humaine, ayant un poids moléculaire équivalent à celui de la LB1, soit de 67 kDa, et les IgG humains purifiés n'ont pas d'effet sur l'agrégation plaquettaire peu importe l'agoniste utilisé (Fig. Annexe 2). À une concentration de 0,1, 0,2 ou 0,3 $\mu\text{g}/10^6$ plaquettes, la HSA et les IgG humains purifiés ne diminuent pas l'agrégation plaquettaire finale stimulée par chacun des agonistes, tout comme la NH₂-LB1 et les anti-LB1 purifiés.

2.3 Les radeaux lipidiques sont enrichis dans les plaquettes dans les fractions 3 et 4 correspondant aux couches de 15 et 20% sucrose.

Il est connu que dans les plaquettes, les radeaux lipidiques sont enrichis dans les fractions 3 et 4 correspondant aux couches de 15 et 20% sucrose. Nous avons confirmé le succès de l'isolation des radeaux lipidiques en détectant la présence du marqueur CD36 uniquement dans les 2 fractions ci-haut mentionnées (Fig. Annexe 3). Il est connu que ce marqueur n'est présent que dans les radeaux lipidiques des plaquettes (Gousset et al., 2005).

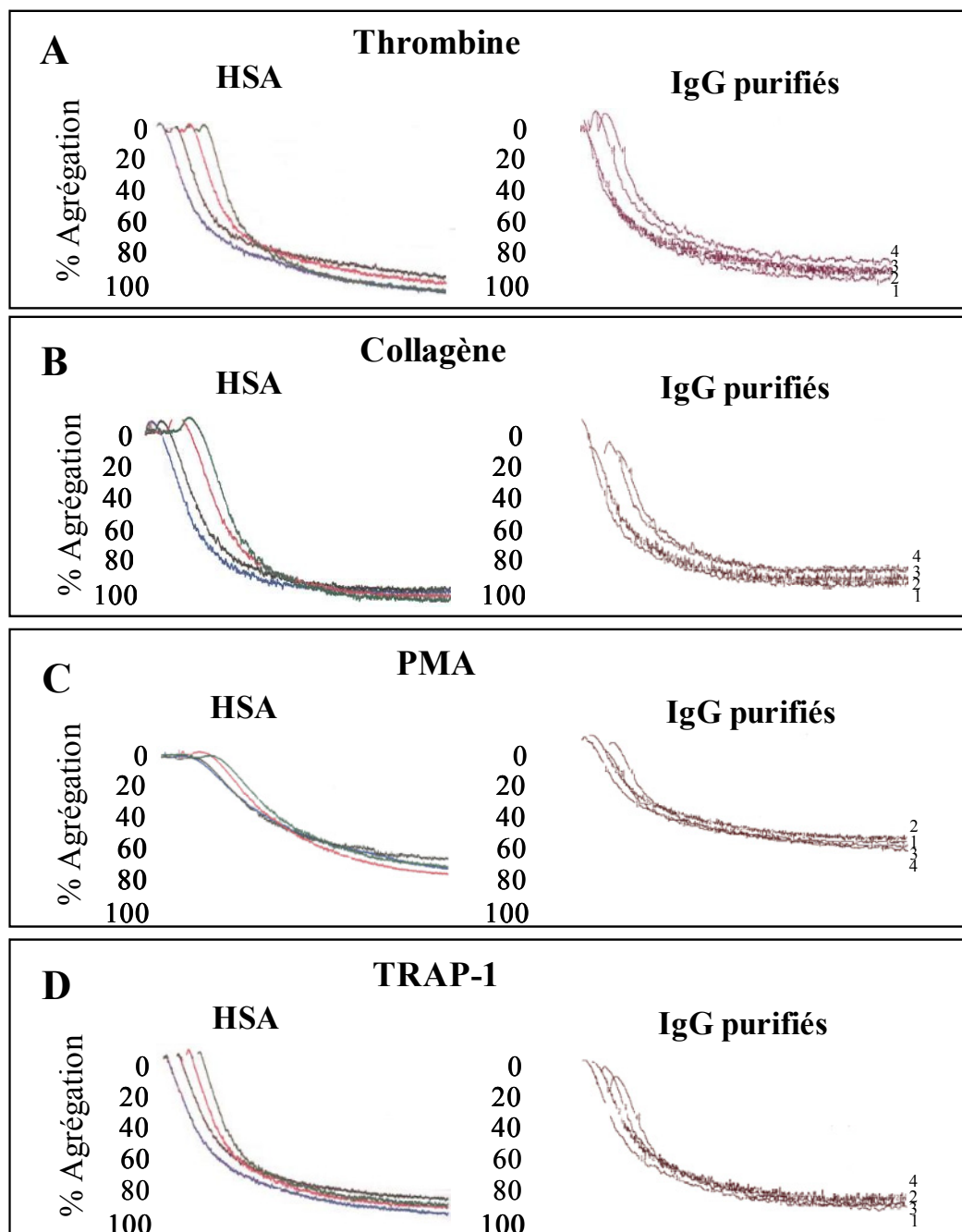
2.4 La LB1 module le plus fortement la phosphorylation de la chaîne- β de l'IR.

Afin d'identifier le récepteur auquel la LB1 se lie dans les plaquettes, nous avons effectué un "KinexTM antibody microarray" qui mesure les changements dans

l'expression et la phosphorylation de 639 protéines dans des plaquettes activées ayant été exposées ou non à de la LB1. Ces expériences nous ont révélé que la LB1 module le plus fortement la phosphorylation de la chaîne- β du récepteur de l'insuline. Lors de ces expériences la phosphorylation de la chaîne- β de l'IR était modulée de plus de 7000% (Fig. Annexe-4).

Figure Annexe 2: L'albumine humaine et des IgG humains purifiés ne diminuent pas l'agrégation plaquettaire.

Des plaquettes humaines isolées furent traitées avec différentes concentrations de (A) HSA ou de d'IgG humains purifiés avant d'être activées avec (A) 0,1 unité/mL de thrombine; (B) 2 $\mu\text{g/mL}$ de collagène; (C) 1 μM de PMA; (D) 5 μM de TRAP-1. Les tracés d'agrégation plaquettaire sont représentatifs de 4 expériences indépendantes, effectuées sur les plaquettes de sujets distincts. 1 ou — 0 $\mu\text{g}/10^6$ plaquettes, 2 ou — 0,1 $\mu\text{g}/10^6$ plaquettes, 3 ou — 0,2 $\mu\text{g}/10^6$ plaquettes, 4 ou — 0,3 $\mu\text{g}/10^6$ plaquettes.



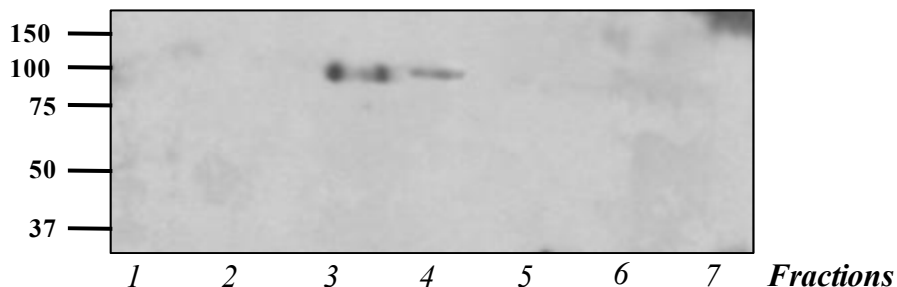


Figure Annexe 3: Les radeaux lipidiques sont enrichis dans les plaquettes dans les fractions 3 et 4 correspondant aux couches de 15 et 20% sucrose

La marqueur CD36 se retrouve uniquement dans les radeaux lipidiques isolées dans les fractions 3 et 4 d'un gradient étagé de sucrose. Des lysats plaquettaires furent séparés sur un gradient étagé de sucrose. Chacune des fractions fut récoltée puis séparée sur gels SDS-PAGE avant d'être analysée pour leur réactivité avec un anti-CD36.

Figure Annexe 4: La LB1 module le plus fortement la phosphorylation de la chaîne- β du récepteur de l'insuline.

"Kinex TM antibody microarray" mesurant les changements dans l'expression et la phosphorylation de 639 protéines dans des plaquettes ayant été incubées ou non avec 0,2 μg de LB1/ 10^6 plaquettes, puis activées à la thrombine (0,05 U/mL). Le pourcentage de modulation est représenté par le % CFC.

Sample IDs: Control ID: 1 (Kinexus ID 9696), Treated ID: 2 (Kinexus ID 9697)
 Array barcode: K010403008

Target Protein Name	Phospho Site (Human)	Full Target Protein Name	% CFC	Total % Error Range
14-3-3 z	Pan-specific	14-3-3 protein zeta		
14-3-3 z	Pan-specific	14-3-3 protein zeta	51.33	1.39
4E-BP1	S65	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (PHAS1)		
4E-BP1	S65	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (PHAS1)	39.22	64.01
Abl	Pan-specific	Abelson proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase		
Abl	Pan-specific	Abelson proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase	-225.71	52.86
Abl	Y412	Abelson proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase		
Abl	Y412	Abelson proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase	25.14	2.33
AcCoA carboxylase	S80	Acetyl coenzyme A carboxylase		
AcCoA carboxylase	S80	Acetyl coenzyme A carboxylase	36.94	38.06
ACK1	Pan-specific	Activated p21cdc42Hs protein-serine kinase		
ACK1	Pan-specific	Activated p21cdc42Hs protein-serine kinase	38.64	62.00
Adducin a/g	S726	Adducin alpha/gamma (ADD1/3)		
Adducin a/g	S726	Adducin alpha/gamma (ADD1/3)	146.73	10.05
AIF	Pan-specific	Apoptosis inducing factor (programed cell death protein 8 (PDCD8))		
AIF	Pan-specific	Apoptosis inducing factor (programed cell death protein 8 (PDCD8))	-95.38	1312.64
Aik	Pan-specific	Anaplastic lymphoma kinase		
Aik	Pan-specific	Anaplastic lymphoma kinase	-19.35	56.37
AK2	Pan-specific	Adenylate kinase 2		
AK2	Pan-specific	Adenylate kinase 2	19.29	9.08
Alk	Pan-specific	Anaplastic lymphoma kinase		
Alk	Pan-specific	Anaplastic lymphoma kinase	49.03	19.13
ALS2CR7	Pan-specific	Amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosomal region candidate gene protein-serine kinase 7		
ALS2CR7	Pan-specific	Amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosomal region candidate gene protein-serine kinase 7	13.30	13.75
AMPKa1/2	T174/T172	AMP-activated protein-serine kinase alpha 1/2		
AMPKa1/2	T174/T172	AMP-activated protein-serine kinase alpha 1/2	74.70	69.14
ANKRD3	Pan-specific	Ankyrin repeat domain protein-serine kinase 3 (RIPK4, DIK)		
ANKRD3	Pan-specific	Ankyrin repeat domain protein-serine kinase 3 (RIPK4, DIK)	11.80	18.36
APG1	Pan-specific	Hsp 70-related heat shock protein 1 (osmotic stress protein 94 (OSP94))		
APG1	Pan-specific	Hsp 70-related heat shock protein 1 (osmotic stress protein 94 (OSP94))	1.68	223.90
APG2	Pan-specific	Hsp 70-related heat shock protein 4 (HSP70RY)		
APG2	Pan-specific	Hsp 70-related heat shock protein 4 (HSP70RY)	9.63	29.71
Arrestin b1	S412	Arrestin beta 1		
Arrestin b1	S412	Arrestin beta 1	-35.44	29.96
ASK1	Pan-specific	Apoptosis signal regulating protein-serine kinase		
ASK1	Pan-specific	Apoptosis signal regulating protein-serine kinase	-181.05	48.52
ATF2	T51/T53	Activating transcription factor 2 (CRE-BP1)		
ATF2	T51/T53	Activating transcription factor 2 (CRE-BP1)	9.47	0.85
ATF2	T53	Activating transcription factor 2 (CRE-BP1)		
ATF2	T53	Activating transcription factor 2 (CRE-BP1)	-61.75	18.31
ATM PK	S1981	Mitogen-activated protein kinase homolog 1		
ATM PK	S1981	Mitogen-activated protein kinase homolog 1	-11.92	9.73
Aurora 2 (Aurora A)	Pan-specific	Aurora 2 (AurB, beta) protein-serine kinase		
Aurora 2 (Aurora A)	Pan-specific	Aurora 2 (AurB, beta) protein-serine kinase	181.47	8.88
Aurora 3	Pan-specific	Aurora 3 (gamma) protein-serine kinase		
Aurora 3	Pan-specific	Aurora 3 (gamma) protein-serine kinase	211.73	22.84
Axl	Pan-specific	Axl proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase		
Axl	Pan-specific	Axl proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase	-13.79	52.42
B23 (NPM)	T199	B23 (nucleophosmin, numatrin, nucleolar protein NO38)		
B23 (NPM)	T199	B23 (nucleophosmin, numatrin, nucleolar protein NO38)	-3.30	23.26
B23 (NPM)	T234	B23 (nucleophosmin, numatrin, nucleolar protein NO38)		
B23 (NPM)	T234	B23 (nucleophosmin, numatrin, nucleolar protein NO38)	44.60	11.99
Bad	S75	Bcl2-antagonist of cell death protein		
Bad	S75	Bcl2-antagonist of cell death protein	46.44	10.75
Bad	S91	Bcl2-antagonist of cell death protein		
Bad	S91	Bcl2-antagonist of cell death protein	94.62	42.01
Bad	S99	Bcl2-antagonist of cell death protein		
Bad	S99	Bcl2-antagonist of cell death protein	1.88	23.29
Bak	Pan-specific	Bcl2 homologous antagonist/killer (BCK2L7)		
Bak	Pan-specific	Bcl2 homologous antagonist/killer (BCK2L7)	-69.93	85.99
Bax	Pan-specific	Apoptosis regulator Bcl2-associated X protein		
Bax	Pan-specific	Apoptosis regulator Bcl2-associated X protein	24.80	21.94
Bcl2	Pan-specific	B-cell lymphoma protein 2 alpha		

Bcl2	Pan-specific	B-cell lymphoma protein 2 alpha	19.51	101.10
Bcl-xS/L	Pan-specific	Bcl-xS/L		
Bcl-xS/L	Pan-specific	Bcl-xS/L	-0.79	27.61
Bid	Pan-specific	BH3 interacting domain death agonist		
Bid	Pan-specific	BH3 interacting domain death agonist	-428.01	103.79
BLK	Pan-specific	B lymphoid tyrosine kinase		
BLK	Pan-specific	B lymphoid tyrosine kinase	-9.87	22.29
BLNK	Y84	B-cell linker protein		
BLNK	Y84	B-cell linker protein	35.40	13.26
BMX (Etk)	Pan-specific	Bone marrow X protein-tyrosine kinase		
BMX (Etk)	Pan-specific	Bone marrow X protein-tyrosine kinase	36.78	10.91
BMX (Etk)	Y40	Bone marrow X protein-tyrosine kinase		
BMX (Etk)	Y40	Bone marrow X protein-tyrosine kinase	-78.30	408.40
BRCA1	S1497	Breast cancer type 1 susceptibility protein		
BRCA1	S1497	Breast cancer type 1 susceptibility protein	-18.65	20.11
BRD2	Pan-specific	Bromodomain-containing protein-serine kinase 2		
BRD2	Pan-specific	Bromodomain-containing protein-serine kinase 2	51.18	13.45
Btk	Pan-specific	Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase		
Btk	Pan-specific	Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase	-84.19	14.64
Btk	Y223	Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase		
Btk	Y223	Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase	-37.83	34.13
BUB1A	Pan-specific	BUB1 mitotic checkpoint protein-serine kinase		
BUB1A	Pan-specific	BUB1 mitotic checkpoint protein-serine kinase	-9.08	9.08
Caldesmon	S789	Caldesmon		
Caldesmon	S789	Caldesmon	-39.32	21.92
CaMK1d	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 1 delta		
CaMK1d	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 1 delta	-3.19	13.09
CaMK1d	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 1 delta		
CaMK1d	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 1 delta	-85.68	30.50
CaMK1g	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 1 gamma		
CaMK1g	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 1 gamma	-1.06	17.67
CaMK2a	T286	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 2 alpha		
CaMK2a	T286	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 2 alpha	7.07	16.10
CaMK2a	T286	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 2 alpha		
CaMK2a	T286	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 2 alpha	-42.37	60.84
CAMK2b	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 2 beta		
CAMK2b	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 2 beta	-12.88	79.19
CAMK2b	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 2 beta		
CAMK2b	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 2 beta	38.51	36.22
CAMK2d	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 2 delta		
CAMK2d	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 2 delta	-39.88	11.59
CAMK2d	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 2 delta		
CAMK2d	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 2 delta	-66.64	55.37
CAMK2g	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 2 gamma		
CAMK2g	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dep. protein-serine kinase 2 gamma	-43.56	8.94
CaMKK	Pan-specific	Calmodulin-dependent protein-serine kinase kinase		
CaMKK	Pan-specific	Calmodulin-dependent protein-serine kinase kinase	-1.44	14.40
CAS	Pan-specific	Cellular apoptosis susceptibility protein (CSE1L)		
CAS	Pan-specific	Cellular apoptosis susceptibility protein (CSE1L)	-3.46	20.45
CASK/Lin2	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dependent protein-serine kinase (Lin2 homolog)		
CASK/Lin2	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dependent protein-serine kinase (Lin2 homolog)	-37.83	28.18
CASP1	Pan-specific	Pro-caspase 1 (Interleukin-1 beta convertase)		
CASP1	Pan-specific	Pro-caspase 1 (Interleukin-1 beta convertase)	-101.44	492.55
CASP2	Pan-specific	Pro-caspase 2 (ICH1 protease)		
CASP2	Pan-specific	Pro-caspase 2 (ICH1 protease)	-3.77	9.44
CASP3	Pan-specific	Pro-caspase 3 (apopain, cysteine protease CPP32)		
CASP3	Pan-specific	Pro-caspase 3 (apopain, cysteine protease CPP32)	-10.92	22.59
CASP4	Pan-specific	Pro-caspase 4 (ICH2 protease, ICE(rel)-II)		
CASP4	Pan-specific	Pro-caspase 4 (ICH2 protease, ICE(rel)-II)	-0.68	68.23
CASP5	Pan-specific	Caspase 5 (ICH3 protease, ICE(rel)-III)		
CASP5	Pan-specific	Caspase 5 (ICH3 protease, ICE(rel)-III)	8.64	34.49
CASP6	Pan-specific	Pro-caspase 6 (apoptotic protease Mch2)		
CASP6	Pan-specific	Pro-caspase 6 (apoptotic protease Mch2)	-62.32	40.13
CASP7	Pan-specific	Pro-caspase 7 (ICE-like apoptotic protease 3 (ICE-LAP3), Mch3)		
CASP7	Pan-specific	Pro-caspase 7 (ICE-like apoptotic protease 3 (ICE-LAP3), Mch3)	-78.46	87.80
CASP8	Pan-specific	Pro-caspase 8 (ICE-like apoptotic protease 5 (ICE-LAP5), Mch5, FLICE, CAP4)		
CASP8	Pan-specific	Pro-caspase 8 (ICE-like apoptotic protease 5 (ICE-LAP5), Mch5, FLICE, CAP4)	-12.78	22.59
CASP8	Pan-specific	Pro-caspase 8 (ICE-like apoptotic protease 5 (ICE-LAP5), Mch5, FLICE, CAP4)		

CASP8	Pan-specific	Pro-caspase 8 (ICE-like apoptotic protease 5 (ICE-LAP5), Mch5, FLICE, CAP4)	513.94	101.41
CASP9	Pan-specific	Pro-caspase 9 (ICE-like apoptotic protease 6 (ICE-LAP6), Mch6, APAF3)		
CASP9	Pan-specific	Pro-caspase 9 (ICE-like apoptotic protease 6 (ICE-LAP6), Mch6, APAF3)	-108.54	319.51
CASP12	Pan-specific	Pro-caspase 12 (mouse)		
CASP12	Pan-specific	Pro-caspase 12 (mouse)	-77.89	37.21
Catenin b	Pan-specific	Catenin (cadherin-associated protein) beta 1		
Catenin b	Pan-specific	Catenin (cadherin-associated protein) beta 1	-180.01	115.67
Catenin b	S45	Catenin (cadherin-associated protein) beta 1		
Catenin b	S45	Catenin (cadherin-associated protein) beta 1	23.25	8.79
Caveolin 2	S23	Caveolin 2		
Caveolin 2	S23	Caveolin 2	-297.31	131.29
Caveolin 2	S36	Caveolin 2		
Caveolin 2	S36	Caveolin 2	-36.36	29.98
CD45	Pan-specific	Leukocyte common antigen CD45 receptor-tyrosine phosphatase (LCA, T200)		
CD45	Pan-specific	Leukocyte common antigen CD45 receptor-tyrosine phosphatase (LCA, T200)	46.28	54.85
Cdc25B	Pan-specific	Cell division cycle 25B phosphatase		
Cdc25B	Pan-specific	Cell division cycle 25B phosphatase	-14.81	17.72
Cdc25C	Pan-specific	Cell division cycle 25C phosphatase		
Cdc25C	Pan-specific	Cell division cycle 25C phosphatase	-257.73	102.14
CDC2L5	Pan-specific	Cell division cycle 2-like protein-serine kinase 5 (CHED)		
CDC2L5	Pan-specific	Cell division cycle 2-like protein-serine kinase 5 (CHED)	-24.67	14.77
Cdc34	Pan-specific	Cell division cycle 34 (ubiquitin-conjugating ligase)		
Cdc34	Pan-specific	Cell division cycle 34 (ubiquitin-conjugating ligase)	36.43	83.42
CDK1	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1 (cdc2)		
CDK1	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1 (cdc2)	-52.38	21.91
CDK2	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 2		
CDK2	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 2	-28.59	17.93
CDK2	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 2		
CDK2	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 2	-4.96	11.76
CDK1 [p34(cdc2)]	Y15	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1		
CDK1 [p34(cdc2)]	Y15	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1	0.22	17.09
CDK1/2	T14+Y15	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1/2		
CDK1/2	T14+Y15	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1/2	18.33	19.25
CDK1/2	T161/T160	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1/2		
CDK1/2	T161/T160	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1/2	-58.98	8.98
CDK1/2	Y15	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1/2		
CDK1/2	Y15	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1/2	-98.96	1343.33
CDK1/2	Y15	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1/2		
CDK1/2	Y15	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1/2	119.37	40.02
CDK4	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 4		
CDK4	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 4	7.97	15.98
CDK5	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 5		
CDK5	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 5	94.15	10.86
CDK6	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 6		
CDK6	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 6	-12.51	14.08
CDK7	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 7		
CDK7	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 7	20.62	11.52
CDK7	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 7		
CDK7	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 7	-121.76	197.75
CDK8	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 8		
CDK8	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 8	10.83	14.21
CDK8	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 8		
CDK8	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 8	-2.67	9.83
CDK9	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 9		
CDK9	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 9	-212.89	26.10
CDK10	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 10		
CDK10	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 10	-5.95	29.47
Chk1	Pan-specific	Checkpoint protein-serine kinase 1		
Chk1	Pan-specific	Checkpoint protein-serine kinase 1	-111.09	34.19
Chk2	Pan-specific	Checkpoint protein-serine kinase 2		
Chk2	Pan-specific	Checkpoint protein-serine kinase 2	-156.19	131.88
c-IAP1	Pan-specific	Cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (baculoviral IAP repeat-containing protein 3, apoptosis inhibitor 2 (API2))		
c-IAP1	Pan-specific	Cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (baculoviral IAP repeat-containing protein 3, apoptosis inhibitor 2 (API2))	-123.37	189.06
CK1d	Pan-specific	Casein protein-serine kinase 1 delta		
CK1d	Pan-specific	Casein protein-serine kinase 1 delta	-86.41	148.44
CK1e	Pan-specific	Casein protein-serine kinase 1 epsilon		
CK1e	Pan-specific	Casein protein-serine kinase 1 epsilon	24.32	11.69

