

Université de Montréal

**ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ PLAQUETTAIRE ET DE L'EFFICACITÉ
FIBRINOLYTIQUE DE LA STREPTOKINASE CHEZ
DES SUJETS AVEC ANTICORPS ANTI-STREPTOKINASE**

Par

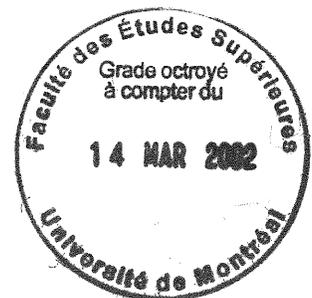
Maryse Courval

Faculté de Pharmacie

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences pharmaceutiques, option pharmacologie**

Novembre 2001

©Maryse Courval, 2001



QV
705
U58
2002
V.002

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ PLAQUETTAIRE ET DE L'EFFICACITÉ
FIBRINOLYTIQUE DE LA STREPTOKINASE CHEZ
DES SUJETS AVEC ANTICORPS ANTI-STREPTOKINASE**

présenté par :

Maryse Courval

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

France Varin, présidente rapporteuse

Chantal Pharand, directrice de recherche

Donald Palisaitis, codirecteur de recherche

Marie-Claude Vanier, membre du jury

Mémoire accepté le :

SOMMAIRE

La streptokinase (SK) est un agent fibrinolytique couramment utilisé dans le traitement de l'infarctus aigu du myocarde (IM-ST). Cependant, une reperfusion incomplète est observée chez 60% des patients et le taux de réocclusion se situe à 16%. L'administration de SK et les infections aux streptocoques (IS) entraînent la production d'anticorps spécifiques à la SK. Ces anticorps peuvent expliquer en partie les taux élevés de reperfusion incomplète et de réocclusion précoce, à cause de leurs propriétés neutralisante et pro-agrégante en présence de SK.

L'objectif principal de l'étude était donc de déterminer la prévalence de l'activation (SPACT) et de l'agrégation plaquettaire (SPAGG) induite par les anticorps anti-SK en présence de SK, chez des patients ayant été traités à la SK (post-infarctus) et chez des patients ayant eu une IS (post-infection). L'effet du tirofiban, un anti-GP IIb/IIIa, a également été étudié dans la prévention de la SPAGG. Cent trois patients ont été inclus dans l'étude : 45 volontaires (groupe N), 45 patients post-infarctus (groupe SK) et 13 patients post-infection (groupe SI). L'activation et l'agrégation plaquettaire, de même que le degré d'inhibition de l'agrégation plaquettaire par le tirofiban, ont été évalués chez chacun des patients.

Les résultats obtenus démontrent une prévalence élevée de SPACT (45.9%) et de SPAGG (24%) chez les patients du groupe SK. Les patients du groupe SI présentaient également une prévalence élevée de SPAGG (23%), bien qu'aucun changement au niveau de l'activation plaquettaire n'ait été observé comparativement au groupe N. Le tirofiban inhibait la SPAGG à 89% ($p < 0.001$). La présence d'anticorps anti-SK peut interférer avec l'efficacité fibrinolytique de la SK et provoquer une aggrégation plaquettaire. Cependant, le tirofiban ayant inhibé la SPAGG, les patients post-infarctus et post-infection pourraient bénéficier de son administration concomitante lors de l'infusion de SK.

Mots clés - *streptokinase, anticorps anti-streptokinase, infarctus aigu du myocarde, agrégation plaquettaire, tirofiban, anti-GP IIb/IIIa, plaquettes*

SOMMAIRE (ANGLAIS)

Streptokinase (SK) use, in acute myocardial infarction (AMI), is hindered by failure to reperfuse (60%) and early reocclusion (16%). SK administration and streptococcal infections (SI) induce the production of antibodies to SK. Failure to reperfuse and early reocclusion may partly be due to inactivation of SK by anti-SK antibodies and SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation (SPAGG).

Therefore, the purpose of this study was to determine the incidence of SK-induced, antibody-mediated, platelet activation (SPACT) and SPAGG after administration of SK or development of a SI. We also evaluated the effect of tirofiban (a GP IIb/IIIa antagonist) in preventing SPAGG after administration of SK or development of a SI. One hundred and three patients were included as follow: 45 normal volunteers (N group), 45 patients who had received SK (SK group) and 13 patients who had suffered a severe SI (SI group). SPACT and SPAGG, as well as the inhibition of platelet aggregation by tirofiban, were measured.

SK patients demonstrated a high incidence of SPACT (45.9%) and SPAGG (24%) after addition of SK. SI patients presented an increased incidence of SPAGG (23%) although no change in platelet activation was noted compared to normals. Tirofiban inhibited SPAGG by 89% ($p < 0.001$).

It is reasonable to believe that SK and SI patients may not express the same benefits to SK therapy as other patients would. In these patients, tirofiban significantly decreased the extent of anti-SK antibody-mediated platelet aggregation. Hence, patients undergoing SK therapy may benefit from tirofiban as an adjunct therapy.

Keywords - *streptokinase, antibodies to streptokinase, acute myocardial infarction, platelet aggregation, tirofiban, GP IIb/IIIa inhibitors, platelets*

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	ii
SOMMAIRE (ANGLAIS)	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS	xii
REMERCIEMENTS	xv
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
1. LES SYNDROMES CORONARIENS AIGUS	2
1.1 Types de syndromes coronariens aigus	2
1.2 Prévalence et physiopathologie de l'infarctus du myocarde	3
1.3 Complications suite à un infarctus du myocarde	4
2. L'ATHÉROSCLÉROSE	5
2.1 Développement de l'athérosclérose	5
2.1.1 Régions atteintes et facteurs de risque	5
2.1.2 Première lésion endothéliale	6
2.1.3 La plaque d'athérosclérose	7
2.1.4 Maturation de la plaque d'athérosclérose	7
2.2 Plaques thrombogènes et plaques sténosantes	8
2.3 Rupture de plaque et perte de l'équilibre hémostatique	9
2.4 Thrombogenèse	10

3.	PLAQUETTES SANGUINES	12
3.1	Morphologie et anatomie des plaquettes	12
3.1.1	<i>La membrane plaquettaire</i>	12
3.1.2	<i>Le complexe GP IIb/IIIa</i>	13
3.1.3	<i>Les microtubules et les microfilaments</i>	14
3.1.4	<i>Le système tubulaire dense</i>	14
3.1.5	<i>Les granules plaquettares</i>	14
3.2	Séquence de réactions de la cascade plaquettaire	16
3.2.1	<i>Adhésion plaquettaire</i>	16
3.2.2	<i>Activation plaquettaire</i>	18
3.2.3	<i>Agrégation plaquettaire</i>	19
4.	LA CASCADE DE LA COAGULATION	20
4.1	Molécules de la cascade de la coagulation	20
4.2	Activation de la cascade de la coagulation	24
4.2.1	<i>La voie intrinsèque</i>	24
4.2.2	<i>La voie extrinsèque</i>	25
4.2.3	<i>Convergence des deux voies d'activation</i>	27
4.3	Conversion du fibrinogène en fibrine	28
4.4	Régulation de la coagulation par la thrombine	28
5.	SYSTÈME FIBRINOLYTIQUE	29
5.1	Rôle et composants du système fibrinolytique	29
5.1.1	<i>Le plasminogène et la plasmine</i>	29
5.1.2	<i>Les activateurs du plasminogène</i>	30
5.1.3	<i>Les inhibiteurs du plasminogène et de la plasmine</i>	31
	5.1.3.1 Les inhibiteurs de type 1 et 2 de l'activateur du plasminogène	31
	5.1.3.2 Les inhibiteurs de la plasmine	32
5.2	Rôle des plaquettes dans la fibrinolyse	32
5.3	Dissolution du thrombus fibrino-plaquettaire	33

6.	TRAITEMENTS DE L'INFARCTUS AIGU DU MYOCARDE	33
6.1	Objectifs du traitement à l'urgence	34
6.2	Contrôle des douleurs	34
6.3	Antithrombotiques et antiplaquettaires	34
6.4	Rétablissement du flot coronarien	37
	6.4.1 <i>Agents fibrinolytiques</i>	37
	6.4.2 <i>Administration des agents fibrinolytiques</i>	38
7.	LA STREPTOKINASE	39
7.1	Origine et pharmacologie	39
7.2	Dosage	40
7.3	Efficacité	40
7.4	Les anticorps anti-streptokinase	41
	7.4.1 <i>Induction d'une réponse immunitaire</i>	41
	7.4.2 <i>Neutralisation de la streptokinase</i>	42
	7.4.3 <i>Caractère pro-agrégant des anticorps anti-streptokinase</i>	43
	7.4.4 <i>Réactions allergiques à la streptokinase</i>	43
7.5	Implication des anticorps anti-streptokinase dans le traitement de l'infarctus aigu du myocarde	45
8.	LES ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS GP IIb/IIIa	46
8.1	Abxicimab	46
8.2	Eptifibatide	47
8.3	Tirofiban	48
9.	BUT DU PROJET DE RECHERCHE	48
	PRÉSENTATION DES MANUSCRIPTS	50

CHAPITRE 2: Platelet Activity And Antibody Titers After Exposure To Streptokinase Or Streptococcal Infection	51
ABSTRACT	53
CONDENSED ABSTRACT	54
ABBREVIATIONS AND ACRONYMS	55
INTRODUCTION	56
METHODS	57
Patient population	57
Study design	57
Collection and preparation of human plasma	57
Determination of platelet activation	58
Determination of platelet aggregation	59
Titration of anti-SK antibodies	59
Determination of SK resistance titers	60
Statistical analysis	60
RESULTS	60
Patients	60
Platelet activation	61
Platelet aggregation	62
Anti-SK antibody, SK resistance and antistreptolysin-O titers	63
Correlations	65
DISCUSSION	67
Platelet activation	68
Platelet aggregation	69
Antistreptolysin-O, Anti-SK antibody and SK resistance titers	69

Study limitations	70
Conclusion	71
ACKNOWLEDGEMENTS	72
REFERENCES	73
CHAPITRE 3: Inhibition of Streptokinase-Induced, Antibody-Mediated Platelet Aggregation with Tirofiban after Exposure To Streptokinase Or Streptococcal Infection	76
ABSTRACT	78
CONDENSED ABSTRACT	79
ABBREVIATIONS AND ACRONYMS	80
INTRODUCTION	81
METHODS	82
Patient population	82
Collection and preparation of human plasma	82
Determination of platelet aggregation	82
Titration of anti-SK antibodies	83
Statistical analysis	84
RESULTS	84
Patients	84
Platelet aggregation	85
DISCUSSION	86

CONCLUSION	88
ACKNOWLEDGEMENTS	89
REFERENCES	90
CHAPITRE 4: DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	94
1. DISCUSSION GÉNÉRALE	95
1.1 Anticorps anti-streptokinase	96
1.2 Activité plaquettaire	97
1.2.1 <i>Activation plaquettaire</i>	97
1.2.2 <i>Agrégation plaquettaire</i>	98
1.3 Activité fibrinolytique de la streptokinase	100
1.4 Limitations de l'étude	101
2. CONCLUSION	102
BIBLIOGRAPHIE	104

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

I. Classification fonctionnelle des facteurs de coagulation_____ **22**

II. Facteurs de coagulation primaires_____ **23**

CHAPITRE 2

I. Demographic characteristics of study patients_____ **61**

CHAPITRE 3

I. Demographic characteristics of study patients_____ **85**

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

1. Lésions d'athérosclérose_____	11
2. Plaquette sanguine_____	15
3. Adhésion plaquettaire_____	17
4. Voies de la coagulation_____	26
5. Étapes importantes de l'hémostasie et de la coagulation_____	36

CHAPITRE 2

1. Prevalence of SK-induced, antibody-mediated, platelet activation among the three patient groups_____	62
2. Prevalence of SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation among the three patient groups_____	63
3. IgG titers in the three groups of patients_____	64
4. SK resistance titers in the three groups of patients_____	65
5. Correlation between SK resistance titers and IgG titers in all patients_____	66
6. IgG titers in platelet activation and platelet aggregation responders and non-responders_____	67

CHAPITRE 3

1. Inhibition of ADP-induced or SK-induced platelet aggregation with tirofiban or IV.3 in 13 patients demonstrating SK- induced platelet aggregation_____	86
---	-----------

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

α :	Alpha
β :	Beta
δ :	Gamma
μL :	Microlitre
$^{\text{TM}}$:	Marque de commerce
$^{\text{®}}$:	Marque enregistrée
% :	Pourcentage / <i>Percentage</i>
A-III :	Antithrombine III
AAS :	Acide acétyl salicylique, aspirine
ADP :	Adenosine diphosphate
aPTT :	Temps de céphaline activée
ASA :	<i>Acetylsalicylic acid</i>
ASO :	<i>Antistreptolysin O</i>
AVC :	Accident vasculaire-cérébral
AI :	Angine instable
AMI :	<i>acute myocardial infarction</i>
APSAC :	Anistreplase
BSA :	<i>Bovin serum albumin</i>
Ca^{2+} :	Calcium, ions calciques
CK :	Creatine Kinase
CK-MB :	<i>Creatine Kinase – Myocardial band</i>
CLT :	<i>50% Clot lysis time</i>
CM-CSF :	<i>Cytokine macrophage colony-stimulating factors</i>
CML :	Cellule(s) musculaire(s) lisse(s)
DAG :	Diacylglycérol
ECG :	Électrocardiogramme
FGF :	<i>Fibroblast growth factor</i>
FP3 :	Facteur plaquettaire 3

FT :	Facteur tissulaire
FvW :	Facteur von Willebrand
g :	Gramme(s) / Gram(s)
GP :	Glycoprotéine(s) / <i>Glycoprotein(s)</i>
IAM :	Infarctus aigu du myocarde
Ig :	Immunoglobuline
IM :	Infarctus du myocarde
IM-NST :	Infarctus du myocarde sans élévation du segment ST
IM-ST :	Infarctus du myocarde avec élévation du segment ST
IP ₃ :	Inositol triphosphate
IV :	Intraveineux / <i>Intravenous</i>
KHPM:	Kininogène de haut poids moléculaire
L :	Litre(s) / <i>Liter(s)</i>
LACI :	Inhibiteur de la voie extrinsèque / <i>Lipoprotein- associated coagulation inhibitor</i>
LDL :	<i>Low-density lipoprotein(s)</i>
min :	Minute(s)
mL :	Millilitre(s) / <i>Milliliter(s)</i>
MU :	Millions d'unités
N/A :	<i>Not applicable</i>
oxLDL :	LDL(s) oxydé(s)
PA ₂ :	Phospholipase A ₂
PAI-1, 2 :	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1, 2 / <i>Plasminogen activator inhibitor 1,2</i>
PBS :	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDGF :	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PGI ₂ :	<i>Prostacyclin</i>
PIP ₃ :	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PK :	Prékallikréine
PKC :	Protéine Kinase C
PLC- δ :	Phospholipase C- δ
Plg :	Plasminogène / <i>Plasminogen</i>
PRP :	Plasma riche en plaquettes / <i>Platelet-rich plasma</i>
PPP :	Plasma pauvre en plaquettes / <i>Platelet-poor plasma</i>
RGDS :	Arginine-Glycine-Acide aspartique-Sérine
r-PA :	Retéplase
rt-PA :	Alteplase
TGF- α et β :	<i>Transforming growth factor α et β</i>
TNF :	<i>Tumor necrosis factor</i>
t-PA :	Activateur tissulaire / <i>Tissue-type plasminogen activator</i>
TXA ₂ :	Thromboxane A ₂
U :	Unité(s) / Unit(s)
u-PA :	Urokinase / <i>Urinary-type plasminogen activator</i>
SCA :	Syndrôme(s) coronarien(s) aigu(s)
SK :	Streptokinase
SKRT :	Streptokinase resistance titre
TIMI :	<i>Thrombolysis in myocardial infarction</i>

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, D^r Chantal Pharand, pour m'avoir permis de mener à terme ce projet de recherche et surtout pour ses précieux conseils et son aide grandement appréciée.

Je tiens également à remercier mon codirecteur, le D^r Donald Palisaitis, ainsi que le D^r Bernard Lespérance, qui ont contribué à l'élaboration et l'accomplissement de ce projet par leur expertise et leur soutien. Un merci tout à fait spécial à Céline Groulx pour son dévouement, sa présence et son support tout au long de mes études.

Ma gratitude va aussi au D^r Guy Rousseau, à Michèle Lonergan et à Marie-Françoise Arthus, pour leur grande collaboration.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1. LES SYNDROMES CORONARIENS AIGUS

Les syndromes coronariens aigus (SCA), incluant l'angine instable (AI), l'infarctus du myocarde sans élévation du segment ST (IM-NST) et l'infarctus aigu du myocarde, avec élévation du segment ST (IM-ST), constituent la principale cause de mortalité et d'invalidité aux États-Unis et dans la plupart des pays industrialisés.¹ Pour cette raison, ils représentent une préoccupation majeure en cardiologie clinique.

Les SCA résultent d'une ischémie causée par une réduction du flot sanguin au myocarde. Cette réduction du flot sanguin est généralement le résultat de l'obstruction partielle ou complète d'une artère coronaire, causée par la rupture d'une plaque d'athérosclérose, l'activation des plaquettes et la formation d'un thrombus fibrinoplaquettaire au site de rupture.^{2,3}

1.1. Types de syndromes coronariens aigus

Les SCA se divisent en trois grandes catégories : l'AI, l'IM-NST, et l'IM-ST. Dans l'AI, on considère que le thrombus n'est pas entièrement occlusif et qu'il est principalement composé d'agrégats instables de plaquettes (thrombus blanc). L'IM-NST se distingue de l'AI par la présence, au niveau plasmatique, de marqueurs cardiaques de nécrose (troponine T, troponine I, CK-MB)⁴⁻⁶ et implique des périodes plus longues ou plus sévères d'occlusion coronaire (environ 1 heure dans l'IM-NST comparativement à 10 à 20 minutes dans l'AI),⁶ et donc d'ischémie. Si présents, on note des changements électrocardiographiques similaires pour l'AI et l'IM-NST, soit un sous-décalage du segment ST, avec ou sans inversion de l'onde T. L'IM-NST, présentant généralement des zones de nécrose dans le tiers intérieur de la paroi ventriculaire (paroi sous-endocardique), serait une forme intermédiaire entre l'AI et l'IM-ST. Sa gravité relative repose sur un risque élevé d'extension secondaire avec évolution vers l'IM-ST.

L'IM-ST se développe généralement suite à une rupture de plaque athéroscléreuse associée à la formation d'un thrombus entièrement occlusif.⁶ La présence de ce type de thrombus produit une élévation du segment ST à l'électrocardiogramme (ECG) et, à l'occasion, la formation d'une onde Q. La zone de nécrose touche entièrement ou presque, l'épaisseur de la paroi ventriculaire.⁷ L'IM-ST est habituellement associé à des dommages ventriculaires plus sévères, à une tendance à l'expansion de l'infarctus, au remodelage et à un taux plus élevé de mortalité.⁸⁻¹⁰

1.2. Prévalence et physiopathologie de l'infarctus du myocarde

L'infarctus du myocarde sous sa forme générale (IM) est la principale cause de mortalité aux États-Unis. On estime qu'à chaque année, 1.5 millions d'Américains souffriront d'un IM et que plus d'un tiers y succomberont.¹¹ L'IM se définit comme une nécrose des myocytes résultant d'une ischémie secondaire à une thrombose coronarienne aiguë (obstruction complète ou presque d'une artère coronaire). Cette thrombose est généralement elle-même secondaire à une rupture de plaque d'athérosclérose entraînant l'activation et l'agrégation plaquettaire, puis l'occlusion coronarienne. La nécrose des myocytes se propage rapidement de l'endocarde jusqu'à l'épicarde. On estime qu'en moyenne, 50% de la zone à risque est détruite en 2 heures et 80% à la douzième heure, cette vitesse de destruction étant cependant variable d'un individu à l'autre.¹² La nécrose d'une partie du myocarde est irréversible et incompatible avec la survie de l'individu lorsqu'elle atteint 40% de la masse myocardique, que cette nécrose soit la conséquence d'un infarctus unique ou de plusieurs infarctus successifs.

Il a longtemps été suggéré que la formation d'un thrombus joue un rôle critique dans la physiopathologie de l'IM. Cependant, ce n'est qu'en 1980 que De Wood démontrait, par coronarographie effectuée dans les 4 heures suivant le début des symptômes, la présence d'un thrombus causant une occlusion totale de l'artère coronaire impliquée chez 87% des patients.¹³ On considère maintenant que si une

coronarographie était effectuée tôt après le début des symptômes d'un IM, on observerait la présence d'un thrombus occlusif chez 80 à 95% des patients.^{14, 15}

La pathogenèse des thromboses coronariennes est presque essentiellement fondée sur l'interaction entre la paroi vasculaire altérée par l'athérosclérose et les plaquettes sanguines, résultant en la formation d'un thrombus.^{2, 3, 16, 17} Bien que plusieurs processus pathologiques impliquant les artères coronaires puissent résulter en un IM,¹⁸ comme par exemple l'abus de cocaïne ou des désordres hématologiques, tel qu'un état d'hypercoagulabilité, la rupture d'une plaque d'athérosclérose accompagnée d'un thrombus occlusif est la principale cause de l'IM.⁶ Pour cette raison, nous allons principalement discuter de l'IM secondaire à l'athérosclérose.

1.3. Complications suite à un infarctus du myocarde

Plusieurs complications peuvent survenir suite à un IM, que ce soit de façon précoce, retardée ou tardive. En dehors du risque initial d'arythmies ventriculaires (fibrillation et tachycardie ventriculaire), relativement indépendant de la taille de la nécrose, la fréquence et la gravité des autres complications sont directement dépendantes de la masse myocardique nécrosée. Ces complications peuvent inclure des arythmies auriculaires (fibrillation auriculaire) de même que des complications mécaniques, comme une rupture myocardique, un accident vasculaire-cérébral (AVC) et une insuffisance mitrale aiguë. L'extension de la zone nécrosée est également à craindre. De plus, certaines complications peuvent survenir sous forme de séquelles tardives: insuffisance cardiaque, arythmies ventriculaires et risque de mort subite, syndrome de Dressler (péricardite post-infarctus), anévrisme (rare) qui peut être à l'origine d'autres complications (tachycardies ventriculaires, insuffisance cardiaque, accidents thromboemboliques).¹⁹

2. L'ATHÉROSCLÉROSE

Autrefois considérée comme une maladie dégénérative, à cause de l'accumulation de lipides et de débris nécrotiques, l'athérosclérose est maintenant reconnue comme le résultat d'un processus multifactoriel qui commence à l'enfance et présente des conséquences cliniques vers la fin de l'âge adulte. Le terme athérosclérose signifie "épaississement et durcissement des artères" et trois événements fondamentaux peuvent être observés dans les lésions avancées: (1) l'accumulation de cellules musculaires lisses (CML) dans l'intima, accompagnée de macrophages et de lymphocytes T, (2) la formation d'une matrice de tissus conjonctifs, incluant le collagène, les fibres élastiques et les protéoglycans et finalement, (3) l'accumulation de lipides, principalement sous la forme d'esters de cholestérol et de cholestérol libre, dans les cellules et la matrice de tissus conjonctifs.^{6,20-23}

2.1. Développement de l'athérosclérose

2.1.1. Régions atteintes et facteurs de risque

L'athérosclérose se développe dans la partie interne des artères, au niveau de l'intima, puis envahit la partie externe de l'endothélium et de l'intima pour former progressivement des stries graisseuses puis une masse soulevée de tissus fibreux. La lésion va éventuellement faire saillie dans la lumière de l'artère et atténuer le flot sanguin.²⁴ Les artères coronaires, carotides et cérébrales, l'aorte et les artères des membres inférieurs sont les plus souvent touchées, particulièrement au niveau des bifurcations artérielles et des points de turbulence circulatoire.^{25,26} Plusieurs facteurs de risque contribuent au développement de l'athérosclérose, soient l'hyperlipidémie, le diabète, l'hypertension artérielle, le tabac et l'obésité. De plus, certains autres facteurs ont aussi une influence sur le développement de l'athérosclérose, tels qu'une histoire familiale positive de maladie coronarienne, le sexe masculin et un âge avancé.²⁷⁻²⁹

2.1.2. Première lésion endothéliale

Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer le déclenchement initial de l'athérosclérose. Le processus pourrait entre autre être déclenché en réponse à une blessure de la paroi vasculaire et d'autres types d'agressions endothéliales. On estime par ailleurs qu'au moins 50% des cas d'athérosclérose seraient dus à une hyperlipidémie, plus particulièrement à l'élévation des concentrations et l'oxydation des LDL (*Low-Density Lipoproteins*).³⁰

Les LDL sont des lipoprotéines plasmatiques qui transportent le cholestérol aux tissus extra-hépatiques. Dans l'athérosclérose, la paroi artérielle deviendrait hyperperméable aux LDL suite à un dommage vasculaire et permettrait l'exposition des molécules d'adhésion leucocytaire à la surface des cellules endothéliales.³¹ Les monocytes et lymphocytes circulant peuvent ainsi adhérer à ces molécules et migrer sous l'endothélium. Une fois sous l'endothélium, les monocytes deviennent des macrophages qui agissent de façon à enlever les substances étrangères, principalement par phagocytose et hydrolyse intracellulaire.³² Ainsi, les macrophages phagocytent les LDL, oxydés (oxLDL) par les monocytes dans le sang et par d'autres macrophages sous l'endothélium, via les récepteurs *scavenger*.³³ Par la suite, les macrophages remplis de oxLDL se transforment en cellules spumeuses et déclenchent des réactions inflammatoires.³⁴⁻³⁷

L'accumulation de ces cellules spumeuses entraîne un dépôt graisseux qui progresse éventuellement pour donner des stries graisseuses. Les CML issues de la média prolifèrent dans l'intima et fabriquent une néo-intima initialement non-thrombogène destinée à remplacer le revêtement endothélial endommagé.^{38,39} De plus, les plaquettes qui adhèrent au sous-endothélium sécrètent du PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), un facteur de croissance cellulaire et un médiateur de la formation néo-intimale.^{40,41} Le PDGF et d'autres facteurs de croissance déclenchent par la suite l'hypertrophie et la prolifération des CML dans la média.⁴² Celles-ci vont alors migrer puis proliférer dans l'intima et contribuer ainsi à l'épaississement progressif de

l'intima. Les CML, les macrophages et les fibroblastes s'accumulent éventuellement et sécrètent une matrice conjonctive extracellulaire (collagène, protéoglycans).⁴³ C'est le développement de la plaque fibromusculaire. Dans le cas d'agressions répétées et persistantes, cette réaction intinale se poursuit indéfiniment. L'athérosclérose résulte donc d'une inflammation intinale excessive et chronique de la paroi artérielle dont le principal élément distinctif est la réaction proliférative fibromusculaire des CML de la paroi.⁴⁴ L'excès et la chronicité des agressions font basculer le processus normal de guérison du vaisseau vers la formation de plaques d'athérosclérose.

