

Université de Montréal

**P-sélectine et PSGL-1 ; Implication
dans les Interactions entre les Plaquettes
et les Neutrophiles**

par

Jean-François Théorêt

Département de pathologie et biologie cellulaire

Université de Montréal

Faculté de Médecine

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître en pathologie et biologie cellulaire**

Août, 1998

© Jean-François Théorêt



3m11.0202.1

Université de Montréal

W
4
U58
1999
v.056

P-sélectine et P2GL-1 ; implication
dans les interactions entre les Plaquettes
et les Neutrophiles

par
Jean-François Théorêt
Département de pathologie et biologie cellulaire
Université de Montréal
Faculté de Médecine

Maitre en pathologie et biologie cellulaire
en vue de l'obtention du grade de
Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

Avril 1998



© Jean-François Théorêt

i

**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

**Ce mémoire intitulé :
P-sélectine et PSGL-1 ; Implication dans les
Interactions entre les Plaquettes
et les Neutrophiles**

**Présenté par :
Jean-François Théorêt**

A été évalué par :

**Dr M. Pelletier Président Rapporteur
Dr. Y. Merhi Directeur de Recherche
Dr. J.G. Latour Codirecteur de Recherche
Dr. L. Giroux Membre du Jury**

mémoire accepté le 14.01.1999

SOMMAIRE

Les sélectines, une famille de molécules d'adhésion, sont impliquées dans les interactions adhésives entre les plaquettes, les neutrophiles et la paroi artérielle vasculaire. Ces interactions sont augmentées après contact avec des surfaces artérielles endommagées, comparativement à une surface endothéliale intacte. De plus, un phénomène d'adhésion des plaquettes aux neutrophiles a été décelé chez des patients souffrant d'angine instable et après infarctus du myocarde et angioplastie. Nous avons donc examiné si ces interactions avec une surface artérielle endommagée pouvaient moduler l'expression de la P-sélectine plaquettaire et celle de MAC-1 et de la L-sélectine des neutrophiles, de même que la liaison des plaquettes aux neutrophiles.

L'expression de ces molécules d'adhésion fut déterminée par une technique de cytométrie en flux en utilisant des anticorps monoclonaux conjugués à l'isothiocyanate fluorescéine (FITC) ou à la phycoérythrine (PE) dirigés contre des marqueurs de surface de plaquettes et de neutrophiles humains. Des mesures furent effectuées avant et après 5 et 15 minutes d'exposition aux surfaces artérielles intactes et endommagées à l'intérieur de chambres à perfusion (2 mm ID, flot de 10 mL/min à 37°C). L'indice de liaison (IL) de la P-sélectine plaquettaire augmente significativement passant de 18.0 ± 3.4 à l'état basal, à 31.4 ± 4.7 et 38.1 ± 4.8 ($p < .05$) après 5 et 15 minutes de perfusion respectivement. Après 15 minutes d'exposition aux surfaces artérielles endommagées, l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) de MAC-1 augmente de 22% ($p < .01$), tandis que celle de la L-sélectine diminue de 10% ($p < .05$). Après perfusion sur surface artérielle intacte, le niveau d'expression de la L-sélectine des neutrophiles décroît, tandis que ceux de la P-sélectine plaquettaire et de MAC-1 des neutrophiles ne varient pas significativement. La liaison des plaquettes aux neutrophiles augmente également significativement ($p < .05$) passant de 4.4 ± 1.0 à l'état basal, à 47.3 ± 12.8 et 63.0 ± 17.6 après exposition de 5 et 15 minutes respectivement à des surfaces artérielles endommagées. Ces interactions furent complètement inhibées par la fucoidine

(un bloqueur de sélectine, 200 µg/mL), du P-Sélectine Glycoprotéine Ligand-1 soluble (PSGL-1, 40 µg/mL), et par un anticorps monoclonal bloquant la fonction de la P-sélectine (2 µg/mL). Par contre, ces interactions ne furent pas influencées par un anticorps monoclonal bloquant la fonction de la L-sélectine (40 µg/mL).

Ces résultats indiquent que les plaquettes et les neutrophiles s'activent suite à un contact avec des surfaces artérielles endommagées, augmentant ainsi leurs interactions adhésives par un mécanisme impliquant la P-sélectine et le PSGL-1.

TABLE DES MATIÈRES

- Identification des membres du jury	i
- Sommaire	ii-iii
- Table des matières	iv-vi
- Liste des figures	vii
- Liste des abréviations	viii-ix
- Chapitre 1 : Implications physiopathologiques des plaquettes et des neutrophiles	1
1.1 Généralités	2
1.1.1 Plaquettes	2
1.1.2 Neutrophiles	2-3
1.2 Infarctus du myocarde	3-6
1.3 Angioplastie et resténose	7-9
1.4 Importance des plaquettes et des neutrophiles	10
- Chapitre 2 : Molécules d'adhésion et implications physiopathologiques	11
2.1 Les sélectines	12
2.1.1 Historique et généralités	12-13
2.1.2 La P-sélectine	13-14
2.1.3 La L-sélectine	15-16
2.1.4 La E-sélectine	16-17
2.1.5 Homologie intra et interespèces	17-18
2.1.6 Les ligands	19
2.1.6.1 Généralités	19
2.1.6.2 Sialyl Lewis ^X (sLe ^X) et Sialyl Lewis ^a (sLe ^a)	19-20
2.1.6.3 Les glycoprotéines	20-21
2.1.6.3.1 P-sélectine	21-23
2.1.6.3.2 L-sélectine	23-25
2.1.6.3.3 E-sélectine	26-28

2.1.7 Implications physiopathologiques des sélectines	28
2.1.7.1 Recrutement des neutrophiles :	
« Rolling motion »	28
2.1.7.1.1 Sélectines et « rolling »	28-30
2.1.7.1.2 Plaquettes et « rolling »	30-31
2.1.7.1.3 Neutrophiles et « rolling »	31-32
2.1.7.2 Agrégation des neutrophiles	32-33
2.2 Les intégrines	33
2.2.1 Structure et généralités	33-34
2.2.2 Le complexe CD11/CD18 (β_2 -intégrine)	34-35
2.2.3 Glycoprotéine GPIIb/IIIa	35-38
2.2.4 Les ligands	38
2.2.4.1 Les complexes CD11/CD18	38
2.2.4.2 La glycoprotéine GPIIb/IIIa	39
2.2.5 Implications physiopathologiques des intégrines	39
2.2.5.1 Recrutement des neutrophiles :	
Adhésion ferme	39-41
2.2.5.2 Recrutement des plaquettes : Adhésion ferme ..	42-43
2.2.5.3 Agrégation des neutrophiles	43-44
2.2.5.4 Agrégation plaquettaire	44-45
2.3 Plaquettes et neutrophiles : interactions possibles?	45
- Chapitre 3 : Interactions entre les plaquettes et les neutrophiles ; importance physiopathologique	46
3.1 Introduction	47-48
3.2 Modulation de l'activité des plaquettes et des neutrophiles	49
3.2.1 Effet des plaquettes sur les neutrophiles	49-50
3.2.2 Effets des neutrophiles sur les plaquettes	50
3.2.2.1 Effets des radicaux libres	50-51
3.2.2.2 Élastase et Cathepsine G	51-53
3.2.2.3 Inhibition de l'activation plaquettaire	53-54

3.3 Métabolisme transcellulaire	54-56
3.4 Liaison des plaquettes aux neutrophiles	56
3.4.1 Généralités	56-57
3.4.2 Plaquettes activées et adhésion aux neutrophiles	57-58
3.4.3 Axe P-sélectine → PSGL-1	59-60
3.4.4 Axe GPIIb/IIIa → Fibrinogène → CD11b/CD18	60-62
3.4.5 Interactions par la thrombospondine	62-65
3.4.6 Axe ICAM-2 → CD11a/CD18	65
3.4.7 Les récepteurs Fcγ	65-67
3.4.8 Cinétique de la liaison plaquettes/neutrophiles	68-69
3.4.9 P-sélectine → PSGL-1 et signalisation intracellulaire	69-72
3.5 Approches thérapeutiques	72
3.5.1 Héparine et dérivés	72-73
3.5.2 Le sLe ^x et analogues	73-74
3.5.3 La fucoidine	74-76
3.5.4 Anticorps anti-P-sélectine et PSGL-1	76
3.6 Perspectives	77
3.7 But de l'étude	77
- Contribution originale	78-104
- Discussion	105-111
- Bibliographie	112-171

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Adhésion des plaquettes aux neutrophiles	100
Figure 2 : Courbes dose/réponse d'agents interagissant avec les sélectines ..	101
Figure 3 : Expression de la P-sélectine suivant perfusion sur des surfaces artérielles intactes et endommagées	102
Figure 4 : Expression de la L-sélectine et de MAC-1 des neutrophiles suivant perfusion sur des surfaces artérielles intactes et endommagées	103
Figure 5 : Adhésion des plaquettes aux neutrophiles suivant perfusion sur des surfaces artérielles endommagées	104

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- AA : Acide arachidonique
ADN : Acide déoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ARN : Acide ribonucléique
BSA : Albumine bovine sérique
CAT : Catalase
CFR : Récepteur du facteur de croissance des fibroblastes de poulet
COX-1 : Cyclooxygénase inductible
CRp : Protéine de régulation du complément
DAG : Diacylglycérol
DTT : Dithiotréitol
EDRF : Facteur relaxant dérivé de l'endothélium
EDTA : Acide éthylènediamine tétraacétique
EGF : Facteur de croissance épidermique
ELAM : Molécule d'adhésion endothéliale-leucocytaire
ESL-1 : E-sélectine ligand-1
FGF : Facteur de croissance des fibroblastes
FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
fMLP : formyl-méthyl-leucyl-phénylalanine
GMP : Guanosine monophosphate
GTP : Guanosine triphosphate
MAPk : Protéine kinase activée par des facteurs mitogéniques
MCP-1 : Protéine chimiotactique des monocytes
MDA : Malondialdéhyde
HBD : Domaine de liaison à l'héparine
ICAM : Molécule d'adhésion intercellulaire
IL-1, IL-8 : Interleukine-1, -8
IMF : Intensité moyenne de fluorescence

IMS : Infarctus du myocarde sévère
IP₃ : Inositol-3 phosphate
LAD : Déficience pour l'adhésion neutrophillique
LAM : Molécule d'adhésion leucocytaire
LECAM : Molécule d'adhésion leucocytaire-endothéliale
Le^X : Lewis X
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Leucotriène
NF-κB : Facteur de transcription nucléaire κB
NO : Oxyde nitrique
PAF : Facteur de l'activation plaquettaire
PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PE : Phycoérythrine
PF4 : Facteur plaquettaire 4
PGE₂ : Prostaglandine E₂
PGI₂ : Prostacycline
PI-3 kinase : Phosphatidyl-3 kinase
PKC : Proteine kinase C
PLC : Phospholipase C
PMA : Phorbol méristate acétate
PPME : Polyphosphomannane
PSGL-1 : P-sélectine glycoprotéine ligand-1
RLO : Radicaux libres oxygénés
sLe^a, sLe^X : Sialyl Lewis X ou A
SOD : Superoxide dismutase
TNFα : Facteur de nécrose tumorale α
VLA : Antigen tardif

Chapitre #1

**Implications physiopathologiques
des plaquettes et des neutrophiles**

1.1 Généralités

1.1.1 Plaquettes

Les plaquettes contribuent au maintien d'une circulation sanguine normale par la préservation de l'intégrité vasculaire et le contrôle des hémorragies suite à une blessure en collaboration avec le système de coagulation. Sous des conditions normales de flot et en présence d'une surface endothéliale intacte, les plaquettes n'adhèrent pas à l'endothélium vasculaire. Cependant, lorsqu'un dommage vasculaire survient, et que la matrice sous-endothéliale est exposée à la circulation, les plaquettes vont adhérer aux sites endommagés ou dysfonctionnels (1,2). La réponse plaquettaire sera directement influencée par la sévérité du dommage causé, entraînant ainsi une réaction normale (hémostatique) ou anormale (thrombogénique). Par exemple, la formation d'un thrombus afin de prévenir des pertes sanguines est une réponse hémostatique physiologique, tandis que des plaquettes s'accumulant à la surface d'un vaisseau athérosclérotique, réduisent la lumière du vaisseau et contribuent à augmenter les risques d'infarctus du myocarde ; ceci serait considéré comme étant une réponse thrombogénique (3,4).

1.1.2 Neutrophiles

Les neutrophiles constituent notre ligne de défense contre les micro-organismes invasifs et participent activement aux réactions inflammatoires. A l'instar des plaquettes, les neutrophiles interagissent avec l'endothélium intact ou activé et aussi avec la matrice sous-endothéliale (5,6). L'interaction des neutrophiles avec la paroi endothéliale s'effectue en deux étapes : 1) une phase de roulement « rolling » et 2) une phase d'adhésion ferme menant à la transmigration ou diapédèse. Suivant cette deuxième étape, les neutrophiles sont donc recrutés aux sites inflammatoires et peuvent sécréter plusieurs

substances cytotoxiques comme des radicaux libres et des enzymes protéolytiques, de même que des substances chimiotactiques (7) capables d'accentuer le recrutement des neutrophiles, les réactions inflammatoires et par le fait même l'endommagement des tissus. D'ailleurs, leur participation au niveau des lésions de reperfusion et de la resténose fut mise en évidence.

1.2 Infarctus du myocarde

On appelle ischémie une diminution temporaire de l'apport en oxygène dans un tissu, diminution telle que la concentration en oxygène devient insuffisante pour répondre aux besoins des cellules. Afin de prévenir la mort cellulaire par privation prolongée en oxygène, la restauration du flot sanguin appert donc vitale (8-10). Pourtant la phase de reperfusion des tissus ischémiques engendre des réactions inflammatoires et un endommagement accru (lésions de reperfusion) des tissus ayant été soumis à la période ischémique (11-14). Ces conséquences néfastes de la reperfusion furent étudiées et à partir de 1983, plusieurs études pointèrent l'implication des neutrophiles dans la progression de ces lésions de reperfusion (15-17). L'importance des neutrophiles dans ces lésions de reperfusion a été démontrée dans des modèles animaux neutropéniques, à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules d'adhésion des neutrophiles et à l'aide de produits interférant avec le métabolisme oxydatif, les enzymes protéolytiques et les leucotriènes.

Les résultats de certaines études suggérèrent que la reperfusion initiait l'infiltration des neutrophiles dans le myocarde (18) et que cette accumulation de neutrophiles se concentrait surtout au niveau du tissu sous-épiqueardique (18). De plus, cette étude mit en lumière une corrélation entre l'accumulation des neutrophiles et la taille de l'infarctus (19) ; la cinétique de l'infiltration fut aussi étudiée révélant une forte accumulation durant les 6 premières heures de reperfusion, période durant laquelle la taille de l'infarctus s'élargit de 40%, mais déclinant entre la 16^è et la 24^è heures.

Les mécanismes par lesquels les neutrophiles exacerberaient l'endommagement du myocarde lors de la reperfusion furent étudiés. La formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO) est l'une des façons par lesquelles les neutrophiles peuvent créer des dommages supplémentaires. Par l'intermédiaire d'une NADPH oxydase située dans la membrane plasmique (20,21), les neutrophiles consacrent 90% de leur consommation en oxygène à la production de superoxyde (O_2^-) qui est sécrété dans l'environnement extracellulaire (22). Une fois l'anion superoxyde relargué, ce dernier peut réagir avec lui-même et deux protons pour former du peroxyde d'hydrogène, réaction catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) que l'on retrouve chez les leukocytes (23). La formation de RLO ne s'arrête pas là, car le plus réactif d'entre tous, le radical hydroxyl ($\bullet OH$) peut être créé en présence de traces d'éléments métalliques par la réaction de Fenton et ainsi participer à l'endommagement cellulaire (24). Une protéine, la lactoferrine, médierait l'endommagement cellulaire engendré par le radical hydroxyl, car elle peut accroître sa production et qu'elle est sécrétée par les neutrophiles activés (25). Dernièrement, il fut démontré que le peroxyde d'hydrogène pouvait interagir avec la myéloperoxydase des neutrophiles pour former un complexe capable d'oxyder des halogènes comme le chlore (Cl^-) pour donner de l'acide hypochlorique hautement réactif et toxique (26,27).

Tous ces RLO peuvent altérer la structure même des tissus en produisant la dégradation de certaines protéines comme les glycosaminoglycans, les protéoglycans et le collagène (28) en plus de provoquer la lyse de différents composants cellulaires dont les cellules endothéliales et les plaquettes (29,30). Ces RLO peuvent aussi entraîner la peroxydation des lipides membranaires, causant une augmentation de la fluidité membranaire, de la perméabilité et une perte de l'intégrité membranaire, ayant pour conséquence de désorganiser les échanges cellulaires (31,32). D'ailleurs le malondialdéhyde (MDA) est un

marqueur de la peroxydation des lipides qui est associé aux dommages causés lors de la réoxygénation du myocarde (33).

Ces lipides peroxydés peuvent par la suite réagir avec des protéines, menant à des pertes d'activités enzymatiques, des scissions de chaînes polypeptidiques et à la destruction de certains acides aminés comme la lysine et la cystéine (34). Ces faits démontrent bien la complexité de l'endommagement tissulaire associé aux RLO, qui d'ailleurs peuvent être produits par la xanthine oxydase (une enzyme endothéliale), la chaîne respiratoire et la phospholipase A₂ (24,35,).

D'ailleurs les défenses naturelles de l'organisme contre les RLO sont affaiblies lors de l'ischémie myocardique ; en effet l'activité de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase, deux enzymes protégeant les cellules contre le stress oxydatif, sont grandement diminuées (36,37).

Dans un milieu physiologique, la demi-vie des RLO est très courte et ils ne peuvent réagir qu'une seule fois de manière non sélective ; par contre les enzymes protéolytiques sécrétées par les neutrophiles peuvent rester actives pour une longue période de temps et discriminer leur substrat, car c'est la nature même d'une enzyme. Les granules des neutrophiles contiennent plus de 20 enzymes, mais seulement quatre d'entre elles sont susceptibles d'être impliquées dans la destruction tissulaire. Tout d'abord, deux protéases à sérines : l'élastase et la cathepsine G, puis deux métalloprotéases : la collagénase et la gélatinase. Ces quatre enzymes se distinguent par leur capacité à dégrader les composantes de la matrice extracellulaire qui entourent les cellules et qui est composée, en grande partie, de collagène de différents types, d'élastine, de protéoglycans et de plusieurs glycoprotéines (38). Le rôle des protéases n'a pas été beaucoup étudié, si ce n'est que certaines études établissent une relation entre l'augmentation de la protéolyse et l'infiltration des neutrophiles dans le myocarde. Pourtant, des traitements avec des inhibiteurs de la protéolyse (leupeptine, pepstatine ou chymostatine) qui suppriment totalement la protéolyse lors de la reperfusion, n'influencent pas la taille de l'infarctus,

suggérant que ces enzymes ne sont impliquées que dans la dégradation des cellules nécrosées (39-42).

Jusqu'à là, les lésions de reperfusion n'étaient imputables qu'aux effets délétères des neutrophiles sans considération pour les autres constituants sanguins. Pourtant, l'importance des plaquettes fut démontrée dans un modèle d'ischémie reperfusion en présence d'une sténose critique chez le chien (43). En effet, une thrombocytopénie réduisit la taille de l'infarctus sans pour autant influencer l'infiltration des neutrophiles. A partir de cette découverte, d'autres voies possibles de l'endommagement myocardique furent suspectées dont le métabolisme transcellulaire de l'acide arachidonique (AA) et des leucotriènes, de même que d'autres interactions entre les plaquettes, les neutrophiles et les cellules endothéliales médiées par leurs molécules d'adhésion respectives (44-47) et aussi par des substances activatrices comme le facteur d'activation plaquettaire (PAF) (48).

Des variations dans les niveaux d'expression de différentes molécules d'adhésion des neutrophiles et des cellules endothéliales furent mises en évidence. Dans un premier temps, les niveaux de la L-sélectine et de l'ICAM-1 solubles furent mesurés et il en résulta que les taux de L-sélectine soluble sont plus faibles chez des patients souffrant d'inflammation chronique due à des maladies ischémiques cardiaques comme l'athérosclérose, l'angine instable et l'infarctus du myocarde. Cette révélation permit de conclure à une réponse inflammatoire médiée par les neutrophiles, car cette baisse des taux circulants en L-sélectine reflète une plus faible expression de la L-sélectine, due à l'activation des neutrophiles et au « shedding » de la L-sélectine (49). Puis l'importance des intégrines fut démontrée par une augmentation de l'expression de CD11a/CD18 (LFA-1) et de CD11b/CD18 (MAC-1), de même que de leur ligand, ICAM-1 et VLA-4 lors de l'infarctus du myocarde (50).

1.3 Angioplastie et resténose

L'angioplastie est un traitement utilisé surtout dans les cas d'obstruction des artères coronaires afin de redonner aux vaisseaux une lumière suffisante et de rétablir un flot sanguin normal. Cependant ce traitement entraîne plusieurs complications comme la formation de thrombus, une réponse vasoconstrictrice et un phénomène de resténose ou de réocclusion progressive (4,51). La dilatation effectuée par l'inflation d'un ballon mène à une rupture de l'intégrité de la paroi endothéliale et de la lame élastique interne, exposant la matrice sous-endothéliale thrombogénique qui conduit à la formation de thrombus et à l'adhésion de plaquettes au site lésé (51,52). De plus, une relation directe entre la vasoconstriction observée et l'adhésion plaquettaire fut démontrée (53), soulevant l'importance des plaquettes dans la réponse pathophysiologique après angioplastie.

Des essais en chambre de perfusion *in vitro* et des modèles expérimentaux *in vivo* ont permis d'étudier les réactions des plaquettes et des neutrophiles en contact avec des surfaces artérielles intactes et endommagées. Dans un premier temps, le rôle des plaquettes et des forces de cisaillements locales sur l'adhésion des neutrophiles à des surfaces artérielles endommagées furent évalués. Les résultats montrèrent que l'adhésion des neutrophiles et des plaquettes augmentaient avec l'élévation des forces de cisaillements (54) et que chez des porcs thrombocytopéniques, l'adhésion des neutrophiles était diminuée et devenait indépendante des forces de cisaillements en présence. Cette adhésion des neutrophiles dépendante des plaquettes se vit confirmée dans des essais en chambre de perfusion sur des surfaces de collagène fibreux humain (55). Ces résultats montrent l'importance des plaquettes dans l'adhésion des neutrophiles suite à l'angioplastie et que cette participation des plaquettes au recrutement des neutrophiles modulait la réponse vasoconstrictrice suivant un endommagement vasculaire sévère par angioplastie (52).

Cette vasoconstriction fut plus amplement caractérisée, par une étude qui utilisa un modèle porcin neutropénique. Les résultats de cette étude révélèrent que l'adhésion plaquettaire n'était pas influencée par la présence des neutrophiles, car elle restait stable chez les animaux neutropéniques. Cependant, la neutropénie entraîna une diminution de la réponse vasoconstrictrice (56), mettant en évidence la participation des neutrophiles dans la réponse vasoconstrictrice.

Sachant que les plaquettes et les neutrophiles étaient associés aux complications physiopathologiques après angioplastie, l'étude des interactions pouvant les moduler devenait incontournable. Dans un premier temps, il fut montré que les neutrophiles et les monocytes étaient activés et qu'une plus importante liaison des plaquettes aux neutrophiles survenait après angioplastie, et ce même chez des patients traités à l'aspirine et à l'héparine (57). La coopération par le métabolisme transcellulaire des leucotriènes entre les plaquettes et les neutrophiles joue un rôle important dans l'adhésion des plaquettes, des neutrophiles et dans la réponse vasoconstrictrice. En utilisant le MK-886, un inhibiteur de la biosynthèse des leucotriènes, Provost et coll. (58) parvinrent à diminuer la déposition plaquettaire, l'adhésion des neutrophiles de même que la vasoconstriction. Ces effets du MK-886 semblent être dus à 1) une baisse importante de la production de leucotriène B₄ (LTB₄) dans du sang complet stimulé avec un ionophore calcique, le A23187 et 2) à une inhibition de l'agrégation des neutrophiles. Cependant le MK-886 n'affecte pas la production des RLO par les neutrophiles, la génération de thromboxane B₂ et l'agrégation plaquettaire (58). Ces résultats mettent en évidence la coopération entre les plaquettes et les neutrophiles lors de la réponse post-angioplastie.

En plus de l'influence des plaquettes sur les neutrophiles et vice versa, l'implication du facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF) ou oxyde nitrique (NO) fut soulevée par des traitements avec des donneurs de NO dans des modèles porcins d'angioplastie, qui menèrent à une diminution de la

vasoconstriction et de l'adhésion des neutrophiles aux segments artériels sévèrement endommagés (59,60). Récemment, l'importance de l'endommagement artériel sur la biochimie de certains facteurs de la chaîne de coagulation (facteur Xa et Va) fut étudiée dans un modèle d'angioplastie chez le lapin. Il appert qu'après un endommagement artériel, dès les premières 15 minutes, une activité Xa/Va est détectée au niveau de la surface endommagée, ce qui induit l'activation de la prothrombine. L'administration d'aspirine (15 mg/kg) 30 minutes avant angioplastie réduisit l'adhésion plaquettaire de même que l'activité Xa/Va et celle de la thrombine 15 minutes et 4 heures après l'intervention. Ces résultats suggèrent que l'activité Xa/Va enregistrée au niveau de la paroi endommagée est associée à l'adhésion plaquettaire qui peut soutenir la synthèse *de novo* de thrombine tout en étant responsable de sa localisation au site vasculaire lésé pour une période allant jusqu'à 96 heures post angioplastie, ceci pouvant avoir une incidence directe sur la formation de thrombus et le remodelage vasculaire (61). Toutes ces interactions augmentent grandement la complexité des mécanismes impliqués dans les processus qui suivent un traitement angioplastique.

L'hyperplasie intimale ou la formation de néointima est une étape du phénomène de resténose qui mène à une perte du gain luminal que l'on peut observer après angioplastie. Cette resténose dépend de plusieurs facteurs comme : 1) le système rénine-angiotensine (62), 2) les récepteurs α -adrénergique (63), 3) les plaquettes (64) et 4) la biosynthèse des leucotriènes (65). Encore une fois, ces différentes données mettent en évidence l'importance des plaquettes et des neutrophiles dans la réponse post angioplastie, surtout qu'une relation fut établie entre l'expression des β_2 -intégrines et le degré de resténose (66).

1.4 Importance des plaquettes et des neutrophiles

Sachant que les plaquettes et les neutrophiles participent activement à la progression de diverses conditions pathologiques (ie : les lésions de reperfusion et la resténose), il devient impératif d'approfondir notre compréhension des mécanismes médiés par les plaquettes et les neutrophiles qui conduisent au développement de ces conditions pathologiques. De plus, les rôles majeurs joués par les plaquettes et les neutrophiles dans la modulation des réponses thrombotiques et inflammatoires (67-69), relèvent l'importance de comprendre et de cerner les mécanismes par lesquels ils interagissent et potentialisent leurs effets délétères. Une partie de la réponse réside en la capacité de leurs différentes molécules d'adhésion à moduler leurs interactions avec l'endothélium vasculaire, la matrice sous-endothéliale, leurs interactions homotypiques et hétérotypiques ainsi que leurs activités propres.