CK1g2	Pan-specific	Casein protein-serine kinase 1 gamma 2		
CK1g2	Pan-specific	Casein protein-serine kinase 1 gamma 2	31.13	14.66
CK2a	Pan-specific	Casein protein-serine kinase 2 alpha/ alpha prime		
CK2a	Pan-specific	Casein protein-serine kinase 2 alpha/ alpha prime	-14.80	51.03
Cofilin 1	S3	Cofilin 1		
Cofilin 1	S3	Cofilin 1	1.46	37.21
Cofilin 2	S3	Cofilin 2		
Cofilin 2	S3	Cofilin 2	-55.52	7.53
Cortactin	Y470	Cortactin (amplixin) (mouse)		
Cortactin	Y470	Cortactin (amplixin) (mouse)	-83.39	22.76
COT	Pan-specific	Osaka thyroid oncogene protein-serine kinase (Tpl2)		
COT	Pan-specific	Osaka thyroid oncogene protein-serine kinase (Tpl2)	-38.58	29.49
COX2	Pan-specific	Cyclo-oxygenase 2 (prostaglandin G/H synthase 2 precursor)		
COX2	Pan-specific	Cyclo-oxygenase 2 (prostaglandin G/H synthase 2 precursor)	0.89	22.65
CREB1	S129+S133	cAMP response element binding protein 1		
CREB1	S129+S133	cAMP response element binding protein 1	25.86	28.89
CREB1	S133	cAMP response element binding protein 1		
CREB1	S133	cAMP response element binding protein 1	33.82	16.87
Crystallin aB	S19	Crystallin alpha B (heat-shock 20 kDa like-protein)		
Crystallin aB	S19	Crystallin alpha B (heat-shock 20 kDa like-protein)	9.02	28.71
Crystallin aB	S45	Crystallin alpha B (heat-shock 20 kDa like-protein)		
Crystallin aB	S45	Crystallin alpha B (heat-shock 20 kDa like-protein)	28.21	8.51
Csk	Pan-specific	C-terminus of Src tyrosine kinase		
Csk	Pan-specific	C-terminus of Src tyrosine kinase	1.66	19.13
Cyclin A	Pan-specific	Cyclin A1		
Cyclin A	Pan-specific	Cyclin A1	-28.24	94.67
Cyclin B1	Pan-specific	Cyclin B1		
Cyclin B1	Pan-specific	Cyclin B1	-25.23	92.48
Cyclin D1	Pan-specific	Cyclin D1 (PRAD1)		
Cyclin D1	Pan-specific	Cyclin D1 (PRAD1)	-61.35	81.65
Cyclin E	Pan-specific	Cyclin E1		
Cyclin E	Pan-specific	Cyclin E1	-102.27	2991.92
Cyclin G1	Pan-specific	Cyclin G1		
Cyclin G1	Pan-specific	Cyclin G1	-101.88	67.05
CytoC	Pan-specific	Cytochrome C		
CytoC	Pan-specific	Cytochrome C	-82.98	81.79
Dab1	Y198	Disabled homolog 1		
Dab1	Y198	Disabled homolog 1	0.23	19.89
DAPK1	Pan-specific	Death-associated protein kinase 1		
DAPK1	Pan-specific	Death-associated protein kinase 1	-11.06	6.68
DAPK2	Pan-specific	Death-associated protein kinase 2		
DAPK2	Pan-specific	Death-associated protein kinase 2	-59.81	54.70
DAXX	Pan-specific	Death-associated protein 6 (BING2)		
DAXX	Pan-specific	Death-associated protein 6 (BING2)	26.57	22.19
DFF45	Pan-specific	DNA fragmentation factor alpha (ICAD)		
DFF45	Pan-specific	DNA fragmentation factor alpha (ICAD)	-40.35	12.82
DGKZ	Pan-specific	Diacylglycerol kinase zeta		
DGKZ	Pan-specific	Diacylglycerol kinase zeta	-24.62	22.27
DNAPK	Pan-specific	DNA-activated protein-serine kinase		
DNAPK	Pan-specific	DNA-activated protein-serine kinase	11.60	3.03
Dok2	Y142	Docking protein 2 (mouse)		
Dok2	Y142	Docking protein 2 (mouse)	49.55	18.82
DRAK1	Pan-specific	DAP kinase-related apoptosis-inducing protein-serine kinase 1 (STK17A)		
DRAK1	Pan-specific	DAP kinase-related apoptosis-inducing protein-serine kinase 1 (STK17A)	96.05	27.02
DRAK2	Pan-specific	DAP kinase-related apoptosis-inducing protein-serine kinase 2 (STK17B)		
DRAK2	Pan-specific	DAP kinase-related apoptosis-inducing protein-serine kinase 2 (STK17B)	-44.36	10.62
eEF2K	Pan-specific	Elongation factor-2 protein-serine kinase		
eEF2K	Pan-specific	Elongation factor-2 protein-serine kinase	36.95	15.21
EGFR	Pan-specific	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase		
EGFR	Pan-specific	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase	37.63	28.06
EGFR	Pan-specific	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase		
EGFR	Pan-specific	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase	11.17	7.92
EGFR	Y1068	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase		
EGFR	Y1068	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase	38.75	9.26
EGFR	Y1148	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase		
EGFR	Y1148	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase	-22.89	100.59
eIF2a	Pan-specific	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha		
eIF2a	Pan-specific	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha	-60.87	56.72

eIF2a	S51	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha		
eIF2a	S51	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha	4.47	27.10
eIF2a	S51	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha		
eIF2a	S51	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha	-0.02	9.90
eIF2Be	S540	Eukaryotic translation initiation factor 2B epsilon		
eIF2Be	S540	Eukaryotic translation initiation factor 2B epsilon	69.59	35.59
eIF4E	S209	Eukaryotic translation initiation factor 4 (mRNA cap binding protein)		
eIF4E	S209	Eukaryotic translation initiation factor 4 (mRNA cap binding protein)	31.85	14.38
eIF4E	S209	Eukaryotic translation initiation factor 4 (mRNA cap binding protein)		
eIF4E	S209	Eukaryotic translation initiation factor 4 (mRNA cap binding protein)	-19.64	24.50
eIF4G	S1107	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1		
eIF4G	S1107	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	-60.37	26.06
eNos	T495	Nitric-oxide synthase, endothelial		
eNos	T495	Nitric-oxide synthase, endothelial	51.61	11.94
EphA1	Pan-specific	Ephrin type-A receptor 1 protein-tyrosine kinase		
EphA1	Pan-specific	Ephrin type-A receptor 1 protein-tyrosine kinase	-42.56	19.58
ErbB2	Pan-specific	ErbB2 (Neu, HER2) receptor-tyrosine kinase		
ErbB2	Pan-specific	ErbB2 (Neu, HER2) receptor-tyrosine kinase	35.68	9.00
ErbB2	Y1139	ErbB2 (Neu, HER2) receptor-tyrosine kinase		
ErbB2	Y1139	ErbB2 (Neu, HER2) receptor-tyrosine kinase	4.44	7.44
ErbB2	Y1139	ErbB2 (Neu, HER2) receptor-tyrosine kinase		
ErbB2	Y1139	ErbB2 (Neu, HER2) receptor-tyrosine kinase	-67.96	451.54
ErbB2	Y1248	ErbB2 (Neu, HER2) receptor-tyrosine kinase		
ErbB2	Y1248	ErbB2 (Neu, HER2) receptor-tyrosine kinase	30.96	19.44
ErbB2	Y1248	ErbB2 (Neu, HER2) receptor-tyrosine kinase		
ErbB2	Y1248	ErbB2 (Neu, HER2) receptor-tyrosine kinase	22.13	19.98
Erk1	Pan-specific	Extracellular regulated protein-serine kinase 1 (p44 MAP kinase)		
Erk1	Pan-specific	Extracellular regulated protein-serine kinase 1 (p44 MAP kinase)	-65.71	6.43
Erk1/2	T202+Y204	Extracellular regulated protein-serine kinase 1/2 (p44/p42 MAP kinases)		
Erk1/2	T202+Y204	Extracellular regulated protein-serine kinase 1/2 (p44/p42 MAP kinases)	-38.32	15.37
Erk1/2	T202+Y204; T185/Y187	Extracellular regulated protein-serine kinase 1/2 (p44/p42 MAP kinases)		
Erk1/2	T202+Y204; T185/Y187	Extracellular regulated protein-serine kinase 1/2 (p44/p42 MAP kinases)	-73.08	34.27
Erk1/2	T202+Y204; T185/Y187	Extracellular regulated protein-serine kinase 1/2 (p44/p42 MAP kinases)		
Erk1/2	T202+Y204; T185/Y187	Extracellular regulated protein-serine kinase 1/2 (p44/p42 MAP kinases)	27.29	45.10
Erk2	Pan-specific	Extracellular regulated protein-serine kinase 2 (p42 MAP kinase)		
Erk2	Pan-specific	Extracellular regulated protein-serine kinase 2 (p42 MAP kinase)	-27.25	46.03
Erk3	Pan-specific	Extracellular regulated protein-serine kinase 3		
Erk3	Pan-specific	Extracellular regulated protein-serine kinase 3	-46.71	30.66
Erk4	Pan-specific	Extracellular regulated protein-serine kinase 4		
Erk4	Pan-specific	Extracellular regulated protein-serine kinase 4	-49.80	75.01
Erk5	T218+Y220	Extracellular regulated protein-serine kinase 5 (Big MAP kinase 1 (BMK1))		
Erk5	T218+Y220	Extracellular regulated protein-serine kinase 5 (Big MAP kinase 1 (BMK1))	-31.18	9.98
Erk6	Pan-specific	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 gamma (MAPK12)		
Erk6	Pan-specific	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 gamma (MAPK12)	-53.20	61.42
ERP57	Pan-specific	ER protein 57 kDa (protein disulfide isomerase-associated 3; 58 kDa glucose regulated protein)		
ERP57	Pan-specific	ER protein 57 kDa (protein disulfide isomerase-associated 3; 58 kDa glucose regulated protein)	-89.80	50.42
ERP72	Pan-specific	ER protein 72 kDa (protein disulfide isomerase-associated 4)		
ERP72	Pan-specific	ER protein 72 kDa (protein disulfide isomerase-associated 4)	13.76	25.79
FAK	Pan-specific	Focal adhesion protein-tyrosine kinase		
FAK	Pan-specific	Focal adhesion protein-tyrosine kinase	-452.90	202.55
FAK	S722	Focal adhesion protein-tyrosine kinase		
FAK	S722	Focal adhesion protein-tyrosine kinase	8.26	7.70
FAK	S732	Focal adhesion protein-tyrosine kinase		
FAK	S732	Focal adhesion protein-tyrosine kinase	38.66	11.23
FAK	S843	Focal adhesion protein-tyrosine kinase		
FAK	S843	Focal adhesion protein-tyrosine kinase	-95.90	6063.16
FAK	S910	Focal adhesion protein-tyrosine kinase		
FAK	S910	Focal adhesion protein-tyrosine kinase	-31.80	4.10
FAK	Y397	Focal adhesion protein-tyrosine kinase		
FAK	Y397	Focal adhesion protein-tyrosine kinase	-21.71	7.40
FAK	Y425	Focal adhesion protein-tyrosine kinase		

FAK	Y425	Focal adhesion protein-tyrosine kinase	-56.18	29.97
FAK	Y576	Focal adhesion protein-tyrosine kinase		
FAK	Y576	Focal adhesion protein-tyrosine kinase	-66.93	73.87
FAK	Y576	Focal adhesion protein-tyrosine kinase		
FAK	Y576	Focal adhesion protein-tyrosine kinase	94.23	21.06
FAK	Y577	Focal adhesion protein-tyrosine kinase		
FAK	Y577	Focal adhesion protein-tyrosine kinase	-40.16	24.62
FAK	Y861	Focal adhesion protein-tyrosine kinase		
FAK	Y861	Focal adhesion protein-tyrosine kinase	24.41	9.55
FAS	Pan-specific	Tumor necrosis factor superfamily member 6 (Apo1, CD95)		
FAS	Pan-specific	Tumor necrosis factor superfamily member 6 (Apo1, CD95)	277.15	86.03
FasL	Pan-specific	Tumor necrosis factor ligand, member 6		
FasL	Pan-specific	Tumor necrosis factor ligand, member 6	-0.70	25.69
Fes	Pan-specific	Fes/Fps protein-tyrosine kinase		
Fes	Pan-specific	Fes/Fps protein-tyrosine kinase	-7.59	9.30
FGFR1	Pan-specific	Fibroblast growth factor receptor-tyrosine kinase 1		
FGFR1	Pan-specific	Fibroblast growth factor receptor-tyrosine kinase 1	-63.25	48.06
FGFR2	Pan-specific	Fibroblast growth factor receptor-tyrosine kinase 2 (BEK)		
FGFR2	Pan-specific	Fibroblast growth factor receptor-tyrosine kinase 2 (BEK)	33.33	71.28
FKHRL1	T32	Forkhead-like transcription factor 1 (FOXO3A)		
FKHRL1	T32	Forkhead-like transcription factor 1 (FOXO3A)	-69.37	176.14
FLT4	Pan-specific	Vascular endothelial growth factor receptor-protein-tyrosine kinase 3 (VEGFR3)		
FLT4	Pan-specific	Vascular endothelial growth factor receptor-protein-tyrosine kinase 3 (VEGFR3)	-52.72	6.30
Fos	Pan-specific	Fos-c FBJ murine osteosarcoma oncoprotein-related transcription factor		
Fos	Pan-specific	Fos-c FBJ murine osteosarcoma oncoprotein-related transcription factor	33.25	14.66
Fos	T232	Fos-c FBJ murine osteosarcoma oncoprotein-related transcription factor		
Fos	T232	Fos-c FBJ murine osteosarcoma oncoprotein-related transcription factor	32.18	58.78
Fyn	Pan-specific	Fyn proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase		
Fyn	Pan-specific	Fyn proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase	-98.63	1222.09
GAP-43	S41	Growth associated protein 43 (Neuromodulin)		
GAP-43	S41	Growth associated protein 43 (Neuromodulin)	-57.90	20.17
GCK	Pan-specific	Germinal centre protein-serine kinase		
GCK	Pan-specific	Germinal centre protein-serine kinase	-357.44	22.88
GFAP	S8	Glial fibrillary acidic protein		
GFAP	S8	Glial fibrillary acidic protein	-112.49	261.30
Glycogen Synthase	S640	Human muscle glycogen synthase		
Glycogen Synthase	S640	Human muscle glycogen synthase	-20.21	53.47
GNB2L1	Pan-specific	Guanine nucleotide-binding protein beta (receptor for activated C kinase 1 (RACK1))		
GNB2L1	Pan-specific	Guanine nucleotide-binding protein beta (receptor for activated C kinase 1 (RACK1))	-27.99	26.18
GRK2	Pan-specific	G protein-coupled receptor-serine kinase 2 (BARK1)		
GRK2	Pan-specific	G protein-coupled receptor-serine kinase 2 (BARK1)	-481.09	34.01
GRK2	S670	G protein-coupled receptor-serine kinase 2 (BARK1)		
GRK2	S670	G protein-coupled receptor-serine kinase 2 (BARK1)	-11.97	7.67
GRK3	Pan-specific	G protein-coupled receptor-serine kinase 3 (BARK2)		
GRK3	Pan-specific	G protein-coupled receptor-serine kinase 3 (BARK2)	-42.60	25.32
GroEL	Pan-specific	GroEL homolog (may correspond to Hsp60)		
GroEL	Pan-specific	GroEL homolog (may correspond to Hsp60)	1.91	18.79
Grp75	Pan-specific	Glucose regulated protein 75		
Grp75	Pan-specific	Glucose regulated protein 75	16.92	11.71
Grp78	Pan-specific	Glucose regulated protein 78		
Grp78	Pan-specific	Glucose regulated protein 78	27.89	6.04
Grp94	Pan-specific	Glucose regulated protein 94 (endoplasmic)		
Grp94	Pan-specific	Glucose regulated protein 94 (endoplasmic)	-65.15	24.43
GSK3a/b	Pan-specific	Glycogen synthase-serine kinase 3 alpha		
GSK3a/b	Pan-specific	Glycogen synthase-serine kinase 3 beta	35.48	61.22
GSK3a/b	S21	Glycogen synthase-serine kinase 3 alpha		
GSK3a/b	S21	Glycogen synthase-serine kinase 3 beta	-284.97	63.93
GSK3a/b	Y279/ Y216	Glycogen synthase-serine kinase 3 alpha		
GSK3a/b	Y279/ Y216	Glycogen synthase-serine kinase 3 beta	-20.74	37.37
GSK3ab	Y279	Glycogen synthase-serine kinase 3 alpha		
GSK3ab	Y279	Glycogen synthase-serine kinase 3 beta	-99.55	12306.98
Haspin	Pan-specific	Haploid germ cell-specific nuclear protein-serine kinase		
Haspin	Pan-specific	Haploid germ cell-specific nuclear protein-serine kinase	-44.37	19.95
hHR23B	Pan-specific	UV excision repair protein RAD23 homolog B		

hHR23B	Pan-specific	UV excision repair protein RAD23 homolog B	28.32	2.36
Hip	Pan-specific	Hsp70/Hsc70 interacting protein (ST13)		
Hip	Pan-specific	Hsp70/Hsc70 interacting protein (ST13)	40.83	16.81
Histone H1	phospho CDK1 sites	Histone H1 phosphorylated		
Histone H1	phospho CDK1 sites	Histone H1 phosphorylated	142.03	37.34
Histone H2A.X	S139	Histone H2A variant X		
Histone H2A.X	S139	Histone H2A variant X	162.29	96.05
Histone H2B	S14	Histone H2B		
Histone H2B	S14	Histone H2B	40.79	5.09
Histone H3	T3	Histone H3.3		
Histone H3	T3	Histone H3.3	-95.04	119.05
Histone H3	T11	Histone H3.3		
Histone H3	T11	Histone H3.3	10.23	14.11
Histone H3	S10	Histone H3.3		
Histone H3	S10	Histone H3.3	-45.53	26.27
Histone H3	S28	Histone H3.3		
Histone H3	S28	Histone H3.3	67.07	23.59
HO1	Pan-specific	Heme oxygenase 1		
HO1	Pan-specific	Heme oxygenase 1	30.69	0.96
HO2	Pan-specific	Heme oxygenase 2		
HO2	Pan-specific	Heme oxygenase 2	92.12	35.16
Hpk1	Pan-specific	Hematopoietic progenitor protein-serine kinase 1		
Hpk1	Pan-specific	Hematopoietic progenitor protein-serine kinase 1	-112.23	401.60
Hsc70	Pan-specific	Heat shock 70 kDa protein 8		
Hsc70	Pan-specific	Heat shock 70 kDa protein 8	-182.19	46.35
HSF4	Pan-specific	Heat shock transcription factor 4		
HSF4	Pan-specific	Heat shock transcription factor 4	6.04	23.73
Hsp25	Pan-specific	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)		
Hsp25	Pan-specific	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)	300.50	85.15
Hsp25	S86	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)		
Hsp25	S86	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)	-68.32	29.44
Hsp27	S15	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)		
Hsp27	S15	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)	12.62	18.48
Hsp27	S15	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)		
Hsp27	S15	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)	-51.22	51.12
Hsp27	S78	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)		
Hsp27	S78	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)	20.48	6.30
Hsp27	S82	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)		
Hsp27	S82	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)	-25.92	19.96
Hsp27	S82	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)		
Hsp27	S82	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)	-83.39	340.39
Hsp40	Pan-specific	DnaJ homolog, subfamily B member 1		
Hsp40	Pan-specific	DnaJ homolog, subfamily B member 1	-93.82	74.32
Hsp47	Pan-specific	Heat shock 47 kDa protein (collagen-binding protein 1, colligin 1)		
Hsp47	Pan-specific	Heat shock 47 kDa protein (collagen-binding protein 1, colligin 1)	2.65	96.33
Hsp60	Pan-specific	Heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin, CPN60)		
Hsp60	Pan-specific	Heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin, CPN60)	-65.67	84.64
Hsp60 (Myobact-Hsp65)	Pan-specific	Heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin, CPN60)		
Hsp60 (Myobact-Hsp65)	Pan-specific	Heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin, CPN60)	23.95	19.37
Hsp70	Pan-specific	Heat shock 70 kDa protein 1		
Hsp70	Pan-specific	Heat shock 70 kDa protein 1	-79.96	129.32
Hsp90	Pan-specific	Heat shock 90 kDa protein alpha		
Hsp90	Pan-specific	Heat shock 90 kDa protein alpha	-18.73	159.04
Hsp105	Pan-specific	Heat shock 105 kDa protein		
Hsp105	Pan-specific	Heat shock 105 kDa protein	-101.03	1567.37
HspBP1	Pan-specific	Hsp70 binding protein 1		
HspBP1	Pan-specific	Hsp70 binding protein 1	32.34	46.13
HSTK12 (Aurora 2)	Pan-specific	Serine/threonine-protein kinase 12 (Aurora-related kinase 2)		
HSTK12 (Aurora 2)	Pan-specific	Serine/threonine-protein kinase 12 (Aurora-related kinase 2)	-75.23	50.01
Huntington	S421	Huntington's disease protein		
Huntington	S421	Huntington's disease protein	-47.07	7.39
ICK	Pan-specific	Intestinal cell protein-serine kinase (MAK-related kinase (MRK))		
ICK	Pan-specific	Intestinal cell protein-serine kinase (MAK-related kinase (MRK))	-50.10	19.99
IGF1R	Pan-specific	Insulin-like growth factor receptor protein-tyrosine kinase		
IGF1R	Pan-specific	Insulin-like growth factor receptor protein-tyrosine kinase	-58.74	26.23
IkBa	Pan-specific	Inhibitor of NF-kappa-B alpha (MAD3)		
IkBa	Pan-specific	Inhibitor of NF-kappa-B alpha (MAD3)	-30.33	73.35
IkBb	Pan-specific	Inhibitor of NF-kappa-B beta (thyroid receptor interacting protein 9)		
IkBb	Pan-specific	Inhibitor of NF-kappa-B beta (thyroid receptor interacting protein 9)	-26.57	16.80
IKKa	Pan-specific	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase alpha (CHUK)		
IKKa	Pan-specific	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase alpha (CHUK)	-29.16	21.76