2.1.3. La plaque d'athérosclérose

Les plaques d'athérosclérose sont composées de deux éléments principaux : un centre athéromateux mou et riche en lipides (*noyau thrombogène*), recouvert d'un tissu sclérotique, dur et riche en collagène (*capsule fibreuse*).^{40,45} À partir de la lumière artérielle, on observe d'abord la capsule fibreuse, une matrice extracellulaire de tissus conjonctifs, constituée en grande partie de CML et de collagène. Le collagène contribue à l'intégrité structurale de la plaque et serait présent principalement sous forme de fibrilles (collagène de types I et III). Les CML contribuent par ailleurs à la synthèse et l'assemblage de ces fibrilles de collagène.⁴⁰ Outre ces deux éléments, la capsule fibreuse est également constituée d'élastine et de différentes classes de protéoglycans.⁴⁶ Sous cette couche, on retrouve des lipides extracellulaires, des lymphocytes T et des macrophages ayant phagocyté des oxLDL.^{47,48} Située plus en profondeur dans la plaque, cette dernière couche représente le centre athéromateux de la plaque, le noyau thrombogène. À l'intérieur de la plaque mature se trouve également un grand nombre de CML en prolifération qui sécrètent du collagène, des protéoglycans, des fibroblastes ainsi que d'autres substances conjonctives.⁴⁹

2.1.4. Maturation de la plaque d'athérosclérose

La régulation et la prolifération des cellules impliquées dans l'athérosclérose, et donc dans la progression des lésions, se font sous l'action de plusieurs cytokines. Les plaquettes, les macrophages, les CML et les cellules endothéliales sécrètent entre

autre du PDGF, un facteur de croissance cellulaire mentionné plus tôt.⁵⁰ D'autres facteurs de croissance (CM-CSF [*cytokine macrophage colony-stimulating factors*], FGF [*fibroblast growth factor*], TNF [*tumor necrosis factor*], TGF- α et β [*transforming growth factor α et β*] et thrombine), provenant pour la plupart de cellules présentes dans la paroi, stimulent également la prolifération des CML, des fibroblastes et des macrophages. L'accumulation des LDL dans la couche profonde et le blocage du transit trans-intimal de ceux-ci jusqu'au *vasa vasorum* conduit à la dégénérescence de cette zone. Les macrophages jouent également plusieurs rôles dans cette dégénérescence. Sous l'influence des facteurs de croissance, les macrophages prolifèrent dans la profondeur de la plaque et contribuent à la sécrétion de cytokines de prolifération cellulaire.^{51,52}

L'accumulation de LDL provoque des changements dégénératifs, entraîne une réaction inflammatoire chronique et permet l'établissement d'un cercle vicieux. Les macrophages meurent, déversent leur contenu en lipides et cholestérol et favorisent l'accroissement d'une zone athéromateuse en partie profonde. Ainsi, avec le temps, un processus dégénératif s'installe et on observe l'augmentation des quantités de oxLDL, l'accentuation de la nécrose des macrophages, l'accumulation de cristaux de cholestérol et de dépôts de calcium (Ca^{2+}), et une hémorragie de la paroi vasculaire.⁵¹

2.2. Plaques thrombogènes et plaques sténosantes

Lorsque la réduction de la lumière de l'artère est limitée (sténose coronaire < 50%), l'athérosclérose ne présente généralement pas de signes cliniques.⁵³ Les plaques athéroscléreuses présentant des manifestations sont généralement élevées dans la lumière du vaisseau et peuvent compromettre le flot sanguin.⁵⁴ Lorsque c'est le cas, elles risquent d'entraîner des périodes d'ischémie. Dans le cas d'une plaque sténosante coronarienne moyenne, la capsule fibreuse est normalement plus volumineuse que le centre athéromateux et constituerait plus de 70% de la plaque.⁵⁵ Par contre, ce tissu sclérosé est souvent considéré inoffensif puisqu'il stabilise la plaque et la protège contre les ruptures.

À l'opposé, lorsque la capsule fibreuse est mince et friable, la plaque est dite thrombogène et est nettement plus dangereuse.⁵⁶ La rupture de la capsule fibreuse suivie de l'exposition, au sang circulant, de la composante athéromateuse (noyau thrombogène) de la plaque sont effectivement des événements risquant de culminer en une thrombose. L'artère affectée peut ainsi être obstruée, suite à une fissure de la plaque d'athérosclérose et la formation d'un thrombus. Le résultat, comme c'est le cas dans l'IM, est une nécrose des tissus normalement irrigués par l'artère obstruée.

2.3. Rupture de plaque et perte de l'équilibre hémostatique

Les perturbations hémorhéologiques autour de la plaque (perte du flux laminaire, augmentation des forces de cisaillement, turbulence sanguine) sont des facteurs de risque thrombogène.^{3,57} De plus, tel que mentionné plus tôt, la nature de la plaque elle-même peut être un facteur de risque à cause de la vulnérabilité aux fissures.

Dans son état normal, la cellule endothéliale est très efficace à prévenir la thrombose et à maintenir l'homéostasie.³ Ainsi, à l'état sain, les forces d'inhibition de la coagulation et de l'activité des plaquettes prédominent sur les forces d'activation dans le sang circulant et à la surface de l'endothélium. Dans le cas de l'athérosclérose, lorsqu'il y a rupture de plaque, dénudation subséquente du sous-endothélium et altération des cellules endothéliales et vasculaires, on observe un renversement de ce rapport de force. On observe un déséquilibre biochimique, souvent associé à un déséquilibre hémorhéologique, entre les facteurs de protection contre la thrombose et les mécanismes d'activation des plaquettes et de la cascade de la coagulation. Ce déséquilibre thrombogène, qui se traduit par la forte présence de thrombine et de collagène, entraîne l'activation de la formation d'un agrégat de plaquettes (thrombus blanc) et de la cascade de la coagulation. Le thrombus blanc, instable au début du processus, se solidifie pour devenir un thrombus fibrinoplaquettaire stable à la suite des événements constituant la cascade de la coagulation.

2.4. Thrombogenèse

La formation du thrombus fait donc généralement suite à la rupture de la capsule fibreuse d'une plaque riche en lipides et à l'exposition de sa matrice sous-endothéliale aux divers composants du sang (Figure 1, page 11).

Suite à une telle rupture de plaque, on peut observer quatre principaux événements qui se déroulent selon un ordre spécifique afin de maintenir l'homéostasie.⁵⁸ On observe d'abord une phase de vasoconstriction qui a pour but de limiter le flot sanguin au site endommagé. Deuxièmement, les plaquettes activées se regroupent et forment un agrégat plaquettaire instable. En troisième étape, il y a formation d'un filet de fibrine autour du thrombus blanc instable. Ce filet retient les plaquettes et assure leur stabilisation. Finalement, le thrombus fibrinoplaquettaire ainsi formé doit être dissout afin de rétablir le flot sanguin normal. Cette dissolution du thrombus, que l'on nomme la "fibrinolyse", est un phénomène physiologique qui peut être accéléré par l'utilisation d'agents fibrinolytiques. C'est notamment le cas dans l'IM-ST, où on tente de rétablir le flot coronarien le plus rapidement possible en accélérant le processus de fibrinolyse. Les prochaines sections traiteront des étapes de l'agrégation plaquettaire, de la cascade de la coagulation et de la fibrinolyse. En dernier lieu, le traitement de l'IM-ST via l'utilisation d'agents fibrinolytiques sera également discuté.

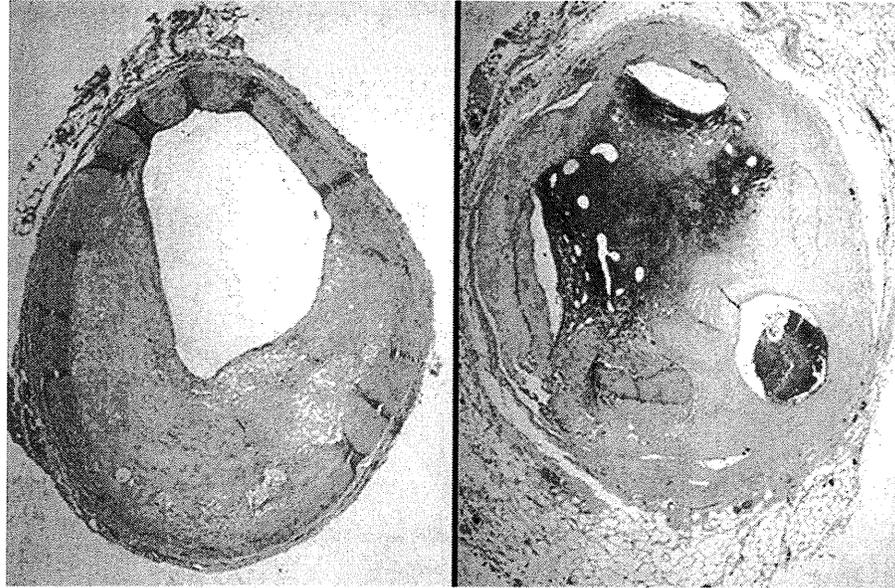


FIGURE 1 : Lésions d'athérosclérose

Coupes transversales d'artères coronaires présentant de l'athérosclérose. L'artère coronaire de gauche présente une sténose de 60 à 70% de la lumière. L'artère coronaire de droite montre également la présence d'un thrombus.

Tiré du site Internet www.medlib.med.utah.edu/WebPath/ATHHTML/ATH005.html

3. PLAQUETTES SANGUINES

Les plaquettes sanguines, des cellules anucléés produites par les mégacaryocytes, sont dix fois plus petites que les érythrocytes et vingt fois moins nombreuses. Dans la microcirculation sanguine, les érythrocytes circulent dans la partie centrale des vaisseaux et du torrent circulatoire.⁵⁹ Par conséquent, les plaquettes sont repoussées et concentrées en périphérie, près de l'endothélium. Cette position stratégique leur permet de participer de façon décisive à l'hémostase en adhérant aux parois vasculaires endommagées et en s'accumulant aux sites de dommage vasculaire.

3.1. Morphologie et anatomie des plaquettes

3.1.1. *La membrane plaquettaire*

L'interaction des plaquettes avec leur environnement et entre elles-mêmes est initiée par la membrane plaquettaire, qui représente une interface réactive entre les composants des parois vasculaires, le plasma, et l'intérieur des plaquettes. Tout comme les autres membranes cellulaires, la membrane des plaquettes se présente comme une double couche lipidique, hydrophile vers l'extérieur et hydrophobe vers l'intérieur, consistant principalement en des glycolipides et des phospholipides.⁶⁰ Les glycolipides sont surtout présents à la face extérieure de la membrane tandis que les phospholipides sont distribués de façon asymétrique dans les deux couches de la membrane. Le cholestérol est également un constituant important de la membrane. Cependant, bien qu'il soit présent dans la double couche, sa concentration est plus grande à la face extérieure qu'à la face intérieure.⁶¹ Par ailleurs, la surface extérieure de la membrane plaquettaire possède un glycocallix composé majoritairement de glycoprotéines. Ce glycocallix contient certaines protéines membranaires riches en glucides ainsi que des résidus sialiques qui donnent à la plaquette une charge négative.⁶² Cette caractéristique entraîne des phénomènes de répulsion des plaquettes entre elles d'une part et vis à vis de l'endothélium vasculaire d'autre part.

À température corporelle, la membrane plaquettaire possède également la propriété de “fluidité”, une propriété fondamentale permettant l’inversion (*flip-flop*) des lipides membranaires.⁶³ Lors de la phase d’activation, les plaquettes peuvent ainsi inverser la polarité des phospholipides et extérioriser le facteur plaquettaire 3 (FP3). Le FP3 consiste en un ensemble de phospholipides chargés négativement (essentiellement des phosphatidylsérines) sur lesquels vont se fixer directement les facteurs V et VIII de la coagulation et indirectement, par l’intermédiaire de ponts calciques, les facteurs vitamine K-dépendants (particulièrement les facteurs IX et X). Le FP3 est donc un support physique de la coagulation sur lequel vont se concentrer un grand nombre de facteurs de coagulation, ce qui permet de nombreuses interactions accélérées entre ces molécules et donc une rapide génération de thrombine.

La membrane est aussi le support d’un grand nombre de glycoprotéines (GP).⁶⁴ Ces GP jouent un rôle dans la structure de la plaquette, un rôle fonctionnel de récepteur vis à vis un certain nombre de molécules et un rôle de répulsion, la partie extérieure des GP étant riche en acide sialique et donc chargée négativement.

3.1.2. Le complexe GP IIb/IIIa

Le complexe GP IIb/IIIa, un récepteur hétérodimérique à la surface des plaquettes, joue un rôle fondamental dans l’agrégation plaquettaire. Il possède en effet plusieurs sites de liaison pour le fibrinogène, qui sont découverts suite à l’activation plaquettaire. Le fibrinogène peut ainsi former des ponts entre les complexes GP IIb/IIIa des plaquettes adjacentes. Ces complexes, une fois activés, fixent aussi d’autres protéines adhésives telles que la fibronectine, la vitronectine et le facteur von Willebrand (FvW).⁶⁵ Ces 4 molécules ont en commun une séquence peptidique Arginine-Glycine-Acide aspartique-Sérine (RGDS) par laquelle elles se fixent au complexe GP IIb/IIIa.^{66,67} Dernièrement, la recherche pharmaceutique a été très active au niveau des antagonistes des récepteurs GP IIb/IIIa, avec le développement d’anticorps, de peptides ou de substances non-peptidiques. Ces molécules font compétition au fibrinogène en se fixant sur le complexe GP IIb/IIIa et exercent un

effet anti-agrégant particulièrement recherché dans les pathologies comme l'AI et l'IM.

3.1.3. Les microtubules et les microfilaments

Les microtubules, des structures rigides formées de microfilaments, sont responsables de la forme discoïdale de la plaquette au repos.⁶⁸ Normalement sous forme polymérisée, ils se dépolymérisent après l'activation plaquettaire. Cette dépolymérisation entraîne un changement de conformation des plaquettes et la formation de pseudopodes.⁶⁹ Tout comme les molécules contractiles des CML, ces microfilaments sont constitués, entre autres, d'actine et de myosine qui se polymérisent en présence de calcium.^{70,71}

3.1.4. Le système tubulaire dense

Le système tubulaire dense consiste en des réservoirs d'ions calciques. Lorsque les plaquettes sont activées, ces ions sont libérés dans le cytoplasme.^{72,73} Ces réservoirs sont également le site de synthèse des prostaglandines.⁷⁴

3.1.5. Les granules plaquettaires

Les plaquettes présentent des granules à leur surface. On retrouve entre autre des granules denses (4 à 6/plaquette) qui renferment du Ca^{2+} .⁷⁵ Le Ca^{2+} , libéré de ces granules suite à l'activation plaquettaire, intervient dans la formation de ponts de fibrinogène entre les plaquettes. On retrouve aussi dans les granules denses de l'adénosine diphosphate (ADP),⁷⁵ molécule fortement impliquée dans l'agrégation plaquettaire, ainsi que de la sérotonine, qui a un effet vasoconstricteur lorsque libérée dans le sang.^{76,77} Outre les granules denses, on retrouve également des granules α . Ceux-ci sont un peu plus nombreux et contiennent une grande diversité de molécules. Mentionnons principalement la β -thromboglobuline,⁷⁸ le facteur plaquettaire 4 (capable de neutraliser l'héparine),⁷⁸ des protéines adhésives (fibrinogène, fibronectine, thrombospondine, FvW),⁷⁹ ainsi que le PDGF.⁸⁰ Tel que mentionné plus

tôt, le PDGF serait responsable de la migration de CML dans la néo-intima du vaisseau lésé et ainsi que de leur prolifération subséquente. Le facteur V, qui intervient dans l'activation de la coagulation, se retrouve également à l'intérieur de ces granules (Figure 2, page 15).⁸¹



FIGURE 2 : Plaquette sanguine

Photographie d'une plaquette sanguine effectuée au microscope électronique. Les points sombres à la surface de la plaquette sont des granules α et des granules denses. Ceux-ci contiennent une variété de médiateurs tel que de l'ADP, du calcium et de la sérotonine. Sous la forme activée, les plaquettes libèrent le contenu de ces granules et stimulent le processus de coagulation, d'agrégation de même que l'amplification de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire subséquente.

Tiré du site Internet www-medlib.med.utah.edu/WebPath/ATHHTML/ATH034.html

3.2. Séquence de réactions de la cascade plaquettaire

3.2.1. Adhésion plaquettaire

L'adhésion plaquettaire consiste principalement en l'accolement des plaquettes à la surface sous-endothéliale et constitue la première réaction morphologiquement observable de la séquence des réactions plaquettaires (Figure 3, page 17).⁸² Lors d'un bris vasculaire, suite à la dénudation de l'endothélium, les plaquettes adhèrent rapidement et fermement aux structures conjonctives de la matrice sous-endothéliale et plus particulièrement au collagène exposé à la surface des cellules endothéliales.⁸³ C'est en effet le collagène, ainsi que d'autres fibres conjonctives, qui provoquent l'accolement des plaquettes à la brèche vasculaire. Les plaquettes adhèrent d'abord au collagène exposé via leurs récepteurs plaquettaires GP Ia/IIa⁸³ et ce premier contact se nomme l'adhésion primaire. Cette adhésion primaire entraîne l'activation des récepteurs membranaires des plaquettes et a pour effet de provoquer un rapide changement de forme: des pseudopodes se développent et la plaquette prendra éventuellement une forme sphérique hérissée de pseudopodes.⁸⁴ La plaquette s'étale et peut alors couvrir une plus grande surface de tissus conjonctifs.

Par la suite, le FvW et la fibronectine multiplient les liens entre la plaquette, le collagène et les autres substances conjonctives de la paroi vasculaire (adhésion secondaire irréversible).⁸⁵ Dans l'adhésion secondaire, le FvW agit en effet comme un cofacteur essentiel à l'adhésion des plaquettes au collagène et aux autres structures conjonctives du sous-endothélium. Il établit des ponts entre, d'une part, le collagène et d'autre part, des GP Ib de la surface plaquettaire.⁸⁶ Ces dernières, combinées aux GP IX et GP V, transmettent des signaux d'activation intracellulaire lorsque stimulées par le FvW.

L'adhésion des plaquettes au sous-endothélium augmente en fonction des forces de cisaillement, de la vitesse d'écoulement du sang au niveau de la paroi et également en fonction de la concentration en hématies et en plaquettes. La formation de points de

stagnation, au niveau des courbures, des bifurcations et des points de turbulence, perturbent le flux laminaire et contribuent ainsi au risque d'adhésion plaquettaire.⁶¹ Ces facteurs entraînent une plus grande adhésion et activation des plaquettes, ce qui favorise la thrombogénèse.



FIGURE 3 : Adhésion plaquettaire

Photographie de plaquettes adhérent à des cellules endothéliales endommagées, prise au microscope électronique. L'adhésion des plaquettes se produit lorsque ces dernières sont exposées aux constituants de la matrice sous-endothéliale, particulièrement au collagène. Cette matrice est dénudée et exposée au sang circulant suite à une rupture de la paroi vasculaire.

Tiré du site Internet <http://greenfield.fortunecity.com/rattler/46/blood.htm>

3.2.2. Activation plaquettaire

Lors de l'adhésion plaquettaire, l'étalement des plaquettes permet une augmentation du nombre de récepteurs plaquettaires activés par le collagène. Cette augmentation du nombre de récepteurs activés entraîne une amplification de l'activation des plaquettes qui vont éventuellement sécréter des substances agrégantes, procoagulantes ou régulatrices.⁸⁷ L'activation plaquettaire comprend de nombreuses réactions morphologiques et biochimiques qui découlent de l'action d'agonistes primaires, comme le collagène et la thrombine, sur les récepteurs membranaires des plaquettes. Plusieurs autres médiateurs chimiques vont également être impliqués dans l'activation plaquettaire, dont le Ca^{2+} , le PDGF, le fibrinogène, la thromboxane A_2 (TXA_2), la sérotonine, l'épinéphrine et l'ADP.⁶⁵

La phase initiale d'activation plaquettaire est d'abord induite par la liaison de la thrombine à des récepteurs plaquettaires spécifiques. Les récepteurs GP V, en particulier, semblent impliqués dans la stimulation des plaquettes par la thrombine.⁸⁸ La liaison de la thrombine à un récepteur GP V aurait pour conséquence d'induire une cascade de transduction du signal. Le récepteur à la thrombine, couplé à une protéine G, active la phospholipase C- δ (PLC- δ). Cette dernière agit par l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2), menant ainsi à la formation d'inositol triphosphate (IP_3) et de diacylglycerol (DAG). L' IP_3 induit la libération du Ca^{2+} intracellulaire tandis que le DAG active la protéine kinase C (PKC).⁸⁹

Un des nombreux effets de la PKC consiste en la phosphorylation et l'activation d'une protéine spécifique de 47 000 daltons (*pleckstrin*). Une fois activée, cette protéine semble induire la libération des constituants des granules plaquettaires comme l'ADP, la sérotonine, le facteur V, le fibrinogène, le FvW et la fibronectine, qui sont alors captés de façon sélective par divers récepteurs.⁹⁰

La présence de collagène, auquel les plaquettes adhèrent via les GP Ia/IIa, ainsi que la libération du Ca^{2+} intracellulaire, ont également pour effet d'activer la phospholipase

A₂ (PLA₂).⁹⁰ Cette activation mène à l'hydrolyse des phospholipides membranaires et à la libération d'acide arachidonique. Sous l'effet de l'acide arachidonique, on note une augmentation de la production et la libération subséquente de thromboxane A₂, un activateur plaquettaire qui agit via la voie PLC- δ . Finalement, la libération de Ca²⁺ intracellulaire active également l'enzyme *myosin light chain kinase* (MLCK). Lorsque activée, cette enzyme phosphoryle la chaîne légère de myosine, permet l'interaction avec l'actine, et résulte en l'altération de la morphologie et de la mobilité des plaquettes.⁹¹

3.2.3. Agrégation plaquettaire

Suite à l'activation plaquettaire et à la sécrétion de substances régulatrices, on peut observer un changement de conformation qui permet l'expression de près de 50 000 récepteurs à la surface membranaire.⁹² Ces récepteurs, qui sont le résultat de la réunion et de l'activation des GP IIb et GP IIIa, couvrent 50% de la surface plaquettaire et sont la structure de base de la voie finale de l'agrégation plaquettaire. Cette agrégation se produit en deux phases : la première phase, l'agrégation primaire, est réversible tandis que la deuxième, l'agrégation secondaire, est irréversible et fait suite à la sécrétion intense d'agents pro-agrégants. C'est l'ADP, sécrétée par les granules lors de l'activation plaquettaire, qui entraîne une modification de la membrane plaquettaire permettant au fibrinogène d'adhérer à deux complexes GP IIb/IIIa sur des plaquettes adjacentes.⁹³ Cette modification a ainsi pour conséquence une agrégation plaquettaire solidifiée par le fibrinogène.

L'agrégat de plaquettes, ou thrombus blanc, formé à la suite de cette série de réactions a donc pour but de colmater rapidement la brèche vasculaire et de faire cesser l'hémorragie. Cependant, bien que le processus soit assez rapide, le thrombus blanc est instable et peut se désagréger facilement par autolyse ou phagocytose. C'est à ce moment que prend toute l'importance de la cascade de la coagulation, qui est également démarrée suite à une rupture de plaque d'athérosclérose.

4. LA CASCADE DE LA COAGULATION

La conversion de fibrinogène soluble en fibrine insoluble, de même que la production de thrombine, sont le résultat d'une cascade de réactions coordonnées et régulées : la cascade de la coagulation, un amplificateur biologique.⁹⁴ Le thrombus blanc, dont nous avons vu les étapes de formation plus tôt, doit en effet être stabilisé par la thrombine et la fibrine. Cette stabilisation donne lieu à la formation d'un thrombus fibrinoplaquettaire.

4.1. Molécules de la cascade de la coagulation

Les réactions constituant la cascade de la coagulation se déroulent essentiellement à la surface des membranes plaquettaires et impliquent une dizaine de protéines plasmatiques. Celles-ci interagissent entre elles et avec les surfaces cellulaires procoagulantes à l'aide d'ions calciques. L'identification des protéines impliquées dans la coagulation a mené au modèle de cascade décrit par MacFarlane, en 1964,⁹⁵ puis par Davie et Ratnoff.⁹⁶ Ce modèle, basé sur les connaissances actuelles de la coagulation, implique que les protéines plasmatiques de la coagulation circulent normalement sous leur forme inactive et sont séquentiellement activées en sérines protéases par clivages spécifiques, par des serpinines, en réponse à un dommage vasculaire.

Les protéines participant à la coagulation peuvent se diviser en trois grands groupes :⁹⁷ le premier inclut les protéines procoagulantes requises pour la formation de la fibrine (majoritairement des sérines protéases : facteurs VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa et thrombine), qui contiennent en leur site actif enzymatique une triade catalytique (sérine, histidine et acide aspartique).¹⁰³ Outre les sérines protéases, le premier groupe inclut également des protéines structurales comme le fibrinogène et des cofacteurs (des cofacteurs plasmatiques, les facteurs V et VIII, et un cofacteur cellulaire, le facteur tissulaire).⁹⁸ Le deuxième groupe de protéines inclut les protéines régulatrices anticoagulantes. Celles-ci régularisent la coagulation à plusieurs niveaux de la

cascade en inhibant en partie son état d'activation dans des conditions physiologiques normales^{99,100} et également en localisant le thrombus au site de dommage vasculaire. On retrouve dans ce groupe la protéine C (sérine protéase), la protéine S, la thrombomoduline, l'antithrombine III (A-III), le cofacteur héparinique II,¹⁰¹ de même que l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire.¹⁰² Finalement, le troisième groupe comprend les éléments du système fibrinolytique. Ces éléments sont la plasmine (sérine protéase), ses activateurs physiologiques, soit l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'urokinase (u-PA), et des serpins régulatrices (α_2 -antiplasmine et les inhibiteurs des activateurs du plasminogène) (Tableaux 1 et 2, pages 22 et 23).

TABLEAU I : Classification fonctionnelle des facteurs de coagulation

Zymogènes de Sérines Protéases	Activités
Facteur XII	Se lie au collagène exposé au site de dommage vasculaire; activé par le kininogène de haut poids moléculaire et la kallikréine
Facteur XI	Activé par le facteur XIIa
Facteur IX	Activé par le facteur XIa en présence de Ca^{2+}
Facteur VII	Activé par la thrombine en présence de Ca^{2+}
Facteur X	Activé à la surface des plaquettes activées par le complexe tenase et par le facteur VIIa en présence du facteur tissulaire et de Ca^{2+}
Facteur II	Activé à la surface des plaquettes activées par le complexe prothrombinase
Cofacteurs	Activités
Facteur VIII	Activé par la thrombine; le facteur VIIIa est un cofacteur dans l'activation du facteur X par le facteur IXa
Facteur V	Activé par la thrombine; le facteur Va est un cofacteur dans l'activation de la prothrombine par le facteur Xa
Facteur III (facteur tissulaire)	Glycoprotéine de surface cellulaire sous-endothéliale agissant comme un cofacteur pour le Facteur VII
Fibrinogène	Activité
Facteur I	Clivé par la thrombine pour former un caillot de fibrine
Transglutaminase	Activité
Facteur XIII	Activé par la thrombine en présence de Ca^{2+} ; stabilise le caillot de fibrine par des liens covalents
Protéines régulatrices et autres	Activités
Protéine C	Activée en protéine Ca par la thrombine liée à la thrombomoduline; dégrade les facteurs VIIIa and Va
Protéine S	Agit comme co-facteur de la protéine C
Von Willebrand Factor	Sert de lien entre les récepteurs GP Ib/IX et le collagène
Antithrombine III	Contrôle l'activité de la thrombine et des facteurs IXa, Xa, XIa, XIIa
Thrombomoduline	Protéine à la surface des cellules endothéliales; se lie à la thrombine, permettant ainsi l'activation de la protéine C

Tiré du site Internet www.ulg.ac.be/physioan/chapitre/ch2s5.htm#5.2.

TABLEAU II : Facteurs de coagulation primaires

Facteur	Nom commun	Voies d'activation
I	Fibrinogène	Extrinsèque et Intrinsèque
II	Prothrombine	Extrinsèque et Intrinsèque
III	Facteur tissulaire	Extrinsèque
IV	Calcium	Extrinsèque et Intrinsèque
V	Proaccéléline	Extrinsèque et Intrinsèque
VI (Va)	Accéléline	-
VII	Proconvertine, accélérateur de la conversion de la prothrombine sérique	Extrinsèque
VIII	Facteur A antihémophilique, globuline antihémophilique (AHG)	Intrinsèque
IX	Facteur de Christmas, Facteur B antihémophilique	Intrinsèque
X	Facteur Stuart-Prower	Extrinsèque et Intrinsèque
XI	Plasma thromboplastin antecédent (PTA)	Intrinsèque
XII	Facteur de Hageman	Intrinsèque
XIII	Protransglutamidase, Facteur stabilisant la fibrine (FSF), fibrinogénase	Extrinsèque et Intrinsèque

Tiré du site Internet www.ulg.ac.be/physioan/chapitre/ch2s5.htm#5.2.

4.2. Activation de la cascade de la coagulation

L'activation de la cascade de la coagulation, telle que décrite de façon traditionnelle, peut se faire par deux voies : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Figure 5, page 26). Bien que ces deux voies soient déclenchées par des mécanismes distincts, les deux convergent en une voie commune menant à la formation du thrombus.¹⁰³ La voie intrinsèque est initiée par l'activation du facteur XII (activation de contact) et se mesure en laboratoire par le temps de céphaline activée (aPTT). La voie extrinsèque est initiée par le facteur tissulaire et le facteur VII et se mesure par le temps de prothrombine. Les deux voies sont complexes et impliquent différents facteurs de coagulation. À l'étape finale, la fibrine forme une capsule enveloppant l'agrégat plaquettaire, ce qui retient les plaquettes superficielles et solidifie l'agrégat.