Chapitre #2

Molécules d'adhésion et implications physiopathologiques

2.1 Les sélectines

2.1.1 Historique et généralités

La famille des sélectines fut découverte en 1989, lorsque le clonage et le séquençage simultanés de trois glycoprotéines membranaires étudiées indépendamment furent effectués (70-73). Ces molécules étaient nommées GMP-140 ou PADGEM pour la première, LECAM-1 ou LAM-1 pour la seconde et ELAM-1 pour la dernière. De par leur grande similarité structurale (un domaine lectine NH₂ terminal, suivi d'un domaine EGF-like (Epidermal Growth Factor) et de plusieurs répétitions de régions consensus (CRp-like, Complement Regulatory proteins) similaires à celles trouvées chez les protéines pouvant lier le complément) et leur implication dans différents processus inflammatoires ; une nouvelle famille de molécules d'adhésion fut créée. Le terme sélectine fut proposé pour souligner la présence du domaine lectine ainsi que leur spécificité d'expression et de fonction (SElective LECTIN domains) (74). Par la suite, les trois glycoprotéines furent soumises à une nomenclature plus uniforme ; elles furent nommées en fonction du type cellulaire sur lequel elles furent découvertes en premier lieu : GMP-140 devint la P-sélectine ou CD62P (Plaquettes), LECAM-1 devint la L-sélectine ou CD62L (Leucocytes) et ELAM-1 devint la E-sélectine ou CD62E (Endothélium) (75).

La dépendance calcique des interactions des sélectines avec leurs récepteurs fut vite mise en évidence grâce à des études sur la caractérisation des deux classes de domaines lectines, qui reconnaissent des oligosaccharides comme substrat de liaison, effectuées antérieurement par Drickamer en 1988 (76). Ceci pava la voie à des recherches intensives quant aux ligands des sélectines.

Un engouement pour cette famille de molécules d'adhésion se répandit, si bien que dès le début de 1991, il existait déjà pas moins de six études portant sur les ligands possibles des différentes sélectines (77-82). Le rôle d'oligosaccharides

fucosylés dont le sialyl Lewis X (sLe^x) fut démontré et depuis, les recherches n'ont cessé de progresser vers la découverte d'autres ligands plus spécifiques.

2.1.2. La P-sélectine

La P-sélectine fut découverte par des chercheurs intéressés par les modifications biochimiques ayant cours lors de l'activation plaquettaire. La production d'anticorps reconnaissant une protéine présente à la surface des plaquettes activées, mais ne se liant pas à la membrane de plaquettes au repos, mit en évidence une glycoprotéine transmembranaire de 140kDa nommée P-sélectine (83,84). Quelques années plus tard, deux groupes de recherche démontrèrent que la P-sélectine était aussi présente au niveau des cellules endothéliales (85-86). Confinée dans les granules α des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales en vertu d'une séquence signal située dans la queue cytoplasmique (87,88), la P-sélectine n'est pas exprimée de manière constitutive par les cellules, mais requiert une stimulation cellulaire (thrombine, PAF, facteur de nécrose tumorale (TNF α) ...) afin d'être rapidement transportée à la surface des cellules. Cette expression de la P-sélectine serait sensible à l'action de dérivés de la sphingosine et de certains inhibiteurs de protéine kinase C (PKC) (89). La cinétique d'expression de la P-sélectine dénote une apparition rapide au niveau de la membrane, dès la première minute, et son expression maximale peut être enregistrée entre 5 et 10 minutes après stimulation cellulaire (90).

Construite de 789 acides aminés, la P-sélectine est composée d'un domaine lectine NH₂ terminal, d'un domaine EGF-like, de neuf régions CRp-like, d'une région transmembranaire et d'une queue cytoplasmique. Les régions consensus sont constituées de 60 acides aminés dont 6 résidus cystéines, ce qui est différent des 4 résidus cystéines trouvés chez d'autres protéines comme les récepteurs du complément (91,92). La portion cytoplasmique de la P-sélectine est phosphorylée de manière complexe, après activation cellulaire des

plaquettes et des cellules endothéliales, sur des résidus histidines, sérines, thréonines et tyrosines, tout particulièrement la sérine en position 788 (93-96). Une tyrosine kinase, pp60-src, que l'on retrouve dans les granules α des plaquettes, serait à l'origine d'une partie de ces phosphorylations. Étant donné la cinétique rapide des phosphorylations, il porte tout lieu de croire que d'autres protéines kinases se trouvent emprisonnées dans les granules de sécrétion et que ces modifications jouent un rôle important dans la fusion des granules de sécrétion avec la membrane plasmique, ne serait-ce que dans le but d'exprimer une P-sélectine déjà active. En plus des différentes phosphorylations que subit la P-sélectine, une modification du résidu cystéine 766 par acylation a lieu (97), mais encore aujourd'hui, toutes ces modifications biochimiques n'ont pas été corrélées avec un changement fonctionnel ou encore avec la régulation de son expression.

Suivant son expression, la teneur membranaire en P-sélectine diminue environ 30 minutes après la stimulation (90). Cette baisse de P-sélectine à la surface des cellules semble s'effectuer par recaptage où les molécules de P-sélectine récupérées sont orientées vers des lysosomes pour y être dégradées ou vers des granules de sécrétion en vue d'une nouvelle activation cellulaire (85,98-100). Sachant que les plaquettes ne possèdent qu'une réserve prédéterminée de P-sélectine et qu'elles ne peuvent effectuer une synthèse *de novo*, ce recyclage de la P-sélectine permet donc aux plaquettes d'être en mesure de faire face à une nouvelle vague de stimulation et d'exercer leurs fonctions plaquettaires associées à la P-sélectine. Par contre, les cellules endothéliales sont capables de produire d'autres molécules de P-sélectine par une synthèse *de novo*, car la transcription du gène de la P-sélectine peut être induite par le LPS (LipoPolySaccharide, un dérivé lipidique glycosylé de membrane bactérienne), le $\text{TNF}\alpha$ et l'interleukine-1 (IL-1) menant à une expression de la P-sélectine au cours des deux à quatre heures suivantes (101-103). Cette caractéristique des cellules endothéliales laisse entrevoir un rôle précoce et tardif pour la P-sélectine dans les réactions inflammatoires.

2.1.3 L-sélectine

La L-sélectine, la première sélectine à être étudiée, fut découverte à l'aide d'un anticorps (MEL-14) dirigé contre un lymphome murin (104). Des études furent conduites avec cet anticorps et l'adhésion de lymphocytes aux veinules de ganglions (*in vitro*) et « l'homing » de lymphocytes aux ganglions (*in vivo*) furent inhibés. Par la suite, l'antigène reconnu par MEL-14 fut identifié à la surface de neutrophiles murins (105) amenant pour la première fois la possibilité qu'une molécule spécifique pouvait être impliquée dans l'adhésion des neutrophiles aux sites d'inflammation. Parallèlement, d'autres études conduisirent à l'identification d'un marqueur de surface des leucocytes humains (Leu-18 ou TQ-1), qui est distribué dans la membrane des neutrophiles, des lymphocytes et des monocytes (106-108). Ce n'est que quelques années plus tard que le rapprochement fut fait entre MEL-14 et Leu-18/TQ1 (108,109).

Contrairement aux deux autres sélectines, la L-sélectine est exprimée de manière constitutive à la surface des cellules. Suite à une stimulation par différentes substances (i.e. : cytokines, phorbol ester, fMLP, C5a et autres) la teneur membranaire en L-sélectine chute drastiquement (« shedding ») (110,111). Cette baisse ou régulation inverse, s'explique par le clivage de la L-sélectine par une protéase en un site localisé juste au-delà de la membrane dans le domaine extracellulaire. Les implications et les mécanismes sous-tendant cette régulation inverse de la L-sélectine ne sont pas encore bien compris et peu explorés. Certaines études semblent montrer que l'adhésion des neutrophiles à des surfaces de fibrine, de fibrinogène ou à des cellules endothéliales est diminuée *in vitro* par différents traitements (protéine C-réactive, leumedines, fMLP et PMA) menant à l'activation et au « shedding » de la L-sélectine (112-114). Ceci montre l'importance de la L-sélectine dans l'accumulation des neutrophiles aux sites vasculaires endommagés ou d'inflammation. Par contre une étude récente rapporte que la prévention du

clivage protéolytique de la L-sélectine par un inhibiteur de métalloprotéase zinc dépendante n'affecte en rien les interactions adhésives des neutrophiles avec l'endothélium vasculaire activé par le biais du $TNF\alpha$ (115). Toutes menées sous conditions physiologiques de flot, les trois premières études diffèrent de la quatrième dans la mesure où seule la dernière utilise des cellules endothéliales activées, ce qui peut expliquer le fait que la L-sélectine n'affecte pas l'adhésion des neutrophiles, car l'endothélium activé exprime la P-sélectine et aussi la E-sélectine, qui peuvent soutenir l'adhésion neutrophilique. Fait intéressant, l'avidité de la L-sélectine pour ses ligands serait augmentée juste avant qu'elle ne soit clivée (116).

Sur le plan structural, la L-sélectine est constituée de 385 acides aminés et des mêmes domaines que la P-sélectine, mais ne possède que deux répétitions de régions consensus, faisant de la L-sélectine la plus courte des sélectines. Son poids moléculaire diffère d'une population leucocytaire à l'autre ; 75kDa pour les lymphocytes, 95 à 105kDa pour les neutrophiles et 110kDa pour les monocytes. Ces différences seraient dues à des modifications post-transcriptionnelles de glycosylations spécifiques aux lignées leucocytaires.

2.1.4 E-sélectine

La E-sélectine fut découverte par des chercheurs intéressés par une molécule endothéliale capable de supporter l'adhésion neutrophilique sur l'endothélium activé (117). Un anticorps fut produit contre une glycoprotéine dont l'expression était induite par IL-1 et le $TNF\alpha$ *in vitro* et aussi exprimée par des cellules endothéliales aux sites inflammatoires *in vivo* (118,119). Par la suite, un second anticorps fut produit reconnaissant la même glycoprotéine, mais à la différence du premier, cet anticorps pouvait bloquer l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales, permettant l'identification d'une nouvelle molécule d'adhésion. (120).

Se retrouvant seulement au niveau des cellules endothéliales, la E-sélectine n'est pas exprimée de manière constitutive, mais requiert la présence de stimuli inflammatoires tels que IL-1, le TNF α ou des lipopolysaccharides bactériens (LPS) (73). Pour être exprimée à la surface des cellules endothéliales, il doit y avoir synthèse *de novo* de la E-sélectine, processus demandant environ 3 à 6 heures pour une expression maximale, avec un retour à des niveaux physiologiques normaux 10 à 12 heures après la stimulation et ce, même si les agents inflammatoires sont encore présents dans le milieu (*in vitro*) (121). Ce retour à la normale s'explique par la courte demie-vie de l'ARN messenger de la E-sélectine et parce qu'elle est recaptée et dégradée dans les lysosomes (99,122-124). La transcription du gène de la E-sélectine serait sous dépendance du facteur de transcription nucléaire NF- κ B, car le promoteur de la E-sélectine contient trois sites d'attache pour NF- κ B. (125,126). Ce facteur de transcription est reconnu pour être impliqué dans la régulation de plusieurs gènes participant aux réactions inflammatoires (126-128). Dans des cas de réactions inflammatoires *in vivo*, surtout lors de « skin delayed hypersensitivity reactions », la E-sélectine peut être exprimée de manière chronique (71,129), ce qui contraste avec sa cinétique d'expression *in vitro*. Cette variation dans le schème d'expression de la E-sélectine semble s'expliquer par une différence au niveau du type et de la stabilité de l'ARN messenger que l'on retrouve chez des cellules en culture comparativement à celui de cellules en conditions physiologiques *in vivo* (130).

La structure de la E-sélectine, faite de 589 acides aminés (115kDa), comprend les mêmes domaines que les autres sélectines, mais diffère par son nombre de répétitions au niveau des régions consensus qui sont au nombre de six.

2.1.5 Homologies intra et interspèces des sélectines

Si l'on observe attentivement les trois sélectines, il est intéressant de porter un regard tout particulier à l'homologie des séquences entre les différents domaines

des sélectines pour une même et pour différentes espèces. Dans un premier temps, pour les domaines transmembranaires et intracellulaires des différentes sélectines d'une même espèce, l'homologie de séquence est nulle, ce qui suggère que ces deux domaines pourraient jouer un rôle important dans les processus de régulation de l'expression et possiblement dans les mécanismes de signalisation intracellulaire des différentes sélectines. Lorsque l'on regarde ce qui arrive pour la même sélectine chez différentes espèces, l'homologie de ces deux domaines est très élevée, soit 75% et 80% pour le domaine transmembranaire et cytoplasmique respectivement. Pour les régions consensus, que l'on regarde entre les trois sélectines d'une même espèce ou pour une même sélectine chez plusieurs espèces, le résultat est le même, l'homologie est faible soit de l'ordre de 35 à 40%. Ce qui est intéressant, c'est de constater que l'homologie des domaines EGF est plus importante pour une même sélectine à travers différentes espèces que pour les trois sélectines d'une même espèce. Ceci est tout à fait normal lorsque l'on prend en considération le fait que le domaine EGF a surtout un rôle au niveau du maintien structural de la protéine. Fait surprenant, c'est que l'homologie du domaine EGF des différentes P-sélectines atteint 90%, ce qui suggère un rôle tout particulier du domaine EGF de la P-sélectine dans la reconnaissance de son ligand. En examinant l'homologie des domaines lectines responsables de l'interaction directe avec les différents ligands des sélectines, on remarque qu'entre les trois sélectines elle n'est que de 52%, ce qui laisse croire que les trois sélectines possèdent des ligands qui leur sont propres, surtout que cette homologie grimpe à 72% pour une même sélectine chez les autres espèces ; témoignant d'une certaine conservation dans la spécificité de liaison avec l'évolution (131). Afin de démontrer que les sélectines forment vraiment une famille à part, la comparaison de tous les domaines des sélectines avec les mêmes domaines retrouvés chez d'autres protéines ne démontre que 25 à 35% d'homologie, confirmant la singularité des sélectines.

2.1.6 Ligands

2.1.6.1 Généralités

Les recherches sur les ligands possibles des sélectines ont rapidement démontré une affinité envers des structures glucidiques complexes, de par la présence de leur domaine lectine (77-82) et aussi par la sensibilité de leur liaison à un traitement à la neuraminidase : une enzyme qui par hydrolyse élimine les substituants d'acide sialique à la surface des glycoprotéines (132). Les sélectines reconnaissent des ligands qui peuvent être classés dans quatre catégories : 1) des oligosaccharides comme les sialyl Lewis^X et sialyl Lewis^a, 2) des mono et polysaccharides phosphorylés, 3) des polysaccharides sulfatés et tout récemment 4) des glycoprotéines.

2.1.6.2 Sialyl Lewis^X (sLe^X) et Sialyl Lewis^a (sLe^a)

Les trois sélectines peuvent interagir avec le sLe^X (133) qui se retrouve en abondance à la surface des neutrophiles et des monocytes et en plus faible quantité sur les lymphocytes (134-136). L'interaction de la P-sélectine avec le Lewis^X (Le^X) fut d'abord démontrée dans un essai de formation de rosettes (liaison de plaquettes activées aux neutrophiles) où un pentasaccharide LNF-III contenant le déterminant Le^X parvint à bloquer les interactions entre les plaquettes activées et les neutrophiles (78). De même, il fut démontré que la P-sélectine interagissait aussi avec sa forme sialylée le sLe^X (137) tout comme la E-sélectine (81,82,138) et la L-sélectine (139). En plus de reconnaître le sLe^X les trois sélectines peuvent lier un isomère structural du sLe^X, le sLe^a (81,82,138) qui n'est pas exprimé par les leukocytes. Cette interaction des sélectines avec le sLe^a et aussi le sLe^X, pourrait avoir une grande importance dans le phénomène de métastase des cellules cancérigènes. En effet le sLe^a se retrouve à la surface de certains types de cellules cancéreuses ; la E-sélectine peut donc supporter

l'adhésion de cellules du carcinome du colon à l'endothélium vasculaire en liant le sLe^a (140-145).

Tout récemment, une étude a montré qu'une importante teneur membranaire en sLe^X ne serait pas essentielle à la formation des interactions avec les sélectines vasculaires (P- et E-sélectine) (146). Pour ce faire, des cellules HL60 et HL60^{var}, dénotant une très faible quantité de composés sLe^X à leur surface, mais une concentration accrue en Le^X, furent testées pour leur adhésion sur des monocouches de cellules CHO exprimant soit la P- soit la E-sélectine. Aucune différence notable ne fut enregistrée. Pourtant l'adhésion des cellules HL60^{var} reste sensible à l'action de la neuraminidase, ce qui suggère que le sLe^X ne serait pas essentiel aux interactions avec les sélectines vasculaires, mais plutôt qu'un autre composé sialylé serait en cause.

Malgré le fait que les sélectines soient capables d'interagir avec les sLe^X et sLe^a, ces liaisons avec ces oligosaccharides sont de faible affinité. Il faut alors faire la différence entre les structures reconnues par les sélectines sous certaines conditions *in vitro* et celles avec lesquelles les sélectines interagissent réellement *in vivo* sous conditions physiologiques.

2.1.6.3 Les glycoprotéines

Outre les composés glucidiques, des études commencèrent à démontrer l'implication de certaines glycoprotéines dans les interactions avec les différentes sélectines (147-150).

Quelle serait l'utilité de structures protéiques, alors que les sélectines reconnaissent des oligosaccharides? Premièrement, il se pourrait que le corps protéique soit essentiel à l'acquisition d'une configuration spatiale spécifique des divers substituants glucidiques (132,151) et que l'information nécessaire aux modifications post-transcriptionnelles (glycosylations et autres) soit contenue

dans la séquence peptidique même. Deuxièmement, la partie peptidique peut être essentielle pour adresser le ligand au bon endroit dans la membrane (i.e. : microvilli, pseudopodes), car comment d'autres structures glucidiques comme les glycolipides pourraient-elles contenir une telle information? Finalement, cette composante protéique peut très bien participer à des mécanismes de signalisation « outside-in », ce qui semble être le cas pour le ligand de la P-sélectine (PSGL-1) à la surface des neutrophiles (152-154).

2.1.6.3.1 P-sélectine

Sachant que l'adhésion des neutrophiles dépendante de la P-sélectine est sensible à diverses protéases (155) et qu'une O-glycoprotéase, qui clive les liens de O-glycosylation des protéines, inhibe l'adhésion des neutrophiles à la P-sélectine, mais que le traitement des neutrophiles avec la glycoprotéase n'affecte pas l'expression du sLe^X (156,157), il appert donc qu'il existe un ligand de haute affinité pour la P-sélectine qui possède une structure peptidique et que les glycoprotéines modifiées par le sLe^X ne représentent qu'une faible portion des ligands de la P-sélectine. Surtout que par chromatographie d'affinité couplée à la P-sélectine, très peu de molécules exprimant le sLe^X sont isolées. (151).

Une des premières cibles glycoprotéiques fut la L-sélectine (158), mais plusieurs études démontrèrent que la L-sélectine seule ne représentait pas la totalité des interactions de hautes affinité de la P-sélectine (148,151,159).

Des purifications de membranes de neutrophiles sur des colonnes d'affinité couplées à la P-sélectine ont permis finalement d'isoler une protéine dont le poids moléculaire est de 240kDa sous conditions non réductrices et de 120kDa sous conditions réductrices, ce qui laisse présager la formation d'un dimère par pont disulfure (148,159). Cette glycoprotéine de la famille des sialomucines est riche en prolines, sérines et thréonines et est aussi fortement O-glycosylée. Constituée de 402 acides aminés, elle possède 3 sites de N-glycosylation au

niveau du domaine extracellulaire, dénote 15 séquences consensus de 10 acides aminés (Alanine - Thréonine / Méthionine – Glutamate - Alanine – Glutamine –Thréonine –Thréonine – X – Proline / Leucine – Alanine / Thréonine, où le X peut être 5 différents acides aminés : Proline, Alanine, Glutamine, Glutamate ou Arginine) et possède une séquence consensus térapeptidique de clivage (Arginine –Asparagine - Arginine - Arginine) pour une enzyme qui reconnaît des paires d'acides aminés basiques (PACE) (160). Les trois sites potentiels de sulfatation de tyrosine (résidus 46, 48, 51) se trouvent proches de l'extrémité NH₂ terminale du domaine extracellulaire (161). En fait, ces sites constituent l'extrémité NH₂ terminale, car la protéine mature est clivée entre les résidus 41 et 42 (159). Attachées aux sérines et aux thréonines des régions consensus répétées, il y a des branches de polylactosamine contenant du fucose et des acides sialiques dont la plupart se terminent par l'exposition d'un sLe^x (151,162,163). Même si le PSGL-1 contient des sLe^x, Moore et coll., en effectuant une digestion spécifique à l'aide d'une sialidase, se rendirent compte que le PSGL-1 était toujours en mesure de lier la P-sélectine. Ils émirent l'hypothèse qu'une certaine teneur minimale en sLe^x devait être atteinte avant de percevoir une inhibition de la liaison PSGL-1/P-sélectine. Il serait aussi possible que les résidus d'acides sialiques nécessaires à la spécificité de liaison soient inaccessibles à l'enzyme à cause d'un encombrement stérique ou qu'ils aient subi des substitutions les rendant résistants à la digestion enzymatique (164).

Les modifications biochimiques du PSGL-1 nécessaires à la liaison de la P-sélectine furent rapidement étudiées. Les premiers résultats suggérèrent que la sulfatation de tyrosine était essentielle pour établir une liaison de haute affinité (165), ce qui fut confirmé par d'autres études (166-167) et en utilisant un traitement à la mocarhagine, une protéase dérivée du venin de cobra qui clive les dix derniers acides aminés du PSGL-1 mature (168). Une étude plus avancée se pencha sur le double rôle de la sulfatation de tyrosine et de la présence de liens O-glycosyls sur les sérines et les thréonines. Il en émana le résultat suivant : seule l'une des trois tyrosines a besoin d'être sulfatée, ceci en

conjoncture avec la formation d'une O-glycosylation sur le résidu thréonine-57, pour que le PSGL-1 soit en mesure de lier la P-sélectine (169).

Une fois que le gène du PSGL-1 fut cloné (159) et qu'un anticorps monoclonal (PL1) fut produit contre le PSGL-1 (170), des études furent entreprises et démontrèrent que PL1 bloquait l'adhésion du PSGL-1 soluble à la P-sélectine immobilisée sur une lame, l'adhésion de la P-sélectine soluble aux neutrophiles, l'adhésion (sous conditions statiques) et le rolling (sous conditions de flot) des neutrophiles sur de la P-sélectine immobile (170).

Des recherches furent effectuées en comparant la séquence d'ADN et d'acides aminés avec les informations contenues dans les différentes banques de données et les résultats furent négatifs ; aucune homologie avec une protéine connue.

Cette glycoprotéine reçut le nom de PSGL-1 et son nombre fut évalué entre 10 et 20 milles sites par neutrophiles, ce qui constitue une faible portion du contenu protéique de la membrane plasmique, représentant en fait moins de 0.01% du total des protéines neutrophiliques (148,149,171).

2.1.6.3.2 L-sélectine

C'est en utilisant la L-sélectine pour effectuer une chromatographie d'affinité sur un ganglion lymphatique murin, que Imai et coll. identifièrent deux glycoprotéines sialylées, fucosylées et sulfatées de 50 et 90 kDa (150). Cependant l'utilisation d'une forme soluble de la L-sélectine (LEC-IgG) révéla une autre bande protéique d'une masse moléculaire de 200kDa en plus des deux ci-haut mentionnées (150,172). La glycoprotéine de 50 kDa fut clonée et séquencée, permettant de découvrir qu'elle contenait deux domaines riches en sérines et en thréonines, qu'elle était O-glycosylée sur plusieurs résidus et ne possédait pas de séquence codant pour une région transmembranaire (147).

Des études subséquentes lui donnèrent le nom de GlyCAM-1 et la caractérisèrent comme étant une molécule sécrétée plutôt qu'ancrée dans la membrane plasmique, ce qui rend improbable son rôle dans l'adhésion des lymphocytes aux veinules lymphatiques (173,174).

Lors du séquençage de la glycoprotéine de 90kDa, un rapprochement avec CD34, une protéine de la famille des mucines qui est présente à la surface de l'endothélium vasculaire humain (175), fut effectué ; cette glycoprotéine de 90kDa serait une forme glycosylée de CD34. En utilisant MECA-79, une IgM qui se lie aux veinules lymphatiques et empêche l'adhésion des lymphocytes (176), pour une purification d'activité, il fut démontré que CD34 ne serait responsable que d'environ 50% des interactions L-sélectine/ligand (177). Étant donné qu'aucune forme de GlyCAM-1 n'a été rapportée chez l'humain, la glycoprotéine de 200kDa jouerait donc un rôle très important dans l'adhésion des lymphocytes aux veinules lymphatiques.

Afin de vérifier l'implication des glycoprotéines dans la liaison avec la L-sélectine, l'anticorps MECA-79 fut en mesure de purifier par chromatographie d'affinité les deux glycoprotéines découvertes par Imai et coll. Par contre, il fut démontré que MECA-79 n'est pas capable de reconnaître des cellules endothéliales en culture, qu'elles soient stimulées par des cytokines ou non (178), ce qui implique que MECA-79 ne reconnaît pas tous les ligands de la L-sélectine, surtout ceux exprimés lors de réactions inflammatoires.

D'autres glycoprotéines furent identifiées par Sawada et coll. à l'aide d'un anticorps (2H5) reconnaissant des glycolipides portant le sLe^x (179). Cet anticorps, aussi capable de bloquer l'adhésion des lymphocytes aux veinules lymphatiques, détecte trois glycoprotéines de 90, 110, 250kDa dont les poids moléculaires se rapprochent de certaines glycoprotéines identifiées par MECA-79. Par contre, à l'instar de MECA-79 qui ne peut marquer les lignées

hématopoïétiques humaines, 2H5 reconnaît la grande majorité des cellules sanguines.

En plus, il semblerait que l'adhésion L-sélectine-dépendante des neutrophiles, monocytes et lymphocytes à une monocouche de cellules endothéliales activées serait imputable à un ligand inductible (180). Des études conduites chez des souris dont le gène pour GlyCAM-1 ou les gènes pour GlyCAM-1 et CD34 furent enlevés par « knock-out », démontrèrent qu'en absence de GlyCAM-1 ou de CD34, la glycoprotéine de 200kDa voyait son expression augmenter de 5 à 10 fois et que cet effet était encore plus marqué en double « knock-out », évaluation faite par chromatographie d'affinité en utilisant le LEC-IgG (observations non publiées de L. Larsky, 1996). Cette découverte ouvrit de nouvelles perspectives et l'on se pencha sur la possibilité que la L-sélectine puisse reconnaître la P- et E-sélectine, deux molécules dont l'expression peut être induite à la surface des cellules endothéliales, ce qui fut souligné par Picker (158).

Il fut aussi suggéré que la L-sélectine puisse lier le PSGL-1 par une étude qui démontra qu'un anticorps dirigé contre le PSGL-1 (KPL1) reconnaissant le domaine de sulfatation des tyrosines, était en mesure de bloquer l'adhésion de cellules lymphoïdes transfectées avec la L-sélectine à des cellules COS exprimant le PSGL-1 (181). Par la suite, une étude démontra une activité de liaison spécifique de la L-sélectine qui ne pouvait être attribuable au PSGL-1. Ramos et coll. préparèrent une lignée de cellules HL-60 n'exprimant plus de PSGL-1 et remarquèrent qu'elles étaient en mesure de supporter le « rolling » de transfectants exprimant la L-sélectine, mais non celui des transfectants exprimant la P-sélectine. De plus des traitements à la neuraminidase bloquèrent complètement le « rolling » des transfectants L-sélectine positifs et n'affectèrent en rien celui des transfectants P-sélectine positifs. Ces résultats suggèrent qu'il existe des protéines O-glycosylées différentes du PSGL-1 capables d'endosser le rôle de ligands de la L-sélectine (182).