IKKa	Pan-specific	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase alpha (CHUK)		
IKKa	Pan-specific	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase alpha (CHUK)	-63.44	71.75
IKKa	Pan-specific	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase alpha (CHUK)		
IKKa	Pan-specific	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase alpha (CHUK)	-26.90	107.54
IKKa/b	S180	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase alpha (CHUK)/beta		
IKKa/b	S180	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase alpha (CHUK)/beta	-74.09	159.15
IKKb	Pan-specific	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase beta		
IKKb	Pan-specific	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase beta	-114.37	239.79
IKKb	Pan-specific	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase beta		
IKKb	Pan-specific	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase beta	-49.08	38.54
ILK1	Pan-specific	Integrin-linked protein-serine kinase 1		
ILK1	Pan-specific	Integrin-linked protein-serine kinase 1	401.04	110.88
ILK1	Pan-specific	Integrin-linked protein-serine kinase 1		
ILK1	Pan-specific	Integrin-linked protein-serine kinase 1	-25.34	79.57
Integrin a4	S988	Integrin alpha 4 (VLA4)		
Integrin a4	S988	Integrin alpha 4 (VLA4)	50.23	37.69
Integrin b1	S785	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta subunit, CD29 antigen)		
Integrin b1	S785	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta subunit, CD29 antigen)	40.24	17.50
Integrin b1	T783	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta subunit, CD29 antigen)		
Integrin b1	T783	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta subunit, CD29 antigen)	-25.58	34.95
IR	Y999	Insulin receptor		
IR	Y999	Insulin receptor	-16.77	21.09
IR/IGF1R	Y1189/Y1190	Insulin receptor / Insulin-like growth factor 1 receptor		
IR/IGF1R	Y1189/Y1190	Insulin receptor / Insulin-like growth factor 1 receptor	-54.57	37.98
IRAK1	Pan-specific	Interleukin 1 receptor-associated kinase 1 (Pelle-like protein kinase)		
IRAK1	Pan-specific	Interleukin 1 receptor-associated kinase 1 (Pelle-like protein kinase)	0.78	67.05
IRAK2	Pan-specific	Interleukin 1 receptor-associated kinase 2		
IRAK2	Pan-specific	Interleukin 1 receptor-associated kinase 2	15.89	18.84
IRAK3	Pan-specific	Interleukin 1 receptor-associated kinase 3		
IRAK3	Pan-specific	Interleukin 1 receptor-associated kinase 3	-14.94	8.98
IRAK4	Pan-specific	Interleukin 1 receptor-associated kinase 4		
IRAK4	Pan-specific	Interleukin 1 receptor-associated kinase 4	48.93	84.65
IRAK4	Pan-specific	Interleukin 1 receptor-associated kinase 4		
IRAK4	Pan-specific	Interleukin 1 receptor-associated kinase 4	-5.84	18.33
IRS1	Y1179	Insulin receptor substrate 1		
IRS1	Y1179	Insulin receptor substrate 1	74.05	57.33
IRS1	Y612	Insulin receptor substrate 1		
IRS1	Y612	Insulin receptor substrate 1	4.37	21.27
JAK1	Pan-specific	Janus protein-tyrosine kinase 1		
JAK1	Pan-specific	Janus protein-tyrosine kinase 1	5.56	6.33
JAK1	Pan-specific	Janus protein-tyrosine kinase 1		
JAK1	Pan-specific	Janus protein-tyrosine kinase 1	-243.33	42.45
JAK2	Pan-specific	Janus protein-tyrosine kinase 2		
JAK2	Pan-specific	Janus protein-tyrosine kinase 2	-19.27	13.74
JAK2	Y1007/1008	Janus protein-tyrosine kinase 2		
JAK2	Y1007/1008	Janus protein-tyrosine kinase 2	-40.67	38.55
JAK3	Pan-specific	Janus protein-tyrosine kinase 3		
JAK3	Pan-specific	Janus protein-tyrosine kinase 3	-28.58	48.14
JIK	Pan-specific	STE20-like protein-serine kinase		
JIK	Pan-specific	STE20-like protein-serine kinase	-71.70	73.14
JNK	Pan-specific	Jun N-terminus protein-serine kinases (stress-activated protein kinase (SAPK)) 1/2/3		
JNK	Pan-specific	Jun N-terminus protein-serine kinases (stress-activated protein kinase (SAPK)) 1/2/3	-46.84	6.60
JNK	T183/Y185	Jun N-terminus protein-serine kinases (stress-activated protein kinase (SAPK)) 1/2/3		
JNK	T183/Y185	Jun N-terminus protein-serine kinases (stress-activated protein kinase (SAPK)) 1/2/3	-10.65	21.12
JNK	T183/Y185	Jun N-terminus protein-serine kinases (stress-activated protein kinase (SAPK)) 1/2/3		
JNK	T183/Y185	Jun N-terminus protein-serine kinases (stress-activated protein kinase (SAPK)) 1/2/3	-2.84	17.80
JNK	T183/Y185	Jun N-terminus protein-serine kinases (stress-activated protein kinase (SAPK)) 1/2/3		
JNK	T183/Y185	Jun N-terminus protein-serine kinases (stress-activated protein kinase (SAPK)) 1/2/3	8.48	51.12
JNK2	Pan-specific	Jun N-terminus protein-serine kinases (stress-activated protein kinase (SAPK)) 2		
JNK2	Pan-specific	Jun N-terminus protein-serine kinases (stress-activated protein kinase (SAPK)) 2	-96.99	65.34
Jun	S63	Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor		

Jun	S63	Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor	-219.47	69.41
Jun	S73	Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor		
Jun	S73	Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor	34.52	29.16
Jun	S73	Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor		
Jun	S73	Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor	-18.88	20.00
Jun	S73	Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor		
Jun	S73	Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor	36.09	26.77
KAP	Pan-specific	Cyclin-dependent kinase associated phosphatase (CDK inhibitor 3, CIP2)		
KAP	Pan-specific	Cyclin-dependent kinase associated phosphatase (CDK inhibitor 3, CIP2)	13.22	22.39
KHS	Pan-specific	Kinase homologous to SPS1/STE20 (MAP kinase kinase kinase protein-serine kinase 5 (MEKKK5))		
KHS	Pan-specific	Kinase homologous to SPS1/STE20 (MAP kinase kinase kinase protein-serine kinase 5 (MEKKK5))	-345.88	51.05
Kit	Y703	Kit/Steel factor receptor-tyrosine kinase		
Kit	Y703	Kit/Steel factor receptor-tyrosine kinase	3.18	11.26
Kit	Y730	Kit/Steel factor receptor-tyrosine kinase		
Kit	Y730	Kit/Steel factor receptor-tyrosine kinase	28.82	22.21
Kit	Y936	Kit/Steel factor receptor-tyrosine kinase		
Kit	Y936	Kit/Steel factor receptor-tyrosine kinase	-20.28	30.50
Krs2	Pan-specific	STE20-like protein-serine kinase 4 (MST1)		
Krs2	Pan-specific	STE20-like protein-serine kinase 4 (MST1)	-138.17	106.25
Ksr1	Pan-specific	Protein-serine kinase suppressor of Ras 1		
Ksr1	Pan-specific	Protein-serine kinase suppressor of Ras 1	-2.79	62.94
LAR	Pan-specific	LCA antigen-related (LAR) receptor tyrosine phosphatase		
LAR	Pan-specific	LCA antigen-related (LAR) receptor tyrosine phosphatase	5.52	23.66
LATS1	Pan-specific	Large tumor suppressor 1 protein-serine kinase (WARTS)		
LATS1	Pan-specific	Large tumor suppressor 1 protein-serine kinase (WARTS)	-20.16	38.26
Lck	Pan-specific	Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase		
Lck	Pan-specific	Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase	-32.10	32.53
Lck	Pan-specific	Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase		
Lck	Pan-specific	Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase	-0.64	43.10
Lck	S157	Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase		
Lck	S157	Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase	-6.74	73.81
Lck	Y191	Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase		
Lck	Y191	Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase	-20.79	55.42
Lck	Y504	Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase		
Lck	Y504	Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase	-415.66	187.05
LIMK1/2	Y508/T505	LIM domain kinase 1/2		
LIMK1/2	Y508/T505	LIM domain kinase 1/2	-14.70	29.16
LOK	Pan-specific	Lymphocyte-oriented protein-serine kinase		
LOK	Pan-specific	Lymphocyte-oriented protein-serine kinase	-52.78	9.17
Lyn	Pan-specific	Yes-related protein-tyrosine kinase		
Lyn	Pan-specific	Yes-related protein-tyrosine kinase	-186.64	48.14
Lyn	Y507	Yes-related protein-tyrosine kinase		
Lyn	Y507	Yes-related protein-tyrosine kinase	-9.12	31.66
MAK	Pan-specific	Male germ cell-associated protein-serine kinase		
MAK	Pan-specific	Male germ cell-associated protein-serine kinase	5.40	17.27
MAPK14 Ctr Antibody	Pan-specific	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha		
MAPK14 Ctr Antibody	Pan-specific	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha	-0.09	22.38
MAPK14/p38a	Pan-specific	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha		
MAPK14/p38a	Pan-specific	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha	22.68	20.76
MAPKAPK2	Pan-specific	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2		
MAPKAPK2	Pan-specific	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	-250.57	11.75
MAPKAPK2	T222	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2		
MAPKAPK2	T222	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	11.93	18.17
MAPKAPK2	T334	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2		
MAPKAPK2	T334	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	-71.67	30.46
MAPKAPK2	T334	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2		
MAPKAPK2	T334	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	57.73	31.62
MARCKS	S158+S162	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate		
MARCKS	S158+S162	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	-13.41	62.00
MARCKS	S158+S162	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate		
MARCKS	S158+S162	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	-22.18	51.76
MARK	Pan-specific	MAP/microtubule affinity-regulating protein-serine kinase 1		
MARK	Pan-specific	MAP/microtubule affinity-regulating protein-serine kinase 1	-34.89	6.97
Mcl1	Pan-specific	Myeloid cell leukemia differentiation protein 1		
Mcl1	Pan-specific	Myeloid cell leukemia differentiation protein 1	-175.86	48.34
MEK1	Pan-specific	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)		
MEK1	Pan-specific	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)	27.73	48.75
MEK1	S297	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)		
MEK1	S297	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)	31.36	17.48

MEK1	S297	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)		
MEK1	S297	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)	-8.56	9.23
MEK1	T291	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)		
MEK1	T291	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)	34.75	74.69
MEK1	T291	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)		
MEK1	T291	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)	88.56	11.25
MEK1	T291	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)		
MEK1	T291	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)	-82.80	308.88
MEK1	T385	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)		
MEK1	T385	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)	32.83	3.00
MEK1	T385	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)		
MEK1	T385	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)	-0.32	14.28
MEK1	T385	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)		
MEK1	T385	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)	241.42	68.72
MEK1 + B23(NPM)	S217+S221, S4	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)		
MEK1 + B23(NPM)	S217+S221, S4	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)	-14.11	15.95
MEK2	Pan-specific	MAPK/ERK protein-serine kinase 2 (MKK2)		
MEK2	Pan-specific	MAPK/ERK protein-serine kinase 2 (MKK2)	83.06	18.88
MEK2	Pan-specific	MAPK/ERK protein-serine kinase 2 (MKK2)		
MEK2	Pan-specific	MAPK/ERK protein-serine kinase 2 (MKK2)	-54.74	69.14
MEK2 human	T394	MAPK/ERK protein-serine kinase 2 (MKK2) (human)		
MEK2 human	T394	MAPK/ERK protein-serine kinase 2 (MKK2) (human)	4.12	9.31
MEK2 mouse	T394	MAPK/ERK protein-serine kinase 2 (MKK2) (mouse)		
MEK2 mouse	T394	MAPK/ERK protein-serine kinase 2 (MKK2) (mouse)	-11.23	15.11
MEK3	Pan-specific	MAP kinase protein-serine kinase 3 (MKK3)		
MEK3	Pan-specific	MAP kinase protein-serine kinase 3 (MKK3)	-588.64	56.38
MEK3/6	S189/S207	MAP kinase protein-serine kinase 3/6 (MKK3/6)		
MEK3/6	S189/S207	MAP kinase protein-serine kinase 3/6 (MKK3/6)	-59.75	92.57
MEK4	Pan-specific	MAP kinase protein-serine kinase 4 (MKK4)		
MEK4	Pan-specific	MAP kinase protein-serine kinase 4 (MKK4)	-793.20	164.53
MEK4	S257+T261	MAP kinase protein-serine kinase 4 (MKK4)		
MEK4	S257+T261	MAP kinase protein-serine kinase 4 (MKK4)	6.53	21.18
MEK5	Pan-specific	MAPK/ERK protein-serine kinase 5 (MKK5)		
MEK5	Pan-specific	MAPK/ERK protein-serine kinase 5 (MKK5)	153.42	55.11
MEK6	Pan-specific	MAP kinase protein-serine kinase 6 (MKK6)		
MEK6	Pan-specific	MAP kinase protein-serine kinase 6 (MKK6)	50.98	76.21
MEK6 (MKK6)	Pan-specific	MAP kinase protein-serine kinase 6 (MKK6)		
MEK6 (MKK6)	Pan-specific	MAP kinase protein-serine kinase 6 (MKK6)	179.27	61.10
MEK7	Pan-specific	MAP kinase protein-serine kinase 7 (MKK7)		
MEK7	Pan-specific	MAP kinase protein-serine kinase 7 (MKK7)	1765.16	822.14
MEKK1	Pan-specific	MAPK/ERK kinase kinase 1		
MEKK1	Pan-specific	MAPK/ERK kinase kinase 1	-60.03	38.92
MEKK2	Pan-specific	MAPK/ERK kinase kinase 2		
MEKK2	Pan-specific	MAPK/ERK kinase kinase 2	-60.43	13.15
MEKK4	Pan-specific	MAPK/ERK kinase kinase 4		
MEKK4	Pan-specific	MAPK/ERK kinase kinase 4	64.05	24.17
Met	Pan-specific	Hepatocyte growth factor (HGF) receptor-tyrosine kinase		
Met	Pan-specific	Hepatocyte growth factor (HGF) receptor-tyrosine kinase	1.67	29.24
Met	Y1003	Hepatocyte growth factor (HGF) receptor-tyrosine kinase		
Met	Y1003	Hepatocyte growth factor (HGF) receptor-tyrosine kinase	63.04	66.38
Met	Y1230+Y1234+Y1235	Hepatocyte growth factor (HGF) receptor-tyrosine kinase		
Met	Y1230+Y1234+Y1235	Hepatocyte growth factor (HGF) receptor-tyrosine kinase	511.21	40.72
MKP1	Pan-specific	MAP kinase phosphatase 1 (CL100, VH1)		
MKP1	Pan-specific	MAP kinase phosphatase 1 (CL100, VH1)	-46.13	132.27
MKP2	Pan-specific	MAP kinase phosphatase 2 (VH2)		
MKP2	Pan-specific	MAP kinase phosphatase 2 (VH2)	20.38	24.45
MLK3	T277+S281	Mixed-lineage protein-serine kinase 3		
MLK3	T277+S281	Mixed-lineage protein-serine kinase 3	31.41	11.07
Mn SOD	Pan-specific	Manganese superoxide dismutase (SOD2)		
Mn SOD	Pan-specific	Manganese superoxide dismutase (SOD2)	-114.59	533.33
Mnk1	T209+T214	MAP kinase-interacting protein-serine kinase 1 (calmodulin-activated)		
Mnk1	T209+T214	MAP kinase-interacting protein-serine kinase 1 (calmodulin-activated)	57.27	12.34
Mnk2	Pan-specific	MAP kinase-interacting protein-serine kinase 2 (calmodulin-activated)		

Mnk2	Pan-specific	MAP kinase-interacting protein-serine kinase 2 (calmodulin-activated)	71.26	15.65
Mos	Pan-specific	Moloney sarcoma oncogene-encoded protein-serine kinase		
Mos	Pan-specific	Moloney sarcoma oncogene-encoded protein-serine kinase	12.25	6.85
MRLC2 (MLC)	S18	Myosin regulatory light chain isoform 1		
MRLC2 (MLC)	S18	Myosin regulatory light chain isoform 1	30.60	25.68
MSH2	Pan-specific	DNA mismatch repair protein mutS homolog2, colon cancer, nonpolyposis type 1		
MSH2	Pan-specific	DNA mismatch repair protein mutS homolog2, colon cancer, nonpolyposis type 1	49.53	11.67
Msk1	S376	Mitogen & stress-activated protein-serine kinase 1		
Msk1	S376	Mitogen & stress-activated protein-serine kinase 1	60.77	12.19
MST1	Pan-specific	Mammalian STE20-like protein-serine kinase 1		
MST1	Pan-specific	Mammalian STE20-like protein-serine kinase 1	53.66	89.93
MST1	Pan-specific	Mammalian STE20-like protein-serine kinase 1		
MST1	Pan-specific	Mammalian STE20-like protein-serine kinase 1	63.56	45.67
MST2	Pan-specific	Mammalian STE20-like protein-serine kinase 2		
MST2	Pan-specific	Mammalian STE20-like protein-serine kinase 2	44.05	22.41
mTOR	Pan-specific	Mammalian target of rapamycin (FRAP)		
mTOR	Pan-specific	Mammalian target of rapamycin (FRAP)	15.67	17.25
MYPT1	T696	Myosin phosphatase target 1		
MYPT1	T696	Myosin phosphatase target 1	50.25	12.71
Nek2	Pan-specific	NIMA (never-in-mitosis)-related protein-serine kinase 2		
Nek2	Pan-specific	NIMA (never-in-mitosis)-related protein-serine kinase 2	-35.32	38.16
Nek2	Pan-specific	NIMA (never-in-mitosis)-related protein-serine kinase 2		
Nek2	Pan-specific	NIMA (never-in-mitosis)-related protein-serine kinase 2	1.09	11.06
Nek2	Pan-specific	NIMA (never-in-mitosis)-related protein-serine kinase 2		
Nek2	Pan-specific	NIMA (never-in-mitosis)-related protein-serine kinase 2	108.20	48.79
Nek4	Pan-specific	NIMA (never-in-mitosis)-related protein-serine kinase 4		
Nek4	Pan-specific	NIMA (never-in-mitosis)-related protein-serine kinase 4	14.78	3.56
Nek7	Pan-specific	NIMA (never-in-mitosis)-related protein-serine kinase 7		
Nek7	Pan-specific	NIMA (never-in-mitosis)-related protein-serine kinase 7	12.31	17.76
NFkappaB p50	Pan-specific	NF-kappa-B p50 nuclear transcription factor		
NFkappaB p50	Pan-specific	NF-kappa-B p50 nuclear transcription factor	-6.71	6.01
NFkappaB p65	Pan-specific	NF-kappa-B p65 nuclear transcription factor		
NFkappaB p65	Pan-specific	NF-kappa-B p65 nuclear transcription factor	57.17	61.08
NFkB p65 (Rel A)	S276	NF-kappa-B p65 nuclear transcription factor		
NFkB p65 (Rel A)	S276	NF-kappa-B p65 nuclear transcription factor	18.04	10.72
Nip1	Pan-specific	Bcl2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 1		
Nip1	Pan-specific	Bcl2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 1	144.94	22.86
NMDAR2B	Y1474	N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor 2B subunit		
NMDAR2B	Y1474	N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor 2B subunit	-16.99	58.08
NME6	Pan-specific	Nucleotide diphosphate kinase 6 (nm23-H6)		
NME6	Pan-specific	Nucleotide diphosphate kinase 6 (nm23-H6)	54.20	4.96
NME7	Pan-specific	Nucleotide diphosphate kinase 7 (nm23-H7)		
NME7	Pan-specific	Nucleotide diphosphate kinase 7 (nm23-H7)	3.00	19.26
NR1	S896	N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor 1 subunit zeta		
NR1	S896	N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor 1 subunit zeta	-68.81	41.72
NT5E	Pan-specific	Ecto-5'-nucleotidase (CD73 antigen)		
NT5E	Pan-specific	Ecto-5'-nucleotidase (CD73 antigen)	29.65	18.63
p107	Pan-specific	Retinoblastoma (Rb) protein-related p107 (PRB1)		
p107	Pan-specific	Retinoblastoma (Rb) protein-related p107 (PRB1)	-15.82	27.21
p16 INK4	Pan-specific	p16 INK4a cyclin-dependent kinase inhibitor (MTS1)		
p16 INK4	Pan-specific	p16 INK4a cyclin-dependent kinase inhibitor (MTS1)	-11.07	19.63
p18 INK4c	Pan-specific	p18 INK4c cyclin-dependent kinase inhibitor		
p18 INK4c	Pan-specific	p18 INK4c cyclin-dependent kinase inhibitor	12.59	23.25
p21 CDK1	Pan-specific	cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (MDA6)		
p21 CDK1	Pan-specific	cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (MDA6)	39.66	30.80
p27 Kip1	Pan-specific	p27 cyclin-dependent kinase inhibitor 1B		
p27 Kip1	Pan-specific	p27 cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	897.51	81.31
p27 Kip1	S10	p27 cyclin-dependent kinase inhibitor 1B		
p27 Kip1	S10	p27 cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	14.44	20.51
p35	Pan-specific	CDK5 regulatory subunit 1, p35		
p35	Pan-specific	CDK5 regulatory subunit 1, p35	-188.94	162.60
p38a MAPK	Pan-specific	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha		
p38a MAPK	Pan-specific	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha	-11.67	29.63
p38a MAPK	T180+Y182	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha		
p38a MAPK	T180+Y182	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha	42.17	11.25

p38a MAPK	T180+Y182	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha		
p38a MAPK	T180+Y182	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha	206.21	92.24
p38a MAPK	T180+Y182	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha		
p38a MAPK	T180+Y182	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha	-28.55	75.82
p38a MAPK	T180+Y182	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha		
p38a MAPK	T180+Y182	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha	106.07	43.15
p38d MAPK	Pan-specific	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 delta (MAPK13)		
p38d MAPK	Pan-specific	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 delta (MAPK13)	-9.30	19.76
p38 gamma	Pan-specific	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 gamma (ERK6)		
p38 gamma	Pan-specific	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 gamma (ERK6)	-15.13	22.80
P5/PPT (same as PP5C)	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 5 - catalytic subunit (PPT)		
P5/PPT (same as PP5C)	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 5 - catalytic subunit (PPT)	-26.13	17.43
p53	Pan-specific	Tumor suppressor protein p53 (antigenNY-CO-13)		
p53	Pan-specific	Tumor suppressor protein p53 (antigenNY-CO-13)	-32.45	98.95
p53	S392	Tumor suppressor protein p53 (antigenNY-CO-13)		
p53	S392	Tumor suppressor protein p53 (antigenNY-CO-13)	-85.79	135.79
p53	S392	Tumor suppressor protein p53 (antigenNY-CO-13)		
p53	S392	Tumor suppressor protein p53 (antigenNY-CO-13)	15.57	10.21
p53	S392	Tumor suppressor protein p53 (antigenNY-CO-13)		
p53	S392	Tumor suppressor protein p53 (antigenNY-CO-13)	65.35	16.86
PAC1	Pan-specific	Dual specificity MAP kinase protein phosphatase		
PAC1	Pan-specific	Dual specificity MAP kinase protein phosphatase	-173.73	84.50
PACSIN1	Pan-specific	Protein kinase C + casein kinase substrate in neurons protein 1		
PACSIN1	Pan-specific	Protein kinase C + casein kinase substrate in neurons protein 1	9.78	17.44
PAK1	Pan-specific	p21-activated serine kinase 1 (alpha)		
PAK1	Pan-specific	p21-activated serine kinase 1 (alpha)	-238.51	29.82
PAK1/2/3	S144/S141/S154	p21-activated protein-serine kinase 1/2/3		
PAK1/2/3	S144/S141/S154	p21-activated protein-serine kinase 1/2/3	55.72	42.90
PAK3	Pan-specific	p21-activated protein-serine kinase 3		
PAK3	Pan-specific	p21-activated protein-serine kinase 3	209.94	40.96
PAK5	Pan-specific	p21-activated serine kinase 5 (Serine/threonine-protein kinase PAK 7)		
PAK5	Pan-specific	p21-activated serine kinase 5 (Serine/threonine-protein kinase PAK 7)	-2.39	8.95
PAK6	Pan-specific	p21-activated serine kinase 6		
PAK6	Pan-specific	p21-activated serine kinase 6	78.89	43.43
PARP1	Pan-specific	Antibody not available		
PARP1	Pan-specific	Antibody not available		
PARP1	Pan-specific	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (ADPRT)		
PARP1	Pan-specific	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (ADPRT)	-15.29	40.37
Pax2	S394	Paired box protein 2		
Pax2	S394	Paired box protein 2	291.08	60.99
Paxillin 1	Y118	Paxillin 1		
Paxillin 1	Y118	Paxillin 1	-19.83	21.34
Paxillin 1	Y118	Paxillin 1		
Paxillin 1	Y118	Paxillin 1	18.64	24.45
Paxillin 1	Y31	Paxillin 1		
Paxillin 1	Y31	Paxillin 1	-24.37	23.26
PCK2	Pan-specific	Phosphoenolpyruvate carboxykinase		
PCK2	Pan-specific	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	38.91	17.93
PCNA	Pan-specific	Proliferating cell nuclear antigen		
PCNA	Pan-specific	Proliferating cell nuclear antigen	-14.30	30.83
PCTK1	Pan-specific	PCTAIRE-1 protein-serine kinase		
PCTK1	Pan-specific	PCTAIRE-1 protein-serine kinase	179.88	71.35
PDGFRa	Y742	Platelet-derived growth factor receptor kinase alpha		
PDGFRa	Y742	Platelet-derived growth factor receptor kinase alpha	12.97	25.84
PDGFRa	Y754	Platelet-derived growth factor receptor kinase alpha		
PDGFRa	Y754	Platelet-derived growth factor receptor kinase alpha	32.76	32.58
PDGFRa/b	Y572+Y574/Y579+Y581	Platelet-derived growth factor receptor kinase alpha/beta		
PDGFRa/b	Y572+Y574/Y579+Y581	Platelet-derived growth factor receptor kinase alpha/beta	-63.18	65.08
PDGFRb	Y716	Platelet-derived growth factor receptor kinase beta		
PDGFRb	Y716	Platelet-derived growth factor receptor kinase beta	-47.87	22.44
PDK1	Pan-specific	3-phosphoinositide-dependent protein-serine kinase 1		
PDK1	Pan-specific	3-phosphoinositide-dependent protein-serine kinase 1	-79.45	62.49
PDK1	S244	3-Phosphoinositide-dependent protein-serine kinase 1		
PDK1	S244	3-Phosphoinositide-dependent protein-serine kinase 1	78.47	47.62
PDK2	Pan-specific	Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2		
PDK2	Pan-specific	Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2	8.93	13.70
PED15 (PEA15)	S116	Phosphoprotein-enriched in diabetes/astrocytes 15		
PED15 (PEA15)	S116	Phosphoprotein-enriched in diabetes/astrocytes 15	52.63	15.06
PERP	Pan-specific	p53-induced protein PIGPC1		