4.2.1 La voie intrinsèque

La voie intrinsèque de la coagulation nécessite les facteurs de coagulation VIII, IX, X, XI, et XII, la prékallikréine (PK), le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), du Ca^{2+} et des phospholipides sécrétés par les plaquettes.¹⁰³ Chacun de ces constituants mènent à la conversion du facteur X (forme inactive) en facteur Xa (la lettre *a* signifiant active).

L'assemblage de certains composants de la voie intrinsèque (PK, KHPM, facteurs XI et XII) résulte en la conversion de la PK en kallikréine, ce qui entraîne l'activation du facteur XII en facteur XIIa. Le facteur XIIa agit par rétroaction positive sur la PK, par hydrolyse, et active le facteur XI en facteur XIa.¹⁰³ L'activation de ce facteur permet la libération de bradykinine, un puissant vasodilatateur, à partir de la KHPM. En présence de Ca^{2+} , le facteur XIa active le facteur IX en facteur IXa. Le facteur IXa va à son tour activer le facteur X en facteur Xa par clivage d'un lien interne arginine-isoleucine.

Cependant, cette activation du facteur X nécessite également l'assemblage, à la surface des plaquettes activées, d'un complexe *tenase* (Ca^{2+} et facteurs VIIIa, IXa et X).¹⁰⁴ En réponse à l'activation, les plaquettes exposent à leur surface de la phosphatidylsérine et de la phosphatidylinositol. L'activation du facteur VIII en facteur VIIIa se fait en présence de thrombine et l'exposition de ces phospholipides permet la formation du complexe *tenase*. Le facteur VIIIa agit alors comme un récepteur pour les facteurs IXa et X. Lorsque la concentration en thrombine augmente, le facteur VIIIa est ultimement clivé par celle-ci et inactivé. Cette double action de la thrombine sur le facteur VIII permet de limiter l'extension de la formation du complexe *tenase*, et par le fait même, l'extension de la cascade de la coagulation.

4.2.2. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est quant à elle initiée au site lésé, où il y a rupture de plaque, en réponse à la libération du facteur III, également appelé facteur tissulaire (FT). Le FT est un co-facteur impliqué dans l'activation du facteur X.¹⁰⁵ Cette activation est catalysée par le facteur VIIa, circulant dans le plasma en petite quantité sous forme activée et qui agit en activant le facteur X en facteur Xa. Par la suite, l'amplification de l'activation du facteur VII s'effectue sous l'action de la thrombine. L'inhibition de la voie extrinsèque peut se faire au niveau du complexe FT - facteur VIIa - Ca^{2+} - facteur Xa par liaison avec l'inhibiteur de la voie extrinsèque de la coagulation, également connu sous le nom de protéine LACI (*Lipoprotein-associated coagulation inhibitor*).

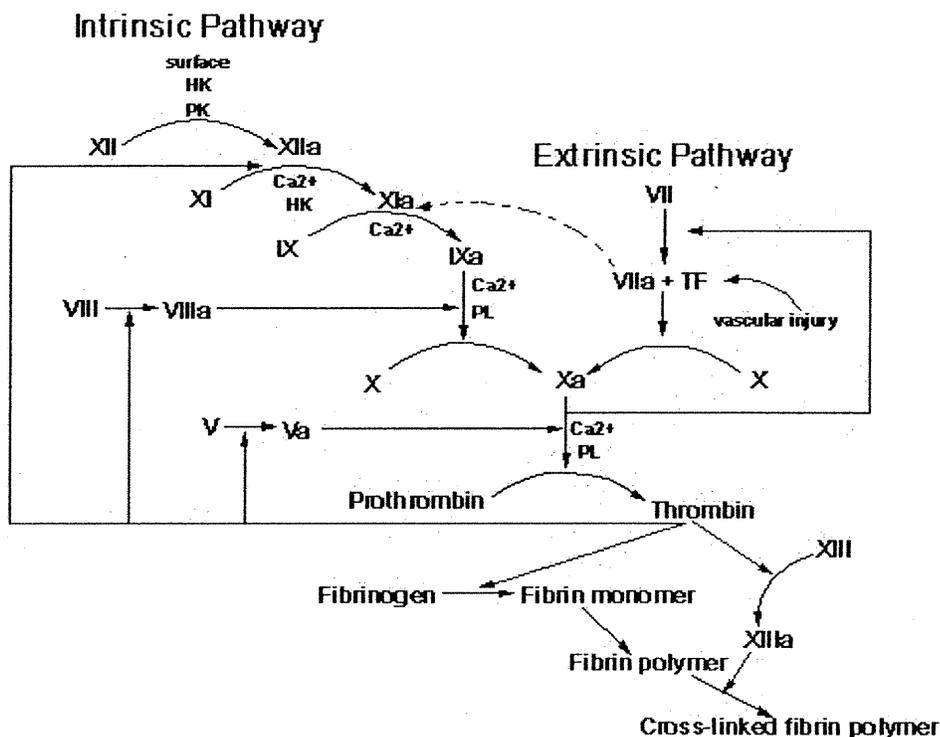


FIGURE 5 : Voies de la coagulation

La voie intrinsèque est initiée par le contact entre des éléments du sang et la surface des cellules endothéliales. La voie extrinsèque est initiée suite à un dommage vasculaire qui entraîne l'exposition du facteur tissulaire (aussi identifié comme le facteur III), une glycoprotéine de surface sur les cellules endothéliales qui se lie aux phospholipides. Les deux voies convergent vers l'activation du facteur X en facteur Xa. Ce dernier sera impliqué dans l'activation subséquente du facteur VII en facteur VIIa et également l'hydrolyse et l'activation de la prothrombine en thrombine. La thrombine ira par la suite activer les facteurs VIII et V, amplifiant ainsi la cascade de la coagulation. Le rôle ultime de la thrombine est cependant la conversion du fibrinogène en fibrine et l'activation du facteur XIII en facteur XIIIa. Ce dernier, une transglutaminase va se lier aux polymères de fibrine et solidifier le thrombus.

Tiré du site <http://greenfield.fortunecity.com/rattler/46/blood.htm>

4.2.3. Convergence des deux voies d'activation

Tel que mentionné plus tôt, les deux voies de la coagulation (intrinsèque et extrinsèque) convergent vers l'activation du facteur X (facteur Xa). Ainsi, suite à son activation par le complexe FT-facteur VIIa (voie extrinsèque) et par le facteur IXa (voie intrinsèque), le facteur Xa active la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa). La thrombine convertit à son tour le fibrinogène (facteur I) en fibrine (facteur Ia). L'activation de la thrombine a lieu à la surface des plaquettes activées et nécessite la formation du complexe prothrombinase.¹⁰⁶ Ce complexe est composé de phospholipides plaquettaires (phosphatidylinositol et phosphatidylserine), de Ca^{2+} , des facteurs Va et Xa, et de prothrombine. Le facteur V est un co-facteur dans la formation du complexe prothrombinase et est activé en facteur Va par des petites quantités de thrombine et inactivé par l'augmentation de la concentration de cette dernière. Le facteur Va se lie à des récepteurs spécifiques à la surface des plaquettes activées et forme un complexe avec la prothrombine et le facteur Xa. La prothrombine est clivée par le facteur Xa à l'intérieur même du complexe prothrombinase et donne la thrombine.

Bien que le modèle de coagulation décrit ci-haut soit encore utilisé pour décrire le processus de coagulation *in vitro*, il s'avère quelque peu simplifié. Ce modèle classique postule que les deux voies interagissent seulement au niveau du facteur X, tandis qu'en réalité, les deux voies seraient très interdépendantes.¹⁰⁷ En effet, une interaction majeure semble induite par le complexe FT-facteur XIIa, qui peut non seulement activer le facteur X (voie extrinsèque) mais également le facteur IX, lequel contribue à l'activation du facteur X (voie intrinsèque). Ainsi, il semble que le processus d'activation *in vivo* serait principalement initié par le complexe FT-facteur VIIa.

4.3. Conversion du fibrinogène en fibrine

Le fibrinogène consiste en 3 paires de polypeptides à deux chaînes ($[A-\alpha][B-\beta][\gamma]_2$).^{108,109} Les 6 chaînes sont reliées de façon covalente par des ponts disulfures près de leur partie N-terminale. Ces régions N-terminales des fibrinopeptides contiennent plusieurs résidus glutamate et aspartate leur procurant une forte charge négative et aident à la solubilisation du fibrinogène dans le plasma. Dans la conversion du fibrinogène en fibrine, les portions N-terminales des chaînes A- α et B- β , également appelées les fibrinopeptides A et B, sont clivées de façon simultanée par la thrombine, résultant en la formation d'un monomère de fibrine et en l'exposition de 2 domaines, D (en partie C-terminale) et E (en partie N-terminal). Étant donné que ces deux domaines sont de charges opposées, leur exposition résulte en une polymérisation spontanée des monomères de fibrine, formant en premier lieu des dimères de fibrine, puis des longs protofibrilles de fibrine, et enfin, des larges fibres de fibrines enlacées à même le caillot.¹¹⁰ En plus de la conversion du fibrinogène en fibrine, la thrombine convertit le facteur XIII en facteur XIIIa, une transglutaminase hautement spécifique qui entraîne des liaisons croisées composées de liens covalents entre l'amide nitro des groupes glutamine et le groupe e-amino des résidus de lysine dans les monomères de fibrinopeptides.

4.4. Régulation de la coagulation par la thrombine

La thrombine, en plus d'activer la formation d'un thrombus de fibrine, joue un rôle important dans la régulation de la coagulation.¹¹¹ Elle se combine avec la thrombomoduline présente à la surface des cellules endothéliales et forme un complexe qui convertit la protéine C en protéine Ca. Cette protéine, avec la protéine S (cofacteur), dégrade les facteurs Va et VIIIa, limitant ainsi l'activité de ces deux facteurs dans la cascade de la coagulation. L'activation de la thrombine est régulée par 4 inhibiteurs spécifiques de la thrombine, l'A-III étant l'inhibiteur le plus important agissant aussi sur les facteurs IXa, Xa, XIa et XIIa.¹¹² L'activité de la

thrombine peut aussi être inhibée par l' α_2 -macroglobuline, le cofacteur II de l'héparine ainsi que l' α_1 -antitrypsine.

5. SYSTÈME FIBRINOLYTIQUE

5.1. Rôle et composants du système fibrinolytique

La cascade de la coagulation amenant la formation du thrombus est normalement suivie de la quatrième phase de la coagulation, nommée la fibrinolyse. La fibrinolyse se définit comme un processus physiologique par lequel la plasmine dégrade la fibrine contenue dans un thrombus. Cette phase de lyse du thrombus commence normalement au bout de 24 heures et ne se termine pas avant 72 heures.¹¹³ Ce processus permet de restaurer la perméabilité coronarienne et de rétablir le flot sanguin. Le système fibrinolytique joue donc un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie et un déséquilibre entre l'activité pro-fibrinolytique et l'activité pro-coagulante peut entraîner des conséquences pathologiques, comme l'IM.¹¹⁴

Globalement, on considère que le système fibrinolytique est constitué du plasminogène (Plg), des activateurs du Plg, soit le t-PA et le u-PA, de trois inhibiteurs du Plg, les inhibiteurs 1 et 2 (PAI-1 et 2) et de l'inhibiteur de la plasmine, l' α_2 -antiplasmine.¹¹⁵⁻¹¹⁸ La plasmine est formée sous l'influence d'activateurs tissulaires et plasmatiques à partir d'un précurseur, le Plg, déjà contenu dans le thrombus. Par la suite, la plasmine est inactivée par des antiplasmines.

5.1.1. *Le plasminogène et la plasmine*

Le Plg, une chaîne unique de GP à 791 acides aminés,¹¹⁹ est une proenzyme inactive qui, sous l'action de certaines molécules (activateurs du Plg), est convertit en sérine protéase active, la plasmine. Cette conversion s'effectue par clivage du lien peptidique liant l'arginine 560 à la valine 561 et donne lieu à une molécule de plasmine à deux chaînes: une chaîne lourde (A) et une chaîne légère (B).^{120,121} Le Plg

contient des sites de liaison à la lysine qui se retrouvent sur la chaîne A de la molécule de plasmine.¹²² Ces sites de liaison sont impliqués dans l'interaction de la plasmine avec la fibrine et l' α_2 -antiplasmine et sont considérés essentiels dans la régulation de la fibrinolyse.^{123,124} La plasmine est une enzyme peu sélective et dégrade une grande variété de protéines plasmatiques (fibrine, fibrinogène, facteurs V et VIII) et de GP de surface cellulaire (thrombospondine, fibronectine). Elle peut également moduler la réponse plaquettaire par son action inhibitrice ou par son action agoniste sur l'activation des plaquettes.

5.1.2. Les activateurs du plasminogène

Les activateurs du Plg peuvent agir via trois voies différentes de la coagulation : la voie intrinsèque (système contact-dépendant), la voie extrinsèque (t-PA et u-PA-dépendant) et la voie exogène (activateurs pharmacologiques).¹²⁵

Comme nous l'avons vu précédemment, la voie intrinsèque est initiée par l'interaction du plasma avec des surfaces chargées négativement.^{126,127} Cependant, les molécules de cette voie (la kallikréine, le facteur XIa et le facteur XIIa) participent également à la conversion du Plg mais ne contribueraient que pour environ 15% de l'activité totale des activateurs du Plg.¹²⁷

Dans la voie extrinsèque, au moins deux activateurs du Plg ont été décrits : le t-PA et le u-PA. Le t-PA est principalement sécrété par les cellules endothéliales, après induction par différents agents tels que la thrombine, l'histamine, la bradykinine, l'épinéphrine et plusieurs autres¹²⁸ tandis que le u-PA est synthétisé dans les reins et les cellules endothéliales (en culture).^{129,130} Le t-PA inactif est relâché par les cellules endothéliales vasculaires suite à une perte d'intégrité de la paroi vasculaire. Il se retrouve sous forme active après sa liaison avec la fibrine. Du u-PA est d'abord produit sous forme inactive, la pro-urokinase, par des cellules épithéliales délimitant les canaux excrétoires. Son rôle consiste à activer la dissolution des caillots de fibrine pouvant se déposer dans ces canaux.

Dans la voie exogène, le Plg est activé par différents agents thrombolytiques. Ceux-ci incluent les enzymes protéolytiques agissant directement sur la fibrine (plasmine et protéase d'*Aspergillus*) et les médicaments capables d'activer le Plg, soit directement (saruplase, urokinase, alteplase), ou indirectement (streptokinase [SK]).

5.1.3. Les inhibiteurs du plasminogène et de la plasmine

Environ 10 % des protéines plasmatiques sont des inhibiteurs de protéases¹³¹ et plusieurs font partie de la famille des serpins (des inhibiteurs de sérines protéases). Ces molécules agissent via un mécanisme d'action qui consiste en la formation irréversible de complexes via le site actif des sérines protéases cibles. Une fois le complexe formé, les deux molécules perdent leurs activités respectives. L'inhibition du système fibrinolytique peut se faire au niveau des activateurs du Plg, par les inhibiteurs des activateurs de Plg (PAI-1 et PAI-2) ou par inhibition de la plasmine, principalement par l' α_2 -antiplasmine et l' α_2 -macroglobuline.

5. 1.3.1. Les inhibiteurs de types 1 et 2 de l'activateur du plasminogène

Le PAI-1 serait le plus important modulateur du système fibrinolytique, contribuant pour 60% de l'action totale des inhibiteurs présents dans le plasma.¹³² Bien qu'il existe d'autres types de PAI, seuls PAI-1 et PAI-2 sont des éléments critiques dans la fibrinolyse.^{133,134} PAI-1 est un inhibiteur agissant rapidement sur le t-PA et le u-PA. Par contre, il peut lui-même être inhibé par la protéine C activée, la thrombine et certains agents oxydants. Les concentrations sanguines en PAI-1 sont généralement basses mais peuvent augmenter de façon significative dans plusieurs conditions, incluant les maladies cardiaques de nature ischémique.¹³⁵ Les cellules endothéliales et les plaquettes constitueraient les principales sources de PAI-1.^{136,137} Les fonctions physiologiques de PAI-2 ne sont pas entièrement comprises puisque ses substrats principaux, le u-PA et le t-PA, sont des enzymes extracellulaires et que PAI-2 agit de façon locale au niveau intracellulaire.

5.1.3.2. Les inhibiteurs de la plasmine

Parmi les inhibiteurs de sérines protéases, seule l' α_2 -antiplasmine, une serpine de 452 acides aminés, inactive directement la plasmine présente dans le sang.¹³⁸ Cette molécule interagit rapidement avec la plasmine libre, formant tout d'abord un complexe stœchiométrique inactif mais réversible, lequel est lentement converti en complexe irréversible. L' α_2 -antiplasmine interfère également de façon compétitive avec la liaison du Plg à la fibrine et offre ainsi une protection contre la lyse prématurée.¹³⁹ Cette molécule est l'inhibiteur de la plasmine le plus abondant et le plus actif. Elle est synthétisée par les hépatocytes et est également un constituant des granules α des plaquettes.^{140,141} Bien que la contribution des plaquettes soit plutôt mineure, elle prend plus d'importance dans la régulation de la fibrinolyse au niveau des thrombi riches en plaquettes.

L' α_2 -macroglobuline, une protéine dimérique synthétisée par les cellules endothéliales et les macrophages, se retrouve également dans les granules α des plaquettes. On estime que son efficacité à neutraliser l'activité de la plasmine est d'environ 10% celle de l' α_2 -antiplasmine.¹⁴²

5.2. Rôle des plaquettes dans la fibrinolyse

Bien que le rôle des plaquettes dans la thrombogenèse soit bien établi, on connaît moins bien leur participation dans le processus fibrinolytique.^{143,144} Les plaquettes ont des effets anti et pro-fibrinolytiques et modulent la fibrinolyse en supportant et localisant le processus à même le thrombus.¹⁴⁵ Elles peuvent lier directement le Plg¹⁴⁶ et le t-PA¹⁴⁷ et potentialiser l'activation du Plg^{148,149} et la fibrinolyse.^{150,151} De plus, la plasmine liée aux plaquettes est protégée de l'inhibition par l' α_2 -antiplasmine. Les granules α des plaquettes contiennent également plusieurs substances telles que le PAI-1,¹³⁶ l' α_2 -antiplasmine,¹⁴¹ l' α_2 -macroglobuline,¹⁵² qui possèdent une action inhibitrice sur la fibrinolyse. L'activation des plaquettes peut atténuer la fibrinolyse coronarienne physiologique et pharmacologique par l'augmentation locale de la

concentration en PAI-1.¹⁵³ Cependant, cette régulation serait significative seulement de façon locale, à même le thrombus, puisque le PAI-1 n'est présent qu'en très petites quantités au niveau des granules α .¹⁵⁴

5.3. Dissolution du thrombus fibrino-plaquettaire

Lors du processus de la coagulation, le Plg se lie à la fibrine ainsi qu'au fibrinogène et se trouve donc incorporé au thrombus durant sa formation. Dans le processus de la fibrinolyse, le t-PA activé clive le Plg en plasmine. Cette dernière ira dégrader le thrombus de fibrine. Une fois la dégradation terminée, la plasmine et le Plg peuvent être rapidement inactivés par leurs inhibiteurs respectifs. La fibrinolyse est donc un phénomène normal du corps humain. Dans le cas de l'IM-ST, la présence de thrombose coronarienne chez plus de 80% des cas a ouvert la voie au développement des agents fibrinolytiques. Il s'agit alors de procéder à l'activation de la quatrième phase de la coagulation en dedans de délais plus rapides que la fibrinolyse physiologique.

6. TRAITEMENTS DE L'INFARCTUS AIGU DU MYOCARDE

La majorité des complications suite à un IM-ST dépendent de la taille de la zone infarctée. Cette zone augmente avec la durée de l'occlusion de l'artère coronaire par un thrombus.¹⁵⁵ Dans le but de limiter la taille de l'infarctus et de diminuer la mortalité et la morbidité qui y sont reliées, il est maintenant recommandé de préconiser l'approche thrombolytique de l'infarctus du myocarde.^{156,157} Dans la thrombose coronaire, les mécanismes de contrôle anti-thrombotiques sont surpassés par les effets pro-thrombotiques du dommage vasculaire. La tendance naturelle du système à se protéger par la formation d'un thrombus de fibrine n'est plus sous la régulation anti-thrombolytique et celui-ci se propage dans les artères coronaires.

6.1. Objectifs du traitement à l'urgence

Ainsi, on peut considérer que le traitement de l'IM-ST suit trois principes thérapeutiques. On cherche tout d'abord à rétablir le flot sanguin au myocarde¹⁵⁸ et à diminuer l'effort fourni par ce dernier. Le deuxième principe a pour objectif la réduction de l'ischémie et de l'extension potentielle de la zone infarctée. Finalement, on cherche à prévenir et éradiquer les arythmies potentiellement mortelles.¹⁵⁹ Avant de s'attarder plus longtemps à la fibrinolyse, nous verrons les mesures générales appliquées lors de l'admission hospitalière d'un patient en IM-ST.

6.2. Contrôle des douleurs

Le contrôle des douleurs associées à un IM-ST se fait généralement par la combinaison de nitrates, d'analgésiques comme la morphine, d'oxygène et de bloqueurs des récepteurs β -adrénergiques (β -bloqueurs). Les nitrates augmentent le flot sanguin coronarien par vasodilatation et diminuent la pré-charge ventriculaire par augmentation de la capacitance veineuse. Les β -bloqueurs sont régulièrement utilisés afin de limiter la taille de l'infarctus et prévenir les troubles du rythme. De plus, la douleur ischémique qui peut augmenter les déterminants de la consommation en oxygène du myocarde par activation du système nerveux sympathique est habituellement soulagée par la reperfusion coronarienne secondaire à une thérapie fibrinolytique. La douleur résiduelle peut être soulagée par les nitrates et des analgésiques narcotiques (ex. morphine).

6.3. Antithrombotiques et antiplaquettaires

Les antithrombotiques et antiplaquettaires sont utilisés afin d'inhiber la coagulation sanguine (Figure 6, page 36). L'aspirine semble particulièrement efficace et fait partie des premières mesures entreprises dans le traitement d'un IM-ST. L'aspirine agit comme inhibiteur de l'activation plaquettaire, par inhibition de l'activité de la cyclooxygénase, réduisant ainsi la production de TXA_2 .^{160,161} Elle réduit également la production, par les cellules endothéliales, de prostacycline (PGI_2), un inhibiteur de

l'agrégation plaquettaire et un vasodilatateur. L'aspirine est administrée par voie orale sous forme de comprimé, à raison de 80 à 325 mg par jour. L'héparine, un antithrombotique agissant sur l'A-III, est utilisée systématiquement par voie intraveineuse débutant par un bolus de 60 U par kilogramme par bolus, suivi d'une infusion de 12 U par kilogramme par heure.¹⁶² Pour les patients ayant un poids supérieur à 70 kilogrammes, le bolus maximal est de 4000 U et est suivi d'une infusion de 1000 U par heure. La vitesse de perfusion est adaptée selon le temps de céphaline activé pour obtenir des valeurs de 1.5 à 2 fois le contrôle.

Plusieurs antagonistes des récepteurs GP IIb/IIIa sont également de plus en plus utilisées, grâce aux connaissances grandissantes au niveau de l'implication des plaquettes dans la thrombogenèse. Ces molécules préviennent l'agrégation des plaquettes sanguines en se liant aux récepteurs GP IIb/IIIa et empêchent la néoformation de thrombus blanc dans les artères coronaires. Il a en effet été démontré que les thrombus riches en plaquettes, comme c'est le cas dans l'IM-ST, sont résistants à la fibrinolyse et que les plaquettes et la fibrine continuent de s'accumuler sur le thrombus malgré une fibrinolyse fonctionnelle.¹⁶³

6.4. Rétablissement du flot coronarien

Plusieurs efforts ont été déployés afin de limiter la taille de la zone infarctée dans l'IM-ST. Celle-ci est effectivement un déterminant important dans le pronostic des patients avec IM-ST, le taux de mortalité étant inférieur chez les patients avec une petite nécrose qui généralement ne développent pas de décompensation cardiaque.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ La limitation de la taille de nécrose peut être atteinte par le biais d'une reperfusion rapide. Tel que mentionné précédemment, bien que le processus de l'infarctus soit évolutif, il faut prendre conscience qu'après deux heures d'ischémie, déjà 50% du territoire est nécrosé. Le pronostic des patients avec IM-ST a donc été grandement amélioré grâce à la prise en charge précoce et à l'utilisation de la fibrinolyse intraveineuse (IV).

6.4.1. Agents fibrinolytiques

La limitation de la taille de l'infarctus se fait ainsi principalement par l'utilisation d'agents fibrinolytiques. Plusieurs grandes études cliniques randomisées ont démontré l'efficacité des agents fibrinolytiques (SK, anistreplase [APSAC], alteplase [rt-PA] et reteplase [r-PA]) dans le traitement de l'IM-ST.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ On peut en effet observer une réduction de mortalité significative par l'emploi de la fibrinolyse IV dans les premières heures suivant un IM. De façon générale, les agents fibrinolytiques agissent en convertissant le Plg en plasmine, ce qui permet une augmentation de la lyse du thrombus. Afin d'en retirer un maximum de bénéfices, ces agents doivent idéalement être administrés dans les 6 heures suivant le début des symptômes de l'IM-ST.¹⁷¹

Lorsqu'introduite dans la circulation systémique, l'alteplase (Activase®, Roche), une sérine protéase, se lie à la fibrine à même le thrombus et convertit le Plg en plasmine. Ce phénomène provoque une lyse locale tout en minimisant les effets systémiques. L'alteplase, qui a une demi-vie inférieure à 5 minutes, est rapidement éliminée (500 mL/min) de la circulation, principalement par le foie.¹⁷²

La reteplase (Retavase™, Crystaal) est une variante de l'alteplase dont l'action sur le Plg est stimulée par la présence de fibrine. Comparée à l'alteplase, la reteplase a une affinité inférieure pour la fibrine de même qu'une capacité catalytique inférieure *in vitro*.¹⁷³

L'anistreplase (Eminase®, Roberts) est un dérivé inactif bi-moléculaire composé de SK et de lys-plasminogène dans lequel le centre catalytique du complexe enzymatique est bloqué par un groupement p-anisoylé, lié par une réaction d'acylation.¹⁷⁴ Le composant lys-plasminogène de APSAC possède une plus grande affinité pour la fibrine que celle du glu-plasminogène natif, ce qui procure à APSAC une grande affinité pour la fibrine. L'activation de APSAC se fait d'abord selon un processus hydrolytique accompagné de la désacylation du groupement p-anisoylé. Après une administration IV, APSAC a un temps de demi-vie d'environ 94 minutes.

Finalement, la streptokinase (Streptase® HMR, Kabikinase® Pharmacia & Upjohn) est une protéine d'origine bactérienne produite par les streptocoques β -hémolytiques du groupe C. Cet agent thrombolytique est décrit plus en détail dans la prochaine section.

6.4.2. Administration des agents fibrinolytiques

Après avoir respecté les contre-indications, les différents agents fibrinolytiques peuvent être administrés selon leur protocole d'utilisation particulier. La SK se donne en perfusion sur 40 à 60 minutes alors que rt-PA est plutôt administré en bolus suivi d'une perfusion sur 90 minutes. APSAC se donne en injection sur 3 à 5 minutes et reteplase, en deux bolus espacés de 30 minutes. Outre les agents fibrinolytiques, il est également possible de procéder par angioplastie, ce qui est cependant moins utilisé. Ce projet d'étude concerne principalement l'utilisation de la SK et d'un antiplaquettaire de nouvelle génération dans le traitement de l'IM-ST.