2.1.6.3.3 E-sélectine

Picker proposa que la L-sélectine pourrait servir de ligand pour la P- et la E-sélectine, en présentant son épitope sLe^x. En étant concentrée au niveau des microvillosités, la densité de surface en sLe^x devient donc très élevée, ce qui pourrait favoriser la L-sélectine face aux autres glycoprotéines distribuées à la grandeur de la surface de la membrane. Afin de vérifier ses hypothèses, il utilisa des cellules transfectées avec la E- et la P-sélectine et mesura l'adhésion des neutrophiles aux cellules. Se servant d'un anticorps dirigé contre la L-sélectine et/ou en enlevant sélectivement la L-sélectine des neutrophiles, il observa une chute de 70% de l'adhésion des neutrophiles (158).

Cependant, une autre molécule d'adhésion à la surface des neutrophiles, faisant partie de la famille des β_2 -intégrines, reconnaît la E-sélectine, soit CD11/CD18 (183).

La capacité de la E-sélectine à interagir avec le PSGL-1 fut démontrée par la purification d'une molécule de 120kDa sous conditions non dénaturantes à partir de cellules HL-60 par un récepteur globulaire de la E-sélectine (une construction faite avec la portion extracellulaire de la E-sélectine couplée avec les régions C_{H2} et C_{H3} de l'immunoglobuline humaine IgG1). Cette protéine dénotant une même masse moléculaire que le PSGL-1, peut aussi lier la P-sélectine sur une colonne de chromatographie d'affinité. De plus, l'anticorps PL5, qui est dirigé contre le PSGL-1, est en mesure de bloquer l'adhésion des cellules HL-60 avec le récepteur globulaire de la E-sélectine (184). Ces résultats suggèrent donc que le PSGL-1 sert de ligand pour la P- et la E-sélectine.

La différence d'affinité de liaison et de ligands de la E- et de la P-sélectine permet de réorienter les recherches d'un ligand spécifique de la E-sélectine vers une molécule autre que le PSGL-1. Cette distinction fut faite par Nelson et coll. qui évaluèrent l'adhésion des neutrophiles sur une surface de E-sélectine-Ig ou

de P-sélectine-Ig immobilisée sur de l'albumine bovine sérique (BSA). En perfusant du sLe^a ou du sLe^x soluble, l'adhésion des neutrophiles fut réduite de 50% sur la surface de E-sélectine-Ig, mais très faiblement inhibée en présence de la P-sélectine-Ig (185). Ce qui démontra que les liaisons de hautes affinités de la E-sélectine dépendaient de récepteurs différents de ceux de la P-sélectine.

L'identification d'une protéine de 150kDa à la surface des cellules myéloïdes (cellules 32Dcl3) capable de lier la E-sélectine à l'aide d'un anticorps anti-E-sélectine de souris (186,187) mena à des études de caractérisation de ce nouveau ligand. Cette glycoprotéine fut nommée ESL-1 (E-Selectin Ligand-1) et sa présence fut aussi détectée au niveau de l'appareil de Golgi et des microvillies des neutrophiles (188) ; sa plus grande distribution à la surface des microvillies (environ 80% du total cellulaire en ESL-1) sous-tend une implication particulière lors des contacts avec les cellules endothéliales. Ce peptide montre une homologie de 94% avec le récepteur du facteur de croissance fibroblastique (FGF) chez le poulet (CFR) et est très riche en cystéines. La seule différence entre les deux protéines se situe au niveau du domaine NH₂ terminal où les 35 premiers résidus du CFR sont remplacés par 70 acides aminés dans le ESL-1. La séquence en acides aminés prédit une structure de poids moléculaire de 131kDa qui consisterait en 1114 acides aminés pour le domaine extracellulaire, où l'on retrouve 16 répétitions de domaines riches en cystéines, un domaine transmembranaire de 21 résidus, une queue cytoplasmique composée de 13 acides aminés et 5 sites potentiels de N-glycosylation (189). ESL-1 ne peut lier la E-sélectine que s'il a été préalablement modifié par une enzyme, la fucosyltransférase-III, ce qui montre que la fucosylation de ESL-1 est très importante pour la liaison à la E-sélectine. Pourtant cette modification de ESL-1 n'entraîne pas de liaison avec la P-sélectine, démontrant bien la spécificité de la E-sélectine pour ESL-1. De plus, ESL-1 ne semble pas être en mesure de lier la L-sélectine, car des cellules CHO transfectées avec la E-sélectine lient ESL-1, tandis que les cellules transfectées avec la L-sélectine ne lient pas le ESL-1 (189). Le traitement de cellules 32Dcl3 avec de la trypsine inhibe à 38% la liaison

de la E-sélectine à ces cellules ; par contre la liaison de la P-sélectine est complètement bloquée, reflétant la différence de sensibilité enregistrée pour les ligands de la P- et la E-sélectine au niveau des cellules HL-60 (155).

Cette forte homologie avec un récepteur membranaire pourrait donner au ESL-1 un double rôle, celui de molécule d'adhésion et celui de récepteur capable de médier une activation cellulaire par stimulation de voies intracellulaires. Des évidences supportent cette hypothèse, car la E-sélectine soluble est capable d'induire l'activation des leucocytes (190).

En connaissant maintenant la structure des différents ligands des sélectines ; qu'en est-il de leur implication au niveau de multiples processus physiopathologiques?

2.1.7 Implications physiopathologiques des sélectines

2.1.7.1 Recrutement des neutrophiles : « Rolling motion »

Les neutrophiles peuvent être recrutés aux sites d'inflammation selon trois différents mécanismes mettant à contribution les sélectines et leurs ligands. Les cellules endothéliales intactes et activées expriment à leur surface des ligands pour les neutrophiles. Outre les composés sialylés, se rajoutent la P- et la E-sélectine après stimulation de l'endothélium. Les trois sélectines jouent un rôle important dans le phénomène de « rolling » ou de roulement des neutrophiles, ceci constituant la première étape de l'adhésion neutrophilique à l'endothélium qui est suivie par la transmigration ou diapédèse.

2.1.7.1.1 Sélectines et roulement

L'implication de la L-sélectine fut démontrée par plusieurs traitements affectant soit la fonction adhésive soit la teneur membranaire de la L-sélectine. Des

études conduites avec des anticorps monoclonaux bloquant les interactions L-sélectine/ligand, ont mené à une diminution de l'adhésion des neutrophiles et des monocytes à un endothélium activé par les cytokines (191-193). Le prétraitement des neutrophiles avec divers agonistes, avant l'évaluation de leur capacité de roulement, démontra que le « shedding » de la L-sélectine réduisait considérablement le phénomène de roulement. Ces résultats obtenus *in vitro* furent reproduits *in vivo* avec des polysaccharides reconnus pour interagir avec les sélectines (fucoidine, dextran sulfate) (194-196). Ces polysaccharides diminuèrent de manière significative le nombre de neutrophiles en phase de « rolling » et la vélocité de roulement. Etant donné que ces polysaccharides peuvent interagir avec les trois sélectines, l'importance de la L-sélectine fut vérifiée avec de la L-sélectine soluble et les mêmes résultats furent obtenus (197). En plus, une expérience effectuée avec des lymphocytes murins n'exprimant pas de sLe^X et transfectés avec un ADN complémentaire (ADNc) pour la L-sélectine a montré que ces lymphocytes étaient en mesure de rouler normalement sur des veinules de lapins aux sites d'inflammation (198).

La P- et la E-sélectine endothéliale sont aussi en mesure de permettre le roulement des neutrophiles par des interactions qui leur sont propres. La P-sélectine supporte le roulement des neutrophiles en liant son récepteur, le PSGL-1 à la surface des neutrophiles, car l'anticorps PL1 bloque l'adhésion du PSGL-1 soluble de même que l'adhésion des neutrophiles à une surface de P-sélectine immobilisée (170). En utilisant le même anticorps, l'adhésion de neutrophiles et de cellules HL-60 aux veinules mésentériques de rat fut inhibée (199). L'implication de la E-sélectine dans le phénomène de roulement des neutrophiles reste obscure, car des anticorps bloquant la E-sélectine ou des analogues du sLe^X ne réduisent le roulement que lorsque mis en présence d'anticorps éliminant les interactions possibles de la P-sélectine (200,201), ce qui laisse envisager que la E-sélectine n'est peut être pas impliquée au niveau de la phase première de capture des neutrophiles (« rolling »), mais reste importante

quant au processus tardif de recrutement des neutrophiles aux sites d'inflammation (200).

Pour qu'un neutrophile puisse rouler, deux paramètres sont très importants : 1) que la formation de liens à l'avant du neutrophile (On-rate) soit égale à la dissociation des liens à l'arrière (Off-rate), car si le « Off-rate » surpasse le « On-rate », les neutrophiles se détacheront de la paroi endothéliale et retourneront à la circulation et 2) une condition minimale de flot (shear stress) supérieure à 0.5 dyn/cm^2 pour permettre la dissociation des liens par l'imposition d'un moment de force (torque) (202). La vitesse ou vitesse avec laquelle les neutrophiles vont rouler dépend des sélectines présentes. Pour une densité similaire de sites, environ $80 \text{ à } 90/\mu\text{m}^2$, la vitesse de roulement des neutrophiles est de 7.5 à 10.5 fois supérieure lorsque la surface de perfusion est composée de CD34 plutôt que de P- ou de E-sélectine. Cette différence n'est pas dépendante de la force de la liaison entre les différentes sélectines et leurs ligands, car une même résistance au détachement sous flot croissant fut quantifiée (203). L'explication à cette variation au niveau de la vitesse de roulement réside peut être dans la structure même des sélectines dans la mesure où la L-sélectine est la plus courte des trois, ce qui pourrait faciliter la formation et la dissociation des liens avec ses ligands. D'ailleurs une étude démontre que la P-sélectine normale est plus efficace qu'une P-sélectine tronquée (construite avec moins de régions consensus) pour soutenir le « rolling » et l'adhésion des neutrophiles (204).

2.1.7.1.2 Plaquettes et roulement

Au site d'endommagement vasculaire, lorsque la matrice sous endothéliale composée de collagène, de facteur de von Willebrand et de fibrinogène est exposée, les plaquettes vont adhérer à la surface thrombogénique, s'activer et exprimer la P-sélectine. Ainsi, les plaquettes peuvent servir d'intermédiaire entre les neutrophiles et la surface artérielle endommagée et contribuer à recruter les neutrophiles aux sites de lésions vasculaires. Ce phénomène de roulement sur

des plaquettes activées fut d'abord caractérisé par Buttrum et coll., (205) qui utilisèrent des plaquettes activées fixées sur une lame comme substrat de perfusion pour des suspensions de neutrophiles. En traitant les plaquettes avec un anticorps anti-P-sélectine ou les neutrophiles avec de la neuraminidase, du dextran sulfate ou de l'acide ethylènediamine tétraacétique (EDTA), ils remarquèrent une inhibition de l'adhésion des neutrophiles. De plus, en traitant les neutrophiles avec une série d'anticorps anti-L-sélectine, ils montrèrent que la L-sélectine est un des ligands de la P-sélectine qui permettrait le roulement des neutrophiles sur les plaquettes. Afin d'appuyer leurs observations, ils activèrent les neutrophiles avec du fMLP pour diminuer la teneur membranaire en L-sélectine et remarquèrent une diminution du nombre de neutrophiles roulant sur les plaquettes et une augmentation de la vitesse de roulement (205). L'interprétation des résultats obtenus par cette expérience est délicate, car l'activation des neutrophiles mène à une redistribution du PSGL-1 vers l'uropode, entraînant une polarisation des neutrophiles et réduisant leur efficacité de liaison à la P-sélectine (206-208). L'activation des neutrophiles affecte donc deux ligands possibles de la P-sélectine lors du roulement.

2.1.7.1.3 Neutrophiles et roulement

À l'image des plaquettes les neutrophiles peuvent aussi permettre le roulement d'autres neutrophiles par un phénomène appelé attachement secondaire ou « secondary tethering ». Une fois que des neutrophiles ont adhéré à une surface endothéliale activée par des cytokines ou à un site vasculaire endommagé, d'autres neutrophiles seront recrutés selon le même principe que celui décrit pour les plaquettes, sauf que le mécanisme impliqué dépend seulement des interactions entre la L-sélectine des neutrophiles en mouvement et le PSGL-1 des neutrophiles attachés à la surface endothéliale (209,210). Les conséquences de l'attachement secondaire sont encore mal connues et les circonstances dynamiques et biochimiques le régulant peu explorées. Une conséquence directe du recrutement de neutrophiles par d'autres neutrophiles serait de former

un agrégat de neutrophiles et ainsi causer l'obstruction de capillaires (211). Pourtant, une étude sous conditions de flot a montré que la formation de ces amas n'était pas dépendante de la L-sélectine, car chez des souris déficientes en L-sélectine, aucune différence dans la formation de ces amas de neutrophiles ne fut enregistrée. Une autre étude avance toutefois le contraire, car sous conditions de flot, l'importance de la L-sélectine fut mise en évidence par des traitements avec un anticorps monoclonal anti-L-sélectine et à la neuraminidase qui diminuèrent la formation des bouchons (114), ce qui n'est pas le cas sous conditions statiques. Ce phénomène serait aussi dû, en partie, à une forte concentration locale en E-sélectine à la surface de l'endothélium, car la formation d'amas est grandement diminuée chez des souris déficientes en E-sélectine (212).

2.1.7.2 Agrégation des neutrophiles

Des traitements à la fucoidine qui modifient la cinétique du « shedding » de la L-sélectine et au dextran sulfate sont en mesure d'inhiber l'agrégation des neutrophiles, laissant présager un rôle pour la L-sélectine. D'ailleurs des essais d'agrégation avec des neutrophiles mis en présence d'endotoxine, ce qui entraîne un « shedding » de la L-sélectine, ont révélé une diminution de l'agrégation (213,214). En mettant en évidence des interactions entre la L-sélectine et le PSGL-1 sous conditions hydrodynamiques par l'utilisation d'anticorps monoclonaux contre la L-sélectine (DREG200) et contre le PSGL-1 (PL1), Walcheck et coll. (215) orientèrent les recherches du ligand possible de la L-sélectine lors de l'agrégation des neutrophiles. Par un même procédé à l'aide d'anticorps monoclonaux, l'implication des interactions entre la L-sélectine et le PSGL-1 fut démontrée dans l'agrégation des neutrophiles (216). Cette interaction L-sélectine/PSGL-1 serait la première étape de l'agrégation des neutrophiles et serait suivi d'une phase de consolidation des liens neutrophiles/neutrophiles par l'intermédiaire des β_2 -intégrines.

Bien que les sélectines participent activement à différentes réponses physiologiques (ie : adhésion des plaquettes et des neutrophiles à l'endothélium endommagé et à la matrice sous-endothéliale ainsi que lors de l'agrégation des neutrophiles), leur contribution unique ne peut être à elle seule responsable de ces phénomènes ; une autre famille d'adhésion est impliquée au niveau d'étapes subséquentes : les intégrines.

2.2 Les intégrines

2.2.1 Structure et généralités

La famille des intégrines fut baptisée en 1987 par Hynes parce que l'on pensait que le rôle des intégrines était d'intégrer le cytosquelette d'une cellule avec celui d'une autre ou avec la matrice extracellulaire (217). Les intégrines sont des protéines hétérodimériques constituées de l'association non covalente entre une sous-unité α et une sous-unité β . Jusqu'à ce jour, 15 différentes sous-unités α (120 à 180 kDa) et 8 différentes sous-unités β (90 à 110kDa) furent identifiées par plusieurs techniques de biologie moléculaire et de chimie des protéines (217,218), donnant une possibilité de 120 intégrines. Constituées d'un large domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique, les intégrines seraient une sorte de pont moléculaire entre le milieu extracellulaire et le cytosquelette de la cellule. Surtout impliquées dans des interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire, les intégrines reconnaissent une variété de ligands divisés en trois classes : les protéines de la matrice extracellulaire, des protéines plasmatiques et des molécules d'adhésion. Chaque intégrine reconnaît plus d'un ligand, ce qui a pour conséquence de créer un chevauchement dans les ligands reconnus par les intégrines et mène à une solidification de l'adhésion cellulaire.

Les intégrines sont subdivisées en sous-classes selon leur sous-unité β . Il y a les β_1 -intégrines aussi connues sous le nom de VLA (219), les β_2 -intégrines en

association avec trois différentes sous-unités alpha (α_L , α_M et α_X) soit les trois complexes CD11/CD18 exprimés par les leucocytes (220) et finalement les β_3 -intégrines ou cytoadhésines parmi lesquelles nous ne retrouvons que deux membres soit $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) et $\alpha_v\beta_3$ toutes deux exprimées par les plaquettes (221). Pour ce qui est des familles β_4 à β_8 peu d'informations sont disponibles à ce jour (222).

2.2.2 Le complexe CD11/CD18 (β_2 -intégrine)

Seulement exprimés à la surfaces des leucocytes, les complexes CD11/CD18 sont au nombre de trois : CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (MAC-1) et CD11c/CD18 (p150/95). Présent à la surface de toutes les lignées leucocytaires, le CD11a/CD18 est le plus uniformément répandu comparativement à CD11b/CD18 et CD11c/CD18 qui ne sont exprimés que par les monocytes, macrophages, neutrophiles et les cellules NK (NK cells).

Des réserves intracellulaires de CD11b,c/CD18 dans les granulocytes furent assignées aux granules secondaires et tertiaires (223,224). Après activation, la teneur membranaire en CD11b,c/CD18 augmente de plusieurs fois et ces intégrines subissent un changement de conformation qui leur confère une plus grande affinité pour leurs ligands (225). Cette augmentation d'affinité se produit entre 5 et 10 minutes après stimulation et décroît durant les 20 minutes suivantes (226,227). Les agonistes qui entraînent l'activation des β_2 -intégrines causent une augmentation du niveau de calcium intracellulaire et stimulent l'activité enzymatique de la PKC, alors que des agents diminuant la concentration intracellulaire en calcium et augmentant celle de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), favorisent l'inactivation des β_2 -intégrines (228).

Les différentes sous-unités α des complexes CD11/CD18 sont phosphorylées de manière constitutive tandis que les sous-unités β subissent une phosphorylation sur des résidus sérines après traitement avec un agoniste (229-

231). Par contre, cette phosphorylation ne semble pas directement associée à l'activation des β_2 -intégrines, car suite à une mutagénèse dirigée sur la sérine-786, qui semble être le résidu critique pour les phosphorylations de la sous-unité β , aucune variation n'a été enregistrée quant à l'activation du complexe (232).

Les β_2 -intégrines sont en étroite relation avec le cytosquelette, car l'activation des neutrophiles à l'aide de l'acide 5-oxo-6,8,11,14-eicosatétraénoïque entraîne une augmentation de l'expression de CD11b de même qu'une forte polymérisation des filaments d'actine (233). Cette association des β_2 -intégrines avec le cytosquelette pourrait avoir comme rôle d'emprisonner les récepteurs à un certain endroit de la membrane, en créant des amas ponctuels de récepteurs, pour favoriser et solidifier leurs interactions avec leurs ligands. D'ailleurs, il a été démontré que la taline colocalisait avec les amas de CD11b/CD18 avant que CD11b/CD18 ne soit impliqué dans une interaction adhésive (234,235).

2.2.3 Glycoprotéine GPIIb/IIIa (β_3 -intégrine)

À la surface des plaquettes se trouve une glycoprotéine importante dans le processus d'agrégation plaquettaire : la GPIIb/IIIa. Cette β_3 -intégrine est composée d'une chaîne α (GPIIb) de 140kDa constituée de deux chaînes peptidiques reliées par un pont disulfure ; une lourde de 125kDa et une légère de 25kDa qui contient le domaine transmembranaire et la courte région cytoplasmique de 26 acides aminés (236,237). Cette sous-unité α comprend, dans son domaine extracellulaire, quatre sites de liaison pour des cations divalents qui témoignent de sa dépendance calcique. La chaîne β_3 (GPIIIa) a un poids moléculaire de 105kDa et est composée de 762 acides aminés dont 692 dans la région extracellulaire, 25 pour le domaine transmembranaire et 45 pour la queue cytoplasmique. L'association entre les deux sous-unités dépend des interactions entre les deux portions NH_2 terminales (238) ainsi que de la présence d'ions calcium (239,240).

Présente à environ 50 000 exemplaires, ce qui représente environ 1 à 2% de la teneur totale en protéine des plaquettes (241), 70% de la GPIIb/IIIa est distribuée de manière aléatoire à la surface des plaquettes et le 30% restant se retrouve au niveau du système caniculaire (OCS pour « Open Canicular System ») (242) et dans la membrane des granules α (242). La GPIIb/IIIa subit un changement de configuration lors de l'activation plaquettaire, ce qui lui confère la capacité de lier ses différents ligands (243,244). Une des premières étapes dans l'activation de la GPIIb/IIIa serait médiée par la phospholipase C (PLC) qui clive le phosphatidylinositol en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP₃), car la plupart des agonistes qui entraînent l'activation de la GPIIb/IIIa mène à une élévation intracellulaire de DAG et d'IP₃ (246-248).

D'autres études ont montré l'implication de la protéine kinase C (PKC), de la guanosine triphosphate (GTP) et du calcium intracellulaire (249-252). L'activation de la PKC et la phosphorylation de ses substrats précèdent l'activation de la GPIIb/IIIa dont le domaine cytoplasmique de la sous-unité GPIIIa peut être phosphorylé par la PKC (253). La participation du GTP suggère qu'une protéine capable de lier le GTP serait en mesure de mener à l'activation de la GPIIb/IIIa. D'ailleurs de récentes études se sont penchées sur le rôle du GTP et ont découvert qu'une petite protéine hétérotrimérique de la famille des protéines G serait en cause ; RhoA (249,251,252). Cette découverte peut être soutenue par l'implication de la PLC, qui est reconnue comme étant un second messenger découlant d'une voie d'activation couplée aux protéines G, dans l'activation de la GPIIb/IIIa et par l'effet inhibiteur de la toxine pertussique qui bloque l'activation de la GPIIb/IIIa induite par stimulation à la thrombine (250). De plus, l'inhibition de RhoA par l'exoenzyme C, qui médie la ribosylation de l'adénosine diphosphate (ADP), entraîne une diminution de la liaison du fibrinogène à la GPIIb/IIIa, ce qui suggère que RhoA agit en aval de PKC (254). En utilisant le Wortmannin, un inhibiteur sélectif de la phosphoinositide-3 kinase (PI-3 kinase), une baisse de la liaison du fibrinogène à la surface des plaquettes activées est observée (255). Pourtant, les mécanismes impliqués dans la transmission des

signaux cellulaires qui découlent de RhoA et de la PI-3 kinase pour conduire à l'activation de la GPIIb/IIIa ne sont pas très clairs. Sachant que PI-3 kinase et RhoA jouent un rôle dans la régulation de la polymérisation de l'actine et de la réorganisation du cytosquelette, un traitement à la cytochalasine D (un inhibiteur de la polymérisation de l'actine) n'affecte en rien la liaison du fibrinogène. De plus, le Wartmannin n'a aucun effet sur la polymérisation de l'actine après activation plaquettaire par la thrombine (255). Ce qui suggère que l'implication de RhoA et de PI-3 est indépendante du réarrangement cytosquelettique.

L'effet du GTP peut être renversé par l'AMPc, ce qui est en accord avec une étude affirmant que la prostacycline (PGI₂) et la prostanglandine E₂ (PGE₂), qui entraînent une élévation de la concentration intracellulaire en AMPc, interférait avec le processus d'activation plaquettaire (256). Le calcium pour sa part, modulerait l'activité de la GPIIb/IIIa en liant un ou les deux domaines cytoplasmiques du complexe (244,245,257). Cet effet de l'augmentation du calcium intracellulaire sur la régulation de l'activité de la GPIIb/IIIa, peut être bloqué par l'indométhacine, un inhibiteur du métabolisme de l'AA, ce qui signifie que le calcium induirait probablement l'activation de la phospholipase A₂ et donc la formation de métabolites dérivés de l'AA (250).

La sous-unité β_3 subit diverses phosphorylations additionnelles lors de son activation, sur des résidus sérines et thréonines (258) et chose étrange, même si cette sous-unité exhibe une séquence consensus pour la phosphorylation d'une tyrosine, aucune phosphorylation de résidus tyrosines n'a encore été détectée.

Lorsque le fibrinogène lie la GPIIb/IIIa, une série d'événements se produit (« outside-in signaling »): 1) une réorganisation du cytosquelette, 2) une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, 3) une élévation du pH intracellulaire, 4) une hydrolyse des lipides membranaires, 5) une activation du métabolisme des phospholipides et 6) une activation de diverses tyrosines et sérines-thréonines kinases comme la protéine kinase C (259,260). Cette

signalisation entraîne une réponse secondaire des plaquettes par sécrétion des granules ainsi qu'une seconde vague d'agrégation (261).

2.2.4 Les ligands des intégrines

2.2.4.1 Les complexes CD11/CD18

Les β_2 -intégrines reconnaissent majoritairement des protéines faisant partie d'une autre famille de molécules d'adhésion : les immunoglobulines. Ces molécules d'adhésion sont composées de plusieurs répétitions de domaines ressemblant à celui des immunoglobulines reliées par des ponts disulfures (262). ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) et ICAM-2, sont toutes deux exprimées par les cellules endothéliales ; l'expression d'ICAM-1 étant inducible et celle d'ICAM-2 constitutive. CD11a/CD18 reconnaît ICAM-1 et ICAM-2, tandis que CD11b/CD18 ne lie que ICAM-1 (262). La découverte récente de la présence d'ICAM-2 à la surface des plaquettes fut surprenante, car ICAM-2 est la seule molécule d'adhésion répertoriée à la surface des plaquettes servant de ligands aux intégrines (263). Un troisième membre de cette famille, ICAM-3 que l'on retrouve à la surface des leucocytes (264,265), est en mesure d'interagir avec CD11a/CD18. Outre ICAM-1, CD11b/CD18 reconnaît des fragments plasmatiques du domaine D de 30kDa issus de la protéolyse du fibrinogène par le plasminogène activé à la streptokinase (266) tandis que CD11c/CD18 lie une séquence du côté NH_2 terminal de la chaîne $A\alpha$ du fibrinogène (267). Une anaphylatoxine dérivée des chaînes α du C3 durant l'activation du complément (268), iC3b (issue de l'action d'une convertase sur C3 qui libère C3a et C3b, ce dernier étant ensuite transformé en iC3b) qui entraîne entre autre la sécrétion d'histamine par les cellules endothéliales (histamine qui peut par la suite mener à une expression de la P-sélectine (269)) peut aussi être reconnue par CD11b/CD18 tout comme le facteur X de la chaîne de coagulation (226,270).

2.2.4.2 La glycoprotéine GPIIb/IIIa

La plupart des β_3 -intégrines qui interagissent avec des protéines de la matrice extracellulaire reconnaissent une séquence de trois acides aminés : RGD (Arginine-Glycine-Acide Aspartique) que l'on retrouve au niveau du fibrinogène, de la thrombospondine, de la vitronectine, de la laminine et du collagène de type I (271). Pourtant les β_2 -intégrines ne semblent pas être en mesure de reconnaître une telle séquence (272,273). Ce n'est qu'après activation que les complexes GPIIb/IIIa deviennent aptes à lier différents substrats comme le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine et le facteur de von Willebrand (262). Ces interactions sont nécessaires à l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale (274).