PERP	Pan-specific	p53-induced protein PIGPC1	-87.11	30.47
MRLC	S20	Myosin regulatory light chain		
MRLC	S20	Myosin regulatory light chain	395.09	64.47
PI3K p110 delta	Pan-specific	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform		
PI3K p110 delta	Pan-specific	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform	142.76	71.94
PI3KR4	Pan-specific	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4		
PI3KR4	Pan-specific	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4	-24.27	26.61
PI4K2b	Pan-specific	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta		
PI4K2b	Pan-specific	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta	103.44	40.94
PI4KCB	Pan-specific	phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, beta polypeptide		
PI4KCB	Pan-specific	phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, beta polypeptide	18.66	47.54
PIP5K2a	Pan-specific	Phosphatidylinositol 4-phosphatase 5-kinase type 2 alpha		
PIP5K2a	Pan-specific	Phosphatidylinositol 4-phosphatase 5-kinase type 2 alpha	-16.32	16.95
PKA	Pan-specific	cAMP-dependent protein-serine kinase		
PKA	Pan-specific	cAMP-dependent protein-serine kinase	-4.33	14.00
PKA Ca/b	Pan-specific	cAMP-dependent protein-serine kinase catalytic subunit alpha/beta		
PKA Ca/b	Pan-specific	cAMP-dependent protein-serine kinase catalytic subunit alpha/beta	1.53	2.42
PKA Ca/b	T197	cAMP-dependent protein-serine kinase catalytic subunit alpha/beta		
PKA Ca/b	T197	cAMP-dependent protein-serine kinase catalytic subunit alpha/beta	25.89	7.56
PKA Cb	S338	cAMP-dependent protein-serine kinase catalytic subunit beta		
PKA Cb	S338	cAMP-dependent protein-serine kinase catalytic subunit beta	261.79	9.31
PKA R2a (PKR2)	Pan-specific	cAMP-dependent protein-serine kinase regulatory type 2 subunit alpha		
PKA R2a (PKR2)	Pan-specific	cAMP-dependent protein-serine kinase regulatory type 2 subunit alpha	-26.70	11.38
PKA R2a	S98	cAMP-dependent protein-serine kinase regulatory type 2 subunit alpha		
PKA R2a	S98	cAMP-dependent protein-serine kinase regulatory type 2 subunit alpha	108.23	17.88
PKA R2b	S114	cAMP-dependent protein-serine kinase regulatory type 2 subunit beta		
PKA R2b	S114	cAMP-dependent protein-serine kinase regulatory type 2 subunit beta	24.98	50.70
PKBa (Akt1)	Pan-specific	Protein-serine kinase B alpha (Akt1)		
PKBa (Akt1)	Pan-specific	Protein-serine kinase B alpha (Akt1)	-40.88	50.37
PKBa (Akt1)	T308	Protein-serine kinase B alpha (Akt1)		
PKBa (Akt1)	T308	Protein-serine kinase B alpha (Akt1)	25.08	47.33
PKBa (Akt1)	S473	Protein-serine kinase B alpha (Akt1)		
PKBa (Akt1)	S473	Protein-serine kinase B alpha (Akt1)	133.28	34.14
PKBa (Akt1)	S473	Protein-serine kinase B alpha (Akt1)		
PKBa (Akt1)	S473	Protein-serine kinase B alpha (Akt1)	38.00	12.52
PKBa (Akt1)	S473	Protein-serine kinase B alpha (Akt1)		
PKBa (Akt1)	S473	Protein-serine kinase B alpha (Akt1)	25.71	12.34
PKBa (Akt1)	T308	Protein-serine kinase B alpha (Akt1)		
PKBa (Akt1)	T308	Protein-serine kinase B alpha (Akt1)	54.33	20.07
PKBb (Akt2)	Pan-specific	Protein-serine kinase B beta (Akt2)		
PKBb (Akt2)	Pan-specific	Protein-serine kinase B beta (Akt2)	38.95	22.28
PKBb (Akt2)	Pan-specific	Protein-serine kinase B beta (Akt2)		
PKBb (Akt2)	Pan-specific	Protein-serine kinase B beta (Akt2)	47.35	41.08
PKBg (Akt3)	Pan-specific	Protein-serine kinase B gamma (Akt3)		
PKBg (Akt3)	Pan-specific	Protein-serine kinase B gamma (Akt3)	-3.15	11.19
PKBg (Akt3)	Pan-specific	Protein-serine kinase B gamma (Akt3)		
PKBg (Akt3)	Pan-specific	Protein-serine kinase B gamma (Akt3)	4.36	30.29
PKCa	Pan-specific	Protein-serine kinase C alpha		
PKCa	Pan-specific	Protein-serine kinase C alpha	10.71	12.53
PKCa	S657	Protein-serine kinase C alpha		
PKCa	S657	Protein-serine kinase C alpha	89.64	30.54
PKCa/b2	T638/T641	Protein-serine kinase C alpha		
PKCa/b2	T638/T641	Protein-serine kinase C alpha	183.32	66.42
PKCb1	Pan-specific	Protein-serine kinase C beta 1		
PKCb1	Pan-specific	Protein-serine kinase C beta 1	-40.76	49.43
PKCb1/2	T500	Protein-serine kinase C beta 1/2		
PKCb1/2	T500	Protein-serine kinase C beta 1/2	23.49	21.55
PKCb2	Pan-specific	Protein-serine kinase C beta 2		
PKCb2	Pan-specific	Protein-serine kinase C beta 2	31.81	10.33
PKCb2	T641	Protein-serine kinase C beta 2		

PKCb2	T641	Protein-serine kinase C beta 2	63.21	52.57
PKCd	Pan-specific	Protein-serine kinase C delta		
PKCd	Pan-specific	Protein-serine kinase C delta	-2.42	34.78
PKCd	S645	Protein-serine kinase C delta		
PKCd	S645	Protein-serine kinase C delta	0.43	12.80
PKCd	S664	Protein-serine kinase C delta		
PKCd	S664	Protein-serine kinase C delta	18.92	31.96
PKCd	T507	Protein-serine kinase C delta		
PKCd	T507	Protein-serine kinase C delta	32.63	107.05
PKCd	Y313	Protein-serine kinase C delta		
PKCd	Y313	Protein-serine kinase C delta	7.83	21.39
PKCd	Y313	Protein-serine kinase C delta		
PKCd	Y313	Protein-serine kinase C delta	23.12	32.73
PKCe	Pan-specific	Protein-serine kinase C epsilon		
PKCe	Pan-specific	Protein-serine kinase C epsilon	-16.73	6.94
PKCe	S729	Protein-serine kinase C epsilon		
PKCe	S729	Protein-serine kinase C epsilon	35.61	17.16
PKCe	S729	Protein-serine kinase C epsilon		
PKCe	S729	Protein-serine kinase C epsilon	45.48	15.38
PKCg	Pan-specific	Protein-serine kinase C gamma		
PKCg	Pan-specific	Protein-serine kinase C gamma	-31.87	22.44
PKCg	T514	Protein-serine kinase C gamma		
PKCg	T514	Protein-serine kinase C gamma	394.40	423.75
PKCg	T514	Protein-serine kinase C gamma		
PKCg	T514	Protein-serine kinase C gamma	73.51	22.61
PKCg	T655	Protein-serine kinase C gamma		
PKCg	T655	Protein-serine kinase C gamma	37.53	19.11
PKCg	T674	Protein-serine kinase C gamma		
PKCg	T674	Protein-serine kinase C gamma	3.99	24.24
PKCh	S674	Protein-serine kinase C eta		
PKCh	S674	Protein-serine kinase C eta	22.38	38.07
PKCh	T655	Protein-serine kinase C eta		
PKCh	T655	Protein-serine kinase C eta	-4.65	23.71
PKCl	Pan-specific	Protein-serine kinase C lambda/iota		
PKCl	Pan-specific	Protein-serine kinase C lambda/iota	-49.70	4.74
PKCl	T555	Protein-serine kinase C lambda/iota		
PKCl	T555	Protein-serine kinase C lambda/iota	274.68	71.39
PKC-nu	Pan-specific	Protein-serine kinase C nu		
PKC-nu	Pan-specific	Protein-serine kinase C nu	5.16	11.22
PKCq	Pan-specific	Protein-serine kinase C theta		
PKCq	Pan-specific	Protein-serine kinase C theta	50.07	15.73
PKCq	S676	Protein-serine kinase C theta		
PKCq	S676	Protein-serine kinase C theta	-9.47	6.97
PKCq	S695	Protein-serine kinase C theta		
PKCq	S695	Protein-serine kinase C theta	-0.68	17.19
PKCq	T538	Protein-serine kinase C theta		
PKCq	T538	Protein-serine kinase C theta	112.28	39.10
PKCz	Pan-specific	Protein-serine kinase C zeta		
PKCz	Pan-specific	Protein-serine kinase C zeta	5.23	37.74
PKCz/l	T410/T403	Protein-serine kinase C zeta/lambda		
PKCz/l	T410/T403	Protein-serine kinase C zeta/lambda	-23.78	47.17
PKD (PKCm)	Pan-specific	Protein-serine kinase C mu (Protein kinase D)		
PKD (PKCm)	Pan-specific	Protein-serine kinase C mu (Protein kinase D)	-104.65	182.06
PKD (PKCm)	S738+S742	Protein-serine kinase C mu (Protein kinase D)		
PKD (PKCm)	S738+S742	Protein-serine kinase C mu (Protein kinase D)	-23.17	94.88
PKD (PKCm)	S910	Protein-serine kinase C mu (Protein kinase D)		
PKD (PKCm)	S910	Protein-serine kinase C mu (Protein kinase D)	27.36	37.37
PKD (PKCm)	S910	Protein-serine kinase C mu (Protein kinase D)		
PKD (PKCm)	S910	Protein-serine kinase C mu (Protein kinase D)	48.50	30.05
PKG1	Pan-specific	Protein-serine kinase G1 (cGMP-dependent protein kinase)		
PKG1	Pan-specific	Protein-serine kinase G1 (cGMP-dependent protein kinase)	86.42	15.17
PKM2	Pan-specific	Pyruvate kinase, isozymes M1/M2		
PKM2	Pan-specific	Pyruvate kinase, isozymes M1/M2	-18.39	15.52
PKN	Pan-specific	Protein-serine kinase C-like 1 (PRK1)		
PKN	Pan-specific	Protein-serine kinase C-like 1 (PRK1)	-106.74	120.03
PKAR1A	Pan-specific	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory chain		
PKAR1A	Pan-specific	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory chain	24.80	25.90
PKR1	Pan-specific	Double stranded RNA dependent protein-serine kinase		
PKR1	Pan-specific	Double stranded RNA dependent protein-serine kinase	15.49	7.78
PKR1	T451	Double stranded RNA dependent protein-serine kinase		

PKR1	T451	Double stranded RNA dependent protein-serine kinase	92.47	16.33
PIK1	Pan-specific	Polo-like protein-serine kinase 1		
Plk1	Pan-specific	Polo-like protein-serine kinase 1	35.72	31.16
PIK1	T210	Polo-like protein-serine kinase 1		
Plk1	T210	Polo-like protein-serine kinase 1	50.17	7.57
PIk2 (SNK)	Pan-specific	Polo-like protein kinase 2 (serum -inducible kinase (SNK))		
PIK2 (SNK)	Pan-specific	Polo-like protein kinase 2 (serum -inducible kinase (SNK))	61.29	31.21
PIK3 (CNK)	Pan-specific	Polo-like protein kinase 3 (cytokine- inducible kinase (CNK))		
PIk3 (CNK)	Pan-specific	Polo-like protein kinase 3 (cytokine- inducible kinase (CNK))	256.11	42.72
PP1/Ca	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 1 - catalytic subunit - alpha isoform		
PP1/Ca	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 1 - catalytic subunit - alpha isoform	36.84	4.42
PP1/Ca	T320	Protein-serine phosphatase 1 - catalytic subunit - alpha isoform		
PP1/Ca	T320	Protein-serine phosphatase 1 - catalytic subunit - alpha isoform	-36.15	22.89
PP1/Cb	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 1 - catalytic subunit - beta isoform		
PP1/Cb	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 1 - catalytic subunit - beta isoform	51.60	27.74
PP1/Cg	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 1 - catalytic subunit - gamma isoform		
PP1/Cg	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 1 - catalytic subunit - gamma isoform	-17.25	49.88
PP2A/Aa/b	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 2A - A regulatory subunit - alpha and beta isoforms		
PP2A/Aa/b	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 2A - A regulatory subunit - alpha and beta isoforms	225.42	40.84
PP2A/Ca	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 2A - catalytic subunit alpha isoform		
PP2A/Ca	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 2A - catalytic subunit alpha isoform	66.73	15.86
PP2B/Aa	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 2B - catalytic subunit - alpha isoform		
PP2B/Aa	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 2B - catalytic subunit - alpha isoform	-0.43	97.24
PP2Cab	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 2C - catalytic subunit - alpha/beta		
PP2Cab	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 2C - catalytic subunit - alpha/beta	-23.79	28.94
PP2Cd	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 2C - catalytic subunit - delta isoform		
PP2Cd	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 2C - catalytic subunit - delta isoform	-1.17	30.27
PP4/A'2	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 4 - regulatory subunit (PPX/A'2)		
PP4/A'2	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 4 - regulatory subunit (PPX/A'2)	3.75	21.75
PP4C	Pan-specific	Protein-serine phosphatase X - catalytic subunit (PPX/C)		
PP4C	Pan-specific	Protein-serine phosphatase X - catalytic subunit (PPX/C)	54.73	14.46
PP5C	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 5 - catalytic subunit (PPT)		
PP5C	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 5 - catalytic subunit (PPT)	10.69	31.19
PP6C	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 6 - catalytic subunit (PPVC)		
PP6C	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 6 - catalytic subunit (PPVC)	-78.94	47.70
PRAS40	T246	Proline-rich Akt substrate 40 kDa (Akt1S1)		
PRAS40	T246	Proline-rich Akt substrate 40 kDa (Akt1S1)	1.76	14.26
PRK1/2	T774	Protein kinase C-related protein-serine kinase 1/2		
PRK1/2	T774	Protein kinase C-related protein-serine kinase 1/2	219.79	52.41
PRK2	Pan-specific	Protein kinase C-related protein-serine kinase 2		
PRK2	Pan-specific	Protein kinase C-related protein-serine kinase 2	68.44	14.54
PRKAB1	Pan-specific	5'-AMP-activated protein kinase (AMPK), beta-1 regulatory subunit		
PRKAB1	Pan-specific	5'-AMP-activated protein kinase (AMPK), beta-1 regulatory subunit	9.20	7.14
PRKWNK4	Pan-specific	Putative protein-serine kinase WNK4		
PRKWNK4	Pan-specific	Putative protein-serine kinase WNK4	-22.84	14.39
Progesterone Receptor	S294	Progesterone receptor		
Progesterone Receptor	S294	Progesterone receptor	133.54	12.46
PRP4K (PRP4)	Pan-specific	Protein-serine kinase PRP4 homolog		
PRP4K (PRP4)	Pan-specific	Protein-serine kinase PRP4 homolog	13.55	10.17
PTEN	Pan-specific	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and protein phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome		
PTEN	Pan-specific	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and protein phosphatase and tensin homolog deleted on	-119.35	140.98

		chromosome		
PTEN	S370	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and protein phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome		
PTEN	S370	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and protein phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome	57.84	58.89
PTEN	S380+S382+S385	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and protein phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome		
PTEN	S380+S382+S385	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and protein phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome	-6.65	32.11
PTP1B	Pan-specific	Protein-tyrosine phosphatase 1B		
PTP1B	Pan-specific	Protein-tyrosine phosphatase 1B	8.97	20.49
PTP1C	Pan-specific	Protein-tyrosine phosphatase 1C (SHP1, SHPTP1)		
PTP1C	Pan-specific	Protein-tyrosine phosphatase 1C (SHP1, SHPTP1)	12.40	2.75
PTP1D	Pan-specific	Protein-tyrosine phosphatase 1D (SHP2, SHPTP2, Syp, PTP2C)		
PTP1D	Pan-specific	Protein-tyrosine phosphatase 1D (SHP2, SHPTP2, Syp, PTP2C)	18.72	31.45
PKR	Pan-specific	Double stranded RNA dependent protein-serine kinase		
PKR	Pan-specific	Double stranded RNA dependent protein-serine kinase	-342.94	60.63
PTP-PEST	Pan-specific	Protein-tyrosine phosphatase with PEST sequences (PTPG1, PTPN12)		
PTP-PEST	Pan-specific	Protein-tyrosine phosphatase with PEST sequences (PTPG1, PTPN12)	373.48	71.15
PyDK2 (PDK2)	Pan-specific	Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2		
PyDK2 (PDK2)	Pan-specific	Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2	20.85	17.13
Pyk2	Pan-specific	Protein-tyrosine kinase 2		
Pyk2	Pan-specific	Protein-tyrosine kinase 2	-40.57	18.57
Pyk2	Y579	Protein-tyrosine kinase 2		
Pyk2	Y579	Protein-tyrosine kinase 2	3.24	13.79
Rac1/cdc42	S71	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1		
Rac1/cdc42	S71	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	13.23	8.77
Rad17	S645	Rad17 homolog		
Rad17	S645	Rad17 homolog	10.46	19.56
Raf1	Pan-specific	Raf1 proto-oncogene-encoded protein-serine kinase		
Raf1	Pan-specific	Raf1 proto-oncogene-encoded protein-serine kinase	11.05	3.96
Raf1	S259	Raf1 proto-oncogene-encoded protein-serine kinase		
Raf1	S259	Raf1 proto-oncogene-encoded protein-serine kinase	432.15	140.09
RafB	Pan-specific	RafB proto-oncogene-encoded protein-serine kinase		
RafB	Pan-specific	RafB proto-oncogene-encoded protein-serine kinase	-40.57	58.70
Rb	Pan-specific	Retinoblastoma-associated protein 1		
Rb	Pan-specific	Retinoblastoma-associated protein 1	-22.19	3.07
Rb	S612	Retinoblastoma-associated protein 1		
Rb	S612	Retinoblastoma-associated protein 1	-1.39	21.29
Rb	S807	Retinoblastoma-associated protein 1		
Rb	S807	Retinoblastoma-associated protein 1	5.48	16.32
Rb	S807+S811	Retinoblastoma-associated protein 1		
Rb	S807+S811	Retinoblastoma-associated protein 1	198.84	24.60
Rb	T821	Retinoblastoma-associated protein 1		
Rb	T821	Retinoblastoma-associated protein 1	5.37	30.79
Rb	T826	Retinoblastoma-associated protein 1		
Rb	T826	Retinoblastoma-associated protein 1	-44.41	6.44
Rb	S780	Retinoblastoma-associated protein 1		
Rb	S780	Retinoblastoma-associated protein 1	43.89	66.66
Ret	S696	Ret receptor-tyrosine kinase		
Ret	S696	Ret receptor-tyrosine kinase	403.34	81.79
RIPK	Pan-specific	Receptor-interacting protein-serine kinase		
RIPK	Pan-specific	Receptor-interacting protein-serine kinase	5.50	12.48
Rb	T356	Retinoblastoma-associated protein 1		
Rb	T356	Retinoblastoma-associated protein 1	-3.32	27.01
ROKa	Pan-specific	RhoA protein-serine kinase alpha (ROCK2)		
ROKa	Pan-specific	RhoA protein-serine kinase alpha (ROCK2)	7.46	12.15
ROR2 (RON2)	Pan-specific	ROR2 neurotrophic receptor-tyrosine kinase		
ROR2 (RON2)	Pan-specific	ROR2 neurotrophic receptor-tyrosine kinase	-1.64	47.78
ROS	Pan-specific	Orosomucoid 1 receptor-tyrosine kinase		
ROS	Pan-specific	Orosomucoid 1 receptor-tyrosine kinase	443.31	58.30
RPTPa	Pan-specific	Antibody not available		
RPTPa	Pan-specific	Antibody not available		
RPTPb	Pan-specific	Antibody not available		
RPTPb	Pan-specific	Antibody not available		
RSK1	Pan-specific	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1		
RSK1	Pan-specific	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1	33.13	34.46
RSK2	Pan-specific	Ribosomal S6 protein-serine kinase 2		