7. LA STREPTOKINASE

7.1. Origine et pharmacologie

La SK est l'agent fibrinolytique le plus utilisé au Canada dans le traitement de l'IM-ST et son efficacité à réduire le taux de mortalité et de morbidité a effectivement été démontrée dans des essais cliniques, avec un meilleur taux de survie après l'administration du médicament.^{156,167} Utilisée depuis plusieurs décennies dans le traitement de l'IM-ST, c'est au début des années 1970 qu'un premier essai clinique prouvait son efficacité à réduire la mortalité reliée à l'IM-ST.¹⁷⁵ La SK est une protéine produite par les streptocoques β -hémolytiques du groupe C qui a la capacité de lyser les thrombi obstruant les artères coronaires.¹⁷⁶ Cette molécule consiste en une chaîne polypeptidique de 414 acides aminés d'un poids moléculaire de 47 000 à 50 000 daltons.^{177,178} Elle agit comme un activateur exogène indirect du système fibrinolytique en se liant avec avidité au Plg afin de produire un complexe activateur SK-Plg. Le complexe subit par la suite un changement de conformation qui résulte en l'exposition d'un site actif sur le Plg. Le site actif découvert catalyse l'activation du Plg en plasmine. Ainsi, le complexe SK-Plg est converti en complexe SK-plasmine. La plasmine et le complexe SK-plasmine peuvent alors dégrader le fibrinogène et d'autres protéines plasmatiques impliquées dans la formation du thrombus. De plus, les complexes SK-Plg et SK-plasmine ne semblent pas être inhibés par l' α_2 -antiplasmine, un inhibiteur important de la plasmine.¹⁷⁹ La plasmine libre, contrairement à la plasmine complexée à la SK, est incapable d'activer le Plg et peut être rapidement inhibée par l' α_2 -antiplasmine. La SK, de par son action sur la plasmine, est donc associée à un état fibrinolytique systémique caractérisé par une hyperplasminémie, une diminution de l' α_2 -antiplasmine et la dégradation du fibrinogène, du facteur V et du facteur VIII.¹⁸⁰

7.2. Dosage

La dose conventionnelle de 1.5 millions d'unités (MU) de SK n'est pas basée sur des études dose-réponse, de mortalité, de fonction ventriculaire gauche ou de perméabilité coronarienne. Elle a plutôt été choisie pour sa capacité à causer un état lytique, défini par un taux de fibrinogène < 1.0 g/L, et pour contrer l'effet des anticorps anti-streptokinase détectables chez la plupart des patients. On estime en effet que 97% de la population atteint un état lytique à un tel dosage, bien que la dose minimale requise varie considérablement d'un individu à l'autre (de 300 000 U à 1 250 000 U).¹⁸¹ La concentration plasmatique de SK est maximale 2 à 3 minutes après son administration intraveineuse et l'activité fibrinolytique est optimale environ 30 minutes plus tard, dépendant de la dose administrée.¹⁸² Les études avec de la SK radioactive indiquent 2 vitesses d'élimination, avec un temps de demi-vie rapide d'environ 18 minutes, dû à l'action des anticorps anti-SK et un temps de demi-vie lent d'environ 83 minutes en absence d'anticorps anti-SK.¹⁸⁰ Environ 350 000 U de SK sont requises pour neutraliser les anticorps anti-SK circulants chez 95% des gens sains, avec des variations interindividuelles allant de 25 000 à 3 000 000 U.¹⁸¹ La dose de SK nécessaire à une fibrinolyse fonctionnelle dépend donc principalement des taux plasmatiques d'anticorps anti-SK et d' α_2 -antiplasmine et varie considérablement d'un individu à l'autre.

7.3. Efficacité

Malgré son utilisation très répandue et la nette amélioration dans la prise en charge des patients en IM-ST, la SK n'est cependant pas l'agent fibrinolytique parfait. D'une part, un flux coronarien normal (TIMI grade 3), défini par coronarographie 90 minutes après l'administration de SK, n'est obtenu que chez environ 60% des patients et d'autre part,¹⁸³ le taux de réocclusion de l'artère infarctée se situe à 16%.¹⁸⁴ De plus, des problèmes d'hémorragies sont reliés à l'agent fibrinolytique. Il a été mentionné qu'une reperfusion imparfaite et une réocclusion précoce suivant l'administration de SK pourraient être dues en partie à la présence d'anticorps anti-SK dans le plasma des

patients,^{185,186} ces mêmes anticorps qui étaient impliqués dans la détermination de la dose nécessaire de SK dans le traitement de l'IM-ST.

7.4. Les anticorps anti-streptokinase

7.4.1. Induction d'une réponse immunitaire

Tel que mentionné ci-haut, la présence d'anticorps anti-SK est un des facteurs dont on a tenu compte dans la détermination de la dose conventionnelle de SK. Ces anticorps peuvent être détectés suite à une infection aux streptocoques ou suite à un IM, après l'administration de SK. En effet, la SK étant une protéine d'origine bactérienne, elle a le désavantage d'induire une réponse immunitaire en entraînant la production d'anticorps spécifiques à la SK.

Les infections aux streptocoques sont fréquentes et des titres détectables, quoique mal caractérisés, sont choses courantes dans la population. Selon *Lynch et al.*, les anticorps anti-SK observés suite à un traitement à la SK seraient principalement des IgG, ce qui indique la présence d'une réponse immunitaire secondaire.¹⁸⁷ On présume ainsi que la première exposition à la SK, produisant une réponse immunitaire primaire, résulte d'une infection aux streptocoques. Par contre, suite à l'administration de SK, les titres augmentent rapidement et demeurent élevés pendant une durée indéterminée. Plusieurs auteurs constatent qu'une augmentation des titres d'anticorps anti-SK est généralement associée à une diminution de l'activité fibrinolytique de la SK *in vitro* (augmentation de la résistance à la SK),^{185,186,188,189} ce qui peut prédire une fibrinolyse moins efficace *in vivo*. Les titres de résistance à la SK, qui concordent généralement bien avec les taux d'anticorps anti-SK circulants, permettent également d'observer *in vitro* la résistance du plasma à la fibrinolyse et de prédire les risques de neutralisation *in vivo* de la SK par les anticorps anti-SK. Plusieurs études suggèrent ainsi que des quantités élevées d'anticorps anti-SK interfèrent défavorablement avec l'effet fibrinolytique de la SK et peuvent même causer une agrégation plaquettaire pouvant mener à la réocclusion.^{185,186}

7.4.2. Neutralisation de la streptokinase

La production d'anticorps anti-SK *in vivo* ainsi que leur comportement *in vitro* sont assez bien décrits dans la littérature. Ainsi, après l'administration classique de 1.5 MU, le taux d'anticorps anti-SK chute initialement puis réaugmente vers le 3^e ou 4^e jour pour atteindre des niveaux très élevés vers le 7^e jour.¹⁸⁷ La deuxième semaine suivant le traitement, le pic d'anticorps peut atteindre 20 à 200 fois le niveau pré-traitement. Selon Lee et *al.*, ces niveaux peuvent rester élevés jusqu'à 4 ans et demi.¹⁹⁰ Dans une autre étude, 51% des patients ayant reçu de la SK 48 mois précédemment présentaient une résistance à cet agent suffisante pour neutraliser une dose de 1.5 MU.¹⁹¹ Au moins 8 études montrent que les titres d'Ac anti-SK et/ou les titres de résistance demeurent élevés jusqu'à 54 mois suivant une première administration de streptokinase.^{187,188,190-192}

Plus récemment, Squire et *al.* ont mesuré les taux d'anticorps anti-SK neutralisant chez 219 sujets ayant reçu de la SK pour un IM-ST 12 à 90 mois précédemment.¹⁹² Le groupe contrôle consistait en 22 sujets ayant eu un IM-ST entre 73 et 84 mois mais n'ayant jamais été traités à la SK. Comparés au groupe contrôle, les taux d'anticorps anti-SK sont demeurés élevés sur toute la période de 12 à 90 mois post-SK. Les titres d'anticorps anti-SK corrélaient également de façon significative avec les titres de résistance (SKRT). Les auteurs estiment que la SK ne devrait pas être réadministrée dans les 90 mois suivant un premier traitement, même si les recommandations actuelles sont plutôt de 1 an seulement. Selon la majorité des auteurs, l'utilisation de la SK devrait même se limiter aux sujets n'ayant jamais reçu l'agent fibrinolytique par le passé et préféablement également, aux sujets ne présentant pas d'anticorps anti-SK, produits suite à une infection aux streptocoques.

Les anticorps anti-SK se lieraient à la SK et empêcheraient la formation des complexes activateurs SK-Plg et SK-plasmine. On estime également que les anticorps anti-SK, déjà présents chez certains patients et produits suite à une infection aux streptocoques, circulent probablement dans le sang en grande quantité. Par contre, les

titres d'anticorps anti-SK et la résistance à la SK suite à une infection aux streptocoques, comme une pharyngite aux streptocoques, ne semblent pas réellement connus.

7.4.3. Caractère pro-agrégant des anticorps anti-streptokinase

Outre leur capacité neutralisante, certains anticorps anti-SK présentent également des propriétés d'agrégation plaquettaire en présence de SK. Cette notion a été suspectée suite à une observation clinique chez un patient ayant reçu de la SK pour un IM-ST. Une extension paradoxale du thrombus intracoronarien, lors du traitement, a pu être démontrée par coronarographie et des analyses ultérieures ont permis de relier l'extension du thrombus aux propriétés particulières des anticorps anti-SK.¹⁸⁶ Par la suite, Vaughan et *al.* ont démontré que 38% des patients présentaient une agrégation plaquettaire intense en présence de SK, 7 jours post-SK.¹⁹³ De plus, 14% des volontaires présentaient une importante agrégation plaquettaire en présence de 5 000 U/ml de SK et les titres d'anticorps anti-SK et de résistance étaient significativement plus élevés chez ces mêmes sujets comparativement aux sujets avec un degré d'agrégation moindre. Dans d'autres études, 30% des sujets sains présentaient une agrégation plaquettaire intense en présence de 5 000 U/ml de SK.¹⁹⁴ Le mécanisme d'agrégation fait appel à la liaison des anticorps anti-SK à la SK complexée au Plg, suivi de la fixation du domaine Fc des anticorps au récepteur plaquettaire FcγRIIa1, ce qui mène à l'activation plaquettaire et à la sécrétion de facteurs procoagulants.^{193,194} Afin de démontrer l'importance de la fixation des anticorps aux récepteurs plaquettaires, on mentionne que l'agrégation induite par l'addition de SK est complètement inhibée par l'anticorps monoclonal anti-FcγRII IV.3 et par le fragment F(ab')₂ anti-Fc d'IgG humain.

7.4.4. Réactions allergiques à la streptokinase

À cause de sa nature immunogénique, la SK peut également provoquer des réactions allergiques.¹⁹⁵ Parmi les effets secondaires de la SK, on mentionne en effet des réactions pouvant être provoquées par les anticorps anti-SK. Dans les essais cliniques

ISAM¹⁹⁶ et GISSI,¹⁵⁶ on rapportait une fréquence de 0.1% de chocs anaphylactiques tandis que les essais cliniques GUSTO¹⁹⁷ et ISIS-2¹⁵⁷ dénotaient des réactions allergiques moins sévères chez environ 5% des patients recevant de la SK pour la première fois. Une autre étude rapportait une incidence de réactions allergiques chez 1.7 à 18% des patients.¹⁹⁸

Trois principaux types de réaction à la SK ont été identifiés.¹⁹⁹ On retrouve d'abord les réactions allergiques de type I, consistant en des réactions anaphylactiques induites par les immunoglobulines E (IgE). Ces derniers se lient aux mastocytes et entraînent la sécrétion de médiateurs chimiques tel que l'histamine. Ce type de réaction survient très rapidement suivant l'exposition des IgE à l'antigène, en l'occurrence la SK, et peut inclure une diminution de la pression sanguine, des tremblements, des chaleurs, des érythèmes cutanés, des éternuements, de l'urticaire, de la dyspnée et/ou des bronchospasmes. Cependant, outre la sécrétion d'histamine, la bradycardie et l'hypotension passagère observées lors de l'infusion de SK, la plupart des effets mentionnés plus haut peuvent également être attribués à l'activation de la cascade du complément et/ou à la sécrétion de bradykinine par la plasmine.

Comme deuxième type de réaction, on peut observer des réactions retardées induites par des complexes immuns (réaction de type III). Les symptômes d'un tel type de réaction consistent en de la fièvre, de la myalgie, une maladie sérique, des érythèmes cutanés, du purpura et/ou une glomérulonéphrite. Ces réactions peuvent être observées 6 à 16 jours suivant l'administration de SK, particulièrement lorsque les titres d'anticorps anti-SK sont élevés.

Finalement, des réactions induites par les lymphocytes peuvent être observées et incluent un malaise systémique et des réactions cutanées. Il a cependant été suggéré que les réactions moins sévères et fréquentes à la SK ne sont pas nécessairement reliées aux anticorps anti-SK. Ainsi, l'incidence des réactions à la SK réellement causées par la présence d'anticorps anti-SK étant généralement peu élevée et peu

reconnue, on se questionne surtout par rapport au potentiel neutralisant et pro-agrégant de ces anticorps.

7.5. Implication des anticorps anti-streptokinase dans le traitement de l'infarctus aigu du myocarde

Les effets cliniques, *in vivo*, des anticorps anti-SK sont en réalité mal connus. Les études à ce sujet sont peu nombreuses et surtout limitées. Dans un modèle animal, Massel et *al.* ont démontré que l'activité fibrinolytique induite par la SK est significativement réduite chez les lapins ayant été traités à la SK 1 mois auparavant, ce qui suggère une influence négative des anticorps anti-SK.²⁰⁰ Gemmill et *al.* notent également que les patients ayant un flot coronarien TIMI 0 ou 1, déterminé par coronarographie à 90 minutes et à 24 heures après l'administration de SK, ont des titres de neutralisation significativement plus élevés que les patients ayant un flot coronarien TIMI 2 ou 3.²⁰¹ D'autres études rapportent cependant l'absence de corrélation entre les titres d'anticorps anti-SK et la perméabilité coronarienne telle que définie par coronarographie²⁰² et par ECG et enzyme cardiaque CK-MB.²⁰³ Selon ces études, il n'y aurait aucune relation entre les taux d'anticorps anti-SK et l'efficacité de la SK ou de l'anistreplase comme agents fibrinolytiques. Par contre, les sujets utilisés dans une de ces études présentaient des titres d'anticorps anti-SK relativement faibles et une autre était limitée par son petit nombre de patients et par l'utilisation et l'analyse non combinée de paramètres de reperfusion non invasifs. De plus, toutes ces études, en plus de leurs limitations, ne tenaient pas compte de l'agrégation plaquettaire induite par les anticorps anti-SK, tout comme c'est le cas des études caractérisant les titres d'anticorps anti-SK et de résistance *in vitro* suite à une première administration de SK.

Les études concernant l'agrégation plaquettaire induite par les anticorps anti-SK décrivent également très peu, sinon pas du tout, le phénomène d'agrégation plaquettaire suite à l'administration de SK ou suite à une infection aux streptocoques et ne tiennent pas compte de la résistance à la fibrinolyse. Par ailleurs, l'influence de

l'agrégation plaquettaire induite par les anticorps anti-SK sur l'efficacité fibrinolytique de la SK ne semble pas avoir été déterminée. L'activation et l'agrégation plaquettaire peuvent avoir un impact sur l'agent fibrinolytique et inhiber le processus de fibrinolyse. Il est aussi généralement admis que l'activation des plaquettes durant le traitement fibrinolytique prédispose à la réocclusion prématurée de l'artère endommagée à cause de l'adhésion et de l'agrégation des plaquettes sur la plaque athéroscléreuse ou sur le résidu de thrombus.²⁰⁴ De plus, des observations expérimentales^{205,206} et cliniques²⁰⁷ démontrent que la perméabilité vasculaire est atteinte plus rapidement et de façon plus soutenue lorsque des anti-plaquettaires sont utilisés conjointement avec l'agent fibrinolytique.

8. LES ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS GP IIb/IIIa

Bien que l'aspirine inhibe la TXA₂ et la synthèse de prostacycline, l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus ne sont pas pour autant bloquées. En effet, l'aspirine n'inhibe pas de façon significative les autres agonistes de l'activation plaquettaire, tels le collagène, la thrombine et l'ADP.²⁰⁸

L'utilisation potentielle d'antagonistes des récepteurs GP IIb/IIIa a d'abord été proposée par Coller et *al.*^{209,210} Ces derniers ont démontré, par l'utilisation d'un anticorps monoclonal dérivé de souris et dirigé contre les récepteurs GP IIb/IIIa, l'inhibition de la liaison fibrinogène-plaquettes. L'anticorps chimérique de ce premier anticorps utilisé est le c7E3Fab (abxicimab, ReoPro®, Lilly), le premier agent de cette classe thérapeutique à avoir été disponible pour la recherche clinique.

8.1. Abxicimab

L'abciximab est un fragment F(ab) qui se lie de façon sélective aux récepteurs plaquettaires GP IIb/IIIa²¹¹ et inhibe l'agrégation plaquettaire en empêchant la liaison du fibrinogène, du FvW et d'autres molécules d'adhésion aux récepteurs GP IIb/IIIa de plaquettes activées. L'abciximab se lie également aux récepteurs de la

vitronectine ($\alpha_v\beta_3$), présents sur les plaquettes, les cellules endothéliales vasculaires et les CML. Ces récepteurs supportent des propriétés pro-coagulantes des plaquettes et des propriétés prolifératives des cellules endothéliales vasculaires et des CML.²¹²

L'abxicimab est indiqué dans la prévention des complications cardiaques de nature ischémique lors d'angioplastie et chez les patients en angine instable ne répondant pas à la thérapie conventionnelle et devant subir une angioplastie. Il est principalement utilisé conjointement avec l'ASA et l'héparine. Cet agent a principalement été étudié dans les études cliniques EPIC,²¹³ EPILOG,²¹⁴ EPISTENT,²¹⁵ CAPTURE²¹⁶ et GUSTO-IV.²¹⁷

8.2. Eptifibatide

L'eptifibatide (Integrilin™, Cor/Key Pharmaceuticals) inhibe de façon réversible l'agrégation plaquettaire en empêchant la liaison du fibrinogène, du FvW et d'autres ligands d'adhésion aux récepteurs plaquettaires GP IIb/IIIa.²¹⁸ Lorsque administré sous forme IV, l'eptifibatide agit de façon dose et concentration-dépendante. Son action est réversible après sa cessation, un processus qui serait le résultat de la dissociation de l'eptifibatide aux récepteurs plaquettaires GP IIb/IIIa.

L'eptifibatide est principalement utilisé dans le traitement de l'AI et de l'IM-NST, incluant le traitement des patients devant subir une angioplastie. Il a également été étudié dans le traitement de l'IM-ST, conjointement avec rt-PA. Dans tous les cas, l'agent doit être administré de façon concomitante avec de l'aspirine et de l'héparine. Les principales études d'efficacité et de sécurité sont les essais cliniques PURSUIT,²¹⁹ IMPACT-II²²⁰ et Intro-AMI.²²¹

8.3. Tirofiban

Le tirofiban (Aggrastat™, Merck & CO) est un antagoniste non-peptidique des récepteurs GP IIb/IIIa. Cet agent inhibe de façon réversible la liaison du fibrinogène aux récepteurs GP IIb/IIIa.²²² Lorsque administré par voie IV, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire s'effectue de façon dose et concentration-dépendante. Chez la plupart des patients, le tirofiban doit être administré par voie IV à un taux initial de 0.4 mcg/kg/min pendant 30 minutes, suivi d'une perfusion continue de 0.1 mcg/kg/min. Lorsque le régime recommandé est respecté, on peut observer une inhibition de l'agrégation plaquettaire supérieure à 90% après 30 minutes d'infusion. L'efficacité et l'innocuité du tirofiban ont été étudiées principalement via trois grands essais cliniques, soit PRISM,²²³ PRISM-PLUS²²⁴ et RESTORE.²²⁵ Tirofiban est indiqué en combinaison avec l'héparine et l'aspirine dans le traitement des SCA sans élévation du segment ST et s'est montré efficace dans la réduction du taux de mortalité, de ré-infarction et d'ischémie réfractaire.²²³⁻²²⁵

9. BUT DU PROJET DE RECHERCHE

Le présent projet de recherche vise donc principalement l'étude et la compréhension des effets *in vitro* des anticorps anti-SK sur l'activation et l'agrégation plaquettaire et la résistance à la fibrinolyse par la SK. Le caractère pro-agrégant et neutralisant des anticorps anti-SK est possiblement un facteur limitant dans le traitement fibrinolytique à la SK chez les patients avec IM-ST. Plusieurs de ces patients sont susceptibles d'avoir des quantités relativement importantes d'anticorps anti-SK. Il est tout à fait justifiable de s'interroger sur le phénomène d'activation et d'agrégation plaquettaire induite par les anticorps anti-SK en présence de SK, ainsi que sur l'activité fibrinolytique de la SK chez des sujets présentant des titres élevés d'anticorps anti-SK, comme les patients ayant reçu de la SK pour un IM-ST ou suite à une infection aux streptocoques. Également, l'effet d'un antagoniste des récepteurs GP IIb/IIIa, comme le tirofiban n'a pas encore été étudié spécifiquement dans ce

contexte et pourrait potentiellement avoir des répercussions sur l'activité fibrinolytique et la résistance à la SK.

L'objectif principal de l'étude était donc de déterminer la prévalence de l'activation et de l'agrégation plaquettaire induite par les anticorps anti-SK en présence de SK chez des sujets susceptibles d'avoir des titres élevés d'anticorps anti-SK, suite à une infection aux streptocoques, et chez des sujets ayant déjà été traités à la SK pour un IM-ST. Nous avons également tenté de déterminer la corrélation entre l'activation et l'agrégation plaquettaire induite par la SK et la résistance à la SK et d'étudier l'effet du tirofiban sur l'agrégation plaquettaire induite par les anticorps anti-SK en présence de SK et sur la résistance *in vitro* à la fibrinolyse.

PRÉSENTATION DES MANUSCRIPTS

CHAPITRE 2

Platelet Activity And Antibody Titers After Exposure To Streptokinase Or Streptococcal Infection

Platelet Activity And Antibody Titers After Exposure To Streptokinase Or Streptococcal Infection

Maryse Courval^{1,2}, BSc, Donald Palisaitis^{1,3}, MD, Jean G. Diodati^{1,3}, MD, FACC,
Bernard Lesperance^{1,3}, MD, Chantal Pharand^{1,2}, PharmD

Platelets, streptokinase and streptococcus

¹Research Center, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal,
and ²Faculty of pharmacy and ³Faculty of Medicine, Université de Montréal,
Montréal, Canada.

Address for correspondence:

Chantal Pharand, Pharm D

Centre de Recherche, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal

5400, Gouin Blvd. West, Montreal, Quebec, H4J 1C5

Tel: [REDACTED] ext: 2506; Fax: 514-338-2694

E-mail: [REDACTED]

This project has been financially supported by a grant from Merck & Co.

ABSTRACT

Objectives – The purpose of this study was to determine the incidence of SK-induced, antibody-mediated, platelet activation and aggregation after administration of SK or development of a streptococcal infection.

Background – Streptokinase (SK) use, in acute myocardial infarction, is hindered by failure to reperfuse (60%) and early reocclusion (16%). The phenomena may, among other causes, be due to systemic inactivation of SK, as well as SK-induced platelet aggregation and clot propagation from antibodies to SK produced after SK administration or streptococcal infections.

Methods – We included 45 normal volunteers (Control), as well as 45 patients who had received SK (SK) and 13 who had suffered a severe streptococcal infection (SI) within the past 3 years. Extent of SK-induced, antibody-mediated, platelet activation and aggregation, as well as anti-SK antibody and SK resistance titers (lowest SK concentration to cause clot lysis within 10 min.) were measured.

Results – Whereas SK-induced, antibody-mediated, platelet activation was observed in 49% of SK patients and in only 17% and 15% of SI patients and Controls ($p < 0.05$ SK vs. Control and SK vs. SI), SK-induced platelet aggregation was observed in 23% of SK patients and SI patients, and in none of the Control patients ($p < 0.05$).

Conclusions – SK-induced, antibody-mediated, platelet activation and aggregation occur in patients with high titers of anti-SK antibody and may play a role in failure of SK therapy. SI patients behave like SK patients in terms of the reactivity of their platelets to subsequent SK dose *in vitro*.

Keywords: streptokinase, antibodies to streptokinase, acute myocardial infarction, platelets, streptococcal infection

CONDENSED ABSTRACT

In acute myocardial infarction, streptokinase (SK) use is hindered by failure to reperfuse and early reocclusion, possibly due to systemic inactivation of SK and SK-induced platelet aggregation and clot propagation from anti-SK antibodies produced after SK administration or streptococcal infections. We evaluated the incidence of SK-induced, antibody-mediated, platelet activation and aggregation after SK administration or streptococcal infection. SK-induced platelet activation and aggregation occur in patients with high titers of anti-SK antibody and may play a role in failure of SK therapy. Patients with previous streptococcal infection behave like SK patients in terms of platelet reactivity to SK *in vitro*.

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

ADP:	Adenosine diphosphate
ASO:	Antistreptolysin-O
Fc γ RII:	Fc-gamma receptor type II
GP:	Glycoprotein
IgG:	Immunoglobulin G
PBS:	Phosphate-buffered saline
PPP:	Platelet poor plasma
PRP:	Platelet rich plasma
SI:	Streptococcal infection
SK:	Streptokinase

INTRODUCTION

Streptokinase (SK) is one of the most widely used and least expensive fibrinolytic agents for the treatment of acute myocardial infarction. However, approximately 60% of patients fail to optimally reperfuse¹ and early reocclusion is observed in up to 16% of patients.² Produced by group C β -hemolytic streptococci, SK induces an immune response, which leads to the production of anti-SK antibodies. These antibodies are ubiquitous in adult humans; they circulate as immunologic evidence of previous streptococcal infection or prior treatment with SK.³⁻⁵ Very high titers may remain in blood for many months to years.⁶⁻⁸

Failure to reperfuse and early reocclusion following SK administration have been attributed to systemic inactivation of SK by anti-SK antibodies as well as SK-induced platelet aggregation.⁹⁻¹¹ Elevated anti-SK antibody titers have been shown to correlate with a decrease in SK fibrinolytic activity *in vitro*.¹⁰ Anti-SK antibodies may also mediate platelet aggregation in the presence of SK and could potentially lead to reocclusion.¹¹⁻¹⁵ Although SK-induced platelet aggregation is not generally recognized as a potential complication of SK administration, its prevalence ranges from 14% to 30% in healthy blood donors.^{11,12,14,15} It is thought to be initiated by the binding of anti-SK antibodies to the SK-plasminogen complex located on the platelet surface and to be independent of the conversion of plasminogen to plasmin.^{11,12,14} The ability of anti-SK antibodies to promote platelet aggregation in the presence of SK is based on an immune activation of platelets and requires the interaction of the Fc domain of anti-SK antibodies with the Fc-gamma receptor type II (Fc γ RII), a receptor found on the platelet membrane.

Readministration of SK is not recommended for months to years after a previous treatment because of its potential lack of efficacy. Limited information is available regarding the magnitude of anti-SK antibody titers and prevalence of SK-induced platelet aggregation after a streptococcal infection. Hence, there are no clear

recommendations for patients with prior streptococcal infection.

Our study had two aims. We established the prevalence of SK-mediated platelet-activation and aggregation in three groups of patients, one having received SK for an acute myocardial infarction, one post streptococcal infection and a control group. We also studied the relationship between anti-SK antibody titers and SK-induced platelet activation and aggregation in our patient groups.

METHODS

Patient population - The study was performed at the Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, between November 1998 and September 1999. Patients were divided into three groups: 45 healthy volunteers (Control group), 45 patients treated with SK for acute myocardial infarction within the past 3 years (SK group), and 13 patients who suffered a streptococcal infection, diagnosed by the microbiology laboratory, within the past 3 years (SI group). Exclusion criteria were as follows: Control group – history of streptococcal infection or SK use within the last 3 years, coronary artery disease, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis; SK group – any streptococcal infection within the past 3 years; SI group – SK use within the past 3 years. In addition, all subjects receiving ticlopidine, warfarin, corticosteroids or immunosuppressive agents were excluded. The study was approved by the institutional review committee and all subjects gave written informed consent.

Study design - A 30-mL venous blood sample was withdrawn from each subject. Five tests were performed on each blood sample: extent of platelet activation and aggregation, SK resistance, anti-SK antibody and antistreptolysin-O (ASO) titers.

Collection and preparation of human plasma - For each patient, five 4,5-mL blood samples were collected in ambient 5-mL vacutainer tubes containing 0,5 mL of 3,8% sodium citrate while an additional 5 mL of blood was collected in a tube with no

anticoagulant to measure ASO titers. Blood was centrifuged at 2000 rpm for 3 minutes at room temperature to obtain citrated platelet rich plasma (PRP). Platelet poor plasma (PPP) was prepared by additional centrifugation at 2800 rpm for 10 min. PRP platelet count was adjusted at 300 000 to 350 000 cells/ μ l by dilution with autologous PPP. PRP was used within 1 to 1,5 hour to determine platelet aggregation after addition of SK. PPP was used to set the aggregometer and to determine anti-SK antibody titers and SK resistance titers. A non-centrifuged tube of blood was used to measure platelet activation in whole blood. All concentrations refer to the final concentration in whole blood, PRP or PPP. Blood samplings in this study were performed at about the same hour of the day to minimize the effects of circadian variation in platelet function.