A l'image des sélectines, les intégrines participent activement à divers phénomènes physiopathologiques, mais ceci dans une optique différente.

2.2.5 Implications physiopathologiques des intégrines

2.2.5.1 Recrutement des neutrophiles : Adhésion ferme

La première étape du recrutement des neutrophiles appelé roulement est suivie d'une seconde étape soit l'adhésion ferme, qui est médiée par les intégrines et mène à la diapédèse ou extravasation. Alors que la L-sélectine est engagée dans le processus de roulement, les neutrophiles seront activés de différentes façons ce qui entraînera une activation des complexes CD11/CD18 par un changement de conformation et une augmentation de la concentration membranaire de ces complexes.

Les cellules endothéliales en présence de cytokines vont sécréter plusieurs substances chimiotactiques pour les neutrophiles qui peuvent restées liées à la membrane des cellules endothéliales comme l'interleukine-8 (IL-8) et le PAF

(275). IL-8 et le PAF une fois attachés à la membrane des cellules endothéliales, vont être rapidement liés par les neutrophiles en phase de roulement (276,277) et entraîner l'activation des β_2 -intégrines qui créeront des liens avec les immunoglobulines à la surface des cellules endothéliales pour transformer la phase de roulement en adhésion ferme (275,278). Cette interaction des β_2 -intégrines avec ICAM-1 pourrait engendrer une rétroaction positive et favoriser davantage l'adhésion des neutrophiles. Il a été démontré que la liaison d'un anticorps monoclonal à l'ICAM-1 entraînait la production de facteurs tissulaires comme le PAF et le $\text{TNF}\alpha$. La production de $\text{TNF}\alpha$ peut être bloquée par le WEB2086, un antagoniste du récepteur du PAF, ce qui suggère fortement que ICAM-1 est couplée à des voies de signalisation intracellulaires qui mènent à la production de facteurs tissulaires par rétroaction positive (279).

Plusieurs études ont mis en évidence la participation de la L-sélectine dans le processus d'activation des neutrophiles et son implication directe dans l'adhésion via les complexes CD11/CD18. Dans un premier temps, un anticorps dirigé contre la L-sélectine cause une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, la production de radicaux libres et surtout une augmentation de la teneur membranaire en CD11b/CD18 (280). Par la suite, la L-sélectine fut impliquée dans une série d'événements de signalisation intracellulaire dont une inhibition de la formation de F-actine induite par les β_2 -intégrines. Cette formation de F-actine semblerait déterminer le site de l'adhésion ferme et de la transmigration par rétroaction face à la quantité ou densité des ligands de la L-sélectine et des β_2 -intégrines à la surface des cellules endothéliales (281). Puis, la capacité de la L-sélectine, mais non de la E-sélectine, à signaler la transition entre le roulement et l'adhésion ferme, fut soulevée par Gopalan et coll. (282) qui à l'aide d'anticorps contre la L-sélectine et de surfaces recouvertes de E-sélectine ou d'ICAM-1, démontrèrent qu'environ 50% des neutrophiles en mouvement, adhèrent fermement. De plus, cette transition serait grandement influencée par les conditions hydrodynamiques, car en bloquant la L-sélectine, pour des forces de cisaillements de l'ordre de $400\text{-}800\text{ s}^{-1}$, l'adhésion des

neutrophiles est diminuée, tandis que sous les 400s^{-1} , seules les β_2 -intégrines seraient essentielles (283). Ceci démontre l'importance de la synergie qui existe entre l'engagement de la L-sélectine et ses propriétés adhésives avec l'activation des β_2 -intégrines et l'adhésion ferme des neutrophiles menant à la diapédèse (284).

Les neutrophiles sont aussi en mesure d'adhérer fermement à des plaquettes aux sites vasculaires endommagés. Cette interaction des neutrophiles circulants avec des plaquettes immobilisées repose sur les sélectines pour la phase de roulement, mais ce sont les intégrines qui stabilisent ces interactions. Ceci est possible parce que CD11b/CD18 subie une série d'activations et de désactivations (changements de conformation) qui permettent aux neutrophiles de rouler sur les plaquettes pendant que de nouvelles molécules de CD11b/CD18 sont dirigées vers la surface. Les complexes CD11b/CD18 présents à la surface sont responsables de la transition du roulement à l'adhésion, tandis que les complexes issus des réserves intracellulaires ou de synthèse *de novo*, participent à la stabilisation de l'adhésion (285). Ce phénomène est aussi observé au niveau des cellules endothéliales.

Lorsque les forces de cisaillements sont modérées, les intégrines leucocytaires sont suffisantes pour permettre l'adhésion des neutrophiles à une surface de fibrine, mais lorsque les force de cisaillements sont élevées, d'autres mécanismes sont requis (ie : des plaquettes activées) pour ralentir suffisamment les neutrophiles afin de permettre l'adhésion ferme (286,287). Outre l'implication de CD11b/CD18 des neutrophiles, une intégrine plaquettaire participe aussi au recrutement des neutrophiles. Des plaquettes ayant adhérees au site vasculaire endommagé seront activées et la GPIIb/IIIa, une fois dans sa conformation active, sera en mesure de capturer le fibrinogène circulant pour s'en servir comme substrat adhésif pour la β_2 -intégrine CD11b/CD18 à la surface des neutrophiles (288,289).

2.2.5.2 Recrutement des plaquettes : Adhésion ferme

L'adhésion plaquettaire aux sites vasculaires endommagés est déclenchée par l'exposition des constituants de la matrice sous-endothéliale. La déposition des plaquettes sur la surface endommagée dépend de la reconnaissance de protéines adhésives par des glycoprotéines membranaires spécifiques qui sont généralement des intégrines (236). Cette adhésion plaquettaire se déroule en trois étapes : 1) une étape de ralentissement, suivie 2) d'une phase d'activation et 3) de l'adhésion ferme.

Les récepteurs impliqués dans la première phase ne sont pas tous des intégrines, mais des glycoprotéines qui reconnaissent diverses composantes de la matrice extracellulaire. Il y a la GPIb-V-IX, une association de trois glycoprotéines, qui lie le facteur de von Willebrand (290,291), les GPIV et GPVI, qui toutes deux reconnaissent le collagène (292). Quelques intégrines participent à la phase de ralentissement soit les trois β_1 -intégrines GPIa/IIa, GPIb/IIIa et $\alpha_6\beta_1$ qui interagissent avec le collagène, la fibronectine et la laminine, respectivement (292). Des tous ces récepteurs membranaires, les intégrines et le complexe GPIb-V-IX sont en mesure d'activer des voies de signalisation intracellulaires menant à l'activation plaquettaire par influx calcique et l'entremise de tyrosine kinases (290,293,294).

Après l'activation plaquettaire, la GPIIb/IIIa médie l'adhésion des plaquettes en liant les protéines de la matrice extracellulaire (295,296). Pourtant, l'implication de la GPIIb/IIIa varie selon l'importance des forces de cisaillements en présence. Pour des forces de cisaillements inférieures à $900s^{-1}$, la GPIIb/IIIa permet l'adhésion immédiate des plaquettes, mais lorsque les forces de cisaillements deviennent supérieures à $900s^{-1}$, d'autres protéines doivent créer des liens temporaires (un peu comme les sélectines dans le phénomène de roulement) afin de permettre à la GPIIb/IIIa d'établir ses liens avec la matrice extracellulaire

(297). Plusieurs études mettent en évidence la participation du complexe GPIb-V-IX, de la GPIa/IIa et de GPVI dans le processus d'adhésion plaquettaire sous conditions de flot (298-301) par interaction avec le facteur de von Willebrand. Cette implication de différents récepteurs membranaires pourrait s'expliquer par le fait que la vitesse de formation des liens entre le facteur de von Willebrand et ces trois protéines est très rapide et la liaison de faible affinité, tandis que les liens entre la GPIIb/IIIa et ses substrats se forment lentement et sont de plus forte affinité.

2.2.5.3 Agrégation des neutrophiles

Comme expliqué précédemment, l'interaction entre la L-sélectine et le PSGL-1 contribue à l'agrégation des neutrophiles. En poussant plus loin l'étude de l'agrégation des neutrophiles, des anticorps dirigés contre la L-sélectine ou les β_2 -intégrines sont en mesure de bloquer l'agrégation des neutrophiles induite par le fMLP. En bloquant sélectivement la L-sélectine ou les β_2 -intégrines, on obtient une inhibition de 50% de l'agrégation des neutrophiles. L'utilisation de neutrophiles provenant de patients atteints de LAD (Leukocyte Adhesion Deficient disease) permet de comprendre que la liaison des neutrophiles LAD dépendait de la présence de la L-sélectine à leur surface et de la présence des β_2 -intégrines à la surface des neutrophiles normaux. Ce qui amena la conclusion suivante : pour que l'agrégation des neutrophiles ait lieu, il faut qu'il y ait présence de L-sélectine à la surface d'une des deux populations et que les β_2 -intégrines soient actives à la surface de la seconde population (214). Le chlorure de manganèse ($MnCl_2$) et le dithiothréitol (DTT) augmentent le potentiel adhésif des β_2 -intégrines ; ces deux substances furent donc utilisées pour évaluer la contribution de la L-sélectine et des β_2 -intégrines dans le processus de l'agrégation des neutrophiles, car la L-sélectine ne subit pas de « shedding » en présence de DTT. Ces deux composés n'induisent pas l'agrégation, mais prolongent celle causée par le fMLP et produisent de plus importants agrégats. Sélectivement, la fonction de la L-sélectine fut bloquée avec l'anticorps DREG56

et/ou celles des β_2 -intégrines, par l'anticorps IB4 Fab. Les résultats indiquent que l'agrégation, dans toutes les conditions expérimentales testées reposait sur la L-sélectine et sur les β_2 -intégrines. La L-sélectine servirait donc à établir le contact intercellulaire que les β_2 -intégrines stabiliseraient (302).

2.2.5.4 Agrégation plaquettaire

Les plaquettes activées avec des agonistes puissants (thrombine, collagène) ou faibles (ADP, épinéphrine) subissent un changement de forme et expriment à leur surface des récepteurs pour le fibrinogène (303,304). La liaison du fibrinogène aux plaquettes, qui est calcium dépendante, est une étape cruciale dans le processus de l'agrégation plaquettaire (303,305). L'implication de la GPIIb/IIIa fut découverte par l'étude de plaquettes de patients souffrant de la maladie de Glanzman qui consiste en une incapacité des plaquettes à agréger suite à une stimulation (306). Les plaquettes de ces patients devaient donc exprimer à leur surface une quantité beaucoup moins importante de récepteurs GPIIb/IIIa que les plaquettes de personnes saines (307,308). Par contre, dans certains cas, des patients atteints de la maladie de Glanzman montrèrent une concentration membranaire en GPIIb/IIIa voisine de la normale (309,310). Cependant dans la majorité de ces cas, des anomalies de structure furent notées : une dissociation des sous-unités, une sensibilité accrue à la présence d'agents chélateurs qui facilitent la dissociation, un poids moléculaire différent pour la GPIIIa et des complexes GPIIb/IIIa exprimant des sites antigéniques différents (237). Le rôle de la GPIIb/IIIa fut aussi mis en évidence par l'utilisation 1) d'anticorps monoclonaux qui inhibent l'agrégation plaquettaire, 2) de dérivés photoactivables du fibrinogène, qui lient la sous-unité GPIIIa et 3) de complexes GPIIb/IIIa reconstitués dans des membranes de phospholipides, qui lient le fibrinogène (310-314). Donc, le fibrinogène lié aux plaquettes a comme rôle la création d'un pont fibreux entre deux plaquettes (315) et/ou de servir de cofacteur pour l'agrégation.

Si l'on compare l'action des sélectines et des intégrines au cours des différentes réponses physiologiques (ie : adhésion des plaquettes et des neutrophiles à l'endothélium activé et à la matrice sous-endothéliale ainsi que pendant l'agrégation tant plaquettaire que neutrophilique), les sélectines endossent un rôle de ralentissement et de rapprochement entre deux cellules, ce qui laisse le temps aux intégrines d'acquérir leur conformation active et de médier l'adhésion ferme entre deux cellules.

2.3 Plaquettes et neutrophiles : interactions possibles?

En sachant que les sélectines et les intégrines jouent des rôles cruciaux dans divers processus pathophysiologiques et que leur activation respective entraîne plusieurs modifications au niveau intracellulaire et membranaire : 1) l'expression de molécules d'adhésion ou une activation de ces dernières et 2) la sécrétion de différentes substances chimiotactiques et activatrices ; il devient important d'évaluer l'importance des interactions possibles entre les plaquettes et les neutrophiles *in vitro* et *in vivo* dans le développement de certaines pathologies.

Chapitre #3

**Interactions entre les plaquettes
et les neutrophiles ; importance
physiopathologique**

3.1 Introduction

L'état d'activation des plaquettes et des neutrophiles semble jouer un rôle important dans le développement et la progression de diverses pathologies cardiovasculaires. C'est pour cette raison qu'au cours des dernières années, plusieurs études furent menées en clinique pour évaluer le niveau d'expression des molécules d'adhésion de même que le métabolisme cellulaire des plaquettes et des neutrophiles lors de différentes atteintes cardiovasculaires.

Le recours à l'angioplastie est de plus en plus fréquent dans les cas d'obstruction coronarienne, mais qu'en est-il de la fonction plaquettaire et leucocytaire lors de cette intervention ?

Étant donné que le procédé d'angioplastie expose la matrice sous endothéliale (316), des chercheurs se sont donc penchés sur la modulation de l'expression de protéines capables d'interagir avec les composantes de la matrice extracellulaire : soit les β_2 -intégrines et le complexe GPIIb/IIIa. Dans un premier temps, Neumann et coll. (317) ont analysé des échantillons sanguins de patients prélevés proximale et distalement au site d'angioplastie (une dilatation de 90 secondes). Leurs résultats montrèrent que les récepteurs au fibrinogène à la surface des plaquettes et que les complexes CD11b/CD18 étaient exprimés en plus grande quantité après exposition à la surface traitée par angioplastie, tandis qu'aucun changement ne fut enregistré chez des patients ayant subi toute la préparation, mais sans angioplastie. En plus, ils remarquèrent que la concentration membranaire en L-sélectine diminuait considérablement, ce qui est logique quand on pense que le « shedding » de la L-sélectine précède l'adhésion ferme des neutrophiles. En poussant plus loin leur analyse des récepteurs au fibrinogène à la surface des plaquettes, ils arrivèrent à la conclusion que cette augmentation n'était pas due à la GPIIb/IIIa, car un marquage avec un anticorps dirigé contre CD41 (la sous-unité GPIIb) n'a révélé aucune variation de l'intensité du marquage. Ce qui est surprenant, car l'utilisation de l'anticorps LIBS1

(« Ligand-Induced Binding Site ») reconnaissant la sous-unité GPIIIa (plus particulièrement le site de liaison induit par le ligand) montre une augmentation significative de la présence de ces sites à la surface des plaquettes (317). Ces résultats peuvent s'expliquer par la présence d'une autre β_3 -intégrine dans la membrane des plaquettes : $\alpha_v\beta_3$, qui reconnaît comme la GPIIb/IIIa une séquence RGDS contenue entre autre dans le fibrinogène (236).

Le groupe de Serrano et coll. (318) reprit sensiblement le même protocole que Neumann et coll. et parvint à démontrer une augmentation de l'expression de la glycoprotéine GPIIb/IIIa au niveau des plaquettes 15 minutes après le traitement, tout en corroborant les résultats obtenus pour les β_2 -intégrines et la L-sélectine.

La détection de plaquettes liées aux neutrophiles et monocytes circulants, phénomène appelé formation de conjugués, rosette ou encore satellitisme, fut aussi mise en évidence suite à la procédure d'angioplastie (57) et corrélée avec la présence accrue de CD11b/CD18 à la surface des neutrophiles. De plus, cette liaison des plaquettes aux leucocytes est plus importante chez les patients présentant des épisodes de douleurs angineuses avant et après angioplastie.

Par la suite, une activation plaquettaire et neutrophilique furent aussi observées chez des patients souffrant d'angine instable et de maladies coronariennes stables (319-321), ceci menant à une augmentation du phénomène de liaison des plaquettes aux neutrophiles circulants.

Ces interactions adhésives entre les plaquettes et les neutrophiles joueraient un rôle important dans la modulation d'événements thrombotiques et inflammatoires (68) par influence mutuelle de leur métabolisme intracellulaire, ayant pour conséquence une réponse accrue et des effets délétères plus prononcés (69).

3.2 Modulation de l'activité des plaquettes et des neutrophiles

3.2.1 Effet des plaquettes sur les neutrophiles

Les plaquettes activées ou au repos influencent le métabolisme des neutrophiles. L'évaluation de la production de superoxyde (O_2^-) par les neutrophiles en présence et en absence de plaquettes activées ou non a montré qu'en présence de plaquettes au repos, la production basale de superoxyde par les neutrophiles était inhibée. Le facteur médiant cette inhibition est sensible à une adénosine déaminase, suggérant que ce facteur plaquettaire est l'adénosine. Cependant en présence de plaquettes activées à la thrombine ou au PAF, les neutrophiles produisent de 2 à 5 fois plus de superoxyde et ce, en fonction de la concentration de l'agoniste utilisé et du rapport plaquettes/neutrophiles, pour un maximum d'activité à 40/1. Des traitements au WEB2086 (un inhibiteur du PAF), à l'aspirine et à l'adénosine déaminase ne peuvent prévenir cette augmentation de la production de superoxyde (322). Bengtsson et coll. (323) s'intéressèrent aussi à la production de radicaux libres par les neutrophiles en présence de plaquettes, mais firent la distinction entre la production intracellulaire et extracellulaire en utilisant des neutrophiles stimulés au fMLP. Ces résultats montrèrent que les plaquettes au repos inhibaient la production de superoxyde extracellulaire, mais non la production intracellulaire. Le rôle de l'adénosine fut aussi soulevé, car l'adénosine déaminase et la théophylline (un bloqueur des récepteurs de l'adénosine) renversent l'inhibition tandis que l'apyrase qui cause une accumulation d'adénosine, potentialise l'inhibition. Résultat surprenant, l'utilisation de plaquettes fixées ou dépourvues d'adénosine entraîne la même inhibition, ce qui suggère que les plaquettes induisent une production d'adénosine par les neutrophiles.

Dans cette même étude, le rôle du cytosquelette fut évalué et il fut proposé que les plaquettes induisent la polymérisation des filaments d'actine des

neutrophiles, car la cytochalasine B empêche les plaquettes d'exercer leur pouvoir inhibiteur.

Par la suite, l'on découvrit que cette induction de la production de radicaux libres dépendait de contacts cellulaires étroits médiés par la P-sélectine plaquettaire (324) et le fibrinogène (325).

Les plaquettes, par l'intermédiaire du facteur 4 plaquettaire (PF4), du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) produits lors de l'activation plaquettaire et des métabolites de l'AA par la voie de la 5-lipoxygénase peuvent favoriser le recrutement des neutrophiles, car ces substances sont chimiotactiques pour les neutrophiles (326-328).

Outre leurs effets sur le métabolisme des radicaux libres, les plaquettes influencent d'autres fonctions des neutrophiles comme leur agrégation, leur fonction bactéricide, leur adhésion et leur dégranulation (329-332). En plus des plaquettes, les érythrocytes et les cellules endothéliales sont aussi en mesure d'influencer les neutrophiles (331,333).

3.2.2 Effets des neutrophiles sur les plaquettes

Les neutrophiles produisent et sécrètent plusieurs substances susceptibles d'activer les plaquettes : des radicaux libres via une NADPH oxidase et des enzymes protéolytiques comme l'élastase et la cathepsine G.

3.2.2.1 Effets des radicaux libres

La stimulation d'une suspension de plaquettes et de neutrophiles avec du fMLP qui est spécifique aux neutrophiles, n'entraîne aucune réponse plaquettaire. Lorsque les plaquettes sont légèrement stimulées (« primed ») avec du collagène ou de l'AA, préalablement à l'ajout du fMLP, il se produit une

agrégation irréversible et une forte production de thromboxane A₂. Cette réponse des plaquettes est augmentée en présence de superoxyde dismutase (une enzyme qui catalyse la dégradation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène) (SOD) et bloquée par la catalase (une enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau) (CAT) et un inhibiteur de la NADPH oxydase, ce qui suggère fortement un rôle du système superoxyde/peroxyde d'hydrogène dans cette interaction cellulaire (334).

L'effet direct du superoxyde sur l'agrégation plaquettaire et la sécrétion de sérotonine fut démontré dans un système où des plaquettes sont mises en présence de xanthine oxydase, une enzyme qui en catalysant sa réaction (xanthine à hypoxanthine) produit du superoxyde. L'agrégation et la sécrétion dépendent du temps d'exposition et sont inhibées par la SOD, mais sont insensibles à l'action de la CAT (335).

Le peroxyde d'hydrogène est capable d'induire la sécrétion de sérotonine et d'adénine par les plaquettes, car la CAT prévient cette sécrétion induite par des neutrophiles en phagocyte. Aucune sécrétion n'est enregistrée lorsque des neutrophiles déficients en myéloperoxydase (maladie héréditaire) ou en métabolisme oxydatif (maladie granulomateuse chronique) sont utilisés, mais la sécrétion est restaurée lorsque de la myéloperoxydase exogène ou une source de peroxyde d'hydrogène est ajoutée au milieu (336). Lorsque des inhibiteurs d'enzymes contenant un motif hème sont ajoutés, il y a potentialisation de l'effet du peroxyde d'hydrogène, car ces inhibiteurs non seulement inhibent la myéloperoxydase des neutrophiles, mais ils neutralisent aussi la CAT des plaquettes (336).

3.2.2.2 Élastase et Cathepsine G

Lorsque des plaquettes et des neutrophiles se retrouvent en suspension et que l'on active les neutrophiles avec du fMLP, les plaquettes sont fortement

activées et cette activation est sensible à l'action du PMSF (PhMeSO₂F), un inhibiteur des protéases à sérine (337). L'élastase et la cathepsine G sont deux protéases à sérine que l'on retrouve au niveau des granules azurophiles positifs à la peroxidase des neutrophiles et des monocytes. L'élastase confère aux neutrophiles un potentiel pro-inflammatoire et une capacité de dégradation de la matrice extracellulaire par clivage de différentes protéines comme le collagène de type III, le pro- et le collagène de type IV, la fibrine, la fibronectine et l'élastine (338-343). La cathepsine G, pour sa part, peut modifier certaines molécules dont des facteurs chimiotactiques et la thrombine (344-347) et possède la capacité de potentialiser l'action de l'élastase (348). Cette protéase peut dégrader la fibronectine, augmenter la perméabilité endothéliale et épithéliale et possède même des propriétés de conversion de l'angiotensine (348-352).

L'élastase est capable de potentialiser l'agrégation plaquettaire en activant la GPIIb/IIIa par un clivage de la région carboxy terminale de la chaîne lourde de la sous-unité GPIIb (353). L'élastase seule est sans effet sur les plaquettes, mais en présence de cathepsine G, qui produit une agrégation faible, et de fibrinogène, les plaquettes lient plus de fibrinogène et voient leurs complexes GPIIb/IIIa être activés 3 fois plus qu'en présence de faibles concentrations de cathepsine G. Ceci fut démontré par une augmentation du marquage plaquettaire avec l'anticorps PAC-1 qui reconnaît la conformation active de la GPIIb/IIIa (353). D'un autre côté, lorsque de fortes concentrations d'élastase sont incubées avec des plaquettes, il en résulte que la cathepsine G et les neutrophiles activés ne sont plus capables d'entraîner l'activation plaquettaire (354).

L'activation plaquettaire induite par la cathepsine G ne semble pas dépendre de l'agoniste utilisé, car le fMLP, le C5a, le LTB₄ ou le PAF produisent le même effet (355,356). En plus, la cathepsine G pourrait jouer un rôle dans le phénomène d'amplification, car l'activation plaquettaire mène à la sécrétion du peptide d'activation du tissu conjonctif (« connective tissue activating

peptide II ») qui est clivé par la cathepsine G pour former le peptide d'activation des neutrophiles (« neutrophil-activating peptide-2 ») qui est un puissant agoniste des neutrophiles (357). L'action de la cathepsine G sur les plaquettes serait de type protéolytique, car la cathepsine G peut cliver la glycoprotéine de surface GPIb (358,359). Pourtant, si l'on traite des plaquettes de patients atteints de la maladie de Bernard-Soulier (des plaquettes sans complexes GPIb-IX) et que l'on mesure l'expression de la P-sélectine, la cathepsine G produit le même degré d'expression de la P-sélectine que ce soit sur des plaquettes normales ou sur des plaquettes du syndrome de Bernard-Soulier (359). La cathepsine G entraîne de manière dépendante de la concentration (20-500 μM) une augmentation du niveau intracellulaire en calcium par l'ouverture de canaux pour les cations divalents au niveau membranaire, ce qui est différent de l'action de la thrombine dont l'influx calcique provient des réserves intracellulaires (360). Cette activation plaquettaire due à la cathepsine G semble dépendre de la PKC qui pourrait être impliquée dans la régulation de l'ouverture des canaux calciques membranaires ainsi que la phospholipase A_2 qui pourrait activer les voies de signalisation intracellulaires (361).

3.2.2.3 Inhibition de l'activation plaquettaire

Outre la capacité des neutrophiles activés à induire l'activation plaquettaire, la présence de neutrophiles non stimulés peut diminuer l'agrégation plaquettaire et la sécrétion d'ATP par des plaquettes activées par le collagène, la thrombine ou par l'AA (362). Cette inhibition de l'activité plaquettaire par les neutrophiles dépend du temps d'exposition et de la concentration de neutrophiles dans le milieu, mais le facteur responsable de l'action inhibitrice n'est ni un métabolite de l'AA, ni des radicaux libres, ni l'oxyde nitrique, ni une protéase. Zatta et coll. (363) proposèrent que le facteur sécrété par les neutrophiles possédait une activité adénosine diphosphatase pour les raisons suivantes : 1) les neutrophiles sont capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire dans le sang complet suite à une stimulation faible des plaquettes, 2) une plus grande concentration

d'agoniste renverse l'effet inhibiteur des neutrophiles, 3) l'activation des neutrophiles par le fMLP permet la restauration de leur pouvoir inhibiteur, 4) les mêmes effets sont enregistrés en utilisant seulement le surnageant des différentes suspensions de neutrophiles, 5) la présence des neutrophiles n'affecte en rien les mouvements calciques et 6) les neutrophiles convertissent ou élimine l'ADP disponible pour l'agrégation plaquettaire. D'autres travaux montrèrent que l'effet inhibiteur des neutrophiles sur l'agrégation plaquettaire ressemblait étrangement à celui engendré par l'oxyde nitrique. En effet, les neutrophiles entraînent chez les plaquettes une augmentation de la concentration intracellulaire en GMP cyclique. Un traitement au N^G-monométhyle-L-arginine méthyle ester (un précurseur non transformable de la synthèse de l'oxyde nitrique) bloque l'inhibition de l'agrégation par les neutrophiles, effet qui est renversé par l'ajout de L-arginine mais non par la D-arginine (364). Ces résultats suggèrent qu'un composé semblable à l'oxyde nitrique est responsable de l'inhibition de l'agrégation plaquettaire par les neutrophiles, ce qui est corroboré par McCall et coll. (365) qui démontrèrent en plus que ce composé est inactivé lors de l'activation des neutrophiles par les radicaux libres dont le superoxyde. En résumé, les neutrophiles peuvent limiter l'agrégation plaquettaire par des mécanismes oxyde nitrique-dépendants et oxyde nitrique-indépendants.