RSK2	Pan-specific	Ribosomal S6 protein-serine kinase 2	63.19	56.40
RSK1	S380/S386	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1		
RSK1	S380/S386	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1	1078.03	95.78
RSK1/2	S221/S227	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1/2		
RSK1/2	S221/S227	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1/2	63.31	15.06
RSK1/2	S363/S369	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1/2		
RSK1/2	S363/S369	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1/2	49.45	26.36
RSK1/2	S380/S386	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1/2		
RSK1/2	S380/S386	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1/2	26.74	6.35
RSK1/2 (p90RSK)	T359/T365	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1/2		
RSK1/2 (p90RSK)	T359/T365	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1/2	-66.82	97.96
RSK1/2	T573/T577	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1/2		
RSK1/2	T573/T577	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1/2	5.91	24.78
RSK4	Pan-specific	Ribosomal protein S6 kinase alpha-6 (RSK4)		
RSK4	Pan-specific	Ribosomal protein S6 kinase alpha-6 (RSK4)	-14.57	14.42
RYK	Pan-specific	RYK tyrosine-protein kinase		
RYK	Pan-specific	RYK tyrosine-protein kinase	-2.86	27.61
S6	S235	40S ribosomal protein S6		
S6	S235	40S ribosomal protein S6	-26.54	5.75
S6Ka	Pan-specific	p70 ribosomal protein-serine S6 kinase alpha		
S6Ka	Pan-specific	p70 ribosomal protein-serine S6 kinase alpha	-82.31	43.94
S6Ka	T389	p70 ribosomal protein-serine S6 kinase alpha		
S6Ka	T389	p70 ribosomal protein-serine S6 kinase alpha	18.90	12.56
S6Ka	T421+S424	p70 ribosomal protein-serine S6 kinase alpha		
S6Ka	T421+S424	p70 ribosomal protein-serine S6 kinase alpha	1.20	22.06
S6Ka	T229	p70 ribosomal protein-serine S6 kinase alpha		
S6Ka	T229	p70 ribosomal protein-serine S6 kinase alpha	5.36	57.02
S6Kb	Pan-specific	p70 ribosomal protein-serine S6 kinase beta		
S6Kb	Pan-specific	p70 ribosomal protein-serine S6 kinase beta	-10.00	29.03
SGK3	Pan-specific	Serum/glucocorticoid regulated kinase 3		
SGK3	Pan-specific	Serum/glucocorticoid regulated kinase 3	124.34	22.96
Shc1	Y349+Y350	SH2 domain-containing transforming protein 1		
Shc1	Y349+Y350	SH2 domain-containing transforming protein 1	26.14	18.60
SHP2	S576	Protein-tyrosine phosphatase 1D		
SHP2	S576	Protein-tyrosine phosphatase 1D	38.65	15.10
SIRPa1	Pan-specific	Signal regulatory protein substrate of PTP1D phosphatase (SHPS1)		
SIRPa1	Pan-specific	Signal regulatory protein substrate of PTP1D phosphatase (SHPS1)	26.08	27.91
SLK	Pan-specific	STE20-like protein-serine kinase		
SLK	Pan-specific	STE20-like protein-serine kinase	-9.45	18.56
Smac/DIABLO	Pan-specific	Second mitochondria-derived activator of caspase		
Smac/DIABLO	Pan-specific	Second mitochondria-derived activator of caspase	112.07	44.31
Smad1/5/9	S463+S465/S463+S465/S465+S467	SMA- and mothers against decapentaplegic homologs 1/5/9		
Smad1/5/9	S463+S465/S463+S465/S465+S467	SMA- and mothers against decapentaplegic homologs 1/5/9	14.26	48.54
Smad2	S465+S467	SMA- and mothers against decapentaplegic homolog 2		
Smad2	S465+S467	SMA- and mothers against decapentaplegic homolog 2	281.61	53.96
SOCS4	Pan-specific	Suppressor of cytokine signalling 4 (SOCS7)		
SOCS4	Pan-specific	Suppressor of cytokine signalling 4 (SOCS7)	-27.23	44.73
SOD (Cu/Zn)	Pan-specific	Superoxide dismutase 1		
SOD (Cu/Zn)	Pan-specific	Superoxide dismutase 1	-40.92	80.44
SODD	Pan-specific	Silencer of death domains (Bcl2 associated athanogene 4 (BAG4))		
SODD	Pan-specific	Silencer of death domains (Bcl2 associated athanogene 4 (BAG4))	50.69	26.02
SOX9	S181	SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)		
SOX9	S181	SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)	-17.18	6.06
SPHK1	Pan-specific	Sphingosine kinase 1		
SPHK1	Pan-specific	Sphingosine kinase 1	7.68	27.60
SPHK2	Pan-specific	Sphingosine kinase 2		
SPHK2	Pan-specific	Sphingosine kinase 2	23.65	20.18
Src	Pan-specific	Src proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase		
Src	Pan-specific	Src proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase	-18.58	48.94
Src	Y418	Src proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase		
Src	Y418	Src proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase	55.65	29.22
Src	Y529	Src proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase		
Src	Y529	Src proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase	-12.39	3.76
STAT1	Pan-specific	Signal transducer and activator of transcription 1		
STAT1	Pan-specific	Signal transducer and activator of transcription 1	27.95	9.46
STAT1	S727	Signal transducer and activator of transcription 1		
STAT1	S727	Signal transducer and activator of transcription 1	81.40	23.55
STAT1	Y701	Antibody not available		
STAT1	Y701	Antibody not available		

STAT1	Y701	Signal transducer and activator of transcription 1		
STAT1	Y701	Signal transducer and activator of transcription 1	319.29	35.62
STAT2	Pan-specific	Signal transducer and activator of transcription 2		
STAT2	Pan-specific	Signal transducer and activator of transcription 2	-33.09	6.42
STAT2	Y690	Signal transducer and activator of transcription 2		
STAT2	Y690	Signal transducer and activator of transcription 2	-6.08	36.44
STAT3	Pan-specific	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute phase response factor)		
STAT3	Pan-specific	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute phase response factor)	15.88	24.21
STAT3	S727	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute phase response factor)		
STAT3	S727	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute phase response factor)	24.03	10.77
STAT4	Pan-specific	Signal transducer and activator of transcription 4 (acute phase response factor)		
STAT4	Pan-specific	Signal transducer and activator of transcription 4 (acute phase response factor)	-21.67	39.36
STAT5A	Pan-specific	Signal transducer and activator of transcription 5A		
STAT5A	Pan-specific	Signal transducer and activator of transcription 5A	-97.26	1342.27
STAT5A	Y694	Signal transducer and activator of transcription 5A		
STAT5A	Y694	Signal transducer and activator of transcription 5A	37.98	25.11
STAT5B	Pan-specific	Signal transducer and activator of transcription 5B		
STAT5B	Pan-specific	Signal transducer and activator of transcription 5B	-8.38	49.13
STAT6	Pan-specific	Signal transducer and activator of transcription 6		
STAT6	Pan-specific	Signal transducer and activator of transcription 6	-12.29	34.76
STI1	Pan-specific	Stress induced phosphoprotein 1 (Hsc70/Hsp90 organizing protein (Hop))		
STI1	Pan-specific	Stress induced phosphoprotein 1 (Hsc70/Hsp90 organizing protein (Hop))	15.63	13.29
STK33	Pan-specific	FLJ35932 protein-serine kinase		
STK33	Pan-specific	FLJ35932 protein-serine kinase	7.32	7.65
Syk	Pan-specific	Spleen protein-tyrosine kinase		
Syk	Pan-specific	Spleen protein-tyrosine kinase	-95.46	166.73
Synapsin 1	S603	Synapsin 1 isoform la		
Synapsin 1	S603	Synapsin 1 isoform la	117.73	164.51
Synapsin 1	S9	Synapsin 1 isoform la		
Synapsin 1	S9	Synapsin 1 isoform la	-649.95	120.38
TAK1	Pan-specific	TGF-beta-activated protein-serine kinase 1		
TAK1	Pan-specific	TGF-beta-activated protein-serine kinase 1	-28.61	25.43
TAK1	Pan-specific	TGF-beta-activated protein-serine kinase 1		
TAK1	Pan-specific	TGF-beta-activated protein-serine kinase 1	3.63	23.99
Tau	S422	Microtubule-associated protein tau		
Tau	S422	Microtubule-associated protein tau	70.43	53.41
Tau	S515	Microtubule-associated protein tau		
Tau	S515	Microtubule-associated protein tau	48.73	18.51
Tau	S515+S518	Microtubule-associated protein tau		
Tau	S515+S518	Microtubule-associated protein tau	55.06	31.90
Tau	S202	Microtubule-associated protein tau		
Tau	S202	Microtubule-associated protein tau	24.79	46.43
Tau	S530	Microtubule-associated protein tau		
Tau	S530	Microtubule-associated protein tau	37.76	12.09
Tau	S578	Microtubule-associated protein tau		
Tau	S578	Microtubule-associated protein tau	85.14	21.46
Tau	S712	Microtubule-associated protein tau		
Tau	S712	Microtubule-associated protein tau	32.76	30.02
Tau	S716	Microtubule-associated protein tau		
Tau	S716	Microtubule-associated protein tau	21.17	18.25
Tau	S720	Microtubule-associated protein tau		
Tau	S720	Microtubule-associated protein tau	-1169.22	324.22
Tau	T231	Microtubule-associated protein tau		
Tau	T231	Microtubule-associated protein tau	27.47	53.65
TBK1	Pan-specific	Tank-binding protein 1		
TBK1	Pan-specific	Tank-binding protein 1	6.02	9.34
TBK1	Pan-specific	Tank-binding protein 1		
TBK1	Pan-specific	Tank-binding protein 1	-527.39	53.92
TEK	Pan-specific	Angiopoietin-1 receptor-tyrosine kinase (TIE2)		
TEK	Pan-specific	Angiopoietin-1 receptor-tyrosine kinase (TIE2)	12.13	8.78
Tik1	Pan-specific	Tousled-like protein-serine kinase 1		
Tik1	Pan-specific	Tousled-like protein-serine kinase 1	-31.28	35.44
Tik1	Pan-specific	Tousled-like protein-serine kinase 1		
Tik1	Pan-specific	Tousled-like protein-serine kinase 1	-19.16	6.86

TRADD	Pan-specific	Tumor necrosis factor receptor type 1 associated DEATH domain protein		
TRADD	Pan-specific	Tumor necrosis factor receptor type 1 associated DEATH domain protein	-3.70	21.34
Trail	Pan-specific	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand		
Trail	Pan-specific	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand	59.21	16.18
TrkA	Pan-specific	Nerve growth factor (NGF) receptor- tyrosine kinase		
TrkA	Pan-specific	Nerve growth factor (NGF) receptor- tyrosine kinase	-20.21	34.85
TrkB	Pan-specific	BDNF/NT3/4/5 receptor- tyrosine kinase		
TrkB	Pan-specific	BDNF/NT3/4/5 receptor- tyrosine kinase	-31.80	22.17
TTK	Pan-specific	Dual specificity protein kinase		
TTK	Pan-specific	Dual specificity protein kinase	21.42	36.06
Tyk2	Pan-specific	Protein-tyrosine kinase 2 (Jak-related)		
Tyk2	Pan-specific	Protein-tyrosine kinase 2 (Jak-related)	-233.98	72.34
Tyro10	Pan-specific	Neurotrophic receptor-tyrosine kinase of discoidin domain receptor family, member 2 precursor (DDR2)		
Tyro10	Pan-specific	Neurotrophic receptor-tyrosine kinase of discoidin domain receptor family, member 2 precursor (DDR2)	131.26	83.23
Tyro10	Pan-specific	Neurotrophic receptor-tyrosine kinase of discoidin domain receptor family, member 2 precursor (DDR2)		
Tyro10	Pan-specific	Neurotrophic receptor-tyrosine kinase of discoidin domain receptor family, member 2 precursor (DDR2)	154.93	22.04
Tyrosine Hydroxylase	S19	Tyrosine hydroxylase isoform a		
Tyrosine Hydroxylase	S19	Tyrosine hydroxylase isoform a	63.80	16.28
Tyrosine Hydroxylase	S71	Tyrosine hydroxylase isoform a		
Tyrosine Hydroxylase	S71	Tyrosine hydroxylase isoform a	-11.06	79.95
VEGFR2	Y1054	Vascular endothelial growth factor receptor-tyrosine kinase 2 (Flk1, KDR)		
VEGFR2	Y1054	Vascular endothelial growth factor receptor-tyrosine kinase 2 (Flk1, KDR)	8.76	11.96
VEGFR2	Y1054+Y1059	Vascular endothelial growth factor receptor-tyrosine kinase 2 (Flk1, KDR)		
VEGFR2	Y1054+Y1059	Vascular endothelial growth factor receptor-tyrosine kinase 2 (Flk1, KDR)	39.03	10.21
VHR	Pan-specific	Dual specificity protein phosphatase 3		
VHR	Pan-specific	Dual specificity protein phosphatase 3	-14.72	35.71
Vimentin	S33	Vimentin		
Vimentin	S33	Vimentin	-27.63	73.69
Vinculin	Y821	Vinculin		
Vinculin	Y821	Vinculin	12.16	10.33
Vrk1	Pan-specific	Vaccinia related protein-serine kinase 1		
Vrk1	Pan-specific	Vaccinia related protein-serine kinase 1	10.64	3.37
Wee1	Pan-specific	Wee1 protein-tyrosine kinase		
Wee1	Pan-specific	Wee1 protein-tyrosine kinase	12.40	4.82
XIAP	Pan-specific	X-linked inhibitor of apoptosis protein (baculoviral IAP repeat-containing 4)		
XIAP	Pan-specific	X-linked inhibitor of apoptosis protein (baculoviral IAP repeat-containing 4)	7.97	12.93
Yes	Pan-specific	Yamaguchi sarcoma proto-oncogene-encoded tyrosine kinase		
Yes	Pan-specific	Yamaguchi sarcoma proto-oncogene-encoded tyrosine kinase	17.53	16.95
ZAP70	Pan-specific	Zeta-chain (TCR) associated protein-tyrosine kinase, 70 kDa		
ZAP70	Pan-specific	Zeta-chain (TCR) associated protein-tyrosine kinase, 70 kDa	-26.19	35.26
ZAP70	Y292	Zeta-chain (TCR) associated protein-tyrosine kinase, 70 kDa		
ZAP70	Y292	Zeta-chain (TCR) associated protein-tyrosine kinase, 70 kDa	-39.24	58.40
ZAP70	Y315+Y319	Zeta-chain (TCR) associated protein-tyrosine kinase, 70 kDa		
ZAP70	Y315+Y319	Zeta-chain (TCR) associated protein-tyrosine kinase, 70 kDa	26.54	24.04
ZAP70	Y319	Zeta-chain (TCR) associated protein-tyrosine kinase, 70 kDa		
ZAP70	Y319	Zeta-chain (TCR) associated protein-tyrosine kinase, 70 kDa	-67.23	23.29
ZIPK	Pan-specific	ZIP kinase (death associated protein-serine kinase 3 (DAPK3))		
ZIPK	Pan-specific	ZIP kinase (death associated protein-serine kinase 3 (DAPK3))	279.08	4.73
ZIPK	Pan-specific	ZIP kinase (death associated protein-serine kinase 3 (DAPK3))		
ZIPK	Pan-specific	ZIP kinase (death associated protein-serine kinase 3 (DAPK3))	246.67	100.97
b-Arrestin	Pan-specific	Arrestin beta		
b-Arrestin	Pan-specific	Arrestin beta	35.32	24.65
CDC42	Pan-specific	Cell division control protein 42 homolog		
CDC42	Pan-specific	Cell division control protein 42 homolog	22.62	55.13
Dok1/p62dok	Pan-specific	Docking protein 1		
Dok1/p62dok	Pan-specific	Docking protein 1	-15.03	51.41
Jun	Pan-specific	Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor		
Jun	Pan-specific	Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor	-6.62	18.86
Paxillin	Pan-specific	Paxillin 1		
Paxillin	Pan-specific	Paxillin 1	46.34	31.12
Caveolin 2	Pan-specific	Caveolin 2		

Caveolin 2	Pan-specific	Caveolin 2	67.93	35.70
Cofilin	Pan-specific	Cofilin 1		
Cofilin	Pan-specific	Cofilin 1	-18.42	9.67
eIF4E	Pan-specific	Eukaryotic translation initiation factor 4 (mRNA cap binding protein)		
eIF4E	Pan-specific	Eukaryotic translation initiation factor 4 (mRNA cap binding protein)	0.54	30.36
Smad2/3	Pan-specific	SMA- and mothers against decapentaplegic homolog 2/3		
Smad2/3	Pan-specific	SMA- and mothers against decapentaplegic homolog 2/3	-43.12	31.13
AMPKb	Pan-specific	5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-1		
AMPKb	Pan-specific	5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-1	39.44	33.70
CPG16/CaMKinase VI	Pan-specific	Serine/threonine-protein kinase DCAMK1		
CPG16/CaMKinase VI	Pan-specific	Serine/threonine-protein kinase DCAMK1	53.79	41.12
LIMK1	Pan-specific	LIM domain kinase 1		
LIMK1	Pan-specific	LIM domain kinase 1	14.02	25.44
MEK3b	Pan-specific	MAP kinase protein-serine kinase 3 (MKK3) beta isoform		
MEK3b	Pan-specific	MAP kinase protein-serine kinase 3 (MKK3) beta isoform	-5.23	43.77
Rac1	Pan-specific	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1		
Rac1	Pan-specific	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	-39.64	26.16
Tyro3	Pan-specific	Tyrosine-protein kinase receptor TYRO3		
Tyro3	Pan-specific	Tyrosine-protein kinase receptor TYRO3	78.67	76.22
IKKg/NEMO	Pan-specific	I-kappa-B kinase gamma/NF-kappa-B essential modulator(NEMO)		
IKKg/NEMO	Pan-specific	I-kappa-B kinase gamma/NF-kappa-B essential modulator(NEMO)	67.39	44.45
MST3	Pan-specific	Mammalian STE20-like protein kinase 3		
MST3	Pan-specific	Mammalian STE20-like protein kinase 3	-687.64	62.02
RIP2/RICK	Pan-specific	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (RIPK2)		
RIP2/RICK	Pan-specific	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (RIPK2)	9.58	20.95
ROCK-I/ROKb	Pan-specific	Rho-associated protein kinase 1		
ROCK-I/ROKb	Pan-specific	Rho-associated protein kinase 1	37.03	34.62
Insulin Receptor b	Pan-specific	Insulin receptor beta chain		
Insulin Receptor b	Pan-specific	Insulin receptor beta chain	-7215.36	421.28
PI3-Kinase	Pan-specific	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha		
PI3-Kinase	Pan-specific	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha	-6.94	28.14
RONa	Pan-specific	Macrophage-stimulating protein receptor alpha chain		
RONa	Pan-specific	Macrophage-stimulating protein receptor alpha chain	-35.96	10.46

Bibliographie

Abu-Shakra, M., Urowitz, M., Gladman, D., and Gough, J. (1995). Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. Predictor variables for mortality. *J Rheumatol.* 22: 1265-1270.

Afshar-Kharghan, V. and Thiagarajan, P. (2006). Leukocyte adhesion and thrombosis. *Curr Opin Hematol.* 13: 34-39.

Alarcon, G.S., McGwin, G. Jr., Petri, M., Reveille, J.D., Ramsey-Goldman, R., Kimberly, R.P., and P.S.G. (2002). Baseline characteristics of a multiethnic lupus cohort: profile. *Lupus.* 11: 95-101.

Alarcon-Segovia, D., Deleze, M., Oria, C., Sanchez-Guerrero, J., Gomez-Pacheco, L., and Cabiedes, J. (1989). Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine (Baltimore)* 68: 353-365.

Alarcón-Segovia, D., Pérez-Vázquez, M.E., Villa, A.R., Drenkard, C., and Cabiedes, J. (1992). Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 21: 275-286.

Alba, P., Bento, L., Cuadrado, M.J., Karim, Y., Tungekar, M.F., Abbs, I., Khamashta, M.A., D'Cruz, D., and Hughes, G.R.V. (2003). Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis. *Ann Rheum Dis.* 62: 556-560.

Alpers, C.E., Hudkins, K.L., Pritzl, P., and Johnson, R.J. (1991). Mechanisms of clearance of immune complexes from peritubular capillaries in the rat. *Am J Pathol.* 139: 855-867.

Ames, P. (1994). Antiphospholipid antibodies, thrombosis and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: a unifying 'membrane stress syndrome' hypothesis. *Lupus.* 3: 371-377.

Amoura, Z., Koutouzov, S., Chabre, H., Cacoub, P., Amoura, I., Musset, L., Bach, J.F., Piette, J.C. (2000). Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 43: 76-84.

Anaya, J.-M., Gómez, L., and Castiblanco, J. (2006). Is there a common genetic basis for autoimmune diseases? *Clin Dev Immunol.* 13: 185-195.

Arbuckle, M., James, J., Kohlhase, K., Rubertone, M., Dennis, G., and Harley, J. (2001). Development of anti-dsDNA autoantibodies prior to clinical diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol.* 54: 211-219.

Arbuckle, M.R., McClain, M.T., Rubertone, M.V., Scofield, R.H., Dennis, G.J., James, J.A., and Harley, J.B. (2003). Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 349: 1526-1533.

Arnett, F.C., Reveille, J.D., Moutsopoulos, H.M., Georgescu, L., and Elkon, K.B. (1996). Ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus. Frequencies in different ethnic groups and clinical and immunogenetic associations. *Arthritis Rheum.* 39: 1833-1839.

Asherson, R., Khamashta, M., Ordi-Ros, J., Derksen, R., Machin, S., and Barquinero, J. (1989). The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine* (Baltimore). 68: 366-374.

Atassi, M.Z., and Casali, P. (2008). Molecular mechanisms of autoimmunity. *Autoimmunity.* 41: 123-132.

Backer, J.M., Kahn, C.R., White, M.F. (1990). The dissociation and degradation of internalized insulin occur in the endosomes of rat hepatoma cells. *J Biol Chem.* 265:14828-14835.

Backer, J.M., Shoelson, S.E., Haring, E., and White, M.F. (1991). Insulin receptors internalize by a rapid, saturable pathway requiring receptor autophosphorylation and an intact juxtamembrane region. *J Cell Biol.* 115: 1535-1545.

Barada, F.A., Andrews, B.S., Davisiv, J.S., and Taylor, R.P. (1981). Antibodies to sm in patients with systemic lupus erythematosus. correlation of sm antibody titers with disease activity and other laboratory parameters. *Arthritis Rheum.* 24: 1236-1244.

Barkalow, K.L., Falet, H., Italiano, J.E., Jr., van Vugt, A., Carpenter, C.L., Schreiber, A.D., and Hartwig, J.H. (2003). Role for phosphoinositide 3-kinase in Fc gamma RIIA-induced platelet shape change. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285: C797-805.

Barry, F.A., Graham, G.J., Fry, M.J., and Gibbins, J.M. (2003). Regulation of glycogen synthase kinase 3 in human platelets: a possible role in platelet function? *FEBS Lett.* 553: 173-178.

Baumgarth, N., Tung, J.W., and Herzenberg, L.A. (2005). Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol.* 26: 347-362.

Becker, C., Stoll, S., Bopp, T., Schmitt, E., and Jonuleit, H. (2006). Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Med Microbiol Immunol.* 195: 113-124.

Becker-Merok, A., Kalaaji, M., Haugbro, K., Nikolaisen, C., Nilsen, K., Rekvig, O., and Nossent, J. (2006). Alpha-actinin-binding antibodies in relation to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Arthritis Res Ther.* 8: R162.

Behnke, O. (1989). Coated pits and vesicles transfer plasma components to platelet granules. *Thromb Haemost.* 62: 718-722.