Determination of platelet activation - Within 10 minutes of blood withdrawal, samples were processed using a method adapted from Shattil et al.¹⁶ Citrated whole blood (225 μ l) was added to 4 tubes containing respectively 25 μ l of: 1) positive control - adenosine diphosphate (ADP, 2 μ M; BioData, PA, USA), 2) SK (Streptase® 5 000 U/mL; Hoechst Marion Roussel, Quebec, Canada), 3) SK (500 U/mL), and 4) IV.3 (2 μ g/mL; Medarex, New Jersey, USA) plus SK (5 000 U/mL). Tube 4 was used to confirm that SK-induced platelet activation requires the interaction of the anti-SK antibody Fc domain with the platelet Fc γ RII (also known as CD32). The monoclonal antibody anti-CD32, IV.3, was incubated for 2 minutes in tube 4 prior to SK addition. The content of each tube was swirled and incubated for 2 (tube 1) or 10 minutes (tubes 2 to 4) at room temperature. After incubation, 5 μ l of whole blood was transferred from each tube to 12 X 75 mm tubes containing 20 μ l of phycoerythrin-conjugated anti-CD42b (Pharmingen, San Diego, USA) and 20 μ l of fluorescein isothiocyanate-conjugated PAC-1 (Becton Dickinson Canada Inc., Ontario, Canada). CD42b antibody binds to platelet receptor glycoprotein (GP) Ib, whereas PAC-1 binds to activated GP IIb/IIIa receptors on platelets. The tubes were then swirled and incubated for 20 minutes at room temperature in the dark. One mL of cold 1% paraformaldehyde was then added to fix the platelets. Fixed cells were stored at 4°C

in the dark for at least 2 hours but no more than 72 hours. Platelet activation was then assessed by whole blood flow cytometry.

Determination of platelet aggregation - Platelet aggregation was measured by the use of a turbidimetric method,¹⁷ using a four channel aggregometer (PAP 4, Biodata, PA, USA). Aggregation curves were calibrated from 0 to 100% light transmission with PRP and PPP, respectively. Four hundred and fifty μ l of PRP were added to 4 cuvettes containing a magnetic stir bar and stirred at 1100 rpm. Platelet aggregation was measured in the first tube after stimulation with ADP 2 μ M (positive control), whereas SK (5 000 U/mL and 500 U/mL) was added in the second and third tubes as the inducing agent. IV.3 (2 μ g/mL) was added 2 minutes before the addition of SK 5 000 U/mL in the fourth tube. As in platelet activation studies, IV.3 was used to confirm that platelet aggregation induced by SK was mediated by anti-SK antibodies. The extent of platelet aggregation was expressed as a percent of light transmission.

Titration of anti-SK antibodies - Plasma anti-SK antibody titers were measured using a one-site non-competitive ELISA according to the method of Engvall and Perlman.¹⁸ Wells of micro-ELISA plates were incubated with a 200- μ l solution of albumin-free SK (1 000 U/mL) in 0,05 M carbonate/bicarbonate buffer (pH 9,6) overnight at 4°C. The wells were then treated with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin and washed 4 times with PBS containing 0,05% Tween 20 (PBS-Tween). Plasma (100 μ l, diluted from 1/50 to 1/204 800) was added to the wells in duplicate and incubated for 2 hours at 37°C. The wells were washed again 4 times with PBS-Tween and incubated for 2 hours with the horseradish peroxidase-conjugated goat immunoglobulin G (IgG) anti-human IgG (ICN pharmaceuticals, Quebec, Canada). After 4 additional washes with PBS-Tween, the peroxidase reaction was performed by addition of *o*-phenylenediamine (2 mg/mL; ICN pharmaceuticals, Quebec, Canada) and 0,003% hydrogen peroxide in 0,1 M citrate and 0,2 M sodium phosphate buffer at pH 5,0. After 30 minutes, the reaction was stopped by addition of 50 μ l of 4 M sulfuric acid, and the absorbency was read at 492

nm. The anti-SK antibody titers were expressed in arbitrary units (AU/mL) by comparison with a control serum, which was given a titer of 500 AU/mL, included on each plate.

Determination of SK resistance titers - SK resistance titers were assessed using the method described by Jaliha and Morris.⁷ SK was diluted in normal saline 0,9% to give a range of concentrations from 125 U/mL to 2 000 U/mL. Twenty μ l of each dilution were added to 170 μ l of PPP in 50 X 9 mm tubes and fibrin clots were formed by the addition of 10 μ l of thrombin (5 U/mL). Immediately after formation of a PPP clot, the tubes were placed in a water bath at 37°C for 10 minutes. The lowest concentration of SK to cause clot lysis within 10 minutes represents the resistance titer.

Statistical analysis - The calculated sample size was 45 subjects in the control and SK groups to detect a difference of at least 15% in the prevalence of SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation with a power of 80% and a confidence interval of 95%. Data are expressed as percentage, median and range or mean \pm SD, when appropriate. The Fisher's exact test was used to detect a difference in the proportion of subjects showing SK-induced, antibody-mediated, platelet activation and aggregation between the 3 groups. The Kruskal-Wallis test was used to compare the ASO, anti-SK antibody and SK resistance titers between the 3 groups. Correlation was studied using Spearman test. Statistical analyses were performed using the SPSS software (SPSS 8.0; SPSS Corporation, Illinois, USA).

RESULTS

Patients - One hundred and three subjects participated in this study: 45 in the Control group, 45 in the SK group and 13 in the SI group. Among the latter group, there were 5 cases of necrotizing fasciitis, 3 streptococcal pharyngitides, 3 septicemias, 1 toxic shock-like syndrome and 1 cellulitis. Demographics are shown in Table 1, page 61.

All patients in the SK group were taking aspirin and 20% of them were also receiving intravenous heparin at the time of the study.

TABLE 1. Demographic characteristics of study patients

	Control group (n=45)	SK group (n=45)	SI group (n=13)
Age (years)	38 ± 9	63 ± 12	46 ± 14
Male (%)	49	69	54
Last exposure to SK or SI (months)	N/A	6.7 ± 6.6	10 ± 7.7

N/A: not applicable; SI: streptococcal infection; SK: streptokinase.

Platelet activation - Results of platelet activation are shown in Figure 1, page 62. Subjects presenting platelet activation induced by the addition of SK, which was inhibited by prior incubation with IV.3, were qualified as responders. Results are reported as the proportion of responders in each group. Patients showing no platelet activation after the addition of ADP (positive control) were eliminated from statistical analysis (n=6) and samples from 7 other patients could not be assessed. A dose of 500 U/mL of SK resulted in no statistical differences in the proportion of responders between the 3 groups (5%, 3% and 0% for the Control, SK and SI groups, respectively). At a dose of 5 000 U/mL, the proportion of responders was greater in the SK group as compared to the Control (49% vs. 15%, respectively, $p = 0.003$) or to the SI group (17%, $p = 0.005$). However, there was no statistical difference between the SI and Control groups. The monoclonal antibody IV.3 reduced the percentage of platelet activation by $75 \pm 16\%$ ($p < 0.001$) in subjects showing SK-induced platelet activation.

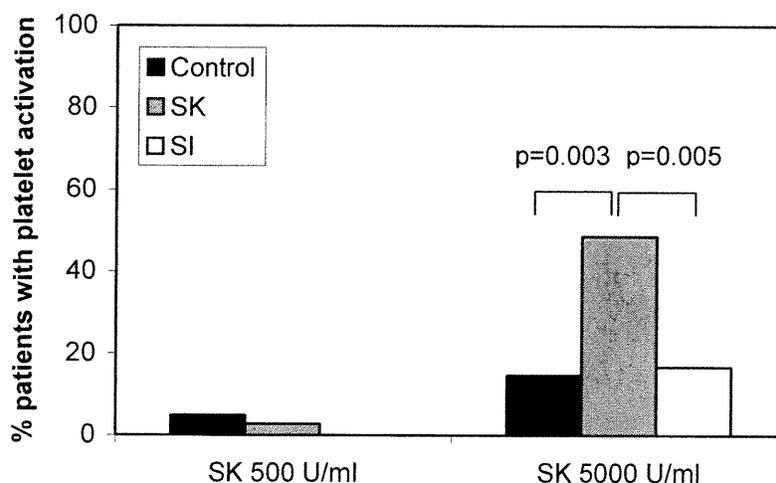


FIGURE 1. Prevalence of SK-induced, antibody-mediated platelet activation among the three patient groups. Two doses of SK were tested (500 and 5000 U/mL). SI = streptococcal infection; SK = streptokinase.

Platelet aggregation - Data are summarized in Figure 2, page 63, and results are reported as the proportion of responders in each group. Patients presenting platelet aggregation induced by the addition of SK, which was inhibited by prior incubation with IV.3, were qualified as responders. Patients showing no platelet aggregation after the addition of ADP (positive control) were eliminated from statistical analysis (n=4) and samples from 7 other patients could not be assessed. A dose of 500 U/mL of SK resulted in no statistical differences in the proportion of responders between the 3 groups (0%, 0% and 8% for the Control, SK and SI groups, respectively). At a dose of 5 000 U/mL, the proportion of responders was greater in the SK and SI groups (both at 23%) as compared to the Control group (0%; $p = 0.002$, SK vs. Control; $p = 0.007$, SI vs. Control). As expected, the monoclonal antibody IV.3 also prevented SK-induced platelet aggregation ($87 \pm 9\%$ inhibition, $p < 0.001$) in patients showing SK-induced platelet aggregation. Of note, the higher rate of platelet aggregation compared to platelet activation in the SI group is related to unavailable platelet activation data for a patient that presented platelet aggregation.

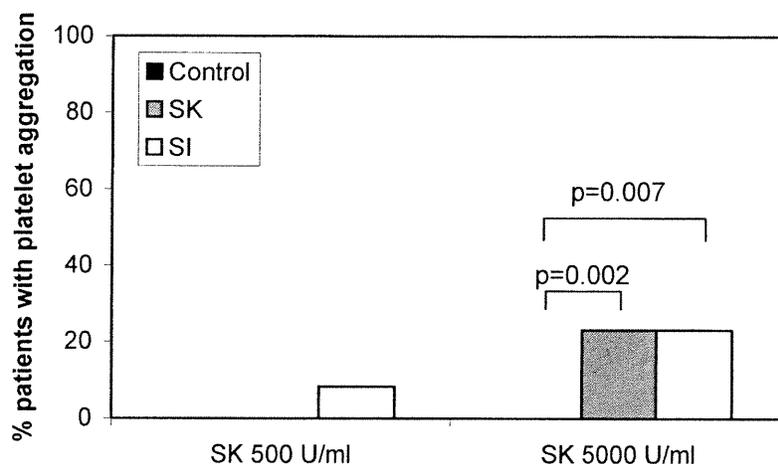


FIGURE 2. Prevalence of SK-induced, antibody-mediated platelet aggregation among the three patient groups. Two doses of SK were tested (500 and 5 000 U/mL). SI = streptococcal infection; SK = streptokinase.

Anti-SK antibody, SK resistance and antistreptolysin-O titers - The median anti-SK antibody levels were highest in the SK group and lowest in the Control group (680 [19-6554] AU/mL in SK; 133 [2-2938] AU/mL in SI; 57 [7-106] AU/mL in Control; $p < 0.05$ for all comparisons; Figure 3, page 64). Similarly, median SK resistance titers were highest in the SK group and lowest in the Control group (500 [62.5-2000] U/mL in SK; 250 [62.5-2000] U/mL in SI; 62.5 [62.5-500] U/mL in Control; $p < 0.05$ for all comparisons; Figure 4, page 65). The median ASO titers were higher in the SI group as compared to the SK and Control groups (undetectable [0-250 Todd units] in SK; 166 [0-2500] Todd units in SI; undetectable [0-333 Todd units] in Control; $p < 0.05$ SI vs. Control and SI vs. SK).

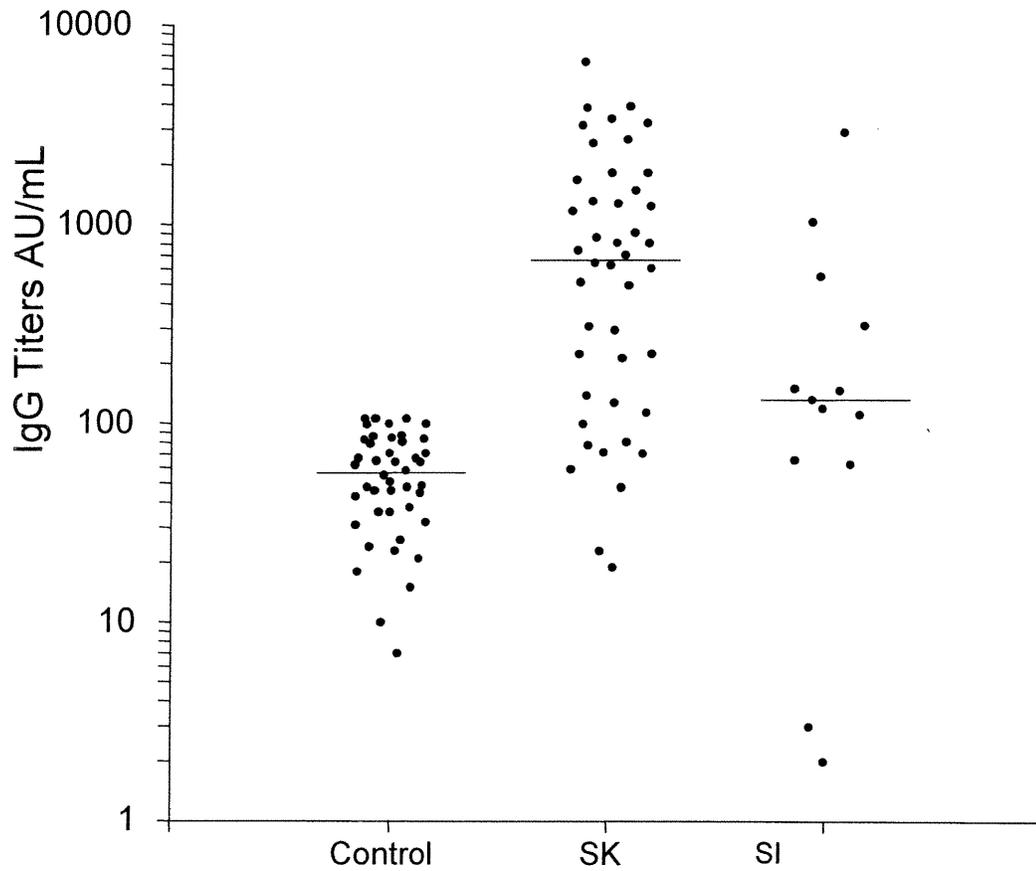


FIGURE 3. IgG titers in the three groups of patients. The short horizontal lines represent the median values; $p < 0.05$ for all comparisons. SI = streptococcal infection; SK = streptokinase.

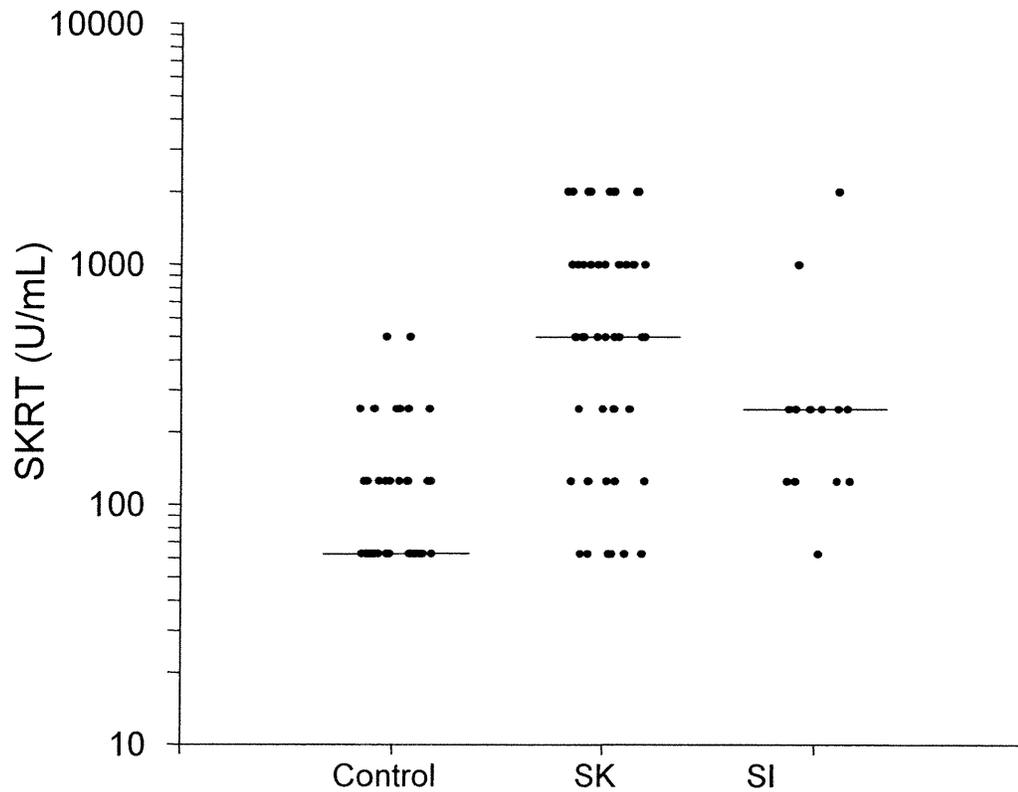


FIGURE 4. SK resistance titers in the three groups of patients. The short horizontal lines represent the median values; $p < 0.05$ for all comparisons. SI = streptococcal infection; SK = streptokinase.

Correlations - There is a positive correlation between anti-SK antibody and SK resistance titers ($r=0.450$, $p<0.001$; Figure 5, page 66). However, there is a weak correlation between anti-SK antibody and ASO titers ($r=0.269$, $p=0.001$) and no correlation between the SK resistance and ASO titers ($r=0.082$, $p=0.323$).

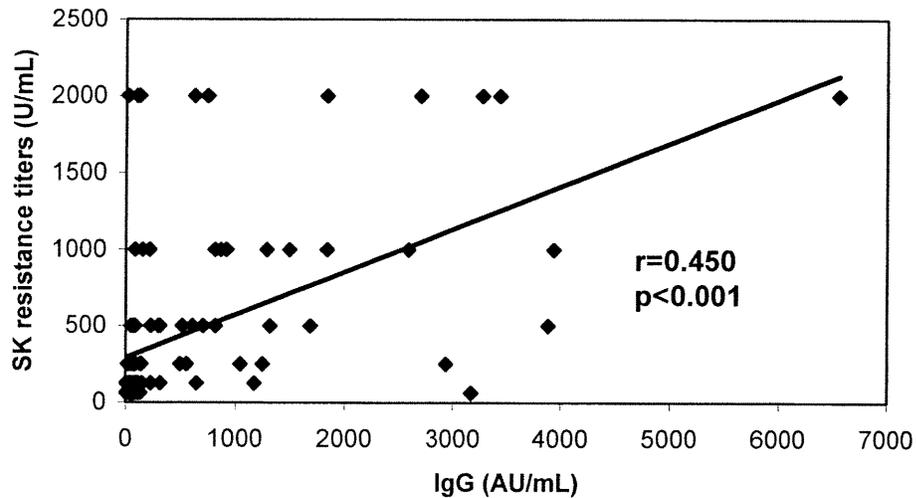


FIGURE 5. Correlation between SK resistance and IgG titers in all patients.

Positive weak correlations can also be observed between the following parameters: anti-SK antibody titers and SK-induced platelet activation ($r=0.397$, $p<0.001$) and aggregation ($r=0.343$, $p=0.001$); SK resistance titers and SK-induced platelet activation ($r=0.427$, $p<0.001$) and aggregation ($r=0.270$, $p=0.007$). Finally, anti-SK antibody titers are significantly higher in patients with SK-induced platelet activation than in non-responders (603.5 [19-6554] AU/mL vs. 82 [2-2938] AU/mL, respectively, $p=0.006$; Figure 6, page 67). The same can also be observed in patients who showed SK-induced platelet aggregation (868 [114-3938] AU/mL vs. 81 [2-6554] AU/mL, respectively, $p=0.0004$).

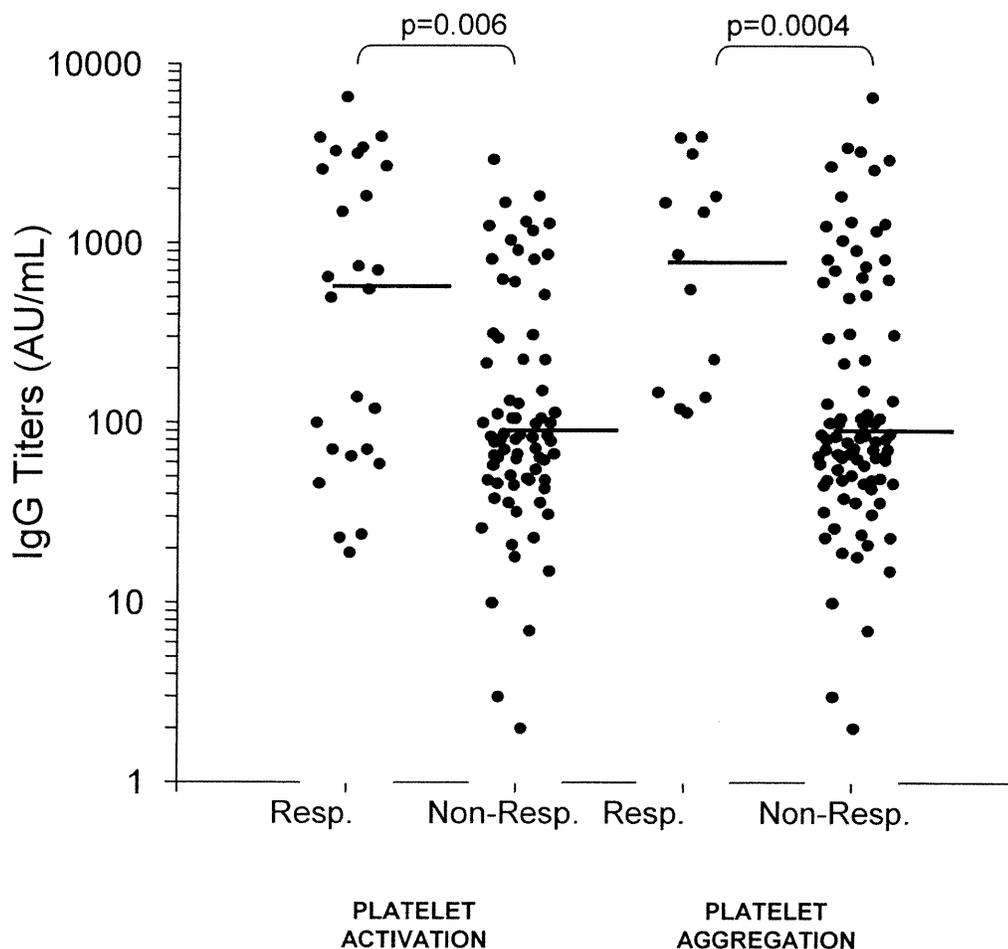


FIGURE 6. IgG titers in platelet activation and platelet aggregation responders and non-responders. The short horizontal lines represent the median values.

DISCUSSION

This study establishes the platelet-activating and aggregating potential of anti-SK antibodies in a population having received SK or having had a streptococcal infection. It also documents the magnitude of anti-SK antibody and resistance titers after administration of SK or after a streptococcal infection.

SK has been used as a fibrinolytic agent for many decades. While it has been shown

to be efficacious in the treatment of acute myocardial infarction, its use is hindered by low patency rates and reocclusion. Both phenomena may, among other reasons, be due to the presence of neutralizing anti-SK antibodies.

Platelet activation - We observed the activating potential of anti-SK antibodies in the presence of SK using whole blood flow cytometry. This is the first time that SK-induced, antibody-mediated, platelet activation is assessed using this method. Indeed, most of the previous studies quantified platelet activation via the dosing of secreted substances. Flow cytometry allows the determination of the activation state of platelets in their physiological milieu of whole blood. It minimizes manipulation of samples, thus preventing artifactual *in vitro* platelet activation, as well as potential loss of platelet sub-populations.¹⁶

Our results show that in terms of platelet activation, our post infection group resembled more closely the control group, whereas in terms of platelet aggregation, it resembled more closely the SK group. In the platelet activation cascade, stimulated platelets express PAC-1 at their surface then aggregate. Platelet activation does not always lead to *in vitro* platelet aggregation. In the SI group, PAC-1 expression was followed by platelet aggregation in all cases. On the contrary, in the SK group, PAC-1 expression led to platelet aggregation in only half of the patients. This could be explained by the platelet aggregation inhibitory effect of aspirin, which was taken by all patients in the SK group and in no patient in the other two groups. In the control group, the fact that the 15% responders to activation did not translate into platelet aggregation could be related to low titers.

The lower platelet activation rate in the SI group compared to the SK group might be explained by the observed lower anti-SK antibody titers. It might also be hypothesized that the subset of antibodies that promotes platelet activation is weakly elicited following a streptococcal infection.

Platelet aggregation - Our platelet aggregation results can be compared to previously reported observations. In one study, platelet aggregation induced by SK was measured from patients treated for AMI with SK. Before treatment with SK, none of the 13 patients had SK-induced platelet aggregation, whereas five of these 13 patients (38%) were positive 1 week after treatment.¹¹ In this study, both anti-SK antibody titers and SK resistance titers were significantly higher in the subjects with SK-induced platelet aggregation (responders) than in the non-responders.

In the present study, none of the healthy volunteers presented SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation. In comparison, Vaughan et al. reported that 14% of healthy volunteers presented SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation,¹² while Abdelouahed et al. found a slightly greater prevalence of 20% of responders among a group of healthy volunteers.¹⁹ Lebrazi et al. also found a 30% prevalence of SK-induced platelet aggregation in healthy blood donors.¹⁴ The authors suggested that the level of the platelet aggregating antibodies in responsive donors is low and that they constitute a distinct qualitative subset of anti-SK antibodies. In a comparative study of recombinant staphylokinase and streptokinase, 6 out of 25 (24%) healthy volunteers also presented SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation.¹⁵ The difference in our results with the literature might be explained by the composition of the Control group. Different exposition rates of streptococcus among different populations may contribute to different baseline titers.

This is the first time that the platelet aggregating potential of anti-SK antibodies is studied following a streptococcal infection. *In vitro*, these antibodies seem to behave similarly to those induced by previous administration of streptokinase. This would suggest that the use of streptokinase should be avoided in patients with a history of prior streptococcal infection as is done in those with prior streptokinase exposure.

Antistreptolysin-O, anti-SK antibody and SK resistance titers - As expected, ASO titers were elevated in the SI group, and undetectable in the control and SK groups.

The levels of anti-SK antibody and resistance titers were elevated and similar in the SK and SI groups. The median in the SI group was lowered because of two outliers from blood drawn late (21 and 22 months) after the streptococcal infection.

Our results are in agreement with previous reports.⁵⁻⁸ Recently, Squire *et al.* measured anti-SK antibodies in 219 patients who had received SK for the treatment of AMI in the last 12 to 90 months.²⁰ Anti-SK antibodies were elevated at all time periods after SK treatment and significantly correlated with neutralizing anti-SK antibody titers. The authors suggested that the readministration of SK must be considered inadvisable up to at least 90 months following first therapeutic exposure. We also found a significant correlation between anti-SK antibody and resistance titers (Figure 5, page 66).

Patients with SK-induced platelet activation and aggregation exhibited elevated anti-SK antibody and resistance titers. These results correlate with those previously reported. Indeed, Vaughan *et al.* found a highly significant correlation between the *in vitro* platelet aggregation response to SK and the anti-SK antibody titers.¹² Moreover, Lonsdale *et al.* found markedly increased SK-induced platelet aggregation and granule release in whole blood from patients 30 days after SK infusion, together with elevated anti-SK antibody levels.²¹ However, Abdelouahed *et al.* observed that SK-induced platelet aggregation did not appear to be related to the titer of anti-SK antibodies.¹⁹

Study limitations - The longer time between exposure and sampling in the SI group may have contributed to lower IgG titers compared to the SK group. The small sample size of the SI group may decrease the reliability of our findings. Since age and gender is known to affect platelet reactivity, the dissimilarity between the three groups may represent a study limitation.¹³ The SK group was older and mostly composed of men. However, it can be argued that patients composing the SK group are representative of the average patient who would receive SK for the treatment of AMI.