3.3 Métabolisme transcellulaire

Les leucotriènes sont une famille de métabolites oxygénés provenant de la voie de synthèse de la 5-lipoxygénase. L'acide 5(S)5,6-oxydo-7,9-trans-11,14-cis-eicosatétraénoïque ou LTA₄ est un important précurseur dans la voie de synthèse des autres leucotriènes, car ce dernier peut être hydrolysé pour donner le LTB₄ ou encore conjugué au glutathion pour donner le LTC₄. Étant donné que les leucotriènes ont d'importantes activités biologiques (i.e. : chimiotactisme, activation des neutrophiles et contraction des cellules musculaires lisses) (366-368) et sont impliqués dans la réponse inflammatoire (369-372), les mécanismes

contribuant à leur biosynthèse sous conditions physiologiques et pathologiques suscitent un grand intérêt.

La première étude qui démontra une coopération entre les plaquettes et les neutrophiles pour la synthèse des eicosanoïdes, mit en évidence la participation de l'AA et du 12-HETE (acide 12-hydroxy-6,8,11,14-eicosatétraénoïque) sécrétés par les plaquettes activées (373). L'AA peut mener à la synthèse de LTB₄ et de 5-HETE et le 12-HETE peut être converti en DHETE par les neutrophiles.

Par la suite, l'incapacité des plaquettes de synthétiser du LTA₄ et par voie de conséquence les autres leucotriènes, fut dévoilée. Des plaquettes mises en présence de LTA₄ peuvent synthétiser du LTC₄ de manière dépendante du temps et de la quantité de substrat présente. Ceci signifie que les plaquettes possèdent la machinerie enzymatique pour transformer le LTA₄, mais non celle à sa synthèse (374-375). Les neutrophiles pouvant synthétiser le LTA₄ deviennent donc un donneur potentiel de ce leucotriène que les plaquettes pourraient métaboliser en LTC₄, ce qui fut vérifié par une augmentation de la production de LTC₄ par des neutrophiles en présence de plaquettes. De plus, l'incubation de plaquettes avec le surnageant de neutrophiles activés mène à la synthèse de LTC₄. Les neutrophiles activés sécrètent donc une substance qui est convertie par les plaquettes en LTC₄, ce qui témoigne de la capacité des plaquettes et des neutrophiles à interagir et à participer étroitement à la synthèse de médiateurs inflammatoires (374,376).

De plus, les dérivés de l'AA issus des neutrophiles peuvent amplifier la formation de thromboxane par les plaquettes, même si ces dernières sont les principales productrices des dérivés de l'AA (377). Les neutrophiles semblent pour leur part être la principale source de LTB₄ et de LTA₄, le principal composé de la voie de la 5-lipoxygénase, sécrétés dans le milieu (378). Dans le cas de processus multicellulaires, le LTA₄ pourrait être transformé en LTC₄ par les plaquettes ou en LTB₄ par la LTA₄ hydrolase des érythrocytes qui ne contiennent

pas de lipoxigénases et donc sont incapables de transformer directement l'AA en LTA₄ (379). Ces mécanismes de métabolisme transcellulaire pourraient donc jouer un rôle primordial dans le développement de diverses pathologies où plaquettes et neutrophiles participent activement. D'ailleurs, certaines molécules d'adhésion, de par leur capacité à maintenir un contact cellulaire, seraient la cible ou encore essentielles afin que le métabolisme transcellulaire ait lieu et que les différents agents sécrétés parviennent à produire une activation cellulaire hétérotypique.

3.4 Liaison des plaquettes aux neutrophiles

3.4.1 Généralités

Plusieurs inhibiteurs de protéases circulent dans le sang et sont susceptibles d'inactiver certaines protéases comme la cathepsine G et l'élastase. Lorsque des plaquettes sont exposées à des surnageants de neutrophiles activés, l'activation plaquettaire observée peut être inhibée par un anticorps dirigé contre la cathepsine G, de même que par différents inhibiteurs de protéases à sérine. Cependant, lors de certaines études, sur des suspensions cellulaires mixtes de plaquettes et de neutrophiles activés, l'effet inhibiteur des anti-protéinases sur l'activation plaquettaire, disparaît complètement (380). Il fut alors proposé qu'un contact cellulaire étroit devait être créé pour permettre la formation d'un micro-environnement où la cathepsine G pourrait être sécrétée tout en étant à l'abri des inhibiteurs de protéases. Cette hypothèse fut vérifiée quelques années plus tard par le même groupe qui utilisa un anticorps dirigé contre la P-sélectine plaquettaire et remarquèrent une diminution de la liaison des plaquettes aux neutrophiles et que cette baisse d'interactions adhésives était corrélée avec une plus grande inhibition d'une α 1-protéase sur la sécrétion de sérotonine par les plaquettes induite par la cathepsine G (381). Cet effet de l'anticorps anti-P-sélectine fut aussi observé avec du mannose-1-phosphate et un traitement à la neuraminidase. Par contre, les trois traitements utilisés sans α 1-protéase ne

diminuent pas la sécrétion de sérotonine, ce qui confirme que le contact plaquette/neutrophile est essentiel pour que la cathepsine G puisse activer les plaquettes, mais ceci seulement en présence d'inhibiteurs de protéases à sérine, sinon la cathepsine G exerce son action sans qu'il y ait contact cellulaire (381).

La cathepsine G des neutrophiles peut induire l'expression de la P-sélectine plaquettaire qui en contrepartie peut lier des neutrophiles. Outre la protection de la cathepsine G des antiprotéases, la formation de ce microenvironnement ou tout simplement l'engagement de la P-sélectine dans une liaison avec son ligand le PSGL-1, favorise le métabolisme transcellulaire. En effet, l'anticorps anti-P-sélectine GE12 réduit la production de thromboxane B₂ et de LTC₄ dans une suspension de plaquettes et de neutrophiles activés au fMLP (377,382). Cependant, la cathepsine G, lorsqu'en présence de thrombine, diminue l'expression de la P-sélectine et la formation de liaisons plaquettes/neutrophiles. L'induction de l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles par la thrombine donne des conjugués stables pour 120 minutes, tandis que lorsque de la cathepsine G est ajoutée, on note une diminution progressive de la liaison des plaquettes aux neutrophiles ; la cathepsine G jouant certainement un rôle déstabilisateur sur la formation des conjugués (383).

Le contact intercellulaire n'est pas seulement important entre les plaquettes et les neutrophiles, mais aussi entre les neutrophiles et les cellules endothéliales, car l'utilisation d'anticorps contre la L-sélectine et les β_2 -intégrines réduit la production de LTC₄ par les neutrophiles et les cellules endothéliales, démontrant bien l'importance de l'adhésion des neutrophiles dans le métabolisme transcellulaire (384).

3.4.2 Plaquettes activées et adhésion aux neutrophiles

C'est en 1963 que les docteurs Field et McLeod (385) ont identifié le phénomène de liaison plaquettaire aux polymorphonucléaires chez un jeune

patient de 14 ans qui souffrait de pertes de conscience répétées. La seule anomalie biologique qu'ils découvrirent fut justement une adhésion de plaquettes aux leucocytes polynucléés lors de prélèvements sanguins avec différents anticoagulants.

Plusieurs autres études montrèrent que les plaquettes pouvaient lier les neutrophiles dans le sang complet anticoagulé à l'EDTA (386-389). Un autre cas clinique fut étudié par Yoo et coll. (390) et révéla certaines anomalies plaquettaire : 1) une diminution de l'agrégation plaquettaire par l'ADP, l'épinéphrine et le collagène, 2) une incapacité à produire une seconde vague d'agrégation par l'ADP ou l'épinéphrine et 3) une instabilité de la liaison plaquette/plaquette qui entraîne une tendance nette vers la désagrégation.

En poussant plus les recherches sur ce phénomène, on découvrit rapidement que la stimulation de plaquettes avec de la thrombine (0.01 à 0.1 U/mL) menait à une augmentation de la liaison des plaquettes aux leucocytes. Les plaquettes activées lient alors les monocytes, les neutrophiles et très faiblement les lymphocytes (391) et ceci sous dépendance calcique. Puis, avec l'apparition d'une nouvelle famille de molécules d'adhésion, les sélectines, les recherches s'intensifièrent, si bien qu'une relation directe entre la liaison des plaquettes activées aux neutrophiles et les granules α des plaquettes fut démontrée (392). Cette étude montra que seules les plaquettes dénotant un marquage important à la thrombospondine (protéine impliquée dans les interactions cellule à cellule et cellule à matrice extracellulaire qui est emmagasinée dans les granules α) étaient impliquées dans des liaisons adhésives avec les neutrophiles. Tandis que d'autres proposèrent qu'une autre protéine contenue dans les granules α serait impliquée, soit la P-sélectine (393).

3.4.3 Axe P-sélectine → PSGL-1

Avant et surtout depuis la découverte du PSGL-1 (148), les recherches sur les interactions entre les plaquettes et les neutrophiles ont porté sur l'importance de la P-sélectine. Dans leur état inactivé, les plaquettes lient très faiblement les neutrophiles; environ 15% des neutrophiles présentent des plaquettes à leur surface, tandis que lorsque les plaquettes sont stimulées à la thrombine, cette proportion grimpe à 60% (394). Ceci dénotant bien le caractère dépendant de l'activation plaquettaire dans l'expression des modulateurs de l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles. Rapidement, l'implication de la liaison de la P-sélectine au PSGL-1 dans l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles fut démontrée. En effet, en utilisant un anticorps anti-P-sélectine (AC1.2) et de l'EDTA, le groupe de Larsen et coll. (393) parvint à inhiber la liaison de plaquettes activées à plusieurs types cellulaires différents dont des neutrophiles, des monocytes et des cellules HL-60 et U937. Cependant, d'autres anticorps se montrèrent inefficaces : anti-GPIIb/IIIa, anti-thrombospondine et anti-GPIV de même que l'ajout de thrombospondine au milieu. Ces résultats suggérèrent donc fortement que seule la liaison de la P-sélectine avec le PSGL-1 serait responsable de l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles.

Cette liaison de la P-sélectine au PSGL-1 des neutrophiles serait régulée par des dérivés de l'AA et l'oxyde nitrique. L'iloprost, un analogue stable de PGI₂, inhibe l'adhésion des plaquettes activées aux neutrophiles et ce en étant 180 fois plus efficace que le nitroprusside de sodium, un donneur d'oxyde nitrique comme le prouve leur IC₅₀ de 5 nM et de 0.93 µM respectivement (395). Des traitements à l'aspirine furent aussi effectués pour bloquer la cyclo-oxygénase constitutive (COX-1) et vérifier si PGI₂ était bel et bien responsable de la régulation de la liaison plaquette/neutrophile. Effectivement, les mêmes résultats furent obtenus avec l'aspirine, sans aucun changement dans les niveaux de thromboxane B₂ et de LTB₄. Pourtant, le traitement des neutrophiles avec des métabolites de L-arginine modifiés pour bloquer la synthèse de l'oxyde nitrique, provoqua aussi

une baisse de l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles. Il semblerait donc que la présence d'oxyde nitrique extracellulaire exerce un effet inhibiteur, tandis que l'oxyde nitrique intracellulaire des neutrophiles a un effet promoteur. Etant donné que l'oxyde nitrique augmente le taux de GMP cyclique intracellulaire et que le GMP cyclique stimule plusieurs fonctions des neutrophiles (i.e. : chimiotactisme et adhésion) (396-400), il est permis de croire que le GMP cyclique intracellulaire contribue à maintenir le récepteur de la P-sélectine à la surface des neutrophiles, en empêchant une activation cellulaire trop forte. Ceci pour deux raisons : 1) l'inhibition de la production d'oxyde nitrique dans les neutrophiles félines entraîne une augmentation de l'expression des β_2 -intégrines (401) et 2) l'activation des neutrophiles mène à une diminution d'environ 70% de la teneur membranaire en PSGL-1 après 15 minutes de stimulation au fMLP 10 nM (402), observations préalablement publiées par plusieurs chercheurs (206-208).

L'étude de ce phénomène sous conditions statiques et dynamiques et par activation des neutrophiles révéla d'autres mécanismes de liaison entre les plaquettes et les neutrophiles (288,403).

3.4.4 Axe GPIIb/IIIa → Fibrinogène → CD11b/CD18

En remplaçant les plaquettes activées à la thrombine par des neutrophiles activés au fMLP ou au PMA, l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles fut aussi observée. En utilisant un anticorps contre les β_2 -intégrines, une inhibition de la liaison des plaquettes aux neutrophiles activés fut enregistrée, mais l'ajout d'anticorps contre la P-sélectine n'eut aucun effet. De plus, en incubant les neutrophiles avec deux anticorps (KIM127 et KIM185) liant les sous-unités CD18 des β_2 -intégrines et capables d'induire la conformation active des β_2 -intégrines, une augmentation de la formation de conjugués plaquettes/neutrophiles eut lieu (288). Les travaux de Brown et coll. (403) mirent en évidence la participation particulière d'une des β_2 -intégrines, soit CD11b/CD18. L'activation des deux populations cellulaires mènent à une plus grande formation de liaisons entre les

plaquettes et les neutrophiles que lorsqu'une seule population est activée. En traitant ces suspensions mixtes activées avec un anticorps contre la P-sélectine ou contre CD11b/CD18, ils n'observèrent qu'une inhibition partielle, mais lorsque les deux anticorps furent utilisés simultanément, une plus forte inhibition fut enregistrée au niveau du pourcentage de neutrophiles ayant liés des plaquettes et du nombre de plaquettes par neutrophiles. Même si seulement les plaquettes subissent l'activation, l'activation de CD11b/CD18 peut être mesurée à la surface des neutrophiles et vice-versa. Ces résultats soulèvent deux points importants : 1) les mécanismes impliqués dans la liaison des plaquettes aux neutrophiles dépendent directement du type cellulaire activé et 2) l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles s'effectue par la P-sélectine et CD11b/CD18 quand les cellules sont activées directement ou par le biais du métabolisme transcellulaire.

Quel peut bien être le récepteur de CD11b/CD18 à la surface des plaquettes? En examinant de plus près les ligands possibles et connus de CD11b/CD18 et certaines études sur les interactions entre les plaquettes et les neutrophiles, le fibrinogène sembla être une cible de choix, parce que la GPIIb/IIIa serait impliquée dans l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles et qu'elle peut aussi lier le fibrinogène. Une première étude montra que la GPIIb/IIIa participait à la formation des liaisons adhésives entre les plaquettes et les neutrophiles, car la liaison des plaquettes activées aux neutrophiles fut diminuée par : 1) un anticorps dirigé contre la sous-unité α (GPIIb ou CD41), 2) des peptides contenant la séquence RGDS et l'échistatine, 3) l'utilisation de l'EGTA qui dissocie le complexe GPIIb/IIIa et 4) par des plaquettes de patients qui n'ont pratiquement pas de CD41 à leur surface, mais une expression normale de P-sélectine (289). La participation du fibrinogène fut notée lors de la formation de liaisons entre les plaquettes et les neutrophiles par 1) des plaquettes non activées en présence de fibrinogène et d'un anticorps dirigé contre la GPIIb/IIIa capable d'induire son activation et 2) l'addition de fibrinogène à des plaquettes activées par l'ADP et fixées (288,404). Ces données montrent bien que les mécanismes régissant les interactions adhésives entre les plaquettes et les

neutrophiles sont bien plus complexes qu'il n'y parut de prime abord, car en plus CD11c/CD18 semble aussi impliquée dans la liaison au fibrinogène (405).

3.4.5 Interactions par la thrombospondine

La thrombospondine est une glycoprotéine trimérique de 450kDa que l'on retrouve à l'intérieur des granules α des plaquettes et qui est exprimée à la surface suivant l'activation plaquettaire où elle participe à la stabilisation de l'agrégation plaquettaire (406-408). Aussi synthétisée et sécrétée par les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses de l'aorte, les polymorphonucléaires, les monocytes et les macrophages (409-413), la thrombospondine est présente en quantité excessive au niveau de la paroi des vaisseaux athérosclérotiques (414,415). Le rôle biologique de la thrombospondine est encore méconnu, mais il a été montré qu'elle peut interagir avec plusieurs macromolécules comme le fibrinogène, la fibronectine, le collagène de type V et l'héparine (416) en plus de posséder une activité lectine, un peu comme les sélectines (417).

Des plaquettes stimulées à la thrombine peuvent adhérer aux monocytes par l'intermédiaire de la thrombospondine, car un anticorps dirigé contre la thrombospondine et la thrombospondine elle-même diminuent l'adhésion des plaquettes aux monocytes (418). D'autres agents comme la fibronectine, le fibrinogène, l'héparine ou encore un peptide RGDS ne parviennent pas à bloquer l'adhésion, ce qui démontre que l'épitope de la thrombospondine impliqué dans la liaison adhésive ne dépend pas de son activité lectine ni d'un site de reconnaissance classique pour les molécules de la matrice extracellulaire. Environ 80% de la thrombospondine liée aux macrophages et monocytes l'est de manière réversible, car l'ajout de thrombospondine non radio-marquée déplace la liaison de la thrombospondine- I^{125} , ce qui permet d'avancer que la thrombospondine reste à la surface de la membrane et n'est pas incorporée par

les cellules. De plus, le niveau d'activation des mononucléaires ne semble pas affecter l'adhésion de la thrombospondine (418).

Contenant une séquence RGDA (419,420), la liaison de la thrombospondine aux monocytes n'est pas affectée par le peptide RGDS (418). L'adhésion de la thrombospondine ne semble pas dépendre de la GPIIb/IIIa à la surface des plaquettes, car elle adhère normalement à des plaquettes génétiquement déficiente en GPIIb/IIIa et qu'elle ne lie pas la GPIIb/IIIa purifiée (421,422). Pourtant, certains anticorps monoclonaux dirigés contre la GPIIb/IIIa diminuent la liaison de la thrombospondine aux plaquettes (423), suggérant que des récepteurs du fibrinogène ou de la fibronectine pourraient jouer un rôle secondaire dans l'adhésion de la thrombospondine aux plaquettes.

Le groupe de Silverstein et coll. (424) identifia une molécule de 88kDa à la surface des monocytes. Cette glycoprotéine se retrouve aussi au niveau des plaquettes (425,426) sous l'appellation CD36 ou GPIV. En utilisant des anticorps dirigé contre GPIV, ils parvinrent à diminuer la liaison de la thrombospondine à la surface des monocytes et aussi à réduire la formation de complexes plaquettes/monocytes, identifiant donc la GPIV comme étant le principal récepteur de la thrombospondine à la surface des monocytes.

Des études sur les épitopes responsables de la liaison de la thrombospondine révèlent que deux sites distincts sont impliqués, variant selon la fonction associée à la liaison et du type cellulaire participant. Le premier site est un site HBD ("Heparin Binding Domain") situé à l'extrémité NH₂ terminale qui interagit avec des glycolipides sulfatés et le protéoglycan (427-429) et participe au chimiotactisme et à l'étalement (« spreading ») de mélanomes, à l'incorporation de la thrombospondine par les cellules musculaires lisses dans la matrice extracellulaire et à la capture et à la dégradation de la thrombospondine par les fibroblastes et les cellules endothéliales (427,430-433). Le deuxième site situé au niveau de l'extrémité COOH terminale de la molécule est entre autre impliqué

dans l'attachement de la thrombospondine aux plaquettes lors de l'agrégation (434).

La thrombospondine peut aussi lier les neutrophiles, potentialiser la production de radicaux libres après l'activation au fMLP de même que l'adhésion et la motilité des neutrophiles (435). Au niveau des neutrophiles non activés il y a 2.3×10^3 sites de liaison à la thrombospondine par cellule, lorsque les neutrophiles sont activés avec du fMLP en présence de cytochalasine B, le nombre de récepteurs augmente de 30 fois passant à 7.6×10^4 par cellule. De ces sites, environ 60% sont des sites HBD comme le démontre l'inhibition de la liaison de la thrombospondine par l'héparine. Sur les sites exprimés après stimulation, la grande majorité sont des sites de faible affinité (5.3×10^4) sensibles à 50% à l'héparine et les autres (2.3×10^4) de plus haute affinité sont capables de lier l'héparine dans une proportion de 70% (435). Cette présence de deux types de récepteurs à la thrombospondine à la surface des neutrophiles joue certainement un rôle au niveau du déclenchement de diverses réponses cellulaires de par leur compartimentation au niveau de deux populations distinctes de granules spécifiques des neutrophiles (436).

L'interaction des plaquettes avec la thrombospondine dépend principalement de deux conditions : 1) la présence de calcium dans le milieu et 2) les forces de cisaillements (437). En absence de calcium, la thrombospondine inhibe l'adhésion des plaquettes sur des surfaces de fibrinogène, de fibronectine, de laminine et de facteur de von Willebrand, tandis qu'en présence de calcium, elle permet l'adhésion. Les forces de cisaillements influencent l'étalement ou le recouvrement par des plaquettes d'une surface de thrombospondine, ceci seulement à des forces élevées d'environ $1600s^{-1}$. Ceci étant différent du comportement des plaquettes sur une surface de fibrinogène qu'elles recouvrent à faible et hautes forces de cisaillements. Trois molécules participeraient aux interactions des plaquettes avec la thrombospondine soit la GPIa/IIa, la GPIIb/IIIa et la GPIV, mais ces dernières ne sont pas seules responsables de

l'adhésion des plaquettes à une surface de thrombospondine, d'autres récepteurs restent encore à être caractérisés (437).

3.4.6 Axe ICAM-2 → CD11a/CD18

Un ligand pour les β_2 -intégrines fut découvert à la surface des plaquettes, soit ICAM-2 (263). Cependant ni ICAM-1 et ni ICAM-3 ne sont présentes au niveau des plaquettes activées ou non. Le nombre de molécules d'ICAM-2 est évalué à environ 3000 par plaquette et ne subit aucune variation après l'activation plaquettaire. Lors d'essais d'adhésion, les plaquettes, activées ou non, sont en mesure de lier CD11a/CD18 de même que d'adhérer à la surface de lymphocytes T activés, adhésion qui est diminuée par un anticorps dirigé contre ICAM-2 ou contre CD11a/CD18. CD11a/CD18 étant présente à la surface des neutrophiles, il est permis de croire qu'ICAM-2 est impliquée dans les interactions adhésives entre les plaquettes et les neutrophiles, mais cela reste à déterminer.

3.4.7 Les récepteurs Fc γ

Les cellules hématopoïétiques humaines expriment trois types de récepteurs Fc γ qui reconnaissent la portion Fc des immunoglobulines de type IgG (438,439). Cette famille de récepteurs est codée par six gènes différents nommés Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (A, B et C) (CD32) et Fc γ RIII (A et B) (CD16). Les neutrophiles expriment de manière constitutive les récepteurs Fc γ RI, Fc γ RII (A et C) et Fc γ RIIIB (qui est sécrété lors de l'activation des neutrophiles (440)), tandis que l'on retrouve seulement Fc γ RIIA à la surface des plaquettes (438,439,441,442). Les récepteurs de faible affinité Fc γ RII sont des glycoprotéines transmembranaires de 40kDa présentes à 10 000 exemplaires à la surface des neutrophiles. Les récepteurs Fc γ RII diffèrent grandement pour leur portion extracellulaire et transmembranaire, mais dénote une homologie très élevée pour leur domaine intracellulaire. Les récepteurs Fc γ RIIIB sont les plus abondants dans la

membrane des neutrophiles à raison de 100 000 molécules par neutrophile et ont un poids moléculaire variant de 50 à 80kDa sous conditions dénaturantes. Ces récepteurs sont liés à la membrane par des liens glycosyl-phosphatidylinositol ou GPI. Finalement, les récepteurs Fc γ RI sont constitués d'une seule chaîne peptidique transmembranaire de 72kDa et sont exprimés à de très faibles niveaux par les neutrophiles, mais peuvent être induits par l'interféron γ . Cependant, leur plus forte affinité de liaison compense pour leur nombre réduit (438,439).

Les récepteurs Fc γ RII et RIII participent de manière active à l'agrégation des neutrophiles, entraînant une activation de tyrosines kinases qui vont phosphoryler plusieurs protéines de poids moléculaire différent et déclenchant la synthèse *de novo* d'autres protéines (443). De plus, des anticorps dirigés contre les récepteurs Fc γ RII et RIII inhibent l'agrégation des neutrophiles activés par des complexes IgG agrégés par un traitement thermique, démontrant la coopération entre les deux types de récepteurs dans le processus de phosphorylation.

La glycoprotéine plaquettaire GPIb-IX-V (constituée de quatre polypeptides soit GPIb α , GPIb β , GPIX et GPV dans un rapport de 2:2:2:1) (444) et le récepteur Fc γ RIIA sont deux protéines membranaires distinctes. Pourtant l'agrégation plaquettaire induite par l'héparine qui est médiée par des anticorps anti-héparine, est inhibée par des anticorps dirigés contre le récepteur Fc γ RIIA ou la GPIb α (445,446), suggérant une certaine interaction entre les deux protéines. Cette proximité et coopération furent étudiées par Sullam et coll. qui démontrèrent qu'en préincubant les plaquettes avec des anticorps dirigés contre la GPIb α (AN51 et SZ2), ils parvenaient à inhiber l'agrégation plaquettaire induite par des polymères d'IgG. En plus, ces deux anticorps empêchent la liaison des polymères d'IgG aux récepteurs Fc γ RIIA (441). A l'aide d'une méthode de cytométrie en flux par transfert d'énergie, un transfert bidirectionnel fut enregistré, indiquant qu'une distance de 10 nm sépare les deux protéines. La

colocalisation de Fc γ RIIA et de GPIb α fut aussi confirmée par une immunoprécipitation de Fc γ RIIA qui co-précipitait avec GPIb α . Ces résultats montrent que les récepteurs Fc γ RIIA des plaquettes s'associent de manière spécifique avec la GPIb α pour agir de concert lors de l'agrégation plaquettaire.

Devant l'implication des récepteurs Fc γ dans différents processus mettant à profit des interactions intercellulaires, leur rôle dans l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles fut étudié. Quatorze patients dénotant la formation d'agrégats plaquettes/neutrophiles lors de leur prélèvement sanguin dans l'EDTA furent soumis à une recherche d'autoanticorps. Les examens révélèrent la présence de deux autoanticorps, un anti-plaquettaire dirigé contre la GPIIb/IIIa et l'autre anti-neutrophile contre le récepteur Fc γ RIII (386,447,448). La spécificité de ces anticorps fut confirmée par une absence de liaison à des plaquettes de patients souffrant de la maladie de Glanzmann de type 1 et à des neutrophiles génétiquement dépourvus de récepteurs Fc γ RIII.

L'utilisation d'anticorps contre la GPIIb/IIIa ou contre Fc γ RIII a inhibé la liaison des plaquettes aux neutrophiles tandis qu'un anticorps anti-Fc γ RII n'a eu aucun effet. De plus, l'incubation de plaquettes de patients atteints de la maladie de Glanzmann de type 1 et de neutrophiles dépourvus de récepteurs Fc γ RIII avec le plasma de patients montrant une formation d'agrégat plaquettes/neutrophiles, n'a pas induit l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles (441).

Il est donc clair que les récepteurs Fc γ doivent jouer un rôle important dans les interactions entre les plaquettes et les neutrophiles entre autre par l'activation des voies de signalisation intracellulaires des neutrophiles et l'activation du facteur NF- κ B (449).