Behnke, O. (1992). Degrading and non-degrading pathways in fluid-phase (non-adsorptive) endocytosis in human blood platelets. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 24: 169-178.

Benmerah, A., and Lamaze, C. (2007). Clathrin-coated pits: vive la difference? *Traffic.* 8: 970-982.

- Berden, J.H., Licht, R., van Bruggen, M.C., and Tax, W.J. (1999). Role of nucleosomes for induction and glomerular binding of autoantibodies in lupus nephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 8: 299-306.
- Berger, J.S., Roncaglioni, M.C., Avanzini, F., Pangrazzi, I., Tognoni, G., Brown, D.L. (2006). Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events in women and men: a sex-specific meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA.* 295:306-313.
- Bernatowicz, M.S., Klimas, C.E., Hartl, K.S., Peluso, M., Allegretto, N.J., and Seiler, S.M. (1996). Development of potent thrombin receptor antagonist peptides. *J Med Chem.* 39: 4879-4887.
- Beyne-Rauzy, O., Thébault, S., Adoue, D., and Fortenfant, F. (2005). Anti-PCNA antibodies: prevalence and predictive value. *Joint Bone Spine.* 72: 432-435.
- Bidot, C., Jy, W., Horstman, L., Ahn, E., Bidot, L., Fontana, V., and Ahn, Y. (2005). Antiphospholipid antibodies and platelet activation as risk factors for thrombosis in thrombocythaemia. *Hematology.* 10: 451-456.
- Blotzer, J. (1983). Systemic lupus erythematosus I: historical aspects. *Md State Med J.* 32: 439-441.
- Bockaert, J., Claeysen, S., Bécamel, C., Pinloche, S., and Dumuis, A. (2002). G protein-coupled receptors: dominant players in cell-cell communication. *Int Rev Cytol.* 212: 63-132.
- Boes, M., Schmidt, T., Linkemann, K., Beaudette, B.C., Marshak-Rothstein, A., and Chen, J. (2000). Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 1184-1189.
- Boillard, E., Bourgoin, S.G., Bernatchez, C., and Surette, M.E. (2003). Identification of an autoantigen on the surface of apoptotic human T cells as a new protein interacting with inflammatory group IIA phospholipase A2. *Blood.* 102: 2901-2909.
- Bombeli, T., Karsan, A., Tait, J.F., and Harlan, J.M. (1997). Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood.* 89: 2429-2442.
- Bonfa, E., Golombek, S.J., Kaufman, L.D., Skelly, S., Weissbach, H., Brot, N., and Elkon, K.B. (1987). Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N Engl J Med.* 317: 265-271.
- Bootsma, H., Spronk, P., Derksen, R., de Boer, G., Wolters-Dicke, H., Hermans, J., Limburg, P., Gmelig-Meyling, F., Kater, L., and Kallenberg, C. (1995). Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 345: 1595-1599; Erratum in: *Lancet* (1995). 346 :516.
- Bordron, A., Dueymes, M., Levy, Y., Jamin, C., Ziporen, L., Piette, J.-C., Shoenfeld, Y., and Youinou, P. (1998). Anti-endothelial cell antibody binding makes negatively charged phospholipids accessible to antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum.* 41: 1738-1747.
- Borg, E., Horst, G., Hummel, E., Limburg, P., and Kallenberg, C. (1990). Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study. *Arthritis Rheum.* 33: 634-643.

Brandt, J., Triplett, D., Alving, B., and Scharrer, I. (1995). Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost.* 74: 1185-1190.

Brass, L.F., Vassallo, R.R., Jr., Belmonte, E., Ahuja, M., Cichowski, K., and Hoxie, J.A. (1992). Structure and function of the human platelet thrombin receptor. Studies using monoclonal antibodies directed against a defined domain within the receptor N terminus. *J Biol Chem.* 267: 13795-13708.

Broers, J.L.V., Ramaekers, F.C.S., Bonne, G., Yaou, R.B., and Hutchison, C.J. (2006). Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev.* 86: 967-1008.

Brown, D.A., and Rose, J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68: 533-544.

Burlingame, R.W. (2004). Recent advances in understanding the clinical utility and underlying cause of antinucleosome (antichromatin) autoantibodies. *Clin and Appl Immunol Rev.* 4: 351-356.

Burlingame, R.W., Boey, M.L., Starkebaum, G., and Rubin, R.L. (1994). The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 94: 184-192.

Buyon, J.P., and Clancy, R.M. (2003). Maternal autoantibodies and congenital heart block: mediators, markers, and therapeutic approach. *Semin Arthritis and Rheum* 33: 140-154.

Buyon, J.P., Rupel, A., and Clancy, R.M. (2004). Neonatal lupus syndromes. *Lupus.* 13: 705-712.

Cabral, A.R., Amigo, M.C., Cabiedes, J., and Alarcon-Segovia, D. (1996). The antiphospholipid/cofactor syndromes: A primary variant with antibodies to beta2-glycoprotein-I but no antibodies detectable in standard antiphospholipid assays. *Am J Med.* 101: 472-481.

Cabrera-Vera, T.M., Vanhauwe, J., Thomas, T.O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M.R., and Hamm, H.E. (2003). Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation. *Endocr Rev.* 24: 765-781.

Campbell, A.L., Pierangeli, S.S., Wellhausen, S., and Harris, E.N. (1995). Comparison of the effects of anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome and with syphilis on platelet activation and aggregation. *Thromb Haemost.* 73: 529-534.

Canoso, J., and Cohen, A. (1979). A review of the use, evaluations, and criticisms of the preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 22: 917-921.

Cantley, L.C. (2002). The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science.* 296: 1655.

Capell, B.C. et Collins, F.S. (2006). Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat Rev Genet.* 7:940-952.

Carreras, L.O., Forastiero, R.R., and Martinuzzo, M.E. (2000). Which are the best biological markers of the antiphospholipid syndrome? *J Autoimmun.* 1: 163-172.

Casciola-Rosen, L.A., Anhalt, G., and Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med.* 179: 1317-1330.

Casiano, C., Martin, S.J., Green, D., tL., Tan, E.M. (1996) Selective Cleavage of Nuclear Autoantigens During CD95 (Fas/APO-1)-mediated T Cell Apoptosis. *J Exp Med.* 184: 765-770.

Ceresa, B.P., Kao, A.W., Santeler, S.R., and Pessin, J.E. (1998). Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol Cell Biol.* 18: 3862-3870.

Cervera, R. (2006). Systemic lupus erythematosus in Europe at the change of the millennium: lessons from the "Euro-Lupus Project". *Autoimmun Rev.* 5: 180-186.

Cervera, R., Khamashta, M., Font, J., Sebastiani, G., Gil, A., and Lavilla, P. (1993). Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore).* 72: 113-124.

Chabre, H., Amoura, Z., Piette, J.C., Godeau, P., Bach, J.F., and Koutouzov, S. (1995). Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 38: 1485-1491.

Chacko, G.W., Brandt, J.T., Coggeshall, K.M., and Anderson, C.L. (1996). Phosphoinositide 3-Kinase and p72syk noncovalently associate with the low affinity Fc receptor on human platelets through an immunoreceptor tyrosine-based activation motif. *J Biol Chem.* 271: 10775-10781.

Chan, T.-M., Leung, J.K.-H., Ho, S.K.-N., and Yung, S. (2002). Mesangial Cell-Binding Anti-DNA antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol.* 13: 1219-1229.

Chen, J., De, S., Damron, D.S., Chen, W.S., Hay, N., and Byzova, T.V. (2004). Impaired platelet responses to thrombin and collagen in AKT-1-deficient mice. *Blood.* 104: 1703-1710.

Chen, X., Smith, J.D., Shi, H., Yang, D.D., Flavell, R.A., and Wolin, S.L. (2003). The Ro autoantigen binds misfolded U2 small nuclear RNAs and assists mammalian cell survival after UV irradiation. *Curr Biol.* 13: 2206-2211.

Chopra, N., Koren, S., Greer, W., Fortin, P., Rauch, J., Fortin, I., Sénécal, J., Docherty, P., and

Hanly, J. (2002). Factor V Leiden, prothrombin gene mutation, and thrombosis risk in patients with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol.* 29: 1683-1688.

Chou, C., and WH, R. (1992). Recognition of multiple epitopes in the coiled-coil domain of lamin B by human autoantibodies. *Mol Immunol.* 29: 1055-1064.

- Clapham, D.E., and Neer, E.J. (1997). Activation of atrial muscarinic-gated K⁺ channels by beta gamma-subunits of G proteins. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 37: 167-172.
- Cocca, B., Cline, A., and Radic, M. (2002). Blebs and apoptotic bodies are B cell autoantigens. *J Immunol.* 169: 159-166.
- Cooley, H.M., Melny, B.J., Gleeson, R., Greco, T., and Kay, T.W. (1999). Clinical and serological associations of anti-Ku antibody. *J Rheumatol.* 26: 563-567.
- Cooper, G.S., and Stroehla, B.C. (2003). The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmunity Rev.* 2, 119-125.
- Coughlin, S.R. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost.* 3: 1800-1814.
- Crowson, A.N., and Magro, C. (2001). The cutaneous pathology of lupus erythematosus: a review. *J Cutan Pathol.* 28: 1-23.
- Danchenko, N., Satia, J.A., and Anthony, M.S. (2006). Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus.* 15: 308-318.
- Day, J., Malik, I., Weerasinghe, A., Poullis, M., Nadra, I., Haskard, D., Taylor, K., and Landis, R. (2004a). Distinct yet complementary mechanisms of heparin and glycoprotein IIb/IIIa inhibitors on platelet activation and aggregation: implications for restenosis during percutaneous coronary intervention. *Heart.* 90: 794-799.
- Day, S., Reeve, J., Myers, D., and Fay, W. (2004b). Murine thrombosis models. *Thromb Haemost.* 92: 486-494.
- D'Cruz, D.P., Khamashta, M.A., and Hughes, G.R.V. (2007). Systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 369: 587-596.
- Deapen, D., Escalante, A., Weinrib, L., Horwitz, D., Bachman, B., Roy-Burman, P., Walker, A., and Mack, T.M. (1992). A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 35: 311-318.
- Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D.K., Solimando, L., and Goldman, R.D. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev.* 22: 832-853.
- Del Papa, N., Guidali, L., Sala, A., Buccellati, C., Khamashta, M., Ichikawa, K., Koike, T., Balestrieri, G., Tincani, A., Hughes, G., and Meroni, P. (1997). Endothelial cells as target for antiphospholipid antibodies. Human polyclonal and monoclonal anti-beta 2-glycoprotein I antibodies react in vitro with endothelial cells through adherent beta 2-glycoprotein I and induce endothelial activation. *Arthritis Rheum.* 40: 551-561.

- Dell'Angelica, E.C. (2001). Clathrin-binding proteins: got a motif? Join the network! *Trends Cell Biol.* 11:315-318.
- Deng, S.X., Hanson, E., and Sanz, I. (2000). In vivo cell penetration and intracellular transport of anti-Sm and anti-La autoantibodies. *Int Immunol.* 12, 415-423.
- DeVoss, J.J., and Anderson, M.S. (2007). Lessons on immune tolerance from the monogenic disease APS1. *Curr Opin Genet Dev.* 17: 193-200.
- Dieker, J.W., van der Vlag, J., and Berden, J.H. (2004). Deranged removal of apoptotic cells: its role in the genesis of lupus. *Nephrol Dial Transplant.* 19: 282-285.
- Dieudé, M., Sénécal, J.-L., and Raymond, Y. (2004). Induction of endothelial cell apoptosis by heat-shock protein 60-reactive antibodies from anti-endothelial cell autoantibody-positive systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* 50: 3221-3231.
- Dieudé, M., Sénécal, J.-L., Rauch, J., Hanly, J.G., Fortin, P., Brassard, N., and Raymond, Y. (2002a). Association of autoantibodies to nuclear lamin B1 with thromboprotection in systemic lupus erythematosus: lack of evidence for a direct role of lamin B1 in apoptotic blebs. *Arthritis Rheum.* 46: 2695-2707.
- Dillner, J., Sternas, L., Kallin, B., Alexander, H., Ehlin-Henriksson, B., Jornvall, H., Klein, G., and Lerner, R. (1984). Antibodies against a synthetic peptide identify the Epstein-Barr Virus-determined nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81, 4652-4656.
- Djellas, Y., Manganello, J.M., Antonakis, K., and Le Breton, G.C. (1999). Identification of Galpha 13 as one of the G-proteins that couple to human platelet thromboxane A₂ receptors. *J Biol Chem.* 274: 14325-1429.
- Dorahy, D.J., Lincz, L.F., Meldrum, C.J., and Burns, G.F. (1996). Biochemical isolation of a membrane microdomain from resting platelets highly enriched in the plasma membrane glycoprotein CD36. *Biochem J.* 319 (Pt 1): 67-72.
- Doria, A., and Briani, C. (2008). Lupus: improving long-term prognosis. *Lupus.* 17: 166-170.
- Dorner, T., Feist, E., Pruss, A., Chaoui, R., Goldner, B., and Hiepe, F. (2000). Significance of autoantibodies in neonatal lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Immunol.* 123, 58-66.
- Dubois, C., Panicot-Dubois, L., Furie, B., and Furie, B.C. (2004). Importance of GPVI in platelet activation and thrombus formation in vivo. *Blood.* 104: abstract 842.
- Escalante, A., L. Brey, R., D.Mitchell, J.B., and Dreiner, U. (1995). Accuracy of anticardiolipin antibodies in identifying a history of thrombosis among patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 98, 559-565.
- Espinola, R., Pierangeli, S., Gharavi, A., and Harris, E. (2002). Hydroxychloroquine reverses platelet activation induced by human IgG antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost.* 87: 518-522.

- Falcon, C., Pfliegler, G., Deckmyn, H., and Vermylen, J. (1988). The platelet insulin receptor: detection, partial characterization, and search for a function. *Biochem Biophys Res Commun.* 157: 1190-1196.
- Fay, W.P., Parker, A.C., Ansari, M.N., Zheng, X., and Ginsburg, D. (1999). Vitronectin inhibits the thrombotic response to arterial injury in mice. *Blood.* 93: 1825-1830.
- Ferreira, I.A., Eybrechts, K.L., Mocking, A.I.M., Kroner, C., and Akkerman, J.-W.N. (2004). IRS-1 mediates inhibition of Ca^{2+} mobilization by insulin via the inhibitory G-protein G_i . *J Biol Chem.* 279: 3254-3264.
- Ferreira, I.A., Mocking, A.I.M., Feijge, M.A.H., Gorter, G., van Haefen, T.W., Heemskerk, J.W.M., and Akkerman, J.-W.N. (2006). Platelet inhibition by insulin is absent in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26: 417-422.
- Finazzi, G., Brancaccio, V., Moia, M., Ciavarella, N., Mazzucconi, M.G., Schinco, P., Ruggeri, M., Pogliani, E.M., Gamba, G., Rossi, E., Baudo, F., Manotti, C., D'Angelo, A., Palareti, G., Stefano, V.D., Berrettini, M., and Barbui, T. (1996). Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: A four-year prospective study from the italian registry. *Am J Med.* 100: 530-536.
- Fishelson, Z., Attali, G., and Mevorach, D. (2001). Complement and apoptosis. *Mol Immunol.* 38: 207-219.
- Fitzgerald, J.R., Foster, T.J., and Cox, D. (2006). The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Micro.* 4: 445-457.
- Flaumenhaft, R., Dilks, J.R., Rozenvayn, N., Monahan-Earley, R.A., Feng, D., and Dvorak, A.M. (2005). The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion. *Blood.* 105: 3879-3887.
- Fontenot, J.D.Y., Rudensky, M.A.G., and Y. Rudensky, A. (2003). Foxp3 programs the development and function of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 4: 330-336.
- Forastiero, R., Martinuzzo, M., Carreras, L., and Maclouf, J. (1998). Anti-beta2 glycoprotein I antibodies and platelet activation in patients with antiphospholipid antibodies: association with increased excretion of platelet-derived thromboxane urinary metabolites. *Thromb Haemost.* 79: 42-45.
- Foti, M., Moukil, M., Dudognon, P., and Carpentier, J. (2004). Insulin and IGF-1 receptor trafficking and signalling. *Novartis Found Symp.* 262: 125-141; discussion 141-127, 265-128.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.-G., and Schioth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 63, 1256-1272.
- Fritzler, M.J., Mccarty, G.A., Ryan, P., and Kinsella, D. (1983). Clinical features of patients with antibodies directed against proliferating cell nuclear antigen. *Arthritis Rheum.* 26: 140-145.

- Fujinami, R.S., von Herrath, M.G., Christen, U., and Whitton, J.L. (2006). Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev.* 19: 80-94.
- Fukuhara, S., Chikumi, H., and Gutkind, J.S. (2001). RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene.* 20: 1661-1668.
- Furie, B., and Furie, B.C. (2005). Thrombus formation in vivo. *J. Clin. Invest.* 115: 3355-3362.
- Gachet, C. (2005). The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacol Ther.* 108: 180-192.
- Gachet, C. (2006). Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46: 277-300.
- Galli, M., Barbui, T., Comfurius, P., Maassen, C., Hemker, H.C., Zwaal, R.F.A., Bevers, E.M., de Baets, M.H., and van Breda-Vriesman, P.J.C. (1990). Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet.* 335: 1544-1549.
- Galli, M., Luciani, D., Bertolini, G., and Barbui, T. (2003). Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood.* 101: 1827-1832.
- Ghirardello, A., Doria, A., Zampieri, S., Gerli, R., Rapizzi, E., and Gambari, P.F. (2000). Anti-ribosomal P protein antibodies detected by immunoblotting in patients with connective tissue diseases: their specificity for SLE and association with IgG anticardiolipin antibodies. *Ann Rheum Dis.* 59: 975-981.
- Gibbins, J.M. (2004). Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci.* 117: 3415-3425.
- Gladman, D.D., Urowitz, M.B. Prognosis, mortality and morbidity in systemic lupus erythematosus. Dubois' lupus erythematosus. Wallace, D.J., Mahn, B.M., eds. (2002) 6th edn. Philadelphia, PA: Lippincott, *Williams and Wilkins.* 1255-1273.
- Goel, M.S., and Diamond, S.L. (2001). Neutrophil enhancement of fibrin deposition under flow through platelet-dependent and -independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21: 2093-2098.
- Gousset, K., Wolkers, W.F., Tsvetkova, N.M., Oliver, A.E., Field, C.L., Walker, N.J., Crowe, J.H., and Tablin, F. (2002). Evidence for a physiological role for membrane rafts in human platelets. *J Cell Physiol.* 190, 117-128.
- Graham, R., Langefeld, C., Gaffney, P., Ortmann, W., Selby, S., Baechler, E., Shark, K., Ockenden, T., Rohlf, K., Moser, K., Brown, W., Gabriel, S., Messner, R., King, R., Horak, P., Elder, J., Stuart, P., Rich, S., and Behrens, T. (2001). Genetic linkage and transmission disequilibrium of marker haplotypes at chromosome 1q41 in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res.* 3: 299-305.
- Gratacap, M.-P., Payrastre, B., Viala, C., Mauco, G., Plantavid, M., and Chap, H. (1998). Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent stimulation of phospholipase C-gamma 2 is

an early key event in Fcγ₃RIIA-mediated activation of human platelets. *J Biol Chem.* 273: 24314-24321.

Grennan, D.M., Bunn, C., Hughes, G.R., Buchanan, W.W., and Dick, W.C. (1977). Frequency and clinical significance of antibodies to ribonucleoprotein in SLE and other connective tissue disease subgroups. *Ann Rheum Dis.* 36, 442-447.

Gripenberg, M., Teppo, A., and Friman, C. (1991). Antibodies to Sm and SS-A demonstrated by enzyme immunoassay. Correlation to clinical manifestations and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 11: 209-213.

Gross, A.J., Hochberg, D., Rand, W.M., and Thorley-Lawson, D.A. (2005). EBV and systemic lupus erythematosus: a new perspective. *J Immunol.* 174: 6599-6607.

Grosser, T., Fries, S., and FitzGerald, G.A. (2006). Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest.* 116: 4-15.

Guilly, M., Danon, F., Brouet, J., Bornens, M., and Courvalin, J. (1987). Autoantibodies to nuclear lamin B in a patient with thrombopenia. *Eur J Cell Biol.* 43: 266-272.

Gustavsson, J., Parpal, S., Karlsson, M., Ramsing, C., Thorn, H., Borg, M., Lindroth, M., Peterson, K.H., Magnusson, K.-E., and Strålfors, P. (1999). Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB J.* 13: 1961-1971.

Hajek, A., Joist, J., Baker, R., Jarett, L., and Daughaday, W. (1979). Demonstration and partial characterization of insulin receptors in human platelets. *J Clin Invest.* 63: 1060-1065.

Halverson, R., Torres, R., and Pelandra, R. (2004). Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat. Immunol.* 5: 645-650.

Hamilton, J.R., Cornelissen, I., and Coughlin, S.R. (2004). Impaired hemostasis and protection against thrombosis in protease-activated receptor 4-deficient mice is due to lack of thrombin signaling in platelets. *J Throm Haemost.* 2, 1429-1435.

Hanly, J.G. (2003). Antiphospholipid syndrome: an overview. *CMAJ.* 168: 1675-1682.

Hanly, J.G., Hong, C., and Issekutz, A. (1996). Beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibody binding to resting and activated cultured human endothelial cells. *J Rheumatol.* 23: 1543-1549.

Hansen, S.H., Sandvig, K., and van Deurs, B. (1993). Molecules internalized by clathrin-independent endocytosis are delivered to endosomes containing transferrin receptors. *J Cell Biol.* 123: 89-97.

Harris, E., Gharavi, A., and Boey, M. (1983). Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 2: 1211-1214.

- Hart, M.J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W.D., Gilman, A.G., Sternweis, P.C., and Bollag, G. (1998). Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by G alpha 13. *Science*. 280: 2112-2114.
- Hasan, A.A., Zisman, T., and Schmaier, A.H. (1998). Identification of cytokeratin 1 as a binding protein and presentation receptor for kininogens on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 3615–3620.
- Haserick, J., and Long, R. (1952). Systemic lupus erythematosus preceded by false-positive serologic tests for syphilis: presentation of five cases. *Ann Intern Med*. 37: 559-565.
- Hechler, B., Leon, C., Vial, C., Vigne, P., Frelin, C., Cazenave, J.-P., and Gachet, C. (1998). The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood*. 92: 152-159.
- Heemskerk, J.W., Bevers, E.M., and Lindhout, T. (2002). Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*. 88: 186-193.
- Hembrough, T., Kralovich, K., Li, L., and Gonias, S. (1996). Cytokeratin 8 released by breast carcinoma cells in vitro binds plasminogen and tissue-type plasminogen activator and promotes plasminogen activation. *Biochem J*. 317: 763–769.
- Hénault, J., Robitaille, G., Sénécal, J.-L., and Raymond, Y. (2006). DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum*. 54: 963-973.
- Hennekens, C.H., Sechenova, O., Hollar, D., Serebruany, V.L. (2006). Dose of aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease: current and future directions. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 11:170-176.
- Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S.V., and Aebi, U. (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8, 562-573.
- Hirsch, E., Bosco, O., Tropel, P., Laffargue, M., Calvez, R., Altruda, F., Wymann, M., and Montrucchio, G. (2001). Resistance to thromboembolism in PI3K gamma-deficient mice. *FASEB J*. 15: 2019-2021.
- Ho, A., Magder, L.S., Barr, S.G., Petri, M. (2001). Decreases in anti-double-stranded DNA levels are associated with concurrent flares in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 44: 2342-2349.
- Hochberg, M.C. (1997). Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 40: 1725.
- Hoger, T.H., Zatloukal, K., Waizenegger, I., and Krohne, G. (1990). Characterization of a second highly conserved B-type lamin present in cells previously thought to contain only a single B-type lamin. *Chromosoma*. 100: 67-69.
- Holers, V.M. (2004). Anti-C1q autoantibodies amplify pathogenic complement activation in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 114: 616-619.