CONCLUSION

This study demonstrates that neutralizing antibody titers to SK and the *in vitro* response of platelets in patients having been exposed to streptococcal infection is similar to patients having been exposed to SK. In the same way that patients having previously received SK are approached with different strategies, so should patients with recent streptococcal infection presenting with acute myocardial infarction. How far back a streptococcal infection history should be searched for is unknown.

This study demonstrates that activation and aggregation of platelets occur with a high frequency, especially in patients with high titers of anti-SK antibodies. Also, while patients who have previously received SK for the treatment of AMI present high anti-SK antibody and resistance levels, about half of them also present antibody-mediated platelet activation and a quarter show *in vitro* antibody-mediated platelet aggregation. Hence, readministration of SK to patients who have previously been treated with SK would not be recommended, not only because of the high anti-SK antibody and SK resistance levels, but also because of the potential risk of *in vivo* platelet activation and aggregation, which could lead to reocclusion.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project has been financially supported by an unrestricted grant from Merck & Co.

We would like to thank Dr Daniel Bichet for the help provided with platelet aggregation studies as well as Dr Benoit Thivierge, Céline Groulx and Mrs. Ginette Gaudette and her team of nurses for their tremendous help with the realization of the study.

REFERENCES

1. The GUSTO Angiographic Investigators. *The effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, or both on coronary-artery patency, ventricular function, and survival after acute myocardial infarction.* N Engl J Med 1993;329:1615-1622.
2. Verheugt FW, Meijer A, Lagrand WK, van Eenige MJ. *Reocclusion: the flip side of coronary thrombolysis.* J Am Coll Cardiol 1996; 27:766-773.
3. Fletcher AP, Alkjaersig N, Sherry S. *The maintenance of a sustained thrombolytic state in man. I. Induction and effects.* J Clin Invest 1959; 38:1111-1119.
4. Verstraete M, Vermylen J, Amery A, Vermylen C. *Thrombolytic therapy with streptokinase using a standard dosage scheme.* Br Med J 1966; 5485:454-456.
5. Lynch M, Littler WA, Pentecost BL, Stockley RA. *Immunoglobulin response to intravenous streptokinase in acute myocardial infarction.* Br Heart J 1991; 66:139-142.
6. Lee HS, Cross S, Davidson R, Reid T, Jennings K. *Raised levels of antistreptokinase antibody and neutralization titres from 4 days to 54 months after administration of streptokinase or anistreplase.* Eur Heart J 1993; 14:84-89.
7. Jalihal S, Morris GK. *Antistreptokinase titres after intravenous streptokinase.* Lancet 1990;335:184-185.
8. Elliott JM, Cross DB, Cederholm-Williams SA, White HD. *Neutralizing antibodies to streptokinase four years after intravenous thrombolytic therapy.* Am J Cardiol 1993; 71:640-645.
9. Gemmill JD, Hogg KJ, Dunn FG, Rae AP, Hillis WS. *Pre-dosing antibody*

- levels and efficacy of thrombolytic drugs containing streptokinase. Br Heart J* 1994; 72:222-225.
10. Lew AS, Neer T, Rodriguez L, Geft IL, Shah PK, Ganz W. *Clinical failure of streptokinase due to an unsuspected high titer of antistreptokinase antibody. J Am Coll Cardiol* 1984; 4:183-185.
 11. Vaughan DE, Kirshenbaum JM, Loscalzo J. *Streptokinase-induced, antibody-mediated platelet aggregation: a potential cause of clot propagation in vivo. J Am Coll Cardiol* 1988; 11:1343-1348.
 12. Vaughan DE, Van Houtte E, Declerck PJ, Collen D. *Streptokinase-induced platelet aggregation. Prevalence and mechanism. Circulation* 1991; 84:84-91.
 13. Armstrong R, May JA, Losche W, Heptinstall S. *Factors that contribute to spontaneous platelet aggregation and streptokinase-induced aggregation in whole blood. Thromb Haemost* 1995; 73:297-303.
 14. Lebrazi J, Helft G, Abdelouahed M. *Human anti-streptokinase antibodies induce platelet aggregation in an Fc receptor (CD32) dependent manner. Thromb Haemost* 1995;74:938-942.
 15. Abdelouahed M, Hatmi M, Helft G, Emadi S, Elalamy I, Samama MM. *Comparative effects of recombinant staphylokinase and streptokinase on platelet aggregation. Thromb Haemost* 1997;77:815-817.
 16. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. *Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. Blood* 1987;70:307-315.
 17. Born GVR, Cross MJ. *The aggregation of blood platelets. J Physiol* 1963;168:178-195.
 18. Engvall E, Perlman P. *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).*

Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 1971; 8:871-874.

19. Abdelouahed M, Elalamy I, Lebrazi J. *Streptokinase modifies in vitro platelet aggregation by two mechanisms: reduced aggregation due to fibrinogenolysis and enhanced aggregation via an immunological reaction.* Platelet 1995; 6:317-325.
20. Squire IB, Lawley W, Fletcher S. *Humoral and cellular immune responses up to 7.5 years after administration of streptokinase for acute myocardial infarction.* Eur Heart J 1999; 20:1245-1252.
21. Lonsdale RJ, Heptinstall S, Westby JC. *A study of the use of the thromboxane A2 antagonist, sulotroban, in combination with streptokinase for local thrombolysis in patients with recent peripheral arterial occlusions: clinical effects, platelet function and fibrinolytic parameters.* Thromb Haemost 1993;69:103-111.

CHAPITRE 3

Inhibition of Streptokinase-Induced, Antibody-Mediated Platelet Aggregation with Tirofiban after Exposure To Streptokinase Or Streptococcal Infection

**Inhibition of Streptokinase-Induced, Antibody-Mediated Platelet
Aggregation with Tirofiban after Exposure To Streptokinase Or
Streptococcal Infection**

Maryse Courval^{1,2}, BSc, Donald Palisaitis^{1,3}, MD, Jean G. Diodati^{1,3}, MD, FACC,
Bernard Lesperance^{1,3}, MD, Chantal Pharand^{1,2}, PharmD

Streptokinase, platelet aggregation and tirofiban

¹Research Center, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal,
and ²Faculty of pharmacy and ³Faculty of Medicine, Université de Montréal.

Address for correspondence:

Chantal Pharand, Pharm D
Centre de Recherche, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal
5400, Gouin Blvd. West, Montreal, Quebec, H4J 1C5
Tel: [REDACTED] ext:2506; Fax: 514-338-2694
E-mail: [REDACTED]

This project has been financially supported by a grant from Merck & Co.

ABSTRACT

Background – Failure to reperfuse (60%) and early reocclusion (16%) following streptokinase (SK) therapy for acute myocardial infarction may, among other causes, be due to systemic inactivation of SK by neutralizing antibodies, as well as SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation.

Objectives – The purpose of this study was to evaluate the effect of tirofiban (a GP IIb/IIIa antagonist) in preventing streptokinase-induced, antibody-mediated, platelet aggregation after administration of SK or development of a streptococcal infection.

Methods and Results – We selected 103 patients divided into 3 groups: 45 normal volunteers, 45 patients who had received SK within the past 3 years, and 13 patients who had suffered a severe streptococcal infection also within the past 3 years. Blood samples were withdrawn to measure the extent of inhibition of SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation by tirofiban. SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation was observed in 23% of SK patients, in 23% of streptococcal infection patients, and in none of the normals. Tirofiban inhibited SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation by 89% ($p < 0.001$). Similarly, ADP-induced platelet aggregation was inhibited by 92% ($p < 0.001$) with tirofiban.

Conclusions – SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation occurred in one fourth of patients who received SK or were exposed to a streptococcal infection in the past 3 years. It is reasonable to believe that such patients may not benefit from SK therapy. In these patients, tirofiban significantly decreases the extent of anti-SK antibody-mediated, platelet aggregation. Hence, patients undergoing SK therapy may benefit from tirofiban as an adjunctive therapy.

Keywords: streptokinase, antibodies, myocardial infarction, platelets, inhibitors

CONDENSED ABSTRACT

We evaluated the effect of tirofiban in preventing streptokinase-induced, antibody-mediated, platelet aggregation after administration of SK or development of a streptococcal infection. We selected 103 patients divided into 3 groups: 45 normal volunteers, 45 patients who had received SK within the past 3 years, and 13 patients who had suffered a severe streptococcal infection also within the past 3 years. SK-induced platelet aggregation was observed in 23% of SK and streptococcal infection patients, and in none of the normals. Tirofiban inhibited SK-induced platelet aggregation by 89%. Hence, patients undergoing SK therapy may benefit from tirofiban as adjunctive therapy.

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

ADP:	Adenosine diphosphate
ASO:	Antistreptolysin-O
Fc γ RII:	Fc-gamma receptor type II
GP:	Glycoprotein
IgG:	Immunoglobulin G
N:	Normal volunteers
PBS:	Phosphate-buffered saline
PPP:	Platelet poor plasma
PRP:	Platelet rich plasma
SI:	Streptococcal infection
SK:	Streptokinase

INTRODUCTION

Streptokinase (SK) has been used for decades in the treatment of acute myocardial infarction. However, its use is hindered by resistance to fibrinolysis and reocclusion. Indeed, greater than 60% of patients fail to optimally reperfuse with SK¹ and early reocclusion is observed in up to 16%.² Produced by β -hemolytic streptococci, SK induces an immune response which leads to the production of anti-SK antibodies. These antibodies are ubiquitous in adult humans and circulate as immunologic evidence of previous treatment with SK or streptococcal infections.³⁻⁵ Very high titers may remain in blood for many months to years.⁶⁻⁹ Anti-SK antibodies may inactivate a subsequent dose of SK.¹⁰ They have also been shown to induce platelet aggregation.¹¹ For this reason, readministration of SK is not recommended for months to years after a previous administration.

Although SK-induced platelet aggregation is not generally recognized as a potential complication of the drug, its prevalence ranges from 14% to 30% in healthy blood donors.¹¹⁻¹³ It is thought to be initiated by the binding of anti-SK antibodies to the SK-plasminogen complex located on the platelet surface and is not dependent on the conversion of plasminogen to plasmin.¹¹⁻¹³ The ability of anti-SK antibodies to promote SK-induced platelet aggregation is based on immune activation of platelets and requires the interaction of the Fc domain of anti-SK antibodies with Fc γ RII (CD32), a receptor that can be found on the platelet membrane.

However, limited information is available regarding the magnitude of anti-SK antibody titers and prevalence of SK-induced platelet aggregation after a streptococcal infection. In recent years, GP IIb/IIIa inhibitors were shown to block fibrinogen binding to platelet GP IIb/IIIa receptors and thus prevent platelet aggregation. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the efficacy of tirofiban (a GP IIb/IIIa inhibitor) in preventing SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation after administration of SK or development of a streptococcal infection.

METHODS

Patient population - The study was performed at the Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, between November 1998 and September 1999. We included 103 patients divided in 3 groups: 45 normal volunteers (N), 45 patients treated with SK within the past 3 years (SK) and 13 patients who had suffered a severe streptococcal infection (SI) also within the past 3 years. Exclusion criteria were as follows: for the N group – history of streptococcal infection or SK use within the last 3 years, coronary artery disease, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis; for the SK group – any streptococcal infection within the past 3 years; for the SI group – previous SK use. In addition, all subjects receiving ticlopidine, warfarin, corticosteroids or immunosuppressive agents were excluded. The study was approved by the institutional review committee and all subjects gave written informed consent.

Collection and preparation of human plasma - Blood samples were collected in ambient 5-mL vacutainer tubes containing 0,5 mL of 3,8% sodium citrate. Blood was centrifuged at 2000 rpm for 3 minutes at room temperature to obtain citrated platelet-rich plasma (PRP). Platelet-poor plasma (PPP) was prepared by additional centrifugation at 2800 rpm for 10 min. PRP counts were adjusted at 300 000 to 350 000 cells/ μ l by dilution with autologous PPP. PRP was used within 1 to 1.5 hour to determine platelet aggregation after addition of SK. PPP was used to set the aggregometer and to determine anti-SK antibody titers. All concentrations refer to the final concentration in PRP or in PPP.

Determination of platelet aggregation - Platelet aggregation was measured by the use of a turbidimetric method,¹⁴ using a four channel aggregometer (PAP 4, Biodata, PA, USA). Aggregation curves were calibrated from 0 to 100% light transmission with PRP and PPP, respectively. Four hundred and fifty μ l of PRP were added in parallel to three cuvettes containing a magnetic stir bar and stirred at 1100 rpm. Platelet aggregation was measured in the first tube after stimulation with ADP 2 μ M (positive control), whereas SK (5 000 U/mL) was added in the second tube as the

inducing agent. IV.3 (2 µg/mL; Medarex, New Jersey, USA) was added 2 minutes before the addition of SK 5 000 U/mL in the third tube. This tube was used to confirm that SK-induced platelet aggregation requires the interaction of the anti-SK antibody Fc domain with the platelet FcγRII (also known as CD32).

In a second series of tests in patients showing SK-induced, antibody-mediated platelet aggregation, the extent of inhibition by tirofiban was measured by incubating tirofiban (50 ng/mL; Merck & Co., Rahway, New Jersey) for 2 minutes prior to the addition of 5 000 U/mL of SK. The dosage of tirofiban was chosen to reflect its maximal plasma concentration during a 1-hour infusion of 0.4 µg/kg/min.¹⁵ Finally, tirofiban was also added 2 minutes before the addition of ADP 2 µM in the last tube as a comparison. The extent of platelet aggregation was expressed as a percent of light transmission.

Titration of anti-SK antibodies - Plasma anti-SK antibody titers were measured using a one-site non-competitive ELISA according to the method of Engvall and Perlman.¹⁶ Wells of micro-ELISA plates were incubated with a 200-µl solution of albumin-free SK (1 000 U/mL) in 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6) overnight at 4°C. The wells were then treated with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin (PBS-BSA) and washed four times with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-Tween). PPP (100 µl, diluted from 1/50 to 1/204 800) was added to the wells in duplicate and incubated for 2 hours at 37°C. The wells were washed again four times with PBS-Tween and incubated for 2 hours with the horseradish peroxidase-conjugated goat IgG anti-human IgG (ICN pharmaceuticals, Quebec, Canada). After four additional washes with PBS-Tween, the peroxidase reaction was performed by addition of *o*-phenylenediamine (2 mg/mL; ICN pharmaceuticals, Quebec, Canada) and 0.003% hydrogen peroxide in 0.1 M citrate and 0.2 M sodium phosphate buffer at pH 5.0. After 30 minutes, the reaction was stopped by addition of 50 µl of 4 M sulfuric acid, and the absorbency was read at 492 nm. The anti-SK antibody titers were expressed in arbitrary units (AU/mL) by comparison with a control serum, which was given a titer of 500 AU/mL, included on

each plate.

Statistical analysis - Data are expressed as percentage, median and range, or mean \pm SD, when appropriate. A paired *t* test was used to evaluate the effect of tirofiban on platelet aggregation in patients presenting SK-induced platelet aggregation. Statistical analyses were performed using the SPSS software (SPSS 8.0; SPSS Corporation, Illinois, USA).

RESULTS

Patients - One hundred and three subjects participated in this study: 45 in the N group, 45 in the SK group and 13 in the SI group. Among the latter group, there were 5 cases of necrotizing fasciitis, 3 streptococcal pharyngitides, 3 septicemias, 1 toxic shock-like syndrome and 1 cellulitis. Demographics are shown in table 1, page 85. All patients in the SK group were taking aspirin and 20% of them were also receiving intravenous heparin at the time of the study. The median anti-SK antibody levels were highest in the SK group and lowest in the N group (680 [19-6554] AU/mL in SK; 133 [2-2938] AU/mL in SI; 57 [7-106] AU/mL in N group).

TABLE 1. Demographic characteristics of study patients

	NORMALS (n=45)	SK (n=45)	SI (n=13)
Age (years)	38 ± 9	63 ± 12	46 ± 14
Male (%)	22 (49)	31 (69)	7 (54)
Last exposure to SK or SI (months)	N/A	6.7 ± 6.6	10 ± 7.7
Median anti-SK antibody titers (AU/mL)	57	680	133
Number of patients with SK-induced platelet aggregation (%)	0 (0)	10 (23)	3 (23)
Aspirin use (%)	0 (0)	45 (100)	0 (0)

N/A: not applicable; SI: streptococcal infection; SK: streptokinase.

Platelet aggregation - A total of 13 patients presented SK-induced platelet aggregation [23% (n=10), 23% (n=3) and 0% of the patients in the SK, SI, and N groups, respectively]. IV.3 prevented SK-induced platelet aggregation in all but one patient (87±9% inhibition, $p < 0.001$; Figure 1, page 86). Tirofiban inhibited SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation by a mean of 89±14% ($p < 0.001$) in all responders, while ADP-induced platelet aggregation was inhibited by 92±6% ($p < 0.001$) with tirofiban in all responders as well.

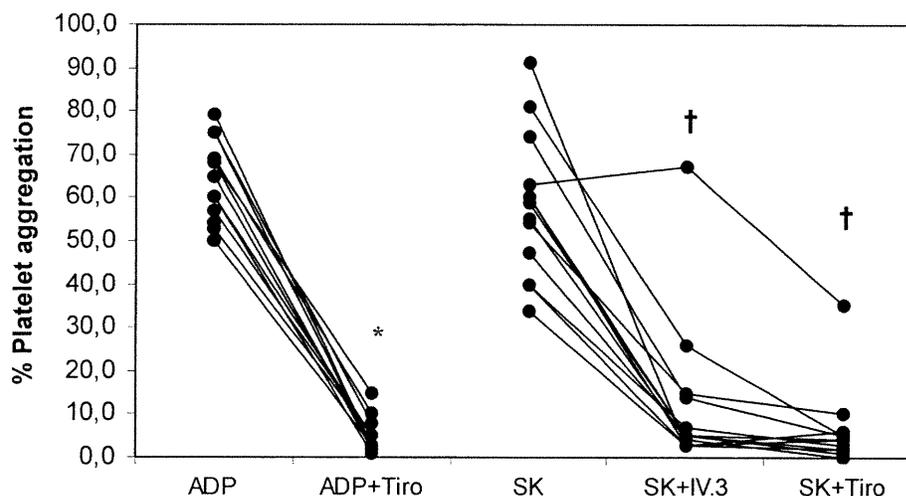


FIGURE 1. Inhibition of adenosine diphosphate (ADP)-induced or streptokinase (SK)-induced platelet aggregation with tirofiban (Tiro) or IV.3 (monoclonal antibody directed against platelet Fc γ receptor type II involved in the interaction with the Fc domain of anti-SK antibodies) in 13 patients demonstrating SK-induced platelet aggregation. * $p < 0.001$ vs ADP; † $p < 0.001$ vs SK.

DISCUSSION

The current study confirms that a GP IIb/IIIa antagonist such as tirofiban can prevent SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation.

Anti-SK antibodies are ubiquitous in adults and increase in titer after infections by streptococci or treatment with SK.⁶⁻⁸ It has also been postulated that a subset of these antibodies can promote platelet aggregation in the presence of SK. In the present study, SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation occurred in about one quarter of patients who had previously been treated with SK for an AMI or had suffered a streptococcal infection within the past 3 years. Among patients who had been treated with SK, SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation occurred

despite daily ASA administration. Tirofiban inhibited *in vitro* platelet aggregation in all patients.

The platelet GP IIb/IIIa membrane receptor plays a pivotal role in the final common pathway leading to platelet aggregation through its binding to fibrinogen.^{17,18} It is intimately involved in the pathophysiology of platelet-rich arterial thromboses¹⁹ and resultant acute coronary syndromes.^{20,21}

Platelet activation can interfere with the fibrinolytic process and predispose to early reocclusion of the culprit artery. Platelet-rich thrombi are resistant to fibrinolysis because platelets and fibrin still accumulate on the thrombus despite functional fibrinolysis.¹⁸ It has been shown that inhibition of platelet function enhances the response to fibrinolytic agents and prevents reocclusion. Indeed, coronary patency occurs faster and is more sustained when antiplatelets, such as ASA and anti-GP IIb/IIIa used with fibrinolytic agents.²²

In vitro, anti-SK antibodies caused platelet aggregation of similar magnitude to a standard dose of ADP in responders. In the same patients, the monoclonal antibody IV.3 confirmed in all but one patient that the anti-SK antibodies were responsible for the platelet aggregation by blocking 87% of their effects. As expected, *in vitro* tirofiban at clinically-used concentrations inhibited 92% of the ADP-induced platelet aggregation. Finally, *in vitro* tirofiban at the same concentration inhibited anti-SK antibodies-induced platelet aggregation to the same extent as it did to ADP-induced aggregation and as did IV.3. Hence, it is possible that the effect of anti-SK antibodies present in almost 25% of recently streptococcus-infected or SK-treated patients, which compromise its efficacy, could be neutralized by the concomitant administration of tirofiban.

Tirofiban, the GP IIb/IIIa antagonist used in this study, has been shown to inhibit *ex vivo* platelet aggregation in a dose- and concentration-dependent manner. Three large-

scale clinical studies have examined the role of tirofiban alone or in combination with heparin in comparison to heparin alone in patients with acute coronary syndrome or undergoing PTCA.²³⁻²⁵ However, tirofiban has not yet been studied in combination with SK for the treatment of AMI. Abciximab, a chimeric antibody to the GP IIb/IIIa receptor able to inhibit platelet aggregation, was studied in combination with ascending doses of streptokinase in patients with acute myocardial infarction and showed no improvement in TIMI 3 flow at 90 minutes over rt-PA alone. Although risk of major bleeding was increased, it was mostly attributed to increased bleedings at instrumented sites, whereas a lower risk of spontaneous or intracranial bleedings was observed.²⁶ A study on the combination of full-dose SK with escalating doses of eptifibatide, a peptidic GP IIb/IIIa antagonist, vs. placebo in 181 patients demonstrated a 42% improvement in patency rate (defined as TIMI 3 flow at 90 minutes).²⁷ This benefit was obtained at the cost of an increase in major and minor bleeding, which occurred mainly at the arterial puncture site.

CONCLUSION

SK-induced, antibody-mediated, platelet aggregation occurred in approximately a quarter of patients who received SK or were exposed to a streptococcal infection within the past 3 years. Such patients may not obtain the same benefits of SK therapy. In these patients, tirofiban significantly decreased the extent of anti-SK antibody-mediated platelet aggregation. Hence, patients presenting with acute myocardial infarction and for whom SK administration is considered may benefit from tirofiban as an adjunct therapy if anti-SK antibodies are present or suspected to be. Additionally, dosing the anti-SK antibody levels prior to initiating thrombolytic therapy would allow better assessment of the risks and benefits for such patients and devices designed for this already exist. However, prospective clinical studies in patients with elevated anti-SK antibody levels are required to assess the safety of a combination of SK and tirofiban and the period of time following a first SK administration or a streptococcal infection remains to be determined.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project has been financially supported by an unrestricted grant from Merck & Co.

We would like to thank Dr Daniel Bichet for the help provided with platelet aggregation studies as well as Dr Benoit Thivierge, Céline Groulx and Mrs. Ginette Gaudette and her team of nurses for their tremendous help with the realization of the study.

REFERENCES

1. The GUSTO Angiographic Investigators. *The effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, or both on coronary-artery patency, ventricular function, and survival after acute myocardial infarction.* N Engl J Med 1993;329:1615-22.
2. Verheugt FW, Meijer A, Lagrand WK. *Reocclusion: the flip side of coronary thrombolysis.* J Am Coll Cardiol 1996;27:766-73.
3. Fletcher AP, Alkjaersig N, Sherry S. *The maintenance of a sustained thrombolytic state in man. I. Induction and effects.* J Clin Invest 1959;38:1111-9.
4. Verstraete M, Vermynen J, Amery A. *Thrombolytic therapy with streptokinase using a standard dosage scheme.* Br Med J 1966;5485:454-6.
5. Lynch M, Littler WA, Pentecost BL. *Immunoglobulin response to intravenous streptokinase in acute myocardial infarction.* Br Heart J 1991;66:139-42.
6. Lee HS, Cross S, Davidson R. *Raised levels of antistreptokinase antibody and neutralization titres from 4 days to 54 months after administration of streptokinase or anistreplase.* Eur Heart J 1993;14:84-9.
7. Jalihal S, Morris GK. *Antistreptokinase titres after intravenous streptokinase.* Lancet 1990;335:184-5.
8. Elliott JM, Cross DB, Cederholm-Williams SA. *Neutralizing antibodies to streptokinase four years after intravenous thrombolytic therapy.* Am J Cardiol

- 1993;71:640-5.
9. Gemmill JD, Hogg KJ, Dunn FG. *Pre-dosing antibody levels and efficacy of thrombolytic drugs containing streptokinase*. Br Heart J 1994;72:222-5.
 10. Lew AS, Neer T, Rodriguez L. *Clinical failure of streptokinase due to an unsuspected high titer of antistreptokinase antibody*. J Am Coll Cardiol 1984;4:183-5.
 11. Vaughan DE, Kirshenbaum JM, Loscalzo J. *Streptokinase-induced, antibody-mediated platelet aggregation: a potential cause of clot propagation in vivo*. J Am Coll Cardiol 1988;11:1343-8.
 12. Vaughan DE, Van Houtte E, Declerck PJ. *Streptokinase-induced platelet aggregation. Prevalence and mechanism*. Circulation 1991;84:84-91.
 13. Lebrazi J, Helft G, Abdelouahed M. *Human anti-streptokinase antibodies induce platelet aggregation in an Fc receptor (CD32) dependent manner*. Thromb Haemost 1995;74:938-42.
 14. Born GVR, Cross MJ. *The aggregation of blood platelets*. J Physiol 1963;168:178-95.
 15. Peerlinck K, De Lepeleire I, Goldberg M. *MK-383 (L-700,462), a selective nonpeptide platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist, is active in man*. Circulation 1993;88:1512-7.
 16. Engvall E, Perlman P. *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry 1971; 8:871-4.

17. Coller BS. *Platelets and thrombolytic therapy*. N Engl J Med 1990;322:33-42.
18. Leung L, Nachman R. *Molecular mechanisms of platelet aggregation*. Annu Rev Med 1986;37:179-86.
19. Coutre S, Leung L. *Novel antithrombotic therapeutics targeted against platelet glycoprotein IIb/IIIa*. Annu Rev Med 1995;46:257-65.
20. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ. *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (first of two parts)*. N Engl J Med 1992;326:242-50.
21. Willerson JT, Golino P, Eidt J. *Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions. Experimental evidence and potential clinical implications*. Circulation 1989;80:198-205.
22. Parise P, Agnelli G. *Thrombus resistance to lysis and reocclusion after thrombolysis: the role of platelets*. Blood Coagul Fibrinolysis 1991;2:749-58.
23. The Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management in Patients Limited by Unstable Signs and Symptoms (PRISM-PLUS) Study Investigators. *Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction*. N Engl J Med 1998;338:1488-97.
24. The Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Study Investigators. *A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina*. N Engl J Med 1998;338:1498-505.

25. The RESTORE Investigators. *Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty*. *Circulation* 1997;96:1445-53.
26. Antman EM, Giugliano RP, Gibson CM. *Abciximab facilitates the rate and extent of thrombolysis: results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 14 trial*. *Circulation* 1999;99:2720-32.
27. Ronner E, van Kesteren HA, Zijnen P. *Safety and efficacy of eptifibatide vs placebo in patients receiving thrombolytic therapy with streptokinase for acute myocardial infarction; a phase II dose escalation, randomized, double-blind study*. *Eur Heart J* 2000;21:1530-6.

CHAPITRE 4

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

1. DISCUSSION GÉNÉRALE

Les travaux effectués dans le cadre de ce projet de maîtrise avaient pour but l'étude de l'effet des anticorps anti-SK sur l'activité plaquettaire et l'efficacité fibrinolytique de la SK. Ce projet de recherche décrit ainsi pour la première fois la production d'anticorps anti-SK et la résistance à la SK chez des patients ayant eu une infection sévère aux streptocoques (cellulite, septicémie ou fascite nécrosante). De plus, nous avons également déterminé le potentiel d'activation et d'agrégation plaquettaire des anticorps anti-SK chez des patients ayant reçu de la SK pour un IM-ST ou suite à une infection aux streptocoques.