3.4.8 Cinétique de la liaison plaquettes/neutrophiles

L'adhésion des plaquettes aux neutrophiles s'effectue par deux types d'interactions principales qui sont influencés par les différentes conditions environnantes : 1) une adhésion directe des plaquettes à la surface des neutrophiles et 2) une adhésion secondaire des plaquettes sur les plaquettes déjà liées aux neutrophiles.

Lorsque l'on bloque l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine dans le sang complet à l'aide du peptide RGD, il y a déplacement des interactions plaquettes/plaquettes vers des interactions plaquettes/neutrophiles (450). Ce qui se produit, c'est que le peptide empêche les complexes GPIIb/IIIa de lier le fibrinogène et de participer efficacement à l'agrégation plaquettaire. Cependant, la thrombine mène à une expression de la P-sélectine, ce qui pousse les plaquettes à former des liaisons hétérotypiques avec les neutrophiles. Donc, initialement, la formation d'agrégats plaquettaires compétitionne avec les neutrophiles pour le recrutement des plaquettes, mais la dissociation des agrégats relargue alors une grande quantité de plaquettes activées qui adhéreront aux neutrophiles via la P-sélectine (450).

La cytométrie de flux est une technique grandement utilisée pour mesurer l'adhésion de plaquettes activées aux neutrophiles ainsi que pour évaluer l'activation plaquettaire (405,451-453). Cette technique consiste en un marquage des différentes populations cellulaires avec des anticorps dirigés contre des marqueurs de surface spécifiques et conjugués à des fluorophores différents. Par exemple, pour la détection de plaquettes liées aux neutrophiles, plusieurs possibilités de marquage peuvent être mises en pratique, mais les plus répandues consistent à marquer les plaquettes avec un anticorps anti-P-sélectine ou anti-GPIIb/IIIa et les neutrophiles avec un anticorps anti- β_2 -intégrines ou anti-CD45 (403,405,450,454). Par la suite, les cellules sont

séparées selon leurs caractéristiques de réfringence (« side-scatter » témoin de la taille des cellules) et de dispersion (« forward scatter » évaluant la granularité des cellules) de la lumière. Alors chaque cellule arborant une double fluorescence correspondra à un neutrophile ayant lié une ou plusieurs plaquettes. La technique de cytométrie en flux nous permet d'évaluer le pourcentage de cellules positives (la proportion de neutrophiles démontrant une liaison à au moins une plaquette) et l'intensité moyenne de fluorescence (une évaluation qualitative du nombre de plaquettes liées par neutrophile).

L'utilisation de ces deux paramètres a permis de mettre en évidence l'adhésion biphasique des plaquettes aux neutrophiles, dans la mesure où en sang complet agité, l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles s'effectue par une augmentation du pourcentage de neutrophiles positifs qui se stabilise après 5 minutes et par la suite par une augmentation de l'intensité de fluorescence à 10 minutes (405). Le peptide RGD peut inhiber la formation de ces interactions entre les plaquettes et les neutrophiles (405) en diminuant l'intensité moyenne de fluorescence à la surface des neutrophiles, mais non le pourcentage de neutrophiles positifs (403). Ces résultats suggèrent que les plaquettes qui adhèrent aux neutrophiles peuvent recruter d'autres plaquettes par un mécanisme probablement semblable à celui de l'agrégation plaquettaire et mettant à contribution la GPIIb/IIIa et le fibrinogène.

3.4.9 P-sélectine → PSGL-1 et signalisation intracellulaire

La liaison de plaquettes activées aux neutrophiles n'est pas sans conséquence sur le métabolisme intracellulaire des neutrophiles qui réagissent en activant certaines protéines kinases, en augmentant la production de substances cytotoxiques et en engendrant le changement de configuration et un plus forte expression de leurs β_2 -intégrines.

Dans un premier temps, des plaquettes activées et fixées, afin d'éviter tout effet issu de métabolites sécrétés par les plaquettes, sont incubées en présence de neutrophiles. La production de radicaux libres est mesurée par chemoluminescence et les résultats de cette étude ont démontré que la liaison des plaquettes non activées et activées aux neutrophiles entraînait une augmentation de la production de radicaux libres de 200% et 550% respectivement, comparativement à celle enregistrée en absence de plaquettes (154). De plus, il fut aussi mis en évidence que l'adhésion de plaquettes aux neutrophiles menait à une capacité phagocytaire accrue de 500% en présence de zymosan (154).

Outre la production de radicaux libres, l'interaction adhésive des plaquettes avec les neutrophiles conduit à une production de diverses cytokines. Cependant, cette étude fut effectuée avec des plaquettes et des leucocytes de patients ayant subi un infarctus du myocarde sévère (IMS), dans le but d'évaluer la participation de l'adhésion plaquette/leucocyte dans l'étiologie de cette pathologie. Ayant décelé une augmentation de la liaison plaquette/leucocyte après IMS, une évaluation de la production de cytokines fut faite. La stimulation des plaquettes avec de la thrombine accroît l'interaction adhésive entre plaquettes et leucocytes, et en moins de deux heures d'incubation, les ARN messagers de IL-1 β , IL-8 et d'une protéine chimiotactique pour les monocytes (MCP-1) sont présents en plus grande quantité. Après quatre heures, la présence de IL-1 β et de IL-8 dans le surnageant des suspensions cellulaires est détectée à des niveaux grandement supérieurs à celui de départ ($268 \pm 36\%$ et $210 \pm 7\%$ respectivement) et le contenu cellulaire en MCP-1 augmente de $170 \pm 8\%$. En ajoutant un anticorps anti-P-sélectine bloquant sa fonction adhésive, la modulation de la production de cytokines par les plaquettes est inhibée presque complètement. Cette sécrétion de cytokines se produit selon deux voies de signalisation indépendantes : 1) une "Mitogen Activated Protein kinase" (MAPk) dépendante et 2) MAPk indépendante (152). Aussi, cette induction de la production de cytokines par les plaquettes activées semble être

déclenchée par l'activation du facteur de transcription nucléaire NF- κ B, car l'incubation de plaquettes activées avec des monocytes ayant adhéré dans des puits mène à l'activation de NF- κ B, tandis que des plaquettes non activées n'entraînent aucun changement au niveau de NF- κ B (153).

L'engagement du PSGL-1 dans une interaction adhésive avec un anticorps (PL1 et PL2) ou avec de la P-sélectine immobilisée entraîne une augmentation de la phosphorylation au niveau de résidus tyrosines sur trois principales protéines de masse moléculaire variant entre 105-120kDa, 70-84kDa, et 42-44kDa (152). Cette vague de phosphorylations se déclenche au cours des deux premières minutes et atteint son maximum en moins de dix minutes pour se maintenir jusqu'à trente minutes après exposition. Un effet médié par les récepteurs Fc γ fut écarté, car la saturation de ces récepteurs avec des anticorps spécifiques n'a pas bloqué l'effet des anticorps PL1 et PL2. De plus, l'ajout de cytochalasine B n'affecte en rien la phosphorylation des protéines, ce qui indique qu'un cytosquelette intact n'est pas requis (152). Fait intéressant, les mêmes protéines semblent phosphorylées après la liaison de l'anticorps DREG200 à la L-sélectine (455), accentuant ainsi l'importance de ces protéines dans la réponse leucocytaire lors du roulement et de l'adhésion cellulaire.

La caractérisation de la plus petite d'entre elles (42-44kDa) fut entreprise, car elle démontrait des caractéristiques électrophorétiques associées aux "mitogen activated protein kinase" (MAPk). Alors l'implication de ERK-1 et ERK-2 fut scrutée lors de la liaison de PL1 au PSGL-1 et il en résulta une activation de ERK-1 et/ou ERK-2 selon une cinétique dépendante du temps et semblable à celle de la phosphorylation de la protéine de 42-44kDa (152). Plusieurs voies principales mènent à l'activation de ERK-1 et ERK-2 soit la GTPase Ras, la kinase Raf et MEK (456). L'étude de Kazuya et coll. (152) suggéra la participation de MEK et de Ras, mais le rôle de Ras est peu clair dans la mesure où son importance dans l'activation de MEK ou de ERK-1 et/ou ERK-2 reste à démontrer.

L'importance de la dimérisation du PSGL-1 dans cette réponse fut soulevée par l'induction à l'aide d'anticorps divalents, mais non d'anticorps monovalent de la phosphorylation de résidus tyrosines (148,152).

Tout récemment, la stimulation du PSGL-1 à la surface de neutrophiles de souris par une forme recombinante de P-sélectine entraîna une adhésion accrue à des cellules CHO exprimant ICAM-1 et ce par un mécanisme mettant à contribution CD11a/CD18 et CD11b/CD18 dont la teneur membranaire est augmentée lors de la liaison du PSGL-1 (457). Cependant ces résultats ne semblent pas se reproduire chez les neutrophiles humains.

3.5 Approches thérapeutiques

3.5.1 Héparine et dérivés

Devant l'importance grandissante de l'implication des molécules d'adhésion au cours de plusieurs pathologies cardiovasculaires, différents traitements furent mis au point afin de contrecarrer les effets délétères associés aux interactions entre les plaquettes et les neutrophiles.

Se basant sur des études qui démontrèrent que l'héparine, un aminoglycan fucosylé et sulfaté avec des propriétés anticoagulantes, et qu'une héparine de bas poids moléculaire (CY 216) étaient en mesure d'inhiber l'activation plaquettaire induite par la cathepsine G (459,460), Nelson et coll. (461) étudièrent les interactions possibles de l'héparine avec les sélectines. Ces résultats montrèrent que l'héparine pouvait lier la P- et la L-sélectine, mais non la E-sélectine, ce qu'ils confirmèrent lors d'essais d'adhésion entre des neutrophiles et des cellules COS exprimant la P- ou la E-sélectine en inhibant seulement la liaison des neutrophiles aux cellules COS P-sélectine positives. En poussant plus loin leurs investigations, ils testèrent l'efficacité de l'héparine à

bloquer l'infiltration neutrophilique dans la cavité péritonéale de souris traitées au thioglycollate et remarquèrent une diminution du flux de neutrophiles.

L'héparine possède des propriétés cardioprotectrices dans un modèle d'ischémie-reperfusion cérébrale chez le rat, en inhibant l'accumulation des leucocytes (462).

Plus récemment, une étude conduite par Dagenais et coll. (463) révéla que l'héparine et une héparine de bas poids moléculaire (énoxaparine) pouvaient interférer avec l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles. Sous conditions tamponnées, les deux agents sont aussi efficaces, mais sous conditions plasmatiques, l'héparine perd son pouvoir inhibiteur tandis que l'énoxaparine conserve ses propriétés inhibitrices. Puis, le pouvoir cardioprotecteur de l'énoxaparine fut démontré dans un modèle canin d'ischémie-reperfusion en présence d'une sténose critique (44).

Ces résultats suggèrent fortement qu'un traitement anti-sélectines est en mesure de freiner certaines réactions inflammatoires et de prévenir l'étendue des dommages causés par l'infiltration des neutrophiles dans les tissus.

3.5.2 Le sLe^X et analogues

Le sLe^X, ligand reconnu des sélectines, fut aussi évalué pour son potentiel thérapeutique dans des modèles d'ischémie reperfusion canins et de lapins. L'une de ces études limita les lésions de reperfusion myocardiques chez le chien, en utilisant des carbohydrates contenant le sLe^X, par 56% et l'infiltration des neutrophiles par 55% (464). Cependant un analogue du sLe^X, le CY1503, ne parvint pas à diminuer la taille de l'infarctus, ni à prévenir le phénomène de « no-reflow » dans un modèle d'infarctus aigu chez le lapin (465). Par contre, un autre analogue du sLe^X, le GM1380, réduisit la taille de l'infarctus dans un modèle similaire (466). Malgré tout, le CY1503 semble posséder d'intéressantes

propriétés cardioprotectrices dans la mesure où son efficacité fut démontrée chez le chat et le chien (467-469). Une autre étude utilisa le sLe^X et obtint une réduction de l'ordre de 53% de la taille de l'infarctus dans un modèle expérimental (470). Ces résultats mitigés des analogues du sLe^X dans les modèles d'ischémie-reperfusion peuvent probablement trouver explication dans les différences entre les espèces et les modèles de même que par la faible affinité de liaison du sLe^X.

Le CY1503 fut aussi testé dans un modèle d'angioplastie porcine où sa capacité à limiter les interactions entre les plaquettes et les neutrophiles au site vasculaire endommagé fut étudiée. Le CY1503 fut sans effet sur l'adhésion des plaquettes, mais inhiba à 58% l'adhésion des neutrophiles sur les segments présentant des lésions sévères *in vivo*. Le mécanisme d'action par lequel le CY1503 interfère avec l'adhésion des neutrophiles fut exploré dans des chambres de perfusion sur des segments artériels porcins dénudés. Les résultats montrèrent clairement que le CY1503 n'inhibait l'adhésion de neutrophiles que lorsque ceux-ci étaient en présence de plaquettes, suggérant l'importance des sélectines dans les interactions plaquettes/neutrophiles après angioplastie (471).

3.5.3 La fucoidine

Le « rolling » des neutrophiles dans les veinules peut-être inhibé par différents polysaccharides sulfatés, par des anticorps dirigés contre la L-sélectine et par une forme recombinée de la L-sélectine (472,473). Ces différents traitements bloquent aussi la liaison des lymphocytes aux ganglions lymphatiques tout comme la fucoidine et le polyphosphomannane (PPME) (474-476). Tous ces composés glucidiques possèdent une certaine similarité structurale, soit un squelette d'hexoses modifié par sulfatation.

Se basant sur cette similarité, Ley et coll. (195) inhibèrent le roulement des neutrophiles dans les veinules mésentériques de rat avec une injection de

fucoïdine, mais non avec le PPME. La fucoïdine ne bloque pas seulement le roulement des neutrophiles, mais aussi leur infiltration au niveau des poumons de lapins soumis à l'action du PMA, afin de simuler une inflammation (194).

Les capacités cardioprotectrices de la fucoïdine furent mises de l'avant lorsqu'une étude effectuée par Omata et coll. (477) rapporta que la fucoïdine intervenait au niveau de l'infiltration des neutrophiles et ce en interférant, entre autre, avec le roulement des neutrophiles sur la P-sélectine endothéliale.

Une étude récente menée par Chauvet et coll. (478) montra que la fucoïdine (5mg/kg) diminuait de manière significative la vasoconstriction post-angioplastique (51%) de même que l'adhésion des plaquettes aux sites des lésions sévères (73%) et celle des neutrophiles aux sites des lésions sévères (84%) et modérées (92%) dans un modèle porcin. Le mécanisme postulé pour expliquer cette propriété anti-adhésive de la fucoïdine repose sur des résultats *in vitro* en chambre à perfusion. La perfusion de suspensions cellulaires sur des surfaces artérielles endommagées montra que l'inhibition de l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles était plus importante lorsque des suspensions mixtes étaient utilisées. Ces résultats suggèrent une coopération entre les plaquettes et les neutrophiles lors de leur adhésion à des surfaces artérielles endommagées. La fucoïdine étant en mesure de diminuer leur adhésion, il est permis de penser que la fucoïdine est capable d'inhiber les interactions entre les plaquettes et les neutrophiles aux sites artériels endommagés. D'ailleurs, la fucoïdine, à des concentrations de l'ordre de 200µg/mL, inhibe à 80% la liaison des plaquettes stimulées à la thrombine aux neutrophiles sous conditions statiques. Cet effet fut aussi observé sous conditions de flot, où la fucoïdine diminue de plus de 70% et 90% l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles après 5 et 15 minutes d'exposition à des surfaces artérielles endommagées (479).

Encore un fois, les succès rencontrés par l'utilisation de la fucoidine dans la prévention de réactions inflammatoires, comme dans le cas du recrutement des leucocytes dans le liquide cérébro-spinal lors de méningites (480), révèlent l'importance des sélectines dans ces différents processus.

3.5.4 Anticorps anti-P-sélectine et PSGL-1

Tous les traitements énumérés précédemment ne sont pas très spécifiques, car ils interagissent avec les trois sélectines, rendant par le fait même difficile l'interprétation des résultats obtenus et la dissection des mécanismes impliqués dans la progression des différentes pathologies. Avec la découverte de ligands plus spécifiques, comme le PSGL-1, des traitements plus efficaces peuvent donc être utilisés.

L'utilisation d'un anticorps anti-P-sélectine dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le lapin démontra une réduction de la taille de l'infarctus de 38% comparativement à 53% avec le sLe^x (470), ce qui montre bien le caractère moins spécifique des traitements à base d'oligosaccharides. De même qu'un traitement avec du PSGL-1 soluble sur des greffons de foie, lors de transplantations hépatiques, réduit les chances de rejet et aussi les dommages associés à l'ischémie/reperfusion par inhibition de l'infiltration des neutrophiles (481). Le PSGL-1 soluble fut aussi utilisé dans un modèle de transplantation rénale et les dommages causés par l'ischémie/reperfusion furent aussi prévenus (482). Comme il est possible de prévenir certains effets délétères en interférant avec les interactions entre la P-sélectine plaquettaire ou endothéliale et le PSGL-1 des neutrophiles, ce phénomène de l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles pourrait devenir la cible des approches thérapeutiques privilégiées lors de troubles thrombotiques et inflammatoires.

3.6 Perspectives

La venue des nouveaux ligands plus spécifiques pour les sélectines de même que l'importance croissante des interactions plaquettes/neutrophiles lors de différentes pathologies, risquent d'ouvrir de nouvelles portes vers une meilleure compréhension des mécanismes impliqués et associés à la synergie entre les plaquettes et les neutrophiles, conduisant éventuellement au développement de traitements plus efficaces et spécifiques.

3.7 But de l'étude

Les interactions entre les plaquettes et les neutrophiles jouent un rôle important dans la progression et le développement de plusieurs pathologies cardiovasculaires où un dysfonctionnement endothélial semble être associé. Que ce soit par une diminution de sa capacité à sécréter du NO ou de la PGI₂ ou encore par l'exposition des constituants de la matrice sous-endothéliale ; la surface exposée à la circulation devient plus thrombogénique et est susceptible d'entraîner l'activation des neutrophiles et des plaquettes et ainsi mener à une augmentation de leurs interactions adhésives et métaboliques.

Cependant bien que la surface endothéliale endommagée est reconnue pour mener à l'activation cellulaire, l'influence de son intégrité sur la modulation de l'expression des différentes molécules d'adhésion plaquettaires et neutrophiliques reste encore à être explorée, de même que son incidence sur les interactions adhésives et métaboliques entre les plaquettes et les neutrophiles.

C'est dans le but d'évaluer l'impact de l'intégrité de la surface endothéliale sur l'expression de certaines molécules d'adhésion (P-sélectin, L-sélectine et MAC-1), sur les interactions adhésives des plaquettes et des neutrophiles et de déterminer les mécanismes impliqués au cours de ces interactions adhésives, que ce projet de recherche fut conduit.

Contribution originale

**Importance of P-selectin and PSGL-1 in Platelet Binding to
Neutrophils Following Exposure to Damaged Arterial Surfaces**

Jean-François Théorêt, Jean-Guy Bienvenu, Anjali Kumar,
Jean-Gilles Latour, Yahye Merhi

Short title : Théorêt, Selectins in Platelet/Neutrophil Interactions

From the Laboratory of Experimental Pathology, Montreal Heart
Institute and the University of Montreal, Quebec, Canada
(J.-F.T., J.-G.B., J.-G.L and Y.M.) ; and Genetics Institute, Andover,
MA, USA (A.K.)

Corresponding author : Dr Yahye Merhi, Research Center, Montreal
Heart Institute, 5000 Bélanger Street, Montreal, Quebec, H1T 1C8,
Canada.

Phone : (514)-376-3330 #3035

Fax : (514)-376-1355 E-mail : merhi@icm.umontreal.ca

ABSTRACT

The selectin family of cell adhesion molecules (CAMs) is involved in the adhesion between neutrophils, platelets and the arterial wall. The interactions of platelets and neutrophils are increased in contact with damaged arterial surfaces as compared to intact endothelium. Also platelet binding to neutrophils has been reported in patients following angioplasty, myocardial infarction and unstable angina. We therefore investigated whether these interactions influence the expression of platelet P-selectin and neutrophils MAC-1 and L-selectin as well as the binding of platelets to neutrophils. Expression of these CAMs was determined by flow cytometry using fluorescein isothiocyanate (FITC) and phycoerythrin (PE) conjugated monoclonal antibodies (Mabs) with human platelet and neutrophil suspensions. Measurement was done at baseline and after exposure for 5 and 15 min to intact and damaged arterial surfaces in perfusion flow chambers (10 mL/min, 2 mm ID, 37°C). The binding index (BI) of platelet P-selectin increased significantly from 18.0 ± 3.4 at baseline, to 31.4 ± 4.7 and 38.1 ± 4.8 ($p < .05$) after 5 and 15 min perfusion, respectively. After 15 min exposure to damaged arterial surfaces, the mean fluorescence intensity (MFI) of neutrophil MAC-1 increased by 22% ($p < .01$), whereas that of L-selectin decreased by 10% ($p < .05$). After perfusion over intact endothelium, neutrophil L-selectin level was decreased, whereas platelet P-selectin and neutrophil MAC-1 levels remained similar to those of the controls. The binding of platelets to neutrophils was increased significantly ($p < .05$) from 4.4 ± 1.0 at baseline, to 47.3 ± 12.8 and 63.0 ± 17.6 after circulating for 5 and 15 min on damaged arterial surfaces. These interactions were completely inhibited by Fucoidan (selectin blocker, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), soluble P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and a blocking anti-P-selectin Mab (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$); they were not influenced, however, by the blocking anti-L-selectin Mab (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). These results indicate, that platelets and neutrophils are activated that in contact with damaged arterial surfaces, thereby enhancing their adhesive interactions via a mechanism involving P-selectin and PSGL-1.

INTRODUCTION

Platelets and leukocytes alone, or as conjugates, can interact with the endothelial cells and the subendothelial matrix via their relative CAMs, thus playing a role in the maintenance of vascular homeostasis and in the modulation of thrombotic and inflammatory reactions (1-3). These interactions are mediated by three major families of CAMs: the integrins, the selectins and the immunoglobulins which mediates homotypic and heterotypic interactions between platelets, neutrophils and the blood vessel wall (4-6).

The selectin family is composed of three members named accordingly to the cellular type on which they were originally discovered. P-selectin (CD62P, GMP-140, PADGEM) is confined to the α -granules of resting platelets and to the Weibel Palade bodies of unactivated endothelial cells (7). Following agonist stimulation, P-selectin is rapidly translocated to the cell surface where it can interact, like the other selectins, with sialylated or fucosylated compounds such as Sialyl Lewis^x (8-9) or PSGL-1, a disulfide-linked 240-kDa homodimer protein of the sialomucin family that is highly O-glycosylated and rich in serin and threonin (10-11). This platelet P-selectin/neutrophil PSGL-1 interaction has been shown to mediate neutrophil rolling *in vivo*, and on immobilized P-selectin and to participate in the recruitment of leukocytes (12-14). L-selectin (LAM, CD62L), is however constitutively expressed on the surface of neutrophils and is shed upon neutrophil activation (9). Neutrophil L-selectin plays an important role in neutrophil recruitment, mediating the slowing and rolling steps ; and in neutrophil/neutrophil interactions via PSGL-1 (15). E-selectin (ELAM, CD62E) is expressed by endothelial cells after agonist stimulation and requires *de novo* synthesis (9).

The engagement of PSGL-1 with P-selectin leads to tyrosine phosphorylation, MAP kinases activation, and an increase in cytokine interleukine-1 β and interleukine-8 expression in neutrophils ; it also leads to an increase in the capacity of neutrophils to generate reactive oxygen species (16-18). Also, neutrophil cathepsin G and elastase can activate platelets via microenvironment

formation, mediated by P-selectin binding, thus protecting the enzymes from inactivation by plasma antiproteinases (19-21). In addition, platelets and neutrophil interactions enhance the transcellular metabolism and secretion of potent vasoactive substances such as thromboxane A_2 , leukotrienes and platelet activating factor (PAF) (22-24). This cross-talk between platelets and neutrophils in close contact thus provides a pathway by which they can increase their recruitment and their deleterious effects in many pathological processes. As shown previously, neutrophils and platelets influence each others adhesion at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs and increase the associated vasoconstrictive response (25-28).

The arterial response to injury following angioplasty or atherosclerosis plaque rupture, involves the exposure of the subendothelial matrix composed, in part, of collagen, fibrinogen, and the von Willebrand factor, which are potent platelet binding proteins. The arterial response therefore leads to a new set of possible interactions between flowing platelets, neutrophils and the newly-exposed damaged and thrombogenic surfaces (29-31). We have previously shown that neutrophil accumulation at the site of vascular injury is time-, shear- and platelet-dependent ; it became shear-independent, however, under thrombocytopenic conditions, thereby revealing the importance of platelet in neutrophil adhesion to damaged arterial surfaces (32). Platelet binding to neutrophils, known as « platelet satellitism » or « rosette formation », has been reported in patients with unstable angina, myocardial infarction, thrombosis, atherosclerosis, restenosis and in a variety of inflammatory processes (33-36). Furthermore, platelets have been shown to become activated following perfusion over a collagen coated surface and a growing thrombi as demonstrated by P-selectin expression, fibrinogen binding and integrin GPIIb/IIIa activation (34). Hence our hypothesis was that platelets will be activated after perfusion over damaged arterial surfaces, and will express P-selectin and interact with neutrophils to form conjugates, thus increasing their interactions. Indeed, this study was designed to investigate the influence of the endothelial surface integrity on platelet and

neutrophil activation states, platelet binding to neutrophils, and the possible mechanism of these interactions under flow conditions.

MATERIAL AND METHODS

Antibodies

All Mabs were mouse directed against human CAMs and were obtained in non conjugated form for indirect immunostaining and FITC or PE conjugated for direct immunostaining. CD62P (clone AK6), CD62L (clone FMC46), CD11b (MAC-1, clone ICRF44) were purchased from Serotec (Oxford, England). CD61 (clone Y2/S1) was obtained from DAKO (Mississauga, Ontario). PAC-1 (clone 340507), blocking Mab for CD11b/CD18 (clone Leu-15) obtained from Becton-Dickinson (San Jose, CA) and blocking Mab to CD62L (clone DREG 56) and IgG κ isotype match control were purchased from Pharmigen (Mississauga, Ontario). We obtained the blocking Mab to P-selectin (clone WASP 12.2) from Endogen (Woburn, MA) and goat anti-mouse IgG (FAB specific) FITC conjugated from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO).

Preparation of platelets

Blood, obtained from healthy volunteers (free from medication known to interfere with platelet or neutrophil functions for at least 10 days) from an antecubital vein through a 19-gauge butterfly needle, was anticoagulated with acid citrate dextrose (ACD) in a ratio of 5 parts blood to 1 part ACD. Platelets were prepared as previously described (25,26,27) Briefly, Platelet Rich Plasma (PRP) was prepared by centrifugation of whole blood at 500 X g for 15 minutes. Platelets were then obtained by centrifugation of PRP at 800 X g for 10 minutes and resuspended Hank's balanced salt solution-HEPES buffer with 0.4 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (HBSS-EDTA) pH 6.5 free from Ca²⁺ and Mg²⁺. After removal of red blood cells by a low centrifugation, the isolated platelets were resuspended in a HBSS-HEPES buffer pH 7.4 with Ca²⁺ (CaCl₂ 1.3 mM) and Mg²⁺ (MgSO₄ 0.81 mM) and adjusted to a final concentration of

250 x 10⁶/mL, using an automated cell counter (T890, Coulter, Burlington, Ontario).