Holmen, C., Elsheikh, E., Christensson, M., Liu, J., Johansson, A.-S., Qureshi, A.R., Jalkanen, S., and Sumitran-Holgersson, S. (2007). Anti endothelial cell autoantibodies selectively activate SAPK/JNK signalling in Wegener's granulomatosis. *J Am Soc Nephrol.* 18: 2497-2508.

Horák, P., Ščudla, V., Heřmanová, Z., Pospíšil, Z., Faltýnek, L., Budíková, M., and Kusá, L. (2001). Clinical utility of selected disease activity markers in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheum.* 20: 337-344.

Howard, O.M., Dong, H.F., Yang, D., Raben, N., Nagaraju, K., Rosen, A., Casciola-Rosen, L., Härtlein, M., Kron, M., Yang, D., Yiadom, K., Dwivedi, S., Plotz, P.H., Oppenheim, J.J. (2002). Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J Exp Med.* 196: 781-791.

Howard, O. (2006). Autoantigen signalling through chemokine receptors. *Curr Opin Rheumatol.* 18: 642-646.

Howard, O.M.Z., Dong, H.F., Su, S.B., Caspi, R.R., Chen, X., Plotz, P., and Oppenheim, J.J. (2005). Autoantigens signal through chemokine receptors: uveitis antigens induce CXCR3- and CXCR5-expressing lymphocytes and immature dendritic cells to migrate. *Blood.* 105: 4207-4212.

Hsu, T., Tsay, G., Chen, T., Liu, Y., and Tzang, B. (2006). Anti-PCNA autoantibodies preferentially recognize C-terminal of PCNA in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin Exp Immunol.* 144: 110-116.

Humphrey, J.H., and Jaques, R. (1955). The release of histamine and 5-hydroxytryptamine (serotonin) from platelets by antigen-antibody reactions (in vitro). *J Physiol.* 128: 9-27.

Hung, D.T., Wong, Y.H., Vu, T.K., and Coughlin, S.R. (1992). The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 267: 20831-20834.

Hunt, J.E., McNeil, H.P., Morgan, G.J., Cramer, R.M., and Krilis, S.A. (1992). A phospholipid-beta2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus.* 1: 75-79.

Ishiwata, S., Tukada, T., Nakanishi, S., Nishiyama, S., and Seki, A. (1997). Postangioplasty restenosis: platelet activation and the coagulation-fibrinolysis system as possible factors in the pathogenesis of restenosis. *Am Heart J.* 133: 387-392.

Jang, Y.J., and Stollar, B.D. (2003). Anti-DNA antibodies: aspects of structure and pathogenicity. *Cell Mol Life Sci.* 60: 309-320.

Jankowski, M., Vreys, I., Wittevrongel, C., Boon, D., Vermeylen, J., Hoylaerts, M.F., and Arnout, J. (2003). Thrombogenicity of beta 2-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster. *Blood.* 101: 157-162.

- Jantzen, H., Gousset, L., Bhaskar, V., Vincent, D., Tai, A., Reynolds, E., and Conley, P. (1999). Evidence for two distinct G-protein-coupled ADP receptors mediating platelet activation. *Thromb Haemost.* 81: 111-117.
- Jantzen, H.-M., Milstone, D., Gousset, L., Conley, P., and Mortensen, R. (2001). Impaired activation of murine platelets lacking $G\alpha_{i2}$. *J. Clin. Invest.* 108: 477-483.
- Janwityanuchit, S., Verasertniyom, O., Vanichapuntu, M., and Vatanasuk, M. (1993). Anti-Sm: its predictive value in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 12: 350-353.
- Jin, J., and Kunapuli, S.P. (1998). Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Nat Acad Sci USA.* 95: 8070-8074.
- Johnson, A.E., Gordon, C., Palmer, R.G., and Bacon, P.A. (1995). The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum.* 38: 551-558.
- Joseph, J.E., Harrison, P., Mackie, I.J., Isenberg, D.A., and Machin, S.J. (2001). Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol.* 115: 451-459.
- Jump, R., Robinson, M., Armstrong, A., Barnes, E., Kilbourn, K., and Richards, H. (2005). Fatigue in systemic lupus erythematosus: contributions of disease activity, pain, depression, and perceived social support. *J Rheumatol.* 32: 699-705.
- Kahn, M.L., Zheng, Y.-W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D., Moff, S., Farese, R.V., Tam, C., and Coughlin, S.R. (1998). A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature.* 394: 690-694.
- Kaplanski, G., Cacoub, P., Farnarier, C., Marin, V., Grégoire, R., Gatel, A., Durand, J.-M., Harlé, J.-R., Bongrand, P., and Piette, J.-C. (2000). Increased soluble vascular cell adhesion molecule 1 concentrations in patients with primary or systemic lupus erythematosus-related antiphospholipid syndrome: correlations with the severity of thrombosis. *Arthritis Rheum.* 43: 55-64.
- Khamashta, M.A., Harris, E.N., Gharavi, A.E., Derue, G., Gil, A., Vazquez, J.J., and Hughes, G.R. (1988). Immune mediated mechanism for thrombosis: antiphospholipid antibody binding to platelet membranes. *Ann Rheum Dis.* 47: 849-854.
- Klages, B., Brandt, U., Simon, M.I., Schultz, G., and Offermanns, S. (1999). Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol.* 144: 745-754.
- Klinger, M. (1994). Post-embedding immunocytochemistry for adhesive proteins and clathrin in LR White- and LR Gold-embedded human platelets. *Ann Anat.* 176: 67-73.
- Klinger, M., and Klüter, H. (1995). Immunocytochemical colocalization of adhesive proteins with clathrin in human blood platelets: further evidence for coated vesicle-mediated transport of von Willebrand factor, fibrinogen and fibronectin. *Cell Tissue Res.* 279: 453-457.

Klinman, D., Dellacqua, D., Conover, J., and Huppi, K. (1993). VH family utilization by IgG anti-DNA-secreting lymphocytes derived from autoimmune MRL-lpr/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 36: 561-568.

Knezevic, I., Borg, C., and Le Breton, G.C. (1993). Identification of Gq as one of the G-proteins which copurify with human platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors. *J Biol Chem.* 268: 26011-26017.

Knip, M., Veijola, R., Virtanen, S.M., Hyoty, H., Vaarala, O., and Akerblom, H.K. (2005). Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes.* 54: S125-S136.

Kojima, H., Shinagawa, A., Shimizu, S., Kanada, H., Hibi, M., Hirano, T., and Nagasawa, T. (2001). Role of phosphatidylinositol-3 kinase and its association with Gab1 in thrombopoietin-mediated up-regulation of platelet function. *Exp Hematol.* 29: 616-622.

Kong, D.F., Califf, R.M., Miller, D.P., Moliterno, D.J., White, H.D., Harrington, R.A., Tcheng, J.E., Lincoff, A.M., Hasselblad, V., Topol, E.J. (1998) Clinical outcomes of therapeutic agents that block the platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin in ischemic heart disease. *Circulation.* 98:2829-2835

Kurz, K., Main, B., and Sandusky, G. (1990). Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res.* 60: 269-280.

Lapteva, L., Nowak, M., Yarboro, C.H., Takada, K., Roebuck-Spencer, T., Weickert, T., Bleiberg, J., Rosenstein, D., Pao, M., Patronas, N., Steele, S., Manzano, M., van der Veen, J.W., Lipsky, P.E., Marenco, S., Wesley, R., Volpe, B., Diamond, B., Illei, G.G. (2006). Anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies, cognitive dysfunction, and depression in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 54: 2505-2514.

Lefkowitz, J., Plow, E., and Topol, E. (1995). Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med.* 332: 1553-1559.

Lefkowitz, J., and Gilkeson, G. (1996). Review: Nephritogenic autoantibodies in lupus: current concepts and continuing controversies. *Arthritis Rheum.* 39: 894-903.

Levine, J.S., Branch, D.W., and Rauch, J. (2002). The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med.* 346: 752-763.

Levine, J.S., Koh, J.S., Subang, R., and Rauch, J. (1999). Apoptotic cells as immunogen and antigen in the antiphospholipid syndrome. *Exp Mol Pathol.* 66: 82-98.

Levine, S.R., Salowich-Palm, L., Sawaya, K.L., Perry, M., Spencer, H.J., Winkler, H.J., Alam, Z., and Carey, J.L. (1997). IgG Anticardiolipin Antibody Titer >40 GPL and the risk of subsequent thrombo-occlusive events and death: a prospective cohort study. *Stroke.* 28: 1660-1665.

Li, Z., Xi, X., and Du, X. (2001). A mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway in the activation of platelet integrin alphaIIb beta 3. *J Biol Chem.* 276: 42226-42232.

- Li, Z., Zhang, G., Feil, R., Han, J., and Du, X. (2006). Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMP-dependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin α IIb β 3. *Blood*. 107: 965-972.
- Lin, F., and Worman, H.J. (1993). Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem*. 268: 16321-16326.
- Lockshin, M.D., Sammaritano, L.R., and Schwartzman, S. (2000). Validation of the Sapporo criteria for antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum*. 43: 440-443.
- López, J.A., Del Conde, I., and Shrimpton, C. (2005). Receptors, rafts, and microvesicles in thrombosis and inflammation. *J Thromb Haemost*. 3: 1737-1744.
- López-Aparicio, P., Rascón, A., Manganiello, V., Andersson, K., Belfrage, P., and Degerman, E. (1992). Insulin induced phosphorylation and activation of the cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 186: 517-523.
- Lord, S.T. (2007). Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis. *Curr Opin Hematol*. 14: 236-241.
- Lotze, M.T., and Tracey, K.J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 5: 331-342.
- Love, P., and Santoro, S. (1990). Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med*. 112: 682-698.
- Lutters, B.C.H., Derksen, R.H.W.M., Tekelenburg, W.L., Lenting, P.J., Arnout, J., and de Groot, P.G. (2003). Dimers of beta2-glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 2'. *J Biol Chem*. 278: 33831-33838.
- Lyons, R., Narain, S., Nichols, C., Satoh, M., and Reeves, W.H. (2005). Effective use of autoantibody tests in the diagnosis of systemic autoimmune disease. *Ann NY Acad Sci*. 1050: 217-228.
- Ma, K., Simantov, R., Zhang, J.-C., Silverstein, R., Hajjar, K.A., and McCrae, K.R. (2000). High affinity binding of beta 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II. *J Biol Chem*. 275: 15541-15548.
- Macchi, L., Rispoli, P., Cloufent-Sanchez, G., Pellegrin, J., Nurden, P., Leng, B., and Nurden, A. (1997). Anti-platelet antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and the primary antiphospholipid antibody syndrome: their relationship with the observed thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 98: 336-341.
- Mackay, I.R., Leskovsek, N.V., Rose, N.R. (2008). Cell damage and autoimmunity: A critical appraisal. *Autoimmu*. 30: 5-11.
- Mackman, N. (2008). Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*. 451: 914-918.

- Makita, N., Sato, J., Manaka, K., Shoji, Y., Oishi, A., Hashimoto, M., Fujita, T., and Iiri, T. (2007). An acquired hypocalciuric hypercalcemia autoantibody induces allosteric transition among active human Ca-sensing receptor conformations. *Proc Nat Acad Sci USA*. 104: 5443-5448.
- Mallavarapu, R.K., and Grimsley, E.W. (2007). The history of lupus erythematosus. *South Med J*. 100: 896-898.
- Manohar, M., Maheswaran, S.K., Frommes, S.P., and Lindorfer, R.K. (1967). Platelet damaging factor, a fifth activity of staphylococcal alpha-toxin. *J Bacteriol*. 94: 224-231.
- Mariette, X., Brouet, J.-C., Danon, F., Tsapis, A., and Lassoued, K. (1993). Nucleotide sequence analysis of the V_L and V_H domains of five human IgM directed to lamin B1. *Arthritis Rheum*. 36: 1315-1324.
- Marshak-Rothstein, A., and Rifkin, I.R. (2007). Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Ann Rev Immunol*. 25: 419-441.
- Martelli, A.M., Zweyer, M., Ochs, R.L., Tazzari, P.L., Tabellini, G., Narducci, P., and Bortul, R. (2001). Nuclear apoptotic changes: an overview. *J Cell Biochem*. 82: 634-646.
- Martínez-Cordero, E., Martínez-Miranda, E., Negrete-García, M., Padilla, A., and Aguilar, L.D. (1992). Anti-dsDNA and Sm autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 11: 341-345.
- Martinuzzo, M.E., Maclouf, J., Carreras, L.O., and Levy-Toledano, S. (1993). Antiphospholipid antibodies enhance thrombin-induced platelet activation and thromboxane formation. *Thromb Haemost*. 70: 667-671.
- Mason LJ, Isenberg D. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. In: Davidson AM, Cameron JS, Grunfeld JP, et al., eds. Oxford textbook of clinical nephrology. Oxford, England: Oxford University Press. 2005:809-829.
- Mason, L.J., Ravirajan, C.T., Rahman, A., Putterman, C., Isenberg, D.A. (2004) Is alpha-actinin a target for pathogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis? *Arthritis Rheum*. 50:866-870.
- Massberg, S., Mueller, I., Besta, F., Thomas, P., and Gawaz, M. (2003). Effects of 2 different antiplatelet regimens with abciximab or tirofiban on platelet function in patients undergoing coronary stenting. *Am Heart J*. 146: E19.
- Matsuno H, Kozawa O, Nagashima S, Kanamaru M, Uematsu T. (1999). Comparative antiplatelet effects of aspirin, vapirost and GR144053, a GPIIb/IIIa antagonist, with a special reference to the role of platelet microaggregates. *Br J Pharmacol*. **127: 1129-34.**
- Mattout, A., Dechat, T., Adam, S.A., Goldman, R.D., Gruenbaum, Y. (2006). Nuclear lamins, diseases and aging. *Curr Opin Cell Biol*. 18: 335-41.
- Mattout, A., Dechat, T., Adam, S.A., Goldman, R.D., Gruenbaum, Y. (2006). Nuclear lamins, diseases and aging. *Curr Opin Cell Biol*. 18:335-41.

- Matzdorff, A., Kuhnel, G., Kemkes-Matthes, B., and Voss, R. (2001). Comparison of GP IIB/IIIa inhibitors and their activity as measured by aggregometry, flow cytometry, single platelet counting, and the rapid platelet function analyzer. *J Thromb Thrombolysis*. 12: 129-139.
- McClain, D.A., and Olefsky, J.M. (1988). Evidence for two independent pathways of insulin-receptor internalization in hepatocytes and hepatoma cells. *Diabetes*. 37: 806-815.
- McGregor, L., Martin, J., and McGregor, J.L. (2006). Platelet-leukocyte aggregates and derived microparticles in inflammation, vascular remodelling and thrombosis. *Front Biosci*. 11: 830-837.
- McNeil, H.P., Simpson, R.J., Chesterman, C.N., and Krilis, S.A. (1990). Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta2-Glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA*. 87, 4120-4124.
- McRae, B., Vanderlugt, C., Dal Canto, M., and Miller, S. (1995). Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Med*. 182: 75-85.
- Meadows, T.A., and Bhatt, D.L. (2007). Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circ res*. 100: 1261-1275.
- Merkel, P.A., Chang, Y., Pierangeli, S.S., Convery, K., Nigel Harris, E., and Polisson, R.P. (1996). The prevalence and clinical associations of anticardiolipin antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue diseases. *Am J Med*. 101: 576-583.
- Meroni, P.L., Raschi, E., Camera, M., Testoni, C., Nicoletti, F., Tincani, A., Khamashta, M.A., Balestrieri, G., Tremoli, E., and Hess, D.C. (2000). Endothelial activation by aPL: a potential pathogenetic mechanism for the clinical manifestations of the syndrome. *J Autoimmun*. 15: 237-240.
- Merrell, M., and Shulman, L. (1955). Determination of prognosis in chronic disease, illustrated by systemic lupus erythematosus. *J Chronic Dis*. 1: 12-32.
- Mevorach, D., Zhou, J., Song, X., and Elkon, K. (1998). Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J. Exp. Med*. 188: 387-392.
- Michelson, A. Platelets. San Diego: *Academic Press/Elsevier Science*. 2006.
- Miller, T.E., Lahita, R.G., Zarro, V.J., MacWilliam, J., Koffler, D. (1981). Clinical significance of anti-double-stranded DNA antibodies detected by a solid phase enzyme immunoassay. *Arthritis Rheum*. 24: 602-610.
- Mimori, T. (1999). Autoantibodies in connective tissue diseases: clinical significance and analysis of target autoantigens. *Intern Med*. 38, 523-532.
- Mimori, T. (2002). Clinical significance of anti-Ku autoantibodies--a serologic marker of overlap syndrome? *Intern Med*. 41: 1096-1098.

- Mitola, S., Belleri, M., Urbinati, C., Coltrini, D., Sparatore, B., Pedrazzi, M., Melloni, E., and Presta, M. (2006). Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J Immunol.* 176: 12-25.
- Miyachi, K., Fritzler, M., and Tan, E. (1978). Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol.* 121: 2228-2234.
- Miyakis, S., Lockshin, M.D., Atsumi, T., Branch, D.W., Brey, R.L., Cervera, R., Derksen, R.H., DE Groot, P.G., Koike, T., Meroni, P.L., Reber, G., Shoenfeld, Y., Tincani, A., Vlachoyiannopoulos, P.G., Krilis, S.A. (2006). International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 4: 295-306.
- Moisan, E., and Girard, D. (2006). Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. *J Leukoc Biol.* 79: 489-498.
- Morel, L., Croker, B.P., Blenman, K.R., Mohan, C., Huang, G., Gilkeson, G., and Wakeland, E.K. (2000). Genetic reconstitution of systemic lupus erythematosus immunopathology with polycongenic murine strains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 6670-6675.
- Morgenstern, E. (1982). Coated membranes in blood platelets. *Eur J Cell Biol.* 26: 315-318.
- Moroni, G., Trendelenburg, M., Del Papa, N., Quaglini, S., Raschi, E., Panzeri, P., Testoni, C.,
- Mor-Vaknin, N., Punturieri, A., Kajal, S., and Markovitz, D.M. (2002). Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat Cell Biol.* 5: 59-63.
- Moss, A.L., and Ward, W.F. (1991). Multiple pathways for ligand internalization in rat hepatocytes II: Effect of hyperosmolarity and contribution of fluid-phase endocytosis. *J Cell Physiol.* 149: 319-323.
- Murugappa, S., and Kunapuli, S. (2006). The role of ADP receptors in platelet function. *Front Biosci.* 1: 1977-1986.
- Nakanishi-Matsui, M., Zheng, Y.W., Sulciner, D.J., Weiss, E.J., Ludeman, M.J., and Coughlin, S.R. (2000). PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature.* 404: 609-613.
- Nanjou, B., Kelly, J.A., Harley, J.B. The genetics of lupus. In: Tsokos, G.C., Gordon, C., Smolen, J.S., eds. Systemic lupus erythematosus. Philadelphia: *Mosby Elsevier.* 2007:74-80.
- Nimpf, J., Bevers, E.M., Bomans, P.H.H., Till, U., Wurm, H., Kostner, G.M., and Zwaal, R.F.A. (1986). Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by beta2-glycoprotein-I. *Biochim Biophys Acta.* 884: 142-149.
- Nimpf, J., Wurm, H., and Kostner, G. (1987). Beta 2-glycoprotein-I (apo-H) inhibits the release reaction of human platelets during ADP-induced aggregation. *Atherosclerosis.* 63: 109-114.
- Nurden, P., Poujol, C., Durrieu-Jais, C., Winckler, J., Combrie, R., Macchi, L., Bihour, C., Wagner, C., Jordan, R., and Nurden, A.T. (1999). Labeling of the internal pool of GP IIb-IIIa in

platelets by c7E3 Fab fragments (abciximab): flow and endocytic mechanisms contribute to the transport. *Blood*. 93: 1622-1633.

Oelzner, P., Deliyska, B., Fünfstück, R., Hein, G., Herrmann, D., and Stein, G. (2003). Anti-C1q antibodies and antiendothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus – relationship with disease activity and renal involvement. *Clin Rheumatol*. 22: 271-278.

Offermanns, S. (2006). Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res*. 99: 1293-1304.

Offermanns, S., Laugwitz, K., Spicher, K., and Schultz, G. (1994). G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Nat Acad Sci*. 91: 504-508.

Ohlmann, P., Laugwitz, K., Nürnberg, B., Spicher, K., Schultz, G., Cazenave, J., and Gachet, C. (1995). The human platelet ADP receptor activates Gi2 proteins. *Biochem J*. 15: 775-779.

Oney, S., Nimjee, S.M., Layzer, J., Que-Gewirth, N., Ginsburg, D., Becker, R.C., Arepally, G., and Sullenger, B.A. (2007). Antidote-controlled platelet inhibition targeting von willebrand factor with aptamers. *Oligonucleotides*. 17: 265-274.

Oosting, J.D., Derksen, R.H., Bobbink, I.W., Hackeng, T.M., Bouma, B.N., and de Groot, P.G. (1993). Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood*. 81: 2618-2625.

Oppenheim, J.J., Dong, H.F., Plotz, P., Caspi, R.R., Dykstra, M., Pierce, S., Martin, R., Carlos, C., Finn, O., Koul, O., and Howard, O.M.Z. (2005). Autoantigens act as tissue-specific chemoattractants. *J Leukoc Biol*. 77: 854-861.

Orth, T., Dorner, T., Meyer Zum Buschenfelde, K., and Mayet, W. (1996). Complete congenital heart block is associated with increased autoantibody titers against calreticulin. *Eur J Clin Invest*. 26: 205-215.

Oshiro, A.C., Derbes, S.J., Stopa, A.R., and Gedalia, A. (1997). Anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies associated with cardiac involvement in childhood systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 56: 272-274.

Paccaud, J.P., Siddle, K., and Carpentier, J.L. (1992). Internalization of the human insulin receptor. The insulin-independent pathway. *J Biol Chem*. 267: 13101-13191.

Pangborn, M. (1941). A new serologically active phospholipid from beef heart. *Proc Soc Exp Biol Med*. 48: 484-486.

Parks, C.G., and Cooper, G.S. (2006). Occupational exposures and risk of systemic lupus erythematosus: a review of the evidence and exposure assessment methods in population-and clinic-based studies. *Lupus*. 15: 728-736.

Parks, C.G., Cooper, G.S., Nylander-French, L.A., Sanderson, W.T., Dement, J.M., Cohen, P.L., Dooley, M.A., Treadwell, E.L., St Clair, E.W., Gilkeson, G.S., Hoppin, J.A., and Savitz, D.A. (2002). Occupational exposure to crystalline silica and risk of systemic lupus erythematosus: A

population-based, case-control study in the southeastern United States. *Arthritis Rheum.* 46: 1840-1850.

Pestina, T.I., Stenberg, P.E., Druker, B.J., Steward, S.A., Hutson, N.K., Barrie, R.J., and Jackson, C.W. (1997). Identification of the Src family kinases, Lck and Fgr in platelets: their tyrosine phosphorylation status and subcellular distribution compared with other Src family members. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17: 3278-3285.