Les limites actuelles du traitement fibrinolytique à la SK chez les patients avec IM-ST reposent en partie sur un taux élevé de réocclusion et un taux insatisfaisant de reperfusion complète (TIMI grade 3). De façon générale, on considère que les anticorps anti-SK risquent d'interférer avec l'activité fibrinolytique de la SK en réduisant son efficacité, et pourraient même accroître les risques de rethrombose et de réocclusion. Ainsi, une connaissance plus approfondie de l'effet des anticorps anti-SK sur des paramètres hématologiques précis, tels que la fibrinolyse et l'activité plaquettaire, peut certainement mener à une utilisation plus efficace de la SK.

Malgré les nombreux articles publiés sur le sujet, l'effet des anticorps anti-SK demeure relativement peu définie. En effet, les études traitant de leur effet neutralisant sur l'activité fibrinolytique de la SK se concentrent principalement sur l'évaluation des titres d'anticorps chez des patients coronariens et dans la population générale. Très peu d'auteurs ont évalué les taux d'anticorps chez des patients ayant eu des infections aux streptocoques, infections de plus en plus fréquentes et qui pourraient avoir un impact négatif sur un éventuel traitement fibrinolytique. D'autres études portaient plutôt sur les phénomènes de réactions allergiques,^{212,219,220} ou d'agrégation plaquettaire.^{213,221,224} Cependant, ces phénomènes ont rarement été étudiés de façon simultanée.

Dans le cadre de ce projet, les taux d'anticorps plasmatiques totaux dirigés contre la SK et les sous-types neutralisants ont été évalués chez des patients ayant été traités à la SK, chez des patients ayant eu une infection sévère aux streptocoques et chez des volontaires sains composant un groupe contrôle. L'activité plaquettaire était également évaluée par le biais de la détermination de l'activation et de l'agrégation plaquettaire. Une méthode additionnelle devait par ailleurs nous permettre d'étudier l'effet d'un anti-plaquettaire, le tirofiban, sur la vitesse de fibrinolyse chez les patients présentant une activation et une agrégation plaquettaire induite par les anticorps anti-SK en présence de SK.

1.1. Les anticorps anti-streptokinase

Les taux d'anticorps anti-SK ont été évalués selon la méthode ELISA, qui permet de quantifier les anticorps plasmatiques de type IgG dirigés contre une variété d'épitopes localisés sur la molécule de SK. Cette méthode a été préconisée par rapport à la méthode de microradioimmunologie à cause de l'avantage qu'elle offre par l'utilisation de petits volumes de réactifs. D'un autre côté, l'évaluation de l'effet des anticorps dirigés contre le centre actif de la SK, qui inhibent par le fait même son activité fibrinolytique, s'est faite par le biais du test de résistance à la SK. Cette méthode permet de mesurer la dose de SK nécessaire à la lyse complète, en 10 minutes, d'un caillot formé par l'addition de thrombine et de calcium sur du plasma sans plaquettes (PPP).

Les résultats obtenus selon ces deux méthodes concordent avec ceux rapportés dans la littérature. Ainsi, les patients ayant déjà reçu de la SK pour un IM-ST présentaient une résistance à la SK et des taux élevés d'anticorps anti-SK, tandis que ces mêmes paramètres, bien que souvent détectables, étaient significativement plus bas chez les volontaires sains. Finalement, la résistance à la SK et les titres d'anticorps anti-SK observés chez les patients ayant eu une infection aux streptocoques, bien qu'inférieurs aux valeurs retrouvées chez les patients du groupe post-infarctus, étaient également

significativement plus élevés, comparativement aux valeurs observées chez les volontaires sains.

La présence d'anticorps anti-SK peut avoir plusieurs impacts négatifs lors d'un traitement fibrinolytique à la SK. D'une part, ces anticorps sont susceptibles de neutraliser la SK par encombrement stérique ou par liaison directe avec le centre actif de la SK, empêchant dans les deux cas le Plg de se lier à la SK. D'autre part, sans être nécessairement neutralisants, les anticorps anti-SK peuvent également entraîner une clairance plasmatique accélérée de l'agent fibrinolytique. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet suggèrent donc que les patients ayant déjà reçu de la SK et les patients ayant eu une infection aux streptocoques pourraient ne pas retirer les mêmes bénéfices que des patients n'ayant jamais eu de contact avec des antigènes dérivés des streptocoques, dans le cadre d'un traitement fibrinolytique à la SK.

1.2. Activité plaquettaire

Outre leur potentiel neutralisant, les anticorps anti-SK peuvent également être impliqués dans la formation de complexes immuns tertiaires avec le Plg et le récepteur plaquettaire CD42, risquant ainsi de provoquer une activation et une agrégation plaquettaire. Afin d'approfondir le sujet, certaines manipulations permettant la détermination de l'activation et de l'agrégation des plaquettes en présence de SK et d'anticorps anti-SK ont été effectuées.

1.2.1. Activation plaquettaire

Tandis que les études antérieures visaient principalement la détermination de l'activation plaquettaire par le biais de la quantification des concentrations en sécrétagogues, la méthode de cytométrie en flux utilisée dans le présent projet, tel que décrite par Shattil et *al.*,²²⁶ nous a permis de déterminer l'état d'activation des plaquettes circulantes selon le principe de la liaison des anticorps monoclonaux activation-dépendants. Cette méthode offre l'avantage de permettre l'étude des

plaquettes dans leur milieu physiologique, soit en sang complet, tout en réduisant les risques d'artéfacts (perte de sous-populations et activation artéfactuelle *in vitro*) et en étant plus représentative de l'aspect clinique.²²⁷ La réactivité des plaquettes était donc étudiée suite à l'ajout d'agonistes (SK, ADP) ou d'antagoniste (IV.3) par le biais de l'expression des récepteurs GP IIb/IIIa, tel que déterminé par un changement dans la liaison de l'anticorps monoclonal PAC-1.²²⁷

Ainsi, nous rapportons pour la première fois l'état d'activation des plaquettes, en présence de SK et d'anticorps anti-SK, par la méthode de cytométrie en flux. Une activation plaquettaire induite par les anticorps anti-SK en présence de SK a été observée chez près de la moitié (45.9%) des patients ayant reçu de la SK pour le traitement de l'IM-ST, avec une dose de 5 000 U/mL. Ce taux chutait à 16.7% chez les patients ayant eu une infection aux streptocoques et à 14.6% chez les patients sains. La différence observée au niveau de la proportion de patients répondeurs, dans chaque groupe, pourrait être expliquée par le fait que le groupe post-infarctus est majoritairement composé d'hommes. En effet, il a déjà été démontré que les plaquettes, chez les patients de sexe masculin, réagissent plus intensément aux agonistes de l'activation et de l'agrégation plaquettaire.²²⁸ De plus, les patients de ce groupe sont en moyenne plus âgés, ce qui peut également affecter la réactivité de plaquettes.²²⁹

1.2.2. Agrégation plaquettaire

En plus de la méthode de cytométrie, nous avons également déterminé la prévalence d'agrégation plaquettaire, suite à l'addition de SK, chez les trois groupes de patients. La méthode d'agrégométrie, telle que décrite par Born et *al.*,²³⁰ permet d'observer si une condition clinique particulière résulte en un changement de la réactivité plaquettaire. Bien que la plupart des publications portant sur l'agrégation plaquettaire induite par les anticorps anti-SK en présence de SK dérivent de l'utilisation de la méthode d'agrégométrie, la prévalence de ce type d'agrégation plaquettaire n'avait jamais été étudiée chez des patients post-infarctus et post-infection.

Ainsi, ce travail rapporte, pour une première fois également, la prévalence de patients post-infarctus et post-infection présentant une agrégation plaquettaire induite par les anticorps anti-SK en présence de SK. Les résultats obtenus démontrent qu'un grand pourcentage (23%) des patients ayant déjà reçu de la SK pour le traitement d'un IM-ST présentent une agrégation plaquettaire induite par les anticorps anti-SK en présence de SK. Le tirofiban ayant inhibé l'agrégation plaquettaire en présence de SK, ces patients pourraient bénéficier de l'addition d'un anti-plaquettaire, tel que le tirofiban, dans le traitement de l'IM-ST.

Au niveau des volontaires sains, nos résultats concordent faiblement avec ceux rapportés dans des études précédentes. Ainsi, alors qu'aucun volontaire sain n'a présenté une agrégation plaquettaire induite par les anticorps anti-SK en présence de SK, Vaughan et *al.* rapportaient une prévalence de 14%, avec une dose identique de SK (5 000 U/mL).¹⁹³ Toujours avec la même dose, Abdelouahed et *al.*²³¹ et Lebrazi et *al.*¹⁹⁴ ont également observé des prévalences assez élevées (20% et 30 % respectivement). Cette divergence de résultats peut s'expliquer en partie par la composition des différents groupes de volontaires sains. Entre autre, les auteurs ne mentionnaient pas avoir exclu les infections possibles chez leurs patients. Par ailleurs, le groupe de volontaires utilisés dans le projet actuel était majoritairement composé de femmes étant significativement plus jeunes que les patients des groupes post-infarctus et post-infection. Tous ces facteurs peuvent affecter la réactivité des plaquettes et expliquer le faible pourcentage de volontaires sains répondeurs observé dans notre étude.

Quoi qu'il en soit, les prévalences élevées d'activation (chez les patients post-infection) et d'agrégation plaquettaire (chez les patients post-infarctus et post-infection) pourraient avoir des répercussions sur le traitement fibrinolytique à la SK. Du plus, la majorité des patients post-infarctus prenaient de l'aspirine quotidiennement et certains étaient même sous thérapie anticoagulante avec de l'héparine. De tels résultats impliquent que les patients recevant un premier traitement fibrinolytique à la SK bénéficieraient de l'administration concomitante d'un anti-

plaquettaire tel que le tirofiban, qui inhibe *in vitro* l'agrégation induite par les anticorps anti-SK en présence de SK.

1.3. Activité fibrinolytique de la streptokinase

Afin de vérifier une des hypothèses de ce projet, à savoir que l'activité fibrinolytique de la SK est potentiellement inhibée non seulement par la présence d'anticorps anti-SK, mais également par l'activation et l'agrégation plaquettaire induite par les anticorps anti-SK en présence de SK, une dernière méthode a été utilisée. Cette méthode, le test *50% clot lysis time*, devait nous permettre de mesurer le temps de lyse en fonction de la densité optique, dans des puits contenant un thrombus plaquettaire et différentes concentrations de SK ou de SK/tirofiban. Bien que cette méthode est habituellement utilisée sur du PPP, l'utilisation du plasma contenant des plaquettes (PRP) était nécessaire pour les besoins de l'étude. En fonction de l'hypothèse, les résultats attendus consistaient en un temps de lyse plus rapide pour les échantillons contenant de la SK et du tirofiban, comparativement aux échantillons n'ayant reçu que de la SK.

Les résultats obtenus par le biais de cette méthode ne correspondent cependant pas à ceux qui étaient attendus et n'ont pas été présentés dans les manuscrits pour les raisons suivantes :

1. Les résultats étaient non reproductibles, une grande variabilité existant entre des puits contenant les mêmes réactifs (*triplicatas*);
2. Les graphiques obtenus par le biais de cette méthode auraient dû présenter une distribution normale alors qu'aucune distribution particulière n'était discernable. De plus, tandis que certains patients présentaient des vitesses de lyse très rapides, d'autres patients n'ont jamais présenté de lyse, même après des périodes d'incubations de plus de 24 heures. Chez certains patients, il a même été impossible d'obtenir un caillot, malgré l'addition de grande concentration de thrombine et de Ca^{2+} .

Une analyse statistique effectuée avec les résultats considérés valides a cependant permis d'observer une différence dans le temps de lyse. Toutefois, cette différence n'était pas statistiquement significative. Cette méthode n'a jamais été utilisée dans les études portant sur les anticorps anti-SK. Il est possible que les résultats incohérents obtenus soient dus aux très petits volumes utilisés et à des erreurs de manipulations. En effet, les volumes étant réduits, la moindre différence de volume ou une erreur de manipulation peut créer de grande divergence.

1.4. Limitations de l'étude

Ce projet comporte certaines limitations dont il est nécessaire de faire mention. Ainsi, les différences dans la composition des groupes, tant au niveau de l'âge que du sexe, la différence au niveau des intervalles depuis l'administration de SK ou depuis l'infection aux streptocoques, sont autant de facteurs ayant pu influencer les résultats.

Malgré ces limitations, plusieurs mesures ont été prises afin de réduire les biais au maximum et représenter autant que possible les conditions cliniques. Ainsi, les échantillons sanguins étaient toujours pris durant la même période de la journée, soit entre 8:00 et 10:00 am. De plus, nous avons également considéré les patients prenant de l'AAS ou sous traitement héparinique. En effet, il aurait été difficile de recruter des patients post-infarctus ne prenant pas cet anti-plaquettaire. D'autre part, l'administration d'AAS étant un standard dans le traitement post-infarctus, l'utilisation de ces patients était pleinement justifiée du point de vue clinique.

À un autre niveau, certains problèmes ont été rencontrés quant au recrutement de patients ayant eu une infection sévère aux streptocoques. Tel que déterminé au préalable, 45 patients devaient être recrutés pour chacun des groupes. Cependant, dû au faible nombre de patients traités pour des infections aux streptocoques à l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, seulement 13 patients ont pu être inclus dans l'étude. De par la faible taille de ce groupe, certaines différences ne peuvent être démontrées d'un point de vue statistique.

2. CONCLUSION

En conclusion, ce travail démontre pour une première fois le potentiel pro-activateur des anticorps anti-SK par le biais de la méthode de cytométrie en flux, tant chez des patients ayant déjà été traités à la SK que chez des patients ayant eu une infection sévère aux streptocoques. Chez ce dernier groupe de patient, ce travail démontre également le potentiel neutralisant des anticorps. De façon idéale, une étude prospective chez des patients ayant des titres élevés d'anticorps anti-SK et qui aurait pour objectifs l'évaluation des titres d'anticorps anti-SK, de la résistance à la SK et de l'activité plaquettaire avant et après l'administration de SK pour un IM-ST, permettrait de définir plus précisément l'impact des anticorps anti-SK sur le traitement fibrinolytique à la SK. Toutefois, une telle étude ne peut être conduite à cause de son caractère non-éthique. Dans un tel contexte, une étude *in vitro* telle que celle effectuée dans le cadre de ce projet de recherche permet l'approfondissement des connaissances. Nous pouvons ainsi affirmer que les taux élevés d'anticorps anti-SK, la résistance à la SK et l'activation et l'agrégation plaquettaires, pourraient avoir des répercussions sur les risques de rethrombose et de réocclusion suite au traitement fibrinolytique avec la SK. Plus spécifiquement, la caractérisation de l'effet des anticorps anti-SK sur l'activité plaquettaire et l'efficacité fibrinolytique nous permet de tirer les conclusions suivantes :

1. Les patients ayant déjà reçu de la SK pour le traitement de l'IM-ST présentent des titres d'anticorps anti-SK et de résistance à la SK significativement plus élevés que ceux observés chez les volontaires sains, de sorte qu'une seconde administration de SK pourrait s'avérer inefficace dans le traitement de l'IM-ST.
2. Bien que les titres d'anticorps et de résistance ne soient pas aussi élevés comparativement aux patients post-infarctus, les patients post-infection aux streptocoques présentent également des valeurs plus élevées que celles retrouvées chez les volontaires. Ces patients pourraient donc également ne pas retirer les mêmes bénéfices, advenant la nécessité d'un traitement à la SK.

3. Chez les patients post-infarctus, l'activité plaquettaire est modulée par les anticorps anti-SK, qui induisent une activation plaquettaire chez près de 50% des patients suite à une seconde exposition et qui provoquent une agrégation plaquettaire dans 25% des cas. Des résultats similaires, bien que d'intensité plus modérée, ont également été observés chez des patients post-infection. Ces phénomènes d'activation et d'agrégation plaquettaire observés *in vitro* pourraient atténuer la vitesse de reperfusion et augmenter les risques de réocclusion suite à un traitement à la SK. L'utilisation d'un anti-GP IIb/IIIa, tel que le tirofiban, peut s'avérer bénéfique dans la réduction de ces risques, puisqu'il inhibe l'agrégation plaquettaire induite par les anticorps anti-SK en présence de SK. Des études prospectives cliniques sont nécessaires pour confirmer l'efficacité et la sécurité de la combinaison.

Depuis la dernière décennie, plusieurs investigateurs se sont penchés sur l'étude des interactions entre la SK, les anticorps anti-SK et le Plg. Ainsi, des études de biologie moléculaire ont permis l'identification de certaines régions antigéniques de la molécule de SK. Ceci pourrait éventuellement permettre la modélisation d'une molécule mutante de SK, possédant la même efficacité fibrinolytique mais démunie de son caractère antigénique.²³² Certains auteurs suggèrent ainsi que la caractérisation détaillée des épitopes permettrait d'éviter les risques de neutralisation, d'agrégation plaquettaire et d'allergies par utilisation du principe d'immunisation (blocage peptidique) avant l'administration de SK ou par substitution de certains acides aminés impliqués dans l'antigénicité de la molécule. La deuxième solution permettrait ainsi d'altérer la reconnaissance immunologique sans toutefois altérer le potentiel fibrinolytique de la molécule.²³³

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Gillum R. *Trends in acute myocardial infarction and coronary artery disease death in the United States*. J Am Coll Cardiol 1993; 23:1273-1277.
2. Davies MJ, Thomas AC. *Plaque fissuring – the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina*. Br Heart J 1985; 53:363-373.
3. Falk E, Shah PK, Fuster V. *Coronary plaque disruption*. Circulation 1995; 92:657-671.
4. Hamm CW, Goldman GU, Heeschen C, Kreymann G, Berger J, Meinertz T. *Emergency room triage of patients with acute chest pain by means of rapid testing for cardiac troponin T or troponin I*. N Engl J Med 1997; 337:1648-1653.
5. Lüscher MS, Thygesen R, Ravkilde J, Heickendorff L, for the TRIM Study Group. *Applicability of cardiac troponin T and I for early risk stratification in unstable coronary artery disease*. Circulation 1997; 96:2578-2585.
6. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes*. N Engl J Med 1992; 326:242-250: 310-318.
7. Fallon JT. *Pathology of myocardial infarction and reperfusion*. In Fuster V, Ross R and Topol EJ (eds). *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996, 791-796.

8. Piérard LA. *Non-Q-wave, incomplete infarction*. In Julian D and Braunwald E (eds). *Management of Acute Myocardial Infarction*. London, WB. Saunders Ltd 1994; 315-330.
9. Pfeffer MA, Braunwald E. *Ventricular remodeling after myocardial infarction: Experimental observations and clinical implications*. *Circulation* 1990; 81:1161-1172.
10. Vaughan DE, Pfeffer MA. *Ventricular remodeling following myocardial infarction and angiotensin-converting enzyme inhibitors*. In Fuster V, Ross R, Topol EJ (eds). *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Philadelphia, Lippincott-Ravin 1996: 1193-1205.
11. American Heart Association. *Heart and Stroke Facts: 1996 Statistical Supplement*. Dallas, American Heart Association, 1996:1-23.
12. Willerson JT, Hillis LD, Buja LD. *Pathogenesis and pathology of ischemic heart disease*. In *Ischemic Heart Disease. Clinical and Pathophysiological Aspects*. New York, Raven Press, 1982: 47.
13. DeWood MA, Spores J, Notske R, Mouser LT, Burroughs R, Golden MS, Lang LT. *Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction*. *N Engl J Med*. 1980; 303: 897-902.
14. Ong L, Reiser P, Coromilas J, Scheer L, Morrison J. *Left ventricular function and rapid release of creatine kinase MB in acute myocardial infarction: Evidence for spontaneous reperfusion*. *N Engl J Med* 1983; 309:1-6.
15. Falk E. *Unstable angina with fatal outcome:dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent*

mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. Circulation 1985; 71:699-708.

16. Constantinides P. *Plaque fissures in human coronary thrombosis.* J Athero Res 1966; 6: 1-17.
17. Willerson JT. *Conversion from chronic to acute coronary heart disease syndromes: Role of platelets and platelet products.* Tex Heart Inst J 1995; 22:13-19.
18. Harrison DC. *Nonatherosclerotic coronary disease.* In Fuster V, Ross R, Topol EJ (eds). *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease.* Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996; 757-772.
19. ACC/AHA guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction. *A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Acute Myocardial Infarction).* J Am Coll Cardiol 1996; 28: 1328-1428.
20. Ross R, Glomset JA. *Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle cell is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis.* Science 1973; 180: 1332-1339.
21. Ross R, Glomset JA. *The pathogenesis of atherosclerosis.* N Engl J Med. 1976; 295: 369-420.
22. Ross R, Harker L. *Hyperlipidemia and atherosclerosis.* Science 1976; 193: 1094-1100.

23. Ross R, Fuster V. *The pathogenesis of atherosclerosis*. In Fuster V, Ross R and Topol EJ (eds). *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996, pp 441-462.
24. Selwyn AP, Yeung AC, Ryan TJ, Raby K, Barry J, Ganz P. *Pathophysiology of ischemia in patients with coronary artery disease*. Prog Cardiovasc Dis 1992; 35:27-39.
25. Deng X, King MW, Guidoin R. *Localization of atherosclerosis in arterial junctions. Concentration distribution of low-density lipoproteins at the luminal surface in regions of disturbed flow*. ASAIO J 1995; 41:58-67.
26. Libby P. *Molecular basis of the acute coronary syndromes*. Circulation 1995; 91:2844-2850.
27. Stolley PD. *Primary prevention of the atherosclerotic disease: a report of the Inter-Society Commission for Heart Disease Resources*. Ann Int Med 1972; 76:661-663.
28. Stamler J, Berkson DM, Lindberg HA. Risk factors: *Their role in the etiology and pathogenesis of the atherosclerotic diseases*. In Wissler RW, Geer JC, Kaufman N (eds). *The Pathogenesis of Atherosclerosis*. Baltimore, Williams and Wilkins Co. 1972: 41-67.
29. Kuller LH. *Epidemiology of cardiovascular disease: Current perspectives*. Am J Epidemiol 1976; 104: 425-496.
30. Ross R, Wight TN, Strandness E, Thiele B. *Human atherosclerosis I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery*. Am J Pathol 1984; 114:79-93.

31. Steinberg D. *Antioxidants and atherosclerosis: A current assessment.* Circulation 1991; 84: 1420-1425.
32. Van Furth R. *Current view on the mononuclear phagocyte system.* Immunobiology 1982; 161: 178-185.
33. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. *Binding site of macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low-density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition.* Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:333-337.
34. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. *Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.* N Engl J Med 1989; 320:915-924.
35. Ylä-Herttuala S, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Sigal E, Särkioja T, Witztum JL, Steinberg D. *Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions: 15-lipoxygenase and acetyl low density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation specific lipid-protein adducts.* J Clin Invest 1991; 87:1146-1152.
36. Witztum JL. *The oxidation hypothesis of atherosclerosis.* Lancet 1994;344:793-795.
37. Libby P, Clinton SK. *The role of macrophages in atherogenesis.* Curr Opin Lipidol 1993; 4: 355-363.
38. Owens GK. *Role of alterations in the differentiated state of smooth muscle cell in atherogenesis.* In Fuster V, Ross R, Topol EJ (eds). *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease.* Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996: 401-420.

39. Ross R. *The smooth muscle cells. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers.* J Cell Biol 1971; 50:172-186.
40. Ross R. *The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s.* Nature 1993; 362:801-809.
41. Baumgartner HR, Hosang M. *Platelets, platelet-derived growth factor and atherosclerosis.* Experientia 1988; 44:109-112.
42. Thyberg J, Palmberg L, Nilsson J, Ksiazek T, Sjolund M. *Phenotype modulation in primary cultures of arterial smooth muscle cells: on the role of platelet-derived growth factor.* Differentiation 1983; 25:156-167.
43. Wight TH. *The extracellular matrix and atherosclerosis.* Curr Opin Lipidol 1995; 6: 326-334.
44. Haust MD, More RH, Movat HZ. *The role of the smooth muscle cell in the fibrogenesis of atherosclerosis.* Am J Pathol 1960; 37:377-389.
45. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis.* Circulation 1995; 92:1355-1374.
46. Stary HC. *Composition and classification of human atherosclerotic lesions.* Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1992; 421:277-290.
47. Lundberg B. *Chemical composition and physical state of lipid deposits in atherosclerosis.* Atherosclerosis 1985; 56:93-110.

48. Small DM. *Progression and regression of atherosclerotic lesions: Insights from lipid physical biochemistry*. *Atherosclerosis* 1988; 8:103-129.
49. Ross R, Glomset JA. *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. *N Engl J Med*. 1976; 295:420-425.
50. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. *A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 1207-1210.
51. Berliner JA, Heinecke JW. *The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis*. *Free Radical Biol & Med* 1996; 20:707-727.
52. Navab M, Fogelman AM, Berliner JA, Territo MC, Demer LL, Frank JS, Watson AD, Edwards PA, Lusis AJ. *Pathogenesis of atherosclerosis*. *A J of Cardiol* 1995; 76:18C-23C.
53. Little WC, Constantinescu M, Applegate RJ, Kutcher MA, Burrows MT, Kahl FR, Santamore WP. *Can coronary angiography predict the site of a subsequent myocardial infarction in patients with mild-to-moderate coronary artery disease?* *Circulation* 1988; 78:1157-1166.
54. Alderman EL, Corley SD, Fisher LD, Chaitman BR, Faxon DP, Foster ED, Killip T, Sosa JA, Bourassa MG, CASS Participating Investigators and Staff. *Five-year angiographic follow-up of factors associated with progression of coronary artery disease in the Coronary Artery Surgery Study (CASS)*. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22:1141-1154.
55. Kragel AH, Reddy SG, Wittes JT, Roberts WC. *Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary*

- arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death.* Circulation 1989; 80:1747-1756.
56. Loree HM, Kamm RD, Stringfellow RG, Lee RT. *Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels.* Circ Res 1992; 71: 850-858.
 57. MacIssac AI, Thomas JD, Topol EJ. *Toward the quiescent coronary plaque.* J Am Coll Cardiol 1993; 22:1228-1241.
 58. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. *Pathogenesis of Thrombosis.* In *Hemostasis and Thrombosis.* Lippincott, Philadelphia, 1987, pp. 1063-1142.
 59. Harker LA. *Pathogenesis of Thrombosis.* In Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. *Hematology.* NY, McGraw-Hill, 1990, pp. 1559-1569.
 60. Behnke O. *Electron microscopical observations on the surface coating of human blood platelets.* J Ultrastruct Res 1968; 24: 51-69.
 61. Frojovic MM, Milton JG. *Human platelet size, shape, and related functions in health and disease.* Physiol Rev 1982; 62:185-261.
 62. Behnke O. *Electron microscopical observations on the surface coating of human blood platelets.* J Ultrastruct Res 1968;24:51-69.
 63. Hemker HC, van Rijn JL, Rosing J, van Dieijen G, Bevers EM, Zwaal RF. *Platelet membrane involvement in blood coagulation.* Blood cells 1983; 9:303-317.

64. Wencel-Drake JD, Plow EF, Kunicki TJ, Woods VL, Keller DM, Ginsberg MH. *Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses*. Am J Pathol 1986; 124:324-334.
65. Lapetina EG. *The signal transduction induced by thrombin in human platelets*. FEBS Lett 1990; 268:400-404.
66. Pytela R, Pierschbacher MD, Ginsberg MH, Plow EF, Ruoslahti E. *Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of ARG-GLY-ASP-specific adhesion receptors*. Science 1986; 231: 1559-1562.
67. Plow EF, McEver RP, Collier BS, Woods VL Jr, Marguerie GA, Ginsberg MH. *Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets*. Blood 1985; 66:724-727.
68. Nachmias VT, Yoshida KI. *The cytoskeleton of the blood platelet: a dynamic structure*. Adv Cell Biol 1988; 2: 181-211.
69. Steiner M, Ikeda Y. *Quantitative assessment of polymerized and depolymerized platelet microtubules. Changes caused by aggregating agents*. J Clin Invest 1979; 63:443-448.
70. Fox JEB. *Platelet contractile proteins*. In: Phillips DR, Shuman MA (eds). *Biochemistry of platelets*. Orlando: Academic Press, 1986:116-159.
71. Hartwig JH, Kwiatkowski DJ. *Actin-binding proteins*. Curr Opin Cell Biol 1991; 3:87-97.
72. White JG. *The sarcoplasmic reticulum of platelets*. Fed Proc 1972; 31:654a.