Preparation of neutrophils

Neutrophil preparation was carried out as previously described (25,26,27). After PRP sampling, during the platelet preparation procedure, the lower phase was treated with an equal volume of HBSS-HEPES citrated (dihydrate sodium citrate 12.9 mM) buffer pH 7.4 without Ca²⁺ and Mg²⁺ and containing 4% dextran (MW 260kDa, Sigma Chemical Co.). After 35-40 minutes sedimentation, the leukocyte rich suspension was washed, layered over an equal volume of Ficoll-Paque gradient separation medium (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and centrifuged at 400 X g for 30 min. After hypotonic lysis of red cells the isolated neutrophils were resuspended in HBSS-HEPES with Ca²⁺ and Mg²⁺ and adjusted to a final concentration of 5 x 10⁶/mL, using an automated cell counter.

Static experiments

In the first set of experiments, the expression of P-selectin and GPIIb/IIIa on isolated platelets was assessed at baseline and after 5 min activation with thrombin (0.1 U/mL). The expression of L-selectin and MAC-1 on isolated neutrophils was also performed at baseline and after 10 min stimulation with formyl-methyl-leucine-phenylalanine (fMLP, 100 nM). The binding of platelets to neutrophil was determined in mixed cell preparations (250 x 10⁶/mL and 5 x 10⁶/mL respectively) using a dual-labeling technique with Mabs to P-selectin FITC- or PE-conjugated, and Mabs to L-selectin or MAC-1 FITC- or PE-conjugated (35,36). The binding was assessed in the presence of Fucoidan (0-300 µg/mL), soluble PSGL-1 (0-100 µg/mL) anti-P-selectin blocking Mab (0-5 µg/mL) and anti-L-selectin blocking Mab (0-40 µg/mL), for 10 min at room temperature (RT), at baseline and after thrombin or fMLP activation. The cells were then fixed with 1% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS) for 2 hours at 4°C in the dark. After being washed with PBS-0.1% sodium azide, the cells were immunolabeled with saturating concentrations of the relevant Mab or

an isotype matched control IgG for 20-30 min. at 4°C in the dark ; they were then washed again and fixed with PBS-1% paraformaldehyde for flow cytometry analyses.

Perfusion experiments

We have used four plexiglas perfusion chambers that mimic the tube-like cylindrical shape of blood vessels (32,37,38). Each chamber contains a window (2.0 mm ID) allowing direct exposure of arterial segments to isolated platelets suspensions mixed or not with neutrophils. These arterial segments were prepared from porcine aortas, which had been dissected free of surrounding tissues, cut into rings, and longitudinally opened. Arterial segments with intact endothelium were cut to fit within the perfusion flow chambers ; the actual preparation and placement were done with great care in order to avoid direct contact with the luminal surface. Damaged arterial segments were prepared by lifting and peeling off the intima, together with a thin portion of the subjacent media, and than cut to fit within the perfusion flow chambers, as previously described (25,32,37). The flow within the chambers was adjusted at 10 mL/min with a peristaltic pump. The chambers were placed in parallel (two per side) in a thermostatically controlled water bath (at 37°C), thus permitting simultaneous parallel, pairwise perfusion over arterial tissues of treated or untreated platelet and/or neutrophil suspensions. In these experiments, we exposed the arterial segments for 5 and 15 min in the flow chambers to platelets ($250 \times 10^6/\text{mL}$), neutrophils ($5 \times 10^6/\text{mL}$) or mixed platelet/neutrophil suspensions. In the mixed suspensions, the cells were pretreated or not for 10 min with fucoidan ($200 \mu\text{g}/\text{mL}$), soluble PSGL-1 ($40 \mu\text{g}/\text{mL}$) or Mab to P-selectin ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$) prior to perfusion. Samples were taken after 5 and 15 min exposure time and immediately fixed in PBS-1% paraformaldehyde and then processed for flow cytometry as described in the static experiments.

Flow cytometry

All samples were analyzed within 6 hours following samples preparation on a Coulter Epics XL Cytometer. For one-color analyses, platelet and neutrophil populations were identified and discriminated from the debris by their scatter profile. Debris were excluded from analysis by setting an appropriate scatter electronic gate or threshold. For two-color analyses, the fluorescence threshold was set to analyze only dual FITC- and PE-labeled cells, corresponding to neutrophils exhibiting platelet-CD62P-FITC fluorescence. Fluorescence data were obtained from 5000 events in each sample or a 2 minute time count.

The platelet population had been previously identified with a monoclonal antibody against CD41, CD61 and with one against the active form of the GPIIb/IIIa integrin on resting and activated platelets and neutrophil population, with antibodies directed against CD62L, and CD11b on resting and activated cells.

Data analyses

Flow cytometry results, for platelets and the platelet/neutrophil mixture, were expressed as the binding index (BI = % of positive cells X mean fluorescence intensity (MFI)) and then transformed in % of binding, as follows :

$$\% \text{ of Binding} = \frac{\text{BI of Stimulated Suspension} - \text{BI of Resting Suspension}}{\text{BI of Treated Suspension} - \text{BI of Resting Suspension}} \times 100$$

MFI was used for neutrophil samples.

Results were expressed as mean +/- SEM. Data were compared using paired t-test and, when appropriate, repeated and standard one-way-analysis of variance (ANOVA). Values of $p < .05$ were considered significant.

RESULTS

CAMs expression and platelet/neutrophil binding

The binding index of platelet P-selectin expression increased 11 fold, from 24.2 ± 3.2 at baseline to 269.0 ± 20.1 , following thrombin stimulation ($p < .001$, $n=38$). Treatment of neutrophils with thrombin, however, had no significant effect on L-selectin and MAC-1 expression. On the other hand, stimulation of neutrophils with fMLP induced L-selectin shedding (30.8 ± 1.9 at baseline to 8.0 ± 1.0 after activation, $p < .001$, $n=20$) and MAC-1 upregulation (23.6 ± 1.2 at baseline to 26.4 ± 1.3 following fMLP stimulation, $p < .01$, $n=13$). Furthermore, fMLP was ineffective in inducing any change in platelet P-selectin expression.

As shown in figure 1, the binding of platelets to neutrophils was negligible at baseline but increased significantly following thrombin stimulation of platelets. This increased binding of stimulated platelets to neutrophils could be inhibited in a concentration-dependent manner by Fucoidan (figure 2a), soluble PSGL-1 (figure 2b) and blocking anti-P-selectin Mab (figure 2C). However a blocking anti-L-selectin Mab had no significant effect on platelet binding to neutrophils (figure 2D).

CAMs expression in perfusion experiments

As shown in figure 3, perfusion of isolated platelets over damaged arterial surfaces lead to an increase in platelet P-selectin expression from 18.0 ± 3.4 at baseline, to 31.4 ± 4.7 after 5 min, to 38.1 ± 4.8 after 15 min exposure time ($p < .05$). Exposure of platelets to arterial surfaces with intact endothelium did not, however, trigger any significant change in platelet P-selectin expression.

Figure 4a shows that exposure of neutrophils to both intact and damaged arterial surfaces induced a significant shedding of L-selectin after 15 min exposure time. It also shows that MAC-1 was significantly upregulated after 15 min perfusion time only on damaged arterial surfaces (figure 4b). After 5 min perfusion, the expression levels of L-selectin and MAC-1 resembled those levels measured at baseline.

Platelet/neutrophil binding in perfusion experiments

The binding of platelets to neutrophils after 5 min and 15 min exposure time to damaged arterial surfaces is presented in figure 5. It shows that platelet/neutrophil binding increased significantly ($p < .05$) from 1.0 ± 0.0 at baseline, to 11.2 ± 2.1 after 5 min, to 18.2 ± 3.9 after 15 min. In the presence of Fucoidan ($200 \mu\text{g/mL}$), this increase in platelet/neutrophil binding in contact with damaged arterial surfaces was inhibited by 63% at 5 min and by 83% at 15 min. On the other hand, soluble PSGL-1 ($40 \mu\text{g/mL}$) and anti-P-selectin Mab ($2 \mu\text{g/mL}$) completely abolished this binding after 5 and 15 min perfusion.

DISCUSSION

In this study, we have demonstrated that platelets and neutrophils were activated in contact with damaged arterial surfaces, thus increasing their adhesive interactions, by a mechanism implicating platelet P-selectin and neutrophil PSGL-1. The effect of endothelial damage on the platelet and neutrophil state of activation and on the phenomenon of platelet binding to neutrophils under flow conditions were assessed by monitoring specific CAMs surface markers. Although previous studies have highlighted the importance of P-selectin in platelet interaction with neutrophils under static conditions (rosette assays) (39,40), studies under flow conditions are few, moreover they mainly examined rolling velocities and adhesion on surface-bound adhesion molecules, extracellular matrix components or monolayers of platelets (41-43). In the present study, we used arterial surfaces instead of coated cover slips and we geared our examination to circulating platelets binding to neutrophils under flow conditions. This focus is more physiopathologically relevant to cardiovascular diseases, where platelet binding to neutrophils has been reported in the flowing blood of patients with unstable angina, stable coronary artery disease, and previous myocardial infarction or angioplasty (33,35,36).

Our first finding was that after exposure to damaged arterial surfaces, platelets and neutrophils are activated ; this activation was manifested by a significant

increase in the expression of platelet P-selectin, the upregulation of neutrophil MAC-1, and the shedding of L-selectin. However, L-selectin shedding occurred on both intact and damaged arterial surfaces after 15 minutes of exposure. This suggests that the rolling motion of neutrophils, which is mediated in part by L-selectin, can occur over intact and damaged arterial surfaces. Although, it is not surprising to find that the intact endothelium supports rolling, because it expresses sialylated and fucosylated carbohydrate moieties which are L-selectin ligands (9). So far, no L-selectin ligands have been discovered in the extracellular matrix. It may be, therefore, that the rolling of neutrophils on damaged arterial surfaces can proceed via other receptors, or simply by interaction with PSGL-1 on the surface of adherent neutrophils (called secondary tethering) (44). These results confirm the thromboresistant properties of the intact endothelium, properties attributed to the secretion of prostacyclin and nitric oxide (27) and the sequestration of the adhesive glycoprotein ligands in the subendothelium, thus preventing platelet activation in the absence of vascular damage. However, contact with injured arterial surfaces, which were prepared by the removal of the intima and exposure of the tunica media –this last is relevant to many clinical situations after atherosclerotic plaque rupture or balloon angioplasty- which uncovers adhesive proteins and inflammatory mediators. These in turn participate in platelet and neutrophil activation and contribute significantly to thrombus growth at the site of injury (25,27,28).

Since platelet and neutrophil activation and platelet binding to neutrophils have been reported in many cardiovascular diseases, we decided to investigate the capacity of damaged arterial surfaces to induce such platelet/neutrophil interactions. We found that exposure of platelet and neutrophil mixtures to damaged arterial surfaces induced an increase in platelet binding to neutrophils after 5 and 15 min exposure time. This binding cannot be attributed to neutrophil activation. It is rather due to platelet activation, as demonstrated by enhanced P-selectin expression after 5 min exposure to damaged arterial surfaces ; neutrophil L-selectin and MAC-1 level of expression, on the other hand, remained unchanged. In addition, this increased binding was inhibited by Fucoidan, which

can interact with L- and P-selectin. The involvement of L-selectin in this interaction was ruled out since a blocking Mab to L-selectin had no significant effect on platelet binding to neutrophils, whereas a blocking Mab to P-selectin abolished this binding. Thus we confirmed the implication of P-selectin in these interactions.

The selectin family of CAMs is characterized by adhesive interactions that involve fucosylated and sialylated oligosaccharides, such as the Sialyl Lewis^x and PSGL-1, as counter receptors. But PSGL-1 is the only high affinity ligand for P-selectin on the surface of intact leukocytes (13). Indeed, the binding of platelets to neutrophils following perfusion over damaged arterial surfaces was abolished by a soluble form of PSGL-1, highlighting the importance of PSGL-1 in mediating neutrophil adhesion to platelet P-selectin under dynamic flow conditions.

Many studies have reported the implication of other mechanisms in platelet binding to neutrophils. These mechanisms include (1) fibrinogen bridging via platelet GPIIb/IIIa and neutrophil MAC-1 (45,46), (2) thrombospondin bridging via GPIa/IIa or GPIIb/IIIa or GPIV on platelets and a specific receptor on neutrophils that is present at the cell surface of resting neutrophils and, upon neutrophil activation, is translocated to the cell surface from an internal pool of these receptors (47,48), (3) platelet ICAM-2 binding to neutrophil LFA-1 (CD11a/CD18) (49). An other possible mechanism could involve (4) platelet Fc γ RII (CD32) and neutrophil Fc γ RIIIb (CD16) receptor via bridging IgG-containing immune complexes (50). Most of those studies, however, have been carried out under static or stirring conditions, without any shear rate applied to the bonds established between platelets and neutrophils. Since the shear rate can modulate platelet and neutrophil adhesion and aggregation, it is more appropriate to study platelet/neutrophil interactions under defined flow condition (51,52).

The importance of platelets in neutrophil adhesion to damaged arterial surfaces has been documented in many experimental studies. Investigations have reported on the involvement of P-selectin in these interactions both in *in vitro*

vessel wall injury models (41-42) and *in vivo* thrombosis and angioplasty models (54). In fact, platelets and neutrophils interact with each other not only at the site of arterial injury, but also in the circulation of patients with arterial disease and possible vascular damage (33,35,36). These adhesive interactions may contribute to each other's activation and to the secretion of potent vasoactive substances that may enhance the arterial response to injury.

Our study provides strong evidence of platelet and neutrophil activation in contact with damaged arterial surfaces ; such surfaces increase their interactions by a mechanism involving platelet P-selectin and neutrophil PSGL-1. Since soluble PSGL-1 treatment has proved successful in reducing liver and kidney graft rejection and ischemia/reperfusion injury (55,56), the blockade of P-selectin or its major ligand PSGL-1 may be a target in the treatment of many inflammatory reactions and thrombotic events.

BIBLIOGRAPHY

- 1- Marcus, A.J., Thrombosis and inflammation as multicellular processes : Pathophysiologic significance of transcellular metabolism, *Blood*, 1990, vol 76, 1903-1907.
- 2- Faint, R.W., Platelet-Neutrophil interactions : their significance, *Blood Reviews*, 1992, vol 6, 83-91.
- 3- Nash, G.B., Adhesion between neutrophils and platelets : a modulator of thrombotic and inflammatory events?, *Thromb. Res.*, 1994, vol 74, suppl 1, S3-S11.
- 4- Springer, T.A., Adhesion receptors of the immune system, *Nature*, 1990, vol 346, 425-433.
- 5- Jang, Y., Lincoff, A.M., Plow, E.F., Topol, E.J., Cell adhesion molecule in coronary artery disease, *JACC*, 1994, vol 24, 1591-1601.
- 6- Frenette, P.S., Wagner, D.D., Molecular medicine : adhesion molecules, *New Eng. J. Med.*, 1996, vol 334, 1526-1529.
- 7- McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L., Bainton, D.F., GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and localized in Weibel-Palade bodies, *JCI*, 1989, vol 84, 92-99.
- 8- Bevilacqua, M.P., Nelson, R.M., Selectins, *JCI*, 1993, vol 91, 379-387.
- 9- Kansas, G.S., Selectins and their ligands : current concept and controversies, *Blood*, 1996, vol 88, 3259-3287.
- 10- Moore, K.L., Stults, N.L., Diaz, S., Smith, D.F., Cummings, R.D., Varki, A., McEver, R.P., Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells, *J. Cell Biol.*, 1992, vol 118, 445-456.
- 11- Sako, D., Chang, X.-J., Barone, K.M., Vachino, G., White, H.M., Shaw, G., Veldman, G.M., Furie, B., Cumming, D.A., Larsen, G.R., Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin, *Cell*, 1993, vol 75, 1179-1186.
- 12- Norman, K.E., Moore, K.L., McEver, R.P., Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1, *Blood*, 1995, vol 86, 4417-4421.

- 13- Moore, K.L., Patel, K.D., Bruehl, R.E., Fugang, L., Johnson, D.A., Lichenstein, H.S., Cummings, R.D., Bainton, D.F., McEver, R.P., P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin, *J. Cell Biol.*, 1995, vol 128, 661-671.
- 14- McEver, R.P., Cummings, R.D., Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment, *JCI.*, 1997, vol 100, suppl, S97-S103.
- 15- Walcheck, B., Moore, K.L., McEver, R.P., Kishimoto, T.K., Neutrophil-Neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation on P-selectin in vitro, *JCI.*, 1996, vol 98, 1081-1087.
- 16- Hidari, K.L.-P.J., Wayrich, A.S., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils, *JBC.*, 1997, vol 272, 28750-28756.
- 17- Neumann, F.-J., Mars, N., Gawaz, M., Brand, K., Ott, I., Rokitta, C., Sticherling, C., Meinel, C., May, A., Schömig, A., Induction of cytokine in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets, *Circulation*, 1997, vol 95, 2387-2394.
- 18- Lösche, W., Redlich, H., Krause, S., Bergmann, I., Spangenberg, P., Platelets activate neutrophils via cell-cell contact, *Ann. Hematol.*, 1992, vol 64, A14.
- 19- Cerletti, C., Evangelista, V., Molino, M., de Gaetano, G., Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes : role of Cathepsin G and P-selectin, *Thrombosis and Haemostasis*, 1995, vol 74, 218-223.
- 20- Evangelista, V., Piccardoni, P., White, J.G., de Gaetano, G., Cerletti, C., Cathepsin G-dependent platelet stimulation by activated polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by antiproteinases : role of P-selectin mediated cell-cell adhesion, *Blood*, 1993, vol 81, 2947-2957.
- 21- Si-Tahar, M., Pidard, D., Balloy, V., Moniatte, M., Kieffer, N., Van Dorsselaer, A., Chignard, M., Human neutrophil elastase proteolytically activates platelet

integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ through cleavage of the carboxyl terminus of the α_{IIb} subunit heavy chain, *JBC.*, 1997, vol 272, 11636-11647.

22- Maugeri, N., Evangelista, V., Piccardoni, P., Dell'Elba, G., Celardo, A., De Gaetano, G., Cerletti, C., Transcellular metabolism of arachidonic acid. Increased platelet thromboxane generation in the presence of activated polymorphonuclear leukocytes, *Blood*, 1992, vol 80, 447-451.

23- Marcus, A.J., Broekman, M.J., Safier, L.B., Ulman, H.L., Islam, H., Function of leukotrienes and hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, vol 109, 130-136.

24- Coëffer, E., Delautier, D., Le Couderc, J.P., Chignard, M., Danizot, Y., Benveniste, J., Cooperation between platelets and neutrophils for PAF-acether formation, *J. Leukoc. Biol.*, 1990, vol 47, 234-243.

25- Merhi, Y., Provost, P., Guidoin, R., Latour, J.G., Importance of platelets in neutrophil adhesion and vasoconstriction following arterial injury by angioplasty in pigs, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1997, vol 17, 1185-1191.

26- Merhi, Y., Lacoste, L., Lam, J.Y.T., Neutrophil implications in platelet deposition and vasoconstriction after deep arterial injury by angioplasty in pigs, *Circulation*, 1994, vol 90, 997-1002.

27- Provost, P., Tremblay, J., Merhi, Y., The antiadhesive and antithrombotic effects of the nitric oxide donor SIN-1 are combined with a decreased vasoconstriction in a porcine model of balloon angioplasty, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1997, vol 17, 1806-1812.

28- Provost, P., Borgeat, P., Merhi, Y., Platelets, neutrophils and vasoconstriction after arterial injury by angioplasty in pigs : effects of MK-886, a leukotriene biosynthesis inhibitor, *Br. J. Pharmacol.*, 1998, vol 123, 251-258.

29- Rand, J.H., Glanville, R.W., Wu, X.-X., Ross, J.M., Zangari, M., Gordon, R.E., Schwartz, E., Potter, B.J., The significance of subendothelial von Willebrand factor, *Thrombosis and Haemostasis*, 1997, vol 78, 445-450.

30- Edenburg, S.C., Hantgan, R.R., Lindeboom-Blokzijl, L., Lankhof, H., Jerome, W.G., Lewis, J.C., Sixma, J.J., de Groot, P.G., On the role of von Willebrand

factor in promoting platelet adhesion to fibrin in flowing blood, *Blood*, 1995, vol 86, 4158-4165.

31- Savage, B., Saldivar, E., Ruggeri, Z.M., Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor, *Cell*, 1996, vol 84, 289-297.

32- Merhi, Y., Lam, J.Y.T., Lacoste, L.L., Latour, J.-G., Guidoin, R., Waters, D., Effects of thrombocytopenia and shear rate on neutrophil and platelet deposition on endothelial and medial arterial surfaces, *Arterioscler. Thromb.*, 1993, vol 13, 951-957.

33- Mickelson, J.K., Lakkis, N.M., Villarreal-Levy, G., Hughes, B.J., Smith, C.W., Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease?, *JACC.*, 1996, vol 28, 345-353.

34- Hagberg, I.A., Roald, H.E., Lyberg, T., Platelet activation in flowing blood passing growing arterial thrombi, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1997, vol 17, 1331-1336.

35- Ott, I., Neumann, F.-J., Gawaz, M., Schmitt, M., Schömig, A., Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina., *Circulation*, 1996, vol 94, 1239-1246.

36- Furman, M.I., Benoit, S.E., Barnard, M.R., Valeri, C.R., Borbone, M.L., Becker, R.C., Hechtman, H.B., Michelson, A.D., Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease, *JACC.*, 1998, vol 31, 352-358.

37- Provost, P., Merhi, Y., Endothelium-derived nitric oxide decreases polymorphonuclear leukocyte interaction with the deeply injured arterial wall under intermediates and high shear conditions, *Thromb. Haemost.*, 1997, vol 78, 939-946.

38- Badimon, L., Turitto, V., Rosemark, J.A., Badimon, J.J., Fuster, V., Characterization of a tubular flow chamber for studying platelet interaction with biologic and prosthetic materials: deposition of Indium¹¹¹-labeled platelets on collagen, subendothelium, and expanded polytetrafluoroethylene, *J. Lab. Clin. Med.*, 1987, vol 110, 706-718.

- 39- Jungi, T.W., Spycher, M.O., Nydegger, U.E., Baradun, S., Platelet-Leukocyte interaction: selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related cell lines, *Blood*, 1986, vol 67, 629-636.
- 40- Hamburger, S.A., McEver, R.P., GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils, *Blood*, 1990, vol 75, 550-554.
- 41- Yeo, E.L., Sheppard, J.-A.I., Feuerstein, I.A., Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model), *Blood*, 1994, vol 83, 2498-2507.
- 42- Kuijper, P.H.M., Torres, H.I.G., Lammers, J.-W.J., Sixma, J.J., Koenderman, L., Zwaginga, J.J., Platelet and fibrin deposition at the damaged vessel wall: cooperative substrates for neutrophil adhesion under flow conditions, *Blood*, 1997, vol 89, 166-175.
- 43- Kirchlofer, D., Riederer, M.A., Baumgartner, H.R., Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model, *Blod*, 1997, vol 89, 1270-1278.
- 44- Kunkel, E.J., Chomas, J.E., Ley, K., Role of primary and secondary capture for leukocyte accumulation in vivo, *Circ. Res.*, 1998, vol 82, 30-38.
- 45- Spangenberg, P., Redlich, H., Bergmann, I., Lösche, W., Götzrath, M., Kehrel, B., The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes, *Thrombosis and Haemostasis*, 1993, vol 70, 514-521.
- 46- Spangenberg, P., Adhesion of activated platelets to polymorphonuclear leukocytes, *Thrombosis Res.*, 1994, vol 74 suppl 1, S-35-S44.
- 47- Silverstein, R.L., Asch, A.S., Nachman, R.L., Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion, *JCI*, 1989, vol 84, 546-552.
- 48- Suchard, S.J., Boxer, L.A., Dixit, V.M., Activation of human neutrophils increases thrombospondin receptor expression, *J. Immunol.*, 1991, vol 147, 651-659.

- 49-Diacovo, T.G., deFougerolles, A.R., Bainton, D.F., Springer, T.A., A functional integrin ligand on the surface of platelets : intercellular adhesion molecule-2, *JCI*, 1994, vol 94, 1243-1251.
- 50- Bizzaro, N., Goldschmeding, R., von dem Borne, A.E.G.K., Platelet satellitism is Fc γ RIII (CD16) receptor-mediated, *Am. J. Clin. Pathol.*, 1995, vol 103, 740-744.
- 51- Lawrence, M.B., Kansas, G.S., Kunkel, E.J., Ley, K., Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E), *J. Cell Biol.*, 1997, vol 136, 717-727.
- 52- Goto, S., Ikeda, Y., Saldivar, E., Ruggeri, Z.M., Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions, *JCI*, 1998, vol 101, 479-486.
- 53- Palabrica, T., Lobb, R., Furie, B.C., Aronovitz, M., Benjamin, C., Hsu, Y-M., Sajer, S.A., Furie, B., Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets, *Nature*, 1992, vol 359, 848-851.
- 54- Merhi, Y., Provost, P., Chauvet, P., Théorêt, J-F., Phillips, M.L., Latour, J.G., Selectin blockade reduces neutrophil interaction with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, in press.
- 55- Dulkanchainun, T.S., Goss, J.A., Imagawa, D.K., Shaw, G.D., Anselmo, D.M., Kalds, F., Wang, T., Zhao, D., Busuttil, A.A., Kato, H., Murray, N.G.B., Kupiec-Weglinski, J.W., Busuttil, R.W., Reduction of hepatic ischemia/reperfusion injury by a soluble P-selectin glycoprotein ligand-1, *Ann. Surg.*, 1998, vol 227, 832-840.
- 56- Takada, M., Nadeau, K.C., Shaw, G.D., Marquette, K.A., Tilney, N.L., The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand, *JCI*, 1997, vol 99, 2682-2690.

Figure 1 : Platelet binding to neutrophils under static conditions, as determined by dual-immunolabeling (platelets with Mab to P-selectin-FITC and neutrophils with Mab to L-selectin-PE) of platelet ($250 \times 10^6/\text{mL}$)/neutrophil ($5 \times 10^6/\text{mL}$) suspensions challenged with thrombin 0.1mL for 5 min. Zone E2 reflects neutrophils stained positive for L-selectin and P-selectin, as the mean fluorescence intensity (MFI) surpasses the threshold set for non-specific interactions, we observe positive platelet binding to neutrophils. The platelet binding to neutrophils increased from 1.0 ± 0.0 at baseline, to 69.4 ± 15.9 after thrombin platelet activation ($***p < .001$, $n=21$), is clearly seen when observing zone E2 darkening (left to right).

Figure 2 : Stimulated platelet binding to neutrophils in the presence of increasing concentrations of A) Fucoidan (0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $n=6$), B) soluble PSGL-1 (0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $n=3$), C) anti-P-selectin Mab (0-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $n=6$) and D) anti-L-selectin Mab (0-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $n=5$) effect on platelet binding to neutrophil under static conditions ($*p < .05$ vs 0, $+p < .05$ vs 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $^{\circ}p < .05$ vs 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and $\bullet p < .05$ vs 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Figure 3 : Platelet P-selectin expression following exposure of platelets to intact (dotted bars, $n=12$) and damaged (waved bars, $n=17$) arterial surfaces for 5 and 15 min ($*p < .05$ vs baseline and $+p < .05$ vs intact surfaces at 15 min).

Figure 4 : Neutrophil L-selectin (A) and MAC-1 (B) expression following exposure to intact (dotted bars, $n=15$) and damaged (waved bars, $n=15$) arterial surfaces for 5 and 15 min ($*p < .05$, $**p < .01$ vs baseline and $+p < .05$ vs intact surfaces at 15 min).