Petri, M. (2000). Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun.* 15, 145-151.

Pierangeli, S.S., Colden-Stanfield, M., Liu, X., Barker, J.H., Anderson, G.L., and Harris, E.N. (1999). Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation.* 99: 1997-2002.

Pierangeli, S.S., Vega-Ostertag, M., and Nigel Harris, E. (2004). Intracellular signaling triggered by antiphospholipid antibodies in platelets and endothelial cells: a pathway to targeted therapies. *Thromb Res.* 114: 467-476.

Pierangeli, S.S., Vega-Ostertag, M.E., and Gonzalez, E.B. (2007). New targeted therapies for treatment of thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Expert Rev Mol Med.* 9: 1-15.

Pierce, K.L., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 639-650.

Podor, T.J., Singh, D., Chindemi, P., Foulon, D.M., McKelvie, R., Weitz, J.I., Austin, R., Boudreau, G., and Davies, R. (2002). Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface. *J Biol Chem.* 277: 7529-7539.

Poletaev, A., and Osipenko, L. (2003). General network of natural autoantibodies as immunological homunculus (Immunculus). *Autoimmun Rev.* 2: 264-271.

Powell, A.M., and Black, M.M. (2001). Epitope spreading: protection from pathogens, but propagation of autoimmunity? *Clin Exp Dermatol.* 26: 427-433.

Pulcinelli, F.M., Pesciotti, M., Pignatelli, P., Riondino, S., and Gazzaniga, P.P. (1998). Concomitant activation of Gi and Gq protein-coupled receptors does not require an increase in cytosolic calcium for platelet aggregation. *FEBS Lett.* 435: 37-40.

Rahman, A. and Isenberg, D. (2008). Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 358: 929-939.

Rand, J.H., Wu, X.-X., Andree, H.A.M., Lockwood, C.J., Guller, S., Scher, J., and Harpel, P.C. (1997). Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody Syndrome - a possible thrombogenic mechanism. *New Engl J Med.* 337: 154-160.

Reed, G. (2004). Platelet secretory mechanisms. *Semin Thromb Hemost.* 30: 441-450.

- Reed, J.H., Neufing, P.J., Jackson, M.W., Clancy, R.M., Macardle, P.J., Buyon, J.P., Gordon, T.P. (2007). Different temporal expression of immunodominant Ro60/60 kDa-SSA and La/SSB apotopes. *Clin Exp Immunol.* 148:153-60.
- Reeves, W.H., Chaudhary, N., Salerno, A., and Blobel, G. (1987). Lamin B autoantibodies in sera of certain patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 165: 750-762.
- Rekvig, O.P., and Nossent, J.C. (2003). Anti-double-stranded DNA antibodies, nucleosomes, and systemic lupus erythematosus: a time for new paradigms? *Arthritis Rheum.* 48: 300-312.
- Renaudineau, Y., Deocharan, B., Jousse, S., Renaudineau, E., Putterman, C., and Youinou, P. (2007). Anti-alpha-actinin antibodies: A new marker of lupus nephritis. *Autoimmun Rev.* 6: 464-468.
- Robitaille, G., Hénault, J., Christin, M-S., Sénécal, J.-L., and Raymond, Y. (2007). The nuclear autoantigen CENP-B displays cytokine-like activities toward vascular smooth muscle cells. *Arthritis Rheum.* 56: 3814-3826.
- Rosen, A., and Casciola-Rosen, L. (1999). Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Cell Death Differ.* 6: 6-12.
- Rothfield, N., Sontheimer, R.D., and Bernstein, M. (2006). Lupus erythematosus: systemic and cutaneous manifestations. *Clin Dermatol.* 24: 348-362.
- Roubey, R.A.S. (2000). Tissue factor pathway and the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun.* 15: 217-220.
- Rubenstein, D.S., and Diaz, L.A. (2006). Pemphigus antibody induced phosphorylation of keratinocyte proteins. *Autoimmunity.* 39: 577-586.
- Rubin R. Drug induced lupus. In: Wallace DJ, Hahn BH, eds. Dubois' lupus erythematosus. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002:885-916.
- Sabatine, M.S., Cannon, C.P., Gibson, C.M., López-Sendón, J.L., Montalescot, G., Theroux, P., Lewis, B.S., Murphy, S.A., McCabe, C.H., Braunwald, E.; Clopidogrel as adjunctive reperfusion therapy (CLARITY)-thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 28 Investigators. (2005). Effect of clopidogrel pretreatment before percutaneous coronary intervention in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with fibrinolytics: the PCI-CLARITY study. *JAMA.* 294: 1224-1232.
- Saklatvala, J., Rawlinson, L., Waller, R.J., Sarsfield, S., Lee, J.C., Morton, L.F., Barnes, M.J., and Farndale, R.W. (1996). Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue. *J Biol Chem.* 271: 6586-6589.
- Sambrano, G.R., Weiss, E.J., Zheng, Y.-W., Huang, W., and Coughlin, S.R. (2001). Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature.* 413: 74-78.
- Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z., and Lisanti, M.P. (1993). Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol.* 122: 789-807.

- Satoh, M., Ajmani, A.K., Ogasawara, T., Langdon, J.J., Hirakata, M., Wang, J., and Reeves, W.H. (1994). Autoantibodies to RNA polymerase II are common in systemic lupus erythematosus and overlap syndrome. Specific recognition of the phosphorylated (HIO) form by a subset of human sera. *J Clin Invest.* 94: 1981-1989.
- Satoh, M., Akizuki, M., Yamagata, H., Nakayama, S., and Homma, M. (1996). Restricted heterogeneity and changing spectrotypes in autoantibodies to La/SS-B. *Autoimmunity.* 24: 229-236.
- Savi, P., Beauverger, P., Labouret, C., Delfaud, M., Salel, V., Kaghad, M., and Herbert, J.M. (1998). Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation. *FEBS Lett.* 422: 291-295.
- Scazziotto, A., Altman, R., Rouvier, J., Gonzalez, C., Ahmed, Z., Jeske, W., Walenga, J., and Fareed, J. (2000). Abciximab treatment in vitro after aspirin treatment in vivo has additive effects on platelet aggregation, ATP release, and P-selectin expression. *Thromb Res.* 100: 479-488.
- Schiller, M., Bekeredjian-Ding, I., Heyder, P., Blank, N., Ho, A.D., and Lorenz, H.M. (2007). Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death Differ.* 15: 183-191.
- Schneebaum, A., Singleton, J., and West, S. (1991). Association of psychiatric manifestations with antibodies to ribosomal P proteins in systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 90: 54-62.
- Schousboe, I. (1980). Binding of beta 2-glycoprotein I to platelets: effect of adenylate cyclase activity. *Thromb Res.* 19: 225-237.
- Schousboe, I. (1985). Beta 2-glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood.* 66: 1086-1091.
- Schousboe, I. (1988). In vitro activation of the contact activation system (Hageman factor system) in plasma by acidic phospholipids and the inhibitory effect of beta 2-glycoprotein I on this activation. *Int J Biochem.* 20: 309-315.
- Schulman, S., Svenungsson, E., and Granqvist, S. (1998). Anticardiolipin antibodies predict early recurrence of thromboembolism and death among patients with venous thromboembolism following anticoagulant therapy. *Am J Med.* 104: 332-338.
- Schur, P. (1995). Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 4: 425-437.
- Schwartz, R.H. (2003). T cell anergy. *Ann Rev Immunol.* 21, 305-334.
- Senécal, J.-L., and Raymond, Y. (1992). Autoantibodies to major and minor nuclear lamins are not restricted to autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol.* 63: 115-118.
- Senécal, J.-L., Rauch, J., Grodzicky, T., Raynauld, J.-P., Uthman, I., Nava, A., Guimond, M., and Raymond, Y. (1999). Strong association of autoantibodies to human nuclear lamin B1 with lupus anticoagulant antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 42: 1347-1353.
- Serrano, C.J., Ramires, J., Venturinelli, M., Arie, S., D'Amico, E., Zweier, J., Pileggi, F., and da Luz, P. (1997). Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion

molecule expression: evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* 29: 1276-1283.

Shariat-Madar, Z., Mahdi, F., and Schmaier, A.H. (2002). Assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system: a new interpretation. *Int Immunopharmacol.* 2: 1841-1849.

Shen, G., Shoenfeld, Y., and Peter, J. (1998). Anti-DNA, antihistone, and antinucleosome antibodies in systemic lupus erythematosus and drug-induced lupus. *Clin Rev Allergy Immunol.* 16: 321-334.

Shi, T., Giannakopoulos, B., Yan, X., Yu, P., Berndt, M., Andrews, R., Rivera, J., Iverson, G., Cockerill, K., Linnik, M., and Krilis, S. (2006). Anti-beta₂-glycoprotein I antibodies in complex with beta₂-glycoprotein I can activate platelets in a dysregulated manner via glycoprotein Ib-IX-V. *Arthritis Rheum.* 54: 2558-2567.

Sigurdsson, S., Nordmark, G., Göring, H.H.H., Lindroos, K., Wiman, A.-C., Sturfelt, G., Jönsen, A., Rantapää-Dahlqvist, S., Möller, B., Kere, J., Koskenmies, S., Widén, E., Eloranta, M.-L., Julkunen, H., Kristjansdottir, H., Steinsson, K., Alm, G., Rönnblom, L., and Syvänen, A.-C. (2005). Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet.* 76: 528-537.

Silman, A.J., Macgregor, A.J., Thomson, W., Holligan, S., Carthy, D., Farhan, A., and Ollier, W.E. (1993). Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol.* 32: 903-907.

Simantov, R., LaSala, J.M., Lo, S.K., Gharavi, A.E., Sammaritano, L.R., Salmon, J.E., and Silverstein, R.L. (1995). Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest.* 96: 2211-2219.

Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387: 569-572.

Simons, K., and van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry.* 27: 6197-6202.

Si-Tahar, M., Pidard, D., Balloy, V., Moniatte, M., Kieffer, N., Van Dorsselaer, A., and Chignard, M. (1997). Human neutrophil elastase proteolytically activates the platelet integrin alpha IIb beta 3 through cleavage of the carboxyl terminus of the alpha IIb subunit heavy chain. Involvement in the potentiation of platelet aggregation. *J Biol Chem.* 272: 11636-11647.

Smith, R.M., Harada, S., Smith, J.A., Zhang, S., and Jarett, L. (1998). Insulin-induced protein tyrosine phosphorylation cascade and signalling molecules are localized in a caveolin-enriched cell membrane domain. *Cell Signal.* 10: 355-362.

Somers, E., Magder, L.S., and Petri, M. (2002). Antiphospholipid antibodies and incidence of venous thrombosis in a cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 29: 2531-2536.

Soulas, P., Woods, A., Jaulhac, B., Knapp, A.-M., Pasquali, J.-L., Martin, T., and Korganow, A.-S. (2005). Autoantigen, innate immunity, and T cells cooperate to break B cell tolerance during bacterial infection. *J Clin Invest.* 115: 2257-2267.

- Sprent, J., and Kishimoto, H. (2002). The thymus and negative selection. *Immunol Rev.* 185: 126-135.
- Stojanovic, A., Marjanovic, J.A., Brovkovich, V.M., Peng, X., Hay, N., Skidgel, R.A., and Du, X. (2006). A phosphoinositide 3-kinase-AKT-nitric oxide-cGMP signaling pathway in stimulating platelet secretion and aggregation. *J Biol Chem.* 281: 16333-16339.
- Sun, K.H., Tang, S.J., Lin, M.L., Wang, Y.S., Sun, G.H., and Liu, W.T. (2001). Monoclonal antibodies against human ribosomal P proteins penetrate into living cells and cause apoptosis of Jurkat T cells in culture. *Rheumatology.* 40: 750-756.
- Sundar, K., Jacques, S., Gottlieb, P., Villars, R., Benito, M.-E., Taylor, D.K., and Spatz, L.A. (2004). Expression of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) in the mouse can elicit the production of anti-dsDNA and anti-Sm antibodies. *J Autoimmun.* 23: 127-140.
- Svegliati, S., Olivieri, A., Campelli, N., Luchetti, M., Poloni, A., Trappolini, S., Moroncini, G., Bacigalupo, A., Leoni, P., Avvedimento, E.V., and Gabrielli, A. (2007). Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 110: 237-241.
- Tabas, I. (2007). Apoptosis and efferocytosis in mouse models of atherosclerosis. *Curr Drug Targets.* 8: 1288-1296.
- Takasaki Y, F.D., Tan EM. (1984). Characterization of proliferating cell nuclear antigen recognized by autoantibodies in lupus sera. *J Exp Med.* 159: 981-992.
- Takasaki, Y., Ando, S., Matsumoto, K., Yamada, H., Ikeda, K., Nawata, M., Matsushita, M., Matsudaira, R., Kaneda, K., Takeuchi, K., Tokano, Y., and Hashimoto, H. (2002). Activated peripheral blood mononuclear cells detected in lupus patients using cDNA coding for proliferating cell nuclear antigen. *Mod Rheumatol.* 12: 0239-0245.
- Takeda, I., Rayno, K., Wolfson-Reichlin, M., and Reichlin, M. (1999). Heterogeneity of anti-dsDNA antibodies in their cross-reaction with ribosomal P protein. *J Autoimmun.* 13: 423-428.
- Tan, E. (1989). Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol.* 44: 93-151.
- Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F., Masi, A.T., Mcshane, D.J., Rothfield, N.F., Schaller, J.G., Talal, N., and Winchester, R.J. (1982). The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25: 1271-1277.
- Teh, L.-S., and Isenberg, D.A. (1994). Antiribosomal p protein antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 37: 307-315.
- Teh, L.S., Doherty, D.G., and Williams, B.D. (1994). HLA-DRB genes and antiribosomal P antibodies in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol.* 33: 1125-1126.
- ter Borg, E.J., Groen, H., Horst, G., Limburg, P.C., Wouda, A.A., and Kallenberg, C.G.M. (1990). Clinical associations of antiribonucleoprotein antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 20: 164-173.

Thomas, D.W., Mannon, R.B., Mannon, P.J., Latour, A., Oliver, J.A., Hoffman, M., Smithies, O., Koller, B.H., and Coffman, T.M. (1998). Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A₂. *J Clin Invest.* 102: 1994-2001.

Tincani, A., Balestrieri, G., Allegri, F., Cinquini, M., Vianelli, M., Taglietti, M., Sanmarco, M., Ichikawa, K., Koike, T., Meroni, P., and Boffa, M.C. (2000). Overview on anticardiolipin ELISA standardization. *J Autoimmun.* 15: 195-197.

Tricot, O., Mallat, Z., Heymes, C., Belmin, J., Leseche, G., and Tedgui, A. (2000). Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 101: 2450-2453.

Triplett DA. Lupus anticoagulant. In: Jespersen J, Bertina RM, Haverkate F, eds. Laboratory techniques in thrombosis — a manual: 2nd revised edition of the ECAT assay procedures. Dordrecht, the Netherlands: *Kluwer Academic*, 1999:183-7.

Uramoto, K.M., Michet, C.J.J., Thumboo, J., Sunku, J., O'Fallon, W.M., and Gabriel, S.E. (1999). Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum.* 42: 46-50.

Vaarala, O., Aho, K., Palosuo, T., Alftan, G., Jauhiainen, M., and Leirisalo-Repo, M. (1993). Crossreaction between antibodies to oxidised low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 341: 923-925.

Vanhaesebroeck, B., Leegers, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J., and Waterfield, M.D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Ann Rev Biochem.* 70: 535-602.

Vassilatis, D.K., Hohmann, J.G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J.E., Mortrud, M.T., Brown, A., Rodriguez, S.S., Weller, J.R., Wright, A.C., Bergmann, J.E., and Gaitanaris, G.A. (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Nat Acad Sci USA.* 100: 4903-4908.

Vega-Ostertag, M., Harris, E.N., and Pierangeli, S.S. (2004). Intracellular events in platelet activation induced by antiphospholipid antibodies in the presence of low doses of thrombin. *Arthritis Rheum.* 50: 2911-2919.

Vergnes, L., Peterfy, M., Bergo, M.O., Young, S.G., and Reue, K. (2004). Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc Nat Acad Sci.* 101: 10428-10433.

Vianna, J., Khamashta, M., Ordi-Ros, J., Font, J., Cervera, R., Lopez-Soto, A., Tolosa, C., Franz, J., Selva, A., and Ingelmo, M. (1994). Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European multicenter study of 114 patients. *Am J Med.* 96: 3-9.

Viard, J.-P., Amoura, Z., and Bach, J.-F. (1992). Association of anti-beta 2 glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 93: 181-186.

Vitali, C., Bombardieri, S., Jonsson, R., Moutsopoulos, H.M., Alexander, E.L., Carsons, S.E., Daniels, T.E., Fox, P.C., Fox, R.I., Kassin, S.S., Pillemer, S.R., Talal, N., and Weisman, M.H.

- (2002). Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European consensus group. *Ann Rheum Dis.* 61: 554-558.
- von Hundelshausen, P., and Weber, C. (2007). Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res.* 100: 27-40.
- von Mühlen, C.A., and Tan, E.M. (1995). Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 24: 323-358.
- Wahl, D.G., Guillemain, F., de Maistre, E., Perret, C., Lecompte, T., and Thibaut, G. (1997). Risk for venous thrombosis related to antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus—a meta-analysis. *Lupus.* 6: 467-473.
- Wakeland, E., Liu, K., Graham, R., and Behrens, T. (2001). Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity.* 15: 397-408.
- Wang, F., Wang, C.L., Tan, C.T., and Manivasagar, M. (1997). Systemic lupus erythematosus in Malaysia: a study of 539 patients and comparison of prevalence and disease expression in different racial and gender groups. *Lupus.* 6: 248-253.
- Wassermann, A., Neisser, A., and Bruck, C. (1906). Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis. *Deutsche Med Wochenschr.* 32: 745-746.
- Watanabe, N., Nakajima, H., Suzuki, H., Oda, A., Matsubara, Y., Moroi, M., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Suzuki, H., Koyasu, S., Ikeda, Y., and Handa, M. (2003). Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha-null platelets characterized by an impaired response to GP VI stimulation. *Blood.* 102: 541-548.
- Weksler, B.B., and Nachman, R.L. (1971). Rabbit platelet bactericidal protein. *J Exp Med.* 134: 1114-1130.
- Wells, M.J., Hatton, M.W.C., Hewlett, B., Podor, T.J., Sheffield, W.P., and Blajchman, M.A. (1997). Cytokeratin 18 is expressed on the hepatocyte plasma membrane surface and interacts with thrombin-antithrombin complexes. *J Biol Chem.* 272: 28574-28581.
- Wetschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* 85: 1159-1164.
- White, J.G. (2005). Platelets are covercytes, not phagocytes: Uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. *Platelets.* 16: 121-131.
- White, J.G., Krumwiede, M.D., Cocking-Johnson, D.J., and Escolar, G. (1996). Uptake of vWF-anti-vWF complexes by platelets in suspension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16: 868-877.
- Wilson, K.L., Zastrow, M.S., and Lee, K.K. (2001). Lamins and disease: insights into nuclear infrastructure. *Cell.* 104: 647-650.
- Wilson, W., Gharavi, A., Koike, T., Lockshin, M., Branch, D., Piette, J., Brey, R., Derksen, R., Harris, E., Hughes, G., Triplett, D., and Khamashta, M. (1999). International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum.* 42: 1309-1311.

- Winn, R.K., and Harlan, J.M. (2005). The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases. *J Thromb Haemost.* 3: 1815-1824.
- Wiviott, S.D., Braunwald, E., McCabe, C.H., Montalescot, G., Ruzyllo, W., Gottlieb, S., Neumann, F.J., Ardissino, D., De Servi, S., Murphy, S.A., Riesmeyer, J., Weerakkody, G., Gibson, C.M., Antman, E.M.; TRITON-TIMI 38 Investigators. (2007). Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 357:2001-15.
- Wolfe, B.L., and Trejo, J. (2007). Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic.* 8: 462-470.
- Worman, H.J., and Bonne, G. (2007). "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res.* 313: 2121-2133.
- Worth, A., Thrasher, A.J., and Bobby Gaspar, H. (2006a). Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br J Haematol.* 133: 124-140.
- Worth, R.G., Chien, C.D., Chien, P., Reilly, M.P., McKenzie, S.E., and Schreiber, A.D. (2006b). Platelet FcγRIIA binds and internalizes IgG-containing complexes. *Exp Hematol.* 34: 1490-1495.
- Woulfe, D., Jiang, H., Morgans, A., Monks, R., Birnbaum, M., and Brass, L.F. (2004). Defects in secretion, aggregation, and thrombus formation in platelets from mice lacking Akt2. *J Clin Invest.* 113: 441-450.
- Wu, J., Edberg, J., Redecha, P., Bansal, V., Guyre, P., Coleman, K., Salmon, J., and Kimberly, R. (1997). A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest.* 100: 1059-1070.
- Wurm, H. (1984). beta 2-glycoprotein-I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles. *Int J Biochem.* 16: 511-515.
- Xue, D., Shi, H., Smith, J.D., Chen, X., Noe, D.A., Cedervall, T., Yang, D.D., Eynon, E., Brash, D.E., Kashgarian, M., Flavell, R.A., and Wolin, S.L. (2003). A lupus-like syndrome develops in mice lacking the Ro 60-kDa protein, a major lupus autoantigen. *Proc Nat Acad Sci USA.* 100: 7503-7508.
- Yacoub, D., Theoret, J.-F., Villeneuve, L., Abou-Saleh, H., Mourad, W., Allen, B.G., and Merhi, Y. (2006). Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alphaIIb beta3 activation, and thromboxane A2 release. *J Biol Chem.* 281: 30024-30035.
- Yanase, K., Smith, R.M., Puccetti, A., Jarett, L., and Madaio, M.P. (1997). Receptor-mediated cellular entry of nuclear localizing anti-DNA antibodies via myosin I. *J Clin Invest.* 100: 25-31.
- Yang, H., Wang, H., Czura, C.J., and Tracey, K.J. (2005). The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol.* 78: 1-8.
- Yin, H., Stojanovic, A., Hay, N., and Du, X. (2008). The role of Akt in the signaling pathway of the glycoprotein Ib-IX induced platelet activation. *Blood.* 111: 658-665.

- Yoshio, T., Onda, K., Nara, H., and Minota, S. (2006). Association of IgG anti-NR2 glutamate receptor antibodies in cerebrospinal fluid with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 54: 675-678.
- Youngren, J. (2007). Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci.* 64: 873-891.
- Yusuf, S., Zhao, F., Mehta, S.R., Chrolavicius, S., Tognoni, G., Fox, K.K. Clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent events trial investigators. (2001). Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med.* 16: 494-502.
- Yuzawa, Y., Brentjens, J.R., Brett, J., Caldwell, P.R., Esposito, C., Fukatsu, A., Godman, G., Stern, D., and Andres, G. (1993). Antibody-mediated redistribution and shedding of endothelial antigens in the rabbit. *J Immunol.* 150: 5633-5646.
- Zhang, J., Zhang, J., Shattil, S.J., Cunningham, M.C., and Rittenhouse, S.E. (1996). Phosphoinositide 3-kinase gamma and p85/phosphoinositide 3-kinase in platelets. Relative activation by thrombin receptor or beta-phorbol myristate acetate and roles in promoting the ligand-binding function of alphaIIb beta3 integrin. *J Biol Chem.* 271: 6265-6272.
- Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. (2005). Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci.* 62:971-88.