73. White JG. *Is the canicular system the equivalent of the muscle sarcoplasmic reticulum?* Hemostasis 1975; 4:185-191.
74. Gerrard JM, White JG, Rao GHR, Townsend D. *Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system.* Am J Pathol 1976; 83:283-298.
75. Holmsen H, Weiss HJ. *Secretable storage pools in platelets.* Annu Rev Med 1979; 30:119-134.
76. Wood JG. *Electron microscopic localization of 5-hydroxytryptamine (5HT).* Texas Rep Biol Med 1965; 23:828-837.
77. White JG. *The dense bodies of human platelets. Origin of serotonin storage particles from platelet granules.* Am J Pathol 1968; 53: 567-575.
78. Sander HJ, Slot JW, Bouma BN, Bolhuis PA, Pepper DS, Sixma JJ. *Immunocytochemical localization of fibrinogen, platelet factor 4, and beta thromboglobulin in thin frozen sections of human blood platelets.* J Clin Invest 1983; 72:1277-1287.
79. Wencel-Drake JD, Painter RG, Zimmerman TS, Ginsberg MH. *Ultrastructural localization of human platelet thrombospondin, fibrinogen, fibronectin, and von Willebrand factor in frozen thin sections.* Blood 1985; 65:929-938.
80. Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, Antoniades HN, Scher CD. *Platelet α -granules contain a growth factor for fibroblasts.* Blood 1979; 53: 1043-1052.

81. Wencel-Drake JD, Dahlback B, White JG, Ginsberg MH. *Ultrastructural localization of coagulation factor V in human platelets*. Blood 1986;68:244-249.
82. Valles J, Santos MT, Aznar J, Marcus AJ, Martinez-Sales V, Portoles M, Broekman MJ, Safier LB. *Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, ADP release, and recruitment*. Blood 1991; 78:154-162.
83. Ruoslahti E. *Integrins*. J Clin Invest 1991;87 :1-5.
84. Tilney LG, Bonder EM, DeRosier DJ. *Actin filaments elongate from their membrane-associated ends*. J Cell Biol 1982; 90:485-494.
85. Sixma JJ, Sakarissen KS, Beeser-Visser NH. *Adhesion of platelets to human artery subendothelium: effect of factor VIII-von Willebrand factor of various multimeric compositions*. Blood 1984; 63:128-139.
86. Ruggeri ZM, Zimmerman TS. *von Willebrand Factor and von Willebrand Disease*. Blood 1987; 70:895-904.
87. Kieffer N, Phillips DR. *Platelet membrane glycoproteins: Functions in cellular interactions*. Ann Rev Cell Biol 1990; 6: 329-357.
88. Dong JF, Sae-Tung G, Lopez JA. *Role of glycoprotein V in the formation of the platelet high-affinity thrombin-binding site*. Blood 1997; 89:4355-4363.
89. Detwiler TC, Charo IP, Feinman RD. *Evidence that calcium regulates platelet function*. Thromb Haemost 1978; 40:207-211.

90. Holmsen H. *Signal transducing mechanisms in platelets*. Proc Nat Sci Council 1991; 15:147-152.
91. Colman RW, Marder VJ, Salzman EW, Hirsh J. *Overview of hemostasis*. In Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (eds). *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practices*. Philadelphia: JB Lippincott, 1994:3-18.
92. Peerschke EIB. *Platelet membranes and receptors*. In Loscalzo J, Schafer AI. *Thrombosis and Hemorrhage*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1998:221-232.
93. Bennett JS, Shattil SJ. *Platelet function*. In Williams J, Beutler E, Erslev AJ (eds). *Hematology*, 4th edition. New York, McGraw-Hill 1990: 1233-1250.
94. Rapoport SI. *Blood coagulation and its alterations in hemorrhagic and thrombotic disorders*. West J Med 1993; 158: 156-161.
95. MacFarlane RG. *An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier*. Nature 1964; 202:498-499.
96. Davie EW, Ratnoff OD. *Waterfall sequence of intrinsic blood coagulation*. Science 1964; 145:1310-1312.
97. Furie B, Furie BC. *The molecular basis of blood coagulation*. Cell 1988; 53:505-518.
98. Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S. *Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes*. Blood 1990; 76: 1-16.

99. Bauer KA, Rosenberg RD. *The pathophysiology of the prothrombotic state in humans: insights gained from studies using markers of hemostatic system activation.* Blood 1987; 70:343-350.
100. Bauer KA, Kass BL, Ten Cate H, Bednarek MA, Hawiger JJ, Rosenberg RD. *Detection of factor X activation in humans.* Blood 1989; 74:2007-2015.
101. Gettins P, Patston PA, Schapira M. *Structure and mechanism of action of serpins.* Hematol Oncol Clin North Am 1992; 6: 1393-1408.
102. Laskowski M Jr, Kato I. *Protein inhibitors of proteinases.* Annu Rev Biochem 1980; 48: 593-626.
103. Stein B, Fuster V, Halperin JL, Chesebro JH. *Antithrombotic therapy in cardiac disease: an emerging approach based on pathogenesis and risk.* Circulation 1989;80 :1501-1513.
104. Furie B, Furie BC. *Molecular and cellular biology of blood coagulation.* N Engl J Med 1992; 326: 800-806.
105. Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. *The structural biology of expression and function of tissue factor.* Thromb Haemost 1991; 66:67-79.
106. Davie EW. *Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade.* Thromb Haemost 1995; 74:1-6.
107. Rapaport SI, Rao LVM. *The tissue factor pathway: How it has become a "prima ballerina?"* Thromb Haemost 1995; 74: 7-17.
108. Doolittle RF. *The structure and evolution of vertebrate fibrinogen.* Ann NY Acad Sci 1983; 408:13-27.

109. Henschen A, Lottspeich F, Kehl M, Southan C. *Covalent structure of fibrinogen*. Ann NY Acad Sci 1983; 408:28-43.
110. Mosesson MW. *Fibrin polymerization and its regulatory role in hemostasis*. J Lab Clin Med 1990; 116:8-17.
111. Fuster V, Verstraete M. *Hemostasis, Thrombosis, Fibrinolysis, and Cardiovascular Disease*. In Braunwald E (ed.). *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Philadelphia, Saunders 1997: 1809-1842.
112. Rosenberg RD, Baurka JF. *The heparin-antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism*. In Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (eds). *Hemostasis and thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia JB, Lippincott, 1994: 837-860.
113. Francis CW, Marder VJ. *Physiologic regulation and pathologic disorders of fibrinolysis*. Hum Pathol 1987; 18:263-274.
114. Stump DC, Taylor FB Jr, Neisheim ME, Giles AR, Dzik WH, Borill EG. *Pathologic fibrinolysis as a cause of clinical bleeding*. Semin Thromb Hemostas 1990; 16:260-273.
115. Collen D. *On the regulation and control of fibrinolysis*. Thromb Haemost 1980; 43: 77-89.
116. Erickson LA, Schleef RR, Ny T, Loskutoff DJ. *The fibrinolytic system of the vascular wall*. Clin Haematol 1985; 14:513-530.
117. Collen D, Lijnen HR. *The fibrinolytic system in man*. CRC Crit Rev Oncol Hematol 1986; 4: 249-301.

118. Loskutoff DJ, Curriden SA. *The fibrinolytic system of the vessel wall and its role in the control of thrombosis*. Ann NY Acad Sci 1990; 598:238-247.
119. Forsgren M, Raden B, Israelson M, Larsson K, Heden LO. *Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen*. FEBS Lett 1987; 213: 254-260.
120. Robbins K, Summaria L, Hsieh B, Shah R. *The peptide chains of human plasmin*. J Biol Chem 1967; 242: 2333-2342.
121. Wallen P, Wiman B. *Characterization of human plasminogen. II: Separation and partial characterization of different molecular forms of human plasminogen*. Biochim Biophys Acta 1972; 257:122-134.
122. Handin RJ, Loscalzo J. *Hemostasis, thrombosis, fibrinolysis and cardiovascular disease*. In: Braunwald E (ed). *Heart Disease – A Textbook of Cardiovascular Medicine, 4th edn*. Philadelphia: Saunders 1992:1767-1789.
123. Miles LA, Plow EF. *Binding and activation of plasminogen on the platelet surface*. J Biol Chem 1985; 260:4303-4311.
124. Bauer PI, Machovich R, Buki KG, Csonka E, Koch SA, Horvath I. *Interaction of plasmin with endothelial cells*. Biochem J 1984; 218:119-124.
125. Backmann F. *Plasminogen activators*. In: Coleman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (eds). *Hemostasis and Thrombosis, 2nd edn*. Philadelphia: Lippincott, 1987:318-339.
126. Kaplan AP. *Initiation of the intrinsic coagulation and fibrinolytic pathways of man: the role of surfaces, Hageman factor, pre-kallikrein, high molecular weight kininogen and factor XI*. Progr Hemost 1978; 4:127-175.

127. Kluft C, Dooijewaard G, Emeis JJ. *Role of the contact system in fibrinolysis*. Semin Thromb Hemost 1987; 13: 50-68.
128. Lucas FV, Miller ML *The fibrinolytic system. Recent advances*. Cleveland Clin J Med 1988; 55: 531-541.
129. Steffens GJ, Gunzler WA, Olting F, Frankhus E, Flohe L. *The complete amino acid sequence of low molecular mass urokinase from human urine*. Physiol Chem 1982; 363:1043-1058.
130. Van Hinsbergh V. *Regulation of the synthesis and secretion of plasminogen activators by endothelial cells*. Haemostasis 1988; 18:307-327.
131. Travis J, Salvesen GS. *Human plasma proteinase inhibitors*. Annu Rev Biochem 1983; 52:655-709.
132. Sprengers ED, Kluft D. *Plasminogen activator inhibitors*. Blood 1987; 69: 381-387.
133. Kruithof EKO. *Plasminogen activator inhibitors – a review*. Enzyme 1988; 40:113-121.
134. Schleef RR, Luskutoff DJ. *Fibrinolytic system of vascular endothelial cells. Role of plasminogen activator inhibitors*. Haemostasis 1988; 18:328-341.
135. Luskutoff DJ, Curriden SA. *The fibrinolytic system of the vessel wall and its role in the control of thrombosis*. Ann NY Acad Sci 1990; 598:238-247.
136. Kruithof EKO, Tran-Thang C, Backmann F. *Studies on the release of plasminogen activator inhibitor by human platelets*. Thromb Haemostas 1986; 55: 201-205.

137. Loskutoff D, Edgington T. *Synthesis of a fibrinolytic activator and inhibitor by endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74:3903-3907.
138. Aoki N. *Natural inhibitors of fibrinolysis*. Progr Cardiovasc Dis 1979; 21: 267-286.
139. Sakata Y, Aoki N. *Significance of cross-linking of $\alpha 2$ -plasmin inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostases*. J Clin Invest 1982; 69: 536-542.
140. Plow EF, Collen D. *The presence and release of alpha-2-antiplasmin from human platelets*. Blood 1981; 58: 1069-1074.
141. Gogstad GO, Stormorken H, Solum NO. *Platelet alpha-2-antiplasmin is isolated in the platelet alpha-granules*. Thromb Res 1983; 31:387-390.
142. Aoki N, Moroi M, Tachiya K. *Effects of $\alpha 2$ -plasmin inhibitor of fibrin clot lysis. Its comparison with $\alpha 2$ -macroglobulin*. Thromb Haemost 1978; 39:22-31.
143. Loscalzo J. *Platelets and thrombolysis*. J Vasc Med Biol 1989; 1: 213-219.
144. Coller BS. *Platelets and thrombolytic therapy*. N Engl J Med 1990; 322:33-42.
145. Aldeman B, Rizk A, Hanners E. *Plasminogen interactions with platelets in plasma*. Blood 1988; 72: 1530-1535.
146. Miles LA, Plow EF. *Binding and activation of plasminogen on the platelet surface*. J Biol Chem 1985; 260:4303-4311.

147. Vaughan DE, Mendelsohn ME, Declerck P, van Houtte E, Collen D, Loscalzo J. *Characterization of the binding of human tissue-type plasminogen activator to platelets.* J Biol Chem 1989; 264:15869-15874.
148. Deguchi K, Murashima S, Shirakawa S, Dunn F, Tobelem G. *The potentiating effect of platelets on plasminogen activation by tissue plasminogen activator.* Thromb Res 1985; 40:853-861.
149. Stricker RB, Wong D, Shiu DT, Reyes PT, Schuman MA. *Activation of plasminogen by tissue plasminogen activator on normal normal and thrombasthenic platelets: effects on surface proteins and platelet aggregation.* Blood 1986; 68:275-280.
150. Carroll RC, Gerrard JM, Gilliam JM. *Clot retraction facilitates clot lysis.* Blood 1981; 57: 44-48.
151. Carroll RC, Radcliffe RD, Taylor FB Jr, Gerrard JM. *Plasminogen, plasminogen activator, and platelets in the regulation of clot lysis.* J Lab Clin Med 1982; 100:986-996.
152. Nachman RL, Harpel PC. *Platelet α 2-macroglobuline and α 1-antitrypsin.* J Biol Chem 1976; 251:4514-4521.
153. Fujii S, Hopkins WE, Sobel BE. *Mechanisms contributing to increased synthesis of plasminogen activator inhibitor type I in endothelial cells by constituents of platelets and their implications for thrombolysis.* Circulation 1991; 83:645-651.
154. Braater JV, Handt S, Jerome WG, Kirkpatrick J, Lewis JC, Hantgan RR. *Regulation of fibrinolysis by platelet-released plasminogen activator inhibitor*

- β1*: Light scattering and ultrastructural examination of lysis of a model platelet-fibrin thrombus. *Blood* 1993;81:1290-1299.
155. Ytrehus K, Downey JM. *Experimental models assessing the physiology of myocardial ischemia*. *Curr Opin Cardiol* 1993; 8:581-592.
156. Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi nell'Infarto Miocardico (GISSI). *Effectiveness of intravenous thrombolytic treatment in acute myocardial infarction*. *Lancet* 1986; 1:397-402.
157. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Randomized trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2*. *Lancet* 1988; 2:349-360.
158. Gersh BJ, Anderson JL. *Thrombolysis and myocardial salvage: Results of clinical trials and the animal paradigm-paradoxical or predictable?* *Circulation* 1993; 88:296-306.
159. National Heart Attack Alert Program Coordinating Committee – 60 Minutes to Treatment Working Group. *Emergency department: Rapid identification and treatment of patients with acute myocardial infarction*. *Ann Emerg Med* 1994; 23:379-381.
160. Stein B, Fuster V. *Clinical pharmacology of platelet inhibitors*. In Fuster V, Verstraete M (eds). *Thrombolysis in cardiovascular disorders*. Philadelphia, WB Saunders Company, 1992:9.
161. Meyer BJ, Chesebro JH. *Aspirin and anticoagulants*. In Julian D, Braunwald E (eds). *Management of acute myocardial infarction*. London. WB Saunders Company 1994: 163.

162. White HD, Yusuf S. Issues regarding the use of heparin following streptokinase therapy. *J Thrombosis Thrombolysis* 1995; 2:5-10.
163. Parise P, Agnelli G. *Thrombus resistance to lysis and reocclusion after thrombolysis: the role of platelets*. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1991; 2:749-758.
164. Gersh BJ, Anderson JL. *Thrombolysis and myocardial salvage: Results of clinical trials and the animal paradigm-paradoxical or predictable?* *Circulation* 1993; 88:296-306.
165. Califf RM, Bengtson JR. *Cardiogenic shock*. *N Engl J Med* 1994; 330: 1724-1730.
166. O'Gara PT. *Primary pump failure*. In Fuster V, Ross R, Topol E (eds). *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. New York, Raven Press, 1995: 1051.
167. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Randomized trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2*. *Lancet* 1988; 2:349-360.
168. The AMIS group. *Long-term effects of intravenous anistreplase in acute myocardial infarction: final report on the AMIS study*. *Lancet* 1990; 335:427-431.
169. Wilcox RG, von der Lippe G., Olsson CG, Jenssen G, Skene AM, Hampton JR. *Trial of tissue plasminogen activator for mortality reduction in acute*

- myocardial infarction. Anglo-Scandinavian Study of early thrombolysis (ASSET). Lancet 1988;ii: 525-530.*
170. The INJECT Investigators. *Randomized, double-blind comparison of reteplase double-bolus administration with streptokinase in acute myocardial infarction (INJECT): trial to investigate equivalence. Lancet 1995; 346:329-336.*
171. Fibrinolytic Therapy Trialists' (FTT) Collaborative Group. *Indications for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction: collaborative overview of early mortality and major morbidity results from all randomised trials of more than 1000 patients. Lancet 1994; 343:311-322.*
172. Seifried E, Tanswell P, Ellbrück D, Haerer W, Schmidt A. *Pharmacokinetics and haemostatic status during consecutive infusions of recombinant tissue-type plasminogen activator in patients with acute myocardial infarction. Thromb Haemost. 1989; 61:497-501.*
173. Stringer K. *Biochemical and pharmacologic comparison of thrombolytic agents. Pharmacother 1996; 16:119s-26s.*
174. Anderson JL. *Development and evaluation of anisoylated plasminogen streptokinase activator complex (APSAC) as a second-generation thrombolytic agent. J Am Coll Cardiol 1987; 10:22B-27B.*
175. The European Working Party. *Streptokinase in recent myocardial infarction: a controlled multicentre trial. Br Med J 1971; 3:325-331.*
176. Tillet WS, Garner RL. *The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. J Exp Med 1933; 688:485-502.*

177. Jackson KW, Tang J. *Complete amino acid sequence of streptokinase and its homology with serine protease*. *Biochemistry* 1982; 21:6620-6625.
178. Malke H, Roe B, Ferretti JJ. *Nucleotide sequence of the streptokinase gene from Streptococcus equisililis H46A*. *Gene* 1985; 34: 357-362.
179. Sakata Y, Aoki N. *Significance of cross-linking of alpha2-antiplasmin inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostases*. *J Clin Invest* 1982; 69:536-542.
180. *Streptase®; Streptokinase, Fibrinolytic agent*. Product monography. Hoechst-Roussel 1998.
181. Verstraete M, Vermynen J, Amery A, Vermynen C. *Thrombolytic therapy with streptokinase using a standard dosage scheme*. *Br Med J* 1966; 1:454-456.
182. Reddy KNN. *Streptokinase-biochemistry and clinical application*. *Enzyme* 1988; 40:78-89.
183. The GUSTO Angiographic Investigators. *The effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, or both on coronary-artery patency, ventricular function, and survival after acute myocardial infarction*. *N Engl J Med* 1993; 329:1615-1622.
184. Verheugt FW, Meijer A, Lagrand WK, van Eenige MJ. *Reocclusion: the flip side of coronary thrombolysis*. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:766-773.

185. Lew AS, Neer T, Rodriguez L, Geft IL, Shah PK, Ganz W. *Clinical failure of streptokinase due to unsuspected high titer of antistreptokinase antibody*. J Am Coll Cardiol 1984; 4:183-185.
186. Vaughan DE, Kirshenbaum JM, Loscalzo J. *Streptokinase-induced, antibody-mediated platelet aggregation: a potential cause of clot propagation in vivo*. J Am Coll Cardiol 1988; 11:1343-1348.
187. Lynch M, Littler WA, Pentecost B/L, Stockley RA. *Immunoglobulin response to intravenous streptokinase in acute myocardial infarction*. Br Heart J 1991; 66:139-142.
188. Jalihal S, Morris K. *Antistreptokinase titres after intravenous streptokinase*. Lancet 1990; 335:184-185.
189. Buchalter MB, Suntharalingam G, Jennings I et al. *Streptokinase resistance: when might streptokinase administration be ineffective?* Br Heart J 1992; 68:449-453.
190. Lee HS, Cross S, Davidson R, Reid T, Jennings K. *Raised levels of anti-streptokinase antibody and neutralization titres from 4 days to 54 months after administration of streptokinase or anistreplase*. Eur Heart J 1993; 14:84-89.
191. Elliott JM, Cross DB, Cederholm-Wereiams SA, White HD. *Neutralizing antibodies to streptokinase four years after intravenous thrombolytic therapy*. Am J Cardiol 1993; 71:640-645.
192. Squire IB, Lawley W, Fletcher S, Holme E, Hillis WS, Hewitt C, Woods KL. *Humoral and cellular immune responses up to 7.5 years after administration of streptokinase for acute myocardial infarction*. Eur Heart J 1999; 20:1245-

- 1252.
193. Vaughan DE, Van Houtte E, Declerk PJ, Collen D. *Streptokinase-induced platelet aggregation. Prevalence and mechanism.* Circulation 1991; 84:84-91.
 194. Lebrazi J, Helft G, Abdelouahed M, Elalamy I, Mirshahi M, Samama MM. *Human anti-streptokinase antibodies induce platelet aggregation in a Fc receptor (CD32) dependent manner.* Thromb Haemost 1995; 74:938-942.
 195. Siebert WJ, Ayres RW, Bulling MT, Thomas CM, Minson RB, Aylward PE. *Streptokinase morbidity – more common than previously recognized.* Aust NZ J Med 1992; 22:129-133.
 196. The ISAM Study Group. *A prospective trial of intravenous streptokinase in acute myocardial infarction (I.S.A.M.). Mortality, morbidity, and infarct size at 21 days.* N Engl J Med 1986; 314:1465-1471.
 197. The GUSTO Investigators. *An International Randomized Trial comparing four Thrombolytic Strategies for Acute Myocardial Infarction.* N Engl J Med 1993; 329:673-682.
 198. McGarth KG, Zeffren B, Alexander J, Kaplan K, Patterson R. *Allergic reactions to streptokinase consistent with antigen-antibody complex-mediated damage.* J Allergy Clin Immunol 1985; 76:453-457.
 199. Brugemann J, de Graeff PA, van der Meer J, Lie KI. *Does the Potential for Development of Streptokinase Antibodies Change the Risk-Benefit Ratio on Older Patients?* Drug & Aging 1995; 7:110-116.

200. Massel DM, Turpie AGG, Cairns JA, Oforu FA, Buchanan MR. *Previous streptokinase therapy inhibits subsequent streptokinase thrombolysis.* Circulation 1991; 84:II-467.
201. Gemmill JD, Hogg KJ, Dunn FG, Rae AP, Hillis WS. *Pre-dosing antibody levels and efficacy of thrombolytic drugs containing streptokinase.* Br Heart J 1994; 72:222-225.
202. Fears R, Hearn J, Standing R, Anderson JL, Marder VJ. *Lack of influence of pretreatment antistreptokinase antibody on efficacy in a multicenter patency comparison of intravenous streptokinase and anistreplase in acute myocardial infarction.* Am Heart J 1992; 124:305-314.
203. Shaila G, Chandrashekar YS, Kumar N, Ganguly NK, Anand IS. *Antistreptokinase antibodies before and after streptokinase therapy in patients with acute myocardial infarction from areas endemic for streptococcal infarction and influence on reperfusion rates.* Am J Cardiol 1994; 74:187-189.
204. Parise P, Agnelli G. *Thrombus resistance to lysis and reocclusion after thrombolysis: the role of platelets.* Blood Coagul Fibrinolysis 1991; 2:749-758.
205. Mickelson JK, Simpson PJ, Cronin M, Homeister JW, Laywell E, Kitzen J, Lucchesi BR. *Antiplatelet antibody (7E3 F(ab')₂) prevents rethrombosis after recombinant tissue-type plasminogen activator-induced coronary artery thrombolysis in a canine model.* Circulation 1990; 81:617-627.
206. Yasuda T, Gold HK, Leinbach RC, Saito T, Guerrero JL, Jang IK, Hotl R, Fallon JT, Collen D. *Lysis of plasminogen activator resistant platelet-rich coronary artery thrombus with combined bolus injection of recombinant*

- tissue-type plasminogen activator and antiplatelet GP IIb/IIIa antibody.* J Am Coll Cardiol 1990; 16:1728-1735.
207. Parise P, Agnelli G. *Thrombus resistance to lysis and reocclusion after thrombolysis: the role of platelets.* Blood Coagul Fibrinolysis 1991; 2:749-758.
208. Roth GJ, Calverley DC. *Aspirin, platelets and thrombosis: theory and practice.* Blood 1994; 83:885-898.
209. Coller BS. *A new murine monoclonal antibody reports an activation-dependent change in the conformation and/or microenvironment of the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex.* J Clin Invest 1985; 76:101-108.
210. Coller BS. *Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis.* In Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE (eds). *The Heart and Cardiovascular System.* New York: Raven Press, 1992: 219-273.
211. Faulds D, Sorkin EM. *Abciximab (c7E3 Fab). A review of its pharmacology and therapeutic potential in ischaemic heart disease.* Drugs 1994; 48:583-598.
212. Nurden AT. *Human platelet membrane glycoproteins.* In Bloom AI, Forbes CP, Thomas DC, Tuddenham EGD (eds). *Hemostasis and Thrombosis*, 3rd edition. Churchill Livingstone 1994:116-165.
213. The EPIC Investigators. *Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty.* N Engl J Med 1994; 330:956-961.

214. The EPILOG Investigators. *Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization*. N Engl J Med 1997; 336:1689-1696.
215. The EPISTENT Investigators. *Randomised placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein-IIb/IIIa blockade. Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibitor for Stenting*. Lancet 1998; 352:87-92.
216. The CAPTURE Investigators. *Randomised placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: the CAPTURE Study*. Lancet 1997; 349:1429-1435.
217. The GUSTO IV-ACS Investigators. *Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blocker abciximab on outcome in patients with acute coronary syndromes without early coronary revascularisation: the GUSTO IV-ACS randomised trial*. Lancet 2001; 357:1915-1924.
218. Phillips DR, Scarborough RM. *Clinical pharmacology of eptifibatide*. Am J Cardiol 1997; 80:11B-20B.
219. The PURSUIT Trial Investigators. *Inhibition of platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatide in patients with acute coronary syndromes. The Platelet Glycoprotein IIb/IIIa in Unstable Angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy*. N Engl J Med 1998; 339:436-443.
220. The IMPACT-II Investigators. *Randomised placebo-controlled trial of the effect of eptifibatide on complications of percutaneous coronary intervention: IMPACT-II*. Lancet 1997; 349:1422-1428.

221. L'Allier PL, Lopez JF, Vrobel TR, Strony JS, Brenner SJ. *Favorable results with immediate coronary intervention after low-dose t-PA and eptifibatide for acute MI : results from the INTRO-AMI trial.* Circulation 1999; 100:1-359.
222. Peerlinck K, De Lepeleire I, Goldberg M. *MK-383 (L-700,462), a selective non peptidique platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist, is active in men.* Circulation 1993;88 :1512-1517.
223. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Study Investigators. *A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina.* N Engl J Med 1998; 338:1498-1505.
224. The PRISM-PLUS investigators. *Inhibition of the Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor with Tirofiban in Unstable Angina and non-Q wave Myocardial Infarction.* N Engl J Med. 1998; 338:1488-1497.
225. The RESTORE Investigators. *Effects of Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Blockade with Tirofiban on Adverse Cardiac Events in Patients with Unstable Angina or Acute Myocardial Infarction Undergoing Coronary Angioplasty.* Circulation 1997; 96:1445-1453.
226. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. *Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent antibodies and flow cytometry.* Blood 1987; 70:307-315.
227. Michelson AD. *Flow cytometry : A clinical test of platelet function, review article.* Blood 1996; 12: 4925-4936
228. Heptinstall S, Berridge DC, Judge H. *Effects of streptokinase and recombinant tissue plasminogen activator on platelet aggregation in whole blood.* Platelets 1990; 1:177-188.

229. Emery JD, Leifer DW, Moura GL, Southern P, Morrissey JH, Lawrence JB. *Whole-blood platelet aggregation predicts in vitro and in vivo primary hemostatic factors in the elderly.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;15:748-753.
230. Born GVR, Cross MJ. *The aggregation of blood platelets.* J physiol 1963;168: 178-195.
231. Abdelouahed M, Elalamy I, Lebrazi J. *Streptokinase modifies in vitro platelet aggregation by two mechanisms: reduced aggregation due to fibrinogenolysis and enhanced aggregation via an immunological reaction.* Platelets 1995; 6:317-325.
232. Reed G.L., Kussie P., Parhami-Seren B. *A functional analysis of the antigenicity of Streptokinase using monoclonal antibody mapping and recombinant Streptokinase fragments.* J Immunol 1993; 150: 4407-4415.
233. Bruslerud Ø, Elsayed S, Pawalec G. *At least five antigenic epitopes on the streptokinase molecule are recognized by human CD4⁺ TCRαβ⁺ T cells.* Molecular Immunol 1992; 9: 1097-1104.