Figure 5 : Platelet binding to neutrophils under flow conditions following exposure of mixed cell suspension to damaged arterial surfaces (control, waved bars, $n=13$) and in the presence of the following selectin interacting agents : Fucoidan (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, checkered bars, $n=6$), soluble PSGL-1 (40 mg/mL , brick

bars, n=3), or anti-P-selectin Mab (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dotted bars, n=4) (*p<.05 vs baseline, +p<.05 vs control, °p<.05 vs control 5 min).

FIGURE 1

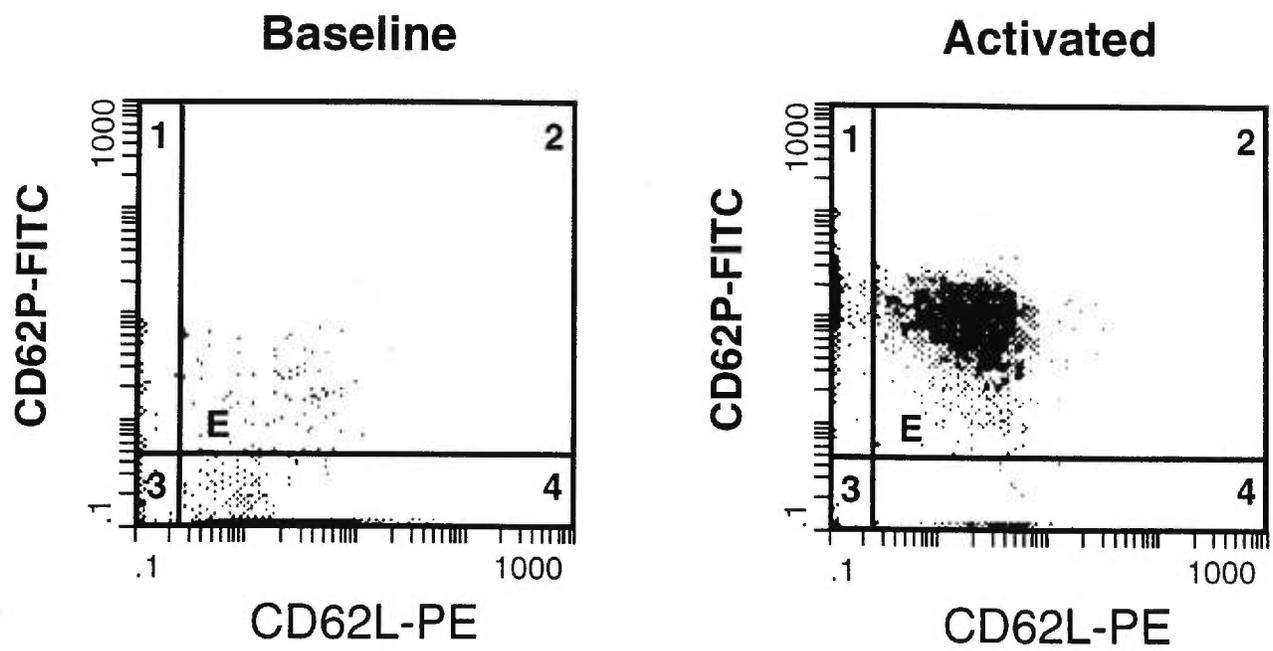


FIGURE 2

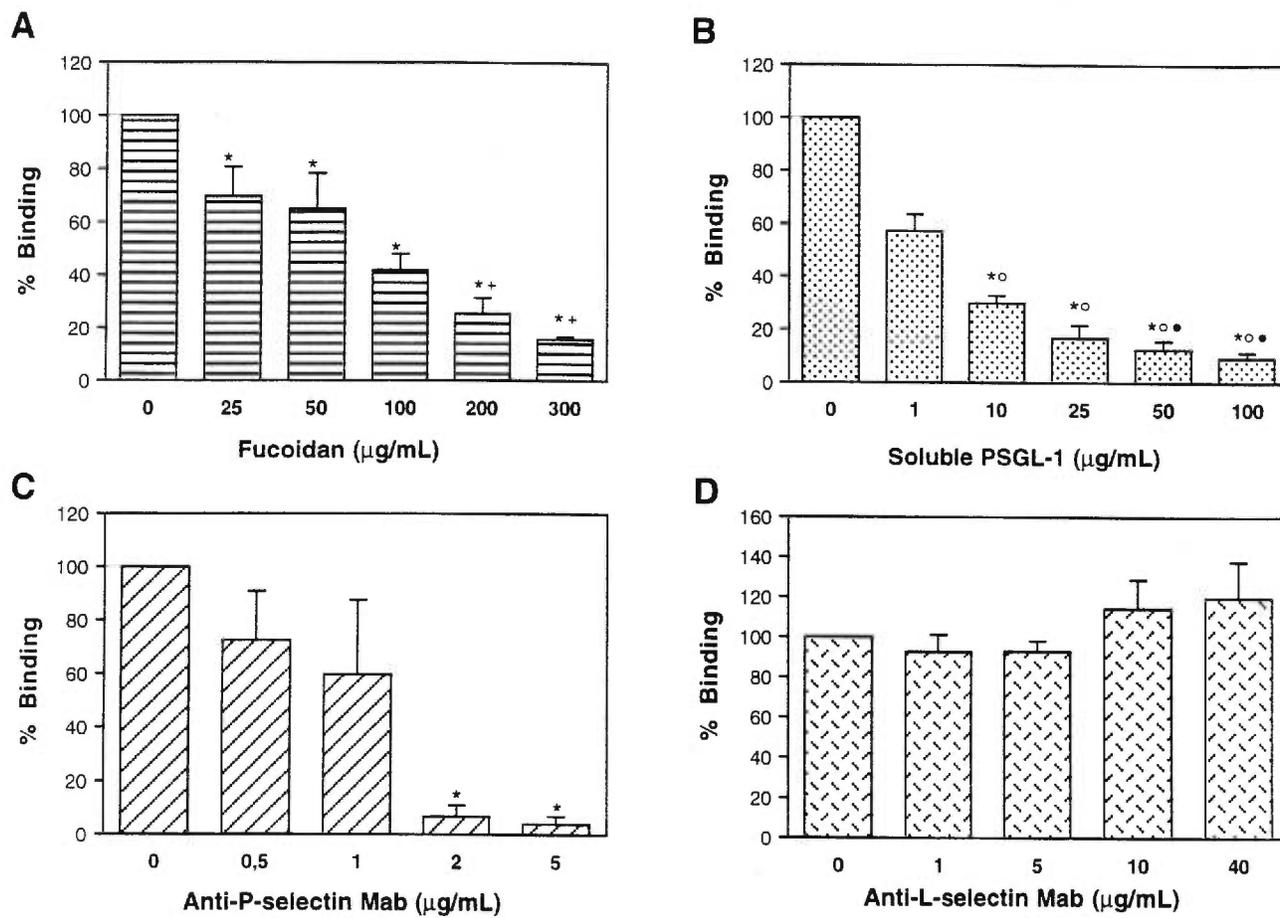


FIGURE 3

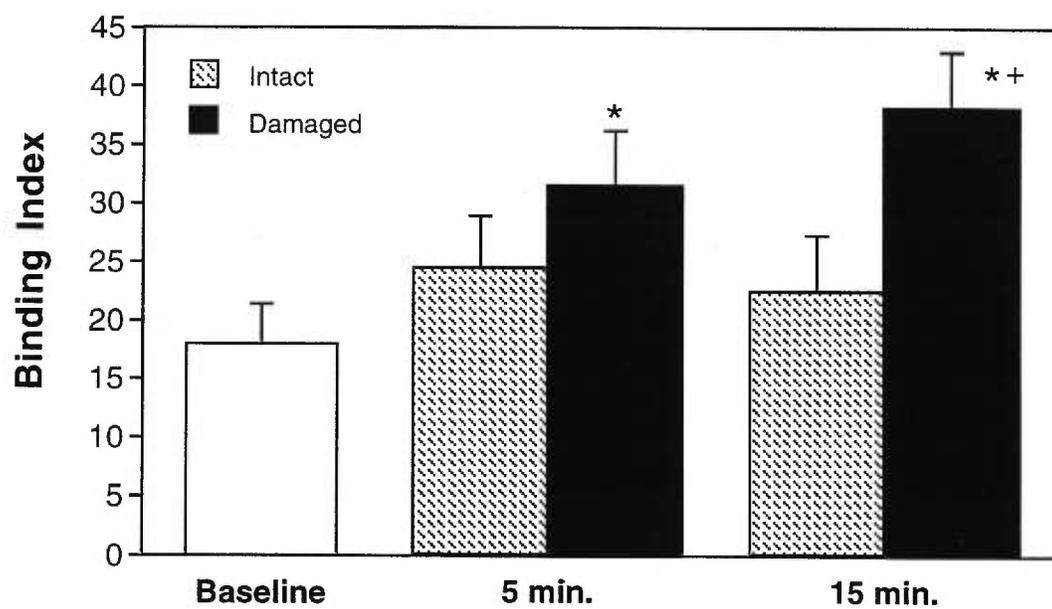


FIGURE 4

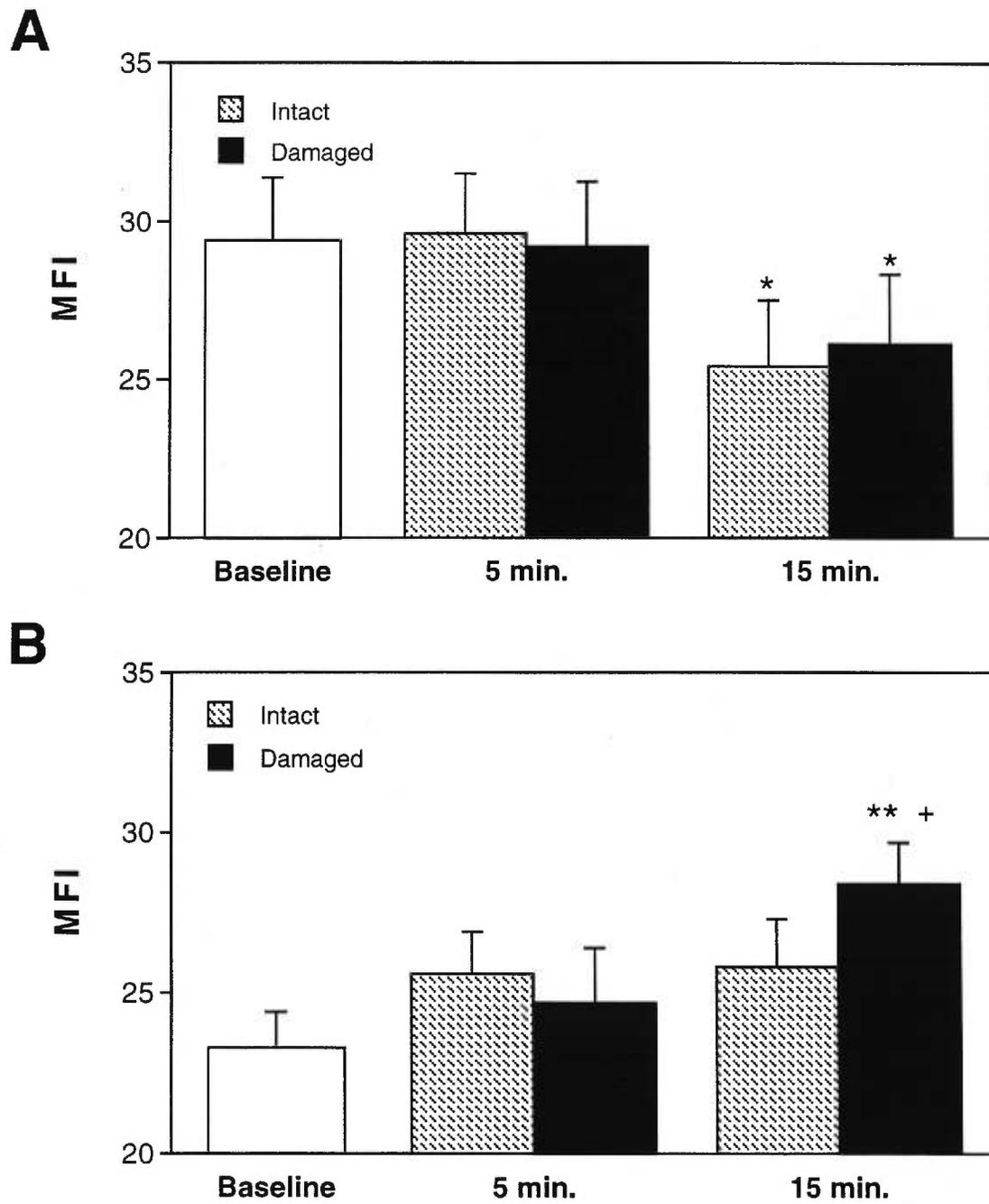
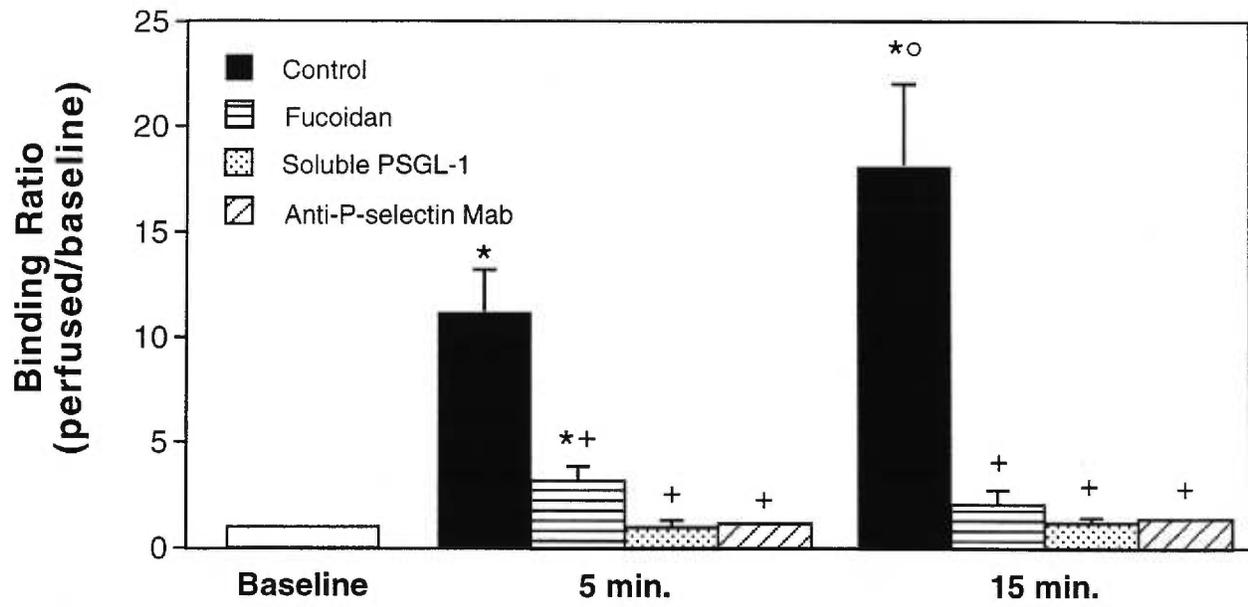


FIGURE 5



Discussion

DISCUSSION

Lors de la présente étude, nous avons démontré que les plaquettes et les neutrophiles s'activent en contact avec des surfaces artérielles endommagées, augmentant ainsi leurs interactions adhésives hétérotypiques par un mécanisme impliquant la P-sélectine plaquettaire et son récepteur, le PSGL-1, à la surface des neutrophiles. L'incidence de l'endommagement artériel sur l'état d'activation des plaquettes et des neutrophiles et sur la liaison des plaquettes aux neutrophiles sous conditions de flot furent évaluées par une technique de cytométrie de flux en explorant les molécules d'adhésion spécifiques aux deux populations cellulaires en tant que marqueurs de surface. Des études antérieures ont souligné l'importance de la P-sélectine dans les interactions des plaquettes avec les neutrophiles sous conditions statiques (391,394). Cependant, peu d'études sous conditions hydrodynamiques furent effectuées, ne s'intéressant qu'aux vitesses de roulement et à l'adhésion cellulaire sur des surfaces recouvertes de molécules d'adhésion, de composantes de la matrice extracellulaire ou de monochouches de plaquettes immobilisées (55,286,483). Lors de cette étude, nous avons utilisé des surfaces artérielles porcines plutôt que de lames recouvertes de différentes protéines et nous avons concentré nos efforts sur l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles en conditions hydrodynamiques, plus représentatives des conditions physiologiques. Notre méthodologie est basée sur des observations récentes démontrant que la liaison des plaquettes aux neutrophiles augmente dans le sang de patients atteints d'angine instable, de maladies coronaires stables et suivant un infarctus du myocarde et angioplastie (57,320,321).

Les premiers résultats de cette étude ont démontré qu'après exposition à des surfaces artérielles endommagées, les plaquettes et les neutrophiles s'activaient, comme l'a démontré une augmentation significative de l'expression de la P-sélectine plaquettaire (voir figure #3) et une augmentation de la teneur membranaire en CD11b/CD18 couplée à une diminution ou « shedding » de la

L-sélectine (voir figure #4). Ces figures montrent que l'indice de liaison (% de cellules exprimant le marqueur de surface X intensité de fluorescence moyenne due au marqueur) varie en fonction du temps ; pour la P-sélectine, l'indice de liaison augmente significativement en fonction du temps d'exposition aux surfaces artérielles endommagées (en noir), sans changement significatif sur surfaces artérielles intactes (en pointillé). De plus, cette augmentation est dépendante du temps d'exposition, car l'expression de la P-sélectine est significativement différente entre 5 et 15 minutes d'exposition aux surfaces artérielles endommagées.

En ce qui à trait aux neutrophiles, l'intensité moyenne de fluorescence décroît significativement pour la L-sélectine peu importe la surface à laquelle les neutrophiles sont exposés, tandis que seule une exposition de 15 minutes aux surfaces artérielles endommagées entraînent une augmentation de la teneur membranaire en MAC-1. Cependant, le retrait membranaire de la L-sélectine fut observé sur surface artérielle intacte tout comme sur surface artérielle endommagée suivant 15 minutes de perfusion. Ceci suggère que le roulement des neutrophiles, qui est médié par la L-sélectine, peut avoir cours sur des surfaces artérielles intactes ou endommagées. Il est bien connu que l'endothelium intact supporte le roulement des neutrophiles par l'intermédiaire de ses oligosaccharides sialylés et fucosylés de surface, qui peuvent être reconnus par la L-sélectine et servir de ligands (131), Par contre, aucun ligand pour la L-sélectine n'a été découvert au niveau de la matrice sous endothéliale. Ceci suggère que le roulement des neutrophiles sur surfaces artérielles endommagées se produit par l'intermédiaire d'un autre mécanisme mettant à contribution d'autres récepteurs ou par des interactions entre la L-sélectine des neutrophiles circulants et le PSGL-1 des neutrophiles ayant déjà adhérents à la surface endommagée ; phénomène appelé second recaptage ou « secondary tethering » (212).

Nos résultats confirment les propriétés thromborésistantes de l'endothélium intact qui lui sont attribuées par la production et sécrétion de prostacycline et

d'oxyde nitrique (60) et la ségrégation dans la matrice sous-endothéliale des divers ligands des glycoprotéines de surface des plaquettes et des neutrophiles (β_2 - et β_3 -intégrines), empêchant ainsi l'activation plaquettaire en absence de dommage vasculaire. Par contre, les plaquettes s'activent en contact avec des surfaces artérielles endommagées, qui furent préparée par le retrait de l'intima et l'exposition de la tunica media qui est caractéristique à plusieurs situations pathologiques comme le détachement d'une plaque athérosclérotique ou après angioplastie. La dénudation de la surface artérielle expose certains médiateurs de la réponse inflammatoire expliquant donc l'activation plaquettaire enregistrée et la potentialisation de la formation de thrombus aux sites vasculaires endommagés (3,484,485).

En se basant sur l'activation plaquettaire et celle des neutrophiles, de même que la liaison des plaquettes aux neutrophiles observées lors de plusieurs atteintes cardiovasculaires, nous avons voulu évaluer la capacité de surfaces artérielles endommagées à induire de telles activations et interactions. Sous conditions statiques (voir figure #1), les plaquettes lient très faiblement les neutrophiles (résultats exprimés en rapport de liaison : indice de liaison des cellules traitées, activées ou perfusées / indice de liaison des cellules à l'état basal), comme le démontre le nombre peu élevé d'événements dans la zone E2 (zone de double fluorescence où seuls les événements montrant un marquage pour la P-sélectine et la L-sélectine sont considérés comme positifs pour la liaison de plaquettes aux neutrophiles). Cependant, lorsque la thrombine est ajoutée à la suspension de plaquettes et de neutrophiles, on constate facilement une forte augmentation de la liaison des plaquettes aux neutrophiles (ie : noircissement de la zone E2). Sous conditions de flot (voir figure #5), nos résultats démontrent que la perfusion de suspensions mixtes de plaquettes et de neutrophiles sur des surfaces artérielles endommagées entraînent la formation de liaisons entre les plaquettes et les neutrophiles (en noir), après 5 et 15 minutes de perfusion et que ces interactions augmentent significativement avec la durée d'exposition aux surfaces artérielles endommagées. Cette interaction

adhésive entre les plaquettes et les neutrophiles ne semble pas dépendre de l'activation des neutrophiles, mais plutôt de celle des plaquettes, car après 5 minutes de perfusion, seule la P-sélectine plaquettaire est exprimée, tandis que les niveaux membranaires en L-sélectine et en CD11b/CD18 au niveau des neutrophiles restent inchangés et similaires aux valeurs avant perfusion. De plus, cette propension des plaquettes activées à lier les neutrophiles fut inhibée par la fucoidine (voir figure #5), un agent pouvant interagir avec la L- et la P-sélectine (la concentration (IC_{80}) fut déterminée pour tous les traitements au cours d'essais *in vitro* (voir figure #2)). L'implication de la L-sélectine dans cette interaction adhésive fut réfutée, car l'utilisation d'un anticorps monoclonal bloquant la fonction de la L-sélectine n'a pu prévenir l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles et qu'un anticorps bloquant la fonction de la P-sélectine inhiba complètement ces liaisons plaquettes/neutrophiles ; confirmant ainsi la participation de la P-sélectine au niveau de la liaison des plaquettes aux neutrophiles.

La famille des sélectines se caractérise par des interactions adhésives impliquant des oligosaccharides sialylés et fucosylés en tant que ligands comme le sLe^x et le PSGL-1. Ce dernier est le seul ligand de haute affinité identifié à la surface des neutrophiles (170). En effet, l'augmentation de la liaison des plaquettes aux neutrophiles observée, après exposition à des surfaces artérielles endommagées, fut entièrement inhibée par une forme soluble du PSGL-1 ; soulevant ici l'importance du PSGL-1 dans le phénomène de la liaison des plaquettes aux neutrophiles par l'intermédiaire de la P-sélectine sous conditions de flot (voir figure #5).

La liaison de la P-sélectine plaquettaire au PSGL-1 des neutrophiles n'est pas la seule possibilité d'interactions adhésives entre ces deux populations cellulaires. En effet, plusieurs études ont mis en évidence la participation d'autres molécules d'adhésion : 1) un pont par le fibrinogène entre la GPIIb/IIIa des plaquettes et le CD11b/CD18 des neutrophiles (289,404), 2) un pont formé

par la thrombospondine liant des GPIa/IIa ou GPIIb/IIIa ou GPIV à la surface des plaquettes et un récepteur spécifique présent au niveau des neutrophiles et surexprimé suivant activation cellulaire à partir de réserves intracellulaires (424,435), 3) la liaison de l'ICAM-2 des plaquettes avec le CD11a/CD18 (LFA-1) des neutrophiles (263) et 4) l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles peut dépendre des récepteurs plaquettaires Fc γ RII (CD32) et Fc γ RIIIb (CD16) des neutrophiles qui reconnaissent des complexes immunitaires composées d'IgG (486). Cependant, toutes ces études furent effectuées sous conditions statiques ou d'agitation, sans aucune forces de cisaillements appliquées aux liens entre les plaquettes et les neutrophiles. Sachant que les forces de cisaillements peuvent moduler l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles, l'importance de ces mécanismes sous conditions de flot reste à déterminer et il est par conséquent plus approprié d'étudier les interactions plaquettes/neutrophiles sous conditions de flot (202,487).

L'importance des plaquettes dans l'adhésion des neutrophiles aux surfaces artérielles endommagées a été rapportée par diverses études expérimentales et l'implication de la P-sélectine dans ces interactions fut démontrée dans des modèles d'endommagement vasculaire *in vitro* (286,483) et *in vivo* dans des modèles de thrombose et d'angioplastie (412). Il ne faut cependant pas oublier que les plaquettes et les neutrophiles n'interagissent pas seulement au site de lésion vasculaire, mais aussi dans la circulation systémique de patients avec diverses maladies cardiovasculaires susceptibles de refléter un endommagement vasculaire (57,320,321). Ces interactions adhésives pourraient créer une synergie contribuant à potentialiser leur niveau d'activation cellulaire et augmenter leur capacité à sécréter des substances vasoactives, modulant et aggravant ainsi la réponse physiologique à un endommagement vasculaire.

En conclusion, notre étude démontre que l'exposition de plaquettes et de neutrophiles à des surfaces artérielles endommagées entraîne l'activation cellulaire et augmente leurs interactions adhésives par un mécanisme impliquant la

P-sélectine plaquettaire et le PSGL-1 des neutrophiles. D'ailleurs, des études montrèrent que le traitement au PSGL-1 soluble, réduisait les risques de rejets de greffes de foie et de rein de même que les dommages associés à l'ischémie/reperfusion chez des animaux (481,482). L'inhibition de la liaison de la P-selectine avec le PSGL-1 serait donc une cible thérapeutique intéressante dans les réactions inflammatoires et les événements thrombotiques.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

1- Baumgartner, H.R., Muggli, R., in Platelets in biology and pathology, 1976, éditeur Gordon, J.L., Elsevier Science Publishers, p. 23-60.

2- Jaffe, E.A., in Hematology, 1990, 4^e édition, éditeurs Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J., and Lichtman, M.A., McGraw-Hill, p. 1322-1337.

3- Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J.J., Chesebro, J.H., The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1), 1992, New Eng. J. Med., vol 326, p. 242-250.

4- Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J.J., Chesebro, J.H., The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2), 1992, New Eng. J. Med., vol 326, p. 310-318.

5- Furie, B., Furie, B.C., Leukocyte crosstalk at the vascular wall, 1997, Thrombosis and Haemostasis, vol 78, p. 306-309.

6- Kubes P., Granger, D.N., Leukocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells, 1996, Cardiovasc. Res., vol 32 p. 699-708.

7- Weiss, S.J., Tissue destruction by neutrophils, 1989, New Eng. J. Med., vol 320, p. 365-376.

8- Maroko, P.R., Kjekshus, J.K., Soble, B.E., Watanabe, T., Covell, J.W., Ross, J.Jr., Braunwald, E., Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions, 1976, Circulation, vol 43, p. 67-82.

9- Maroko, P.R., Braunwald, E., Modification of myocardial infarction size after coronary occlusion, 1973, Ann. Intern. Med., vol 79, p. 720-733.

10- Gillepsie, T., Sobel, B., A rationale for therapy of acute myocardial infarction. Limitation of infarct size, 1977, Adv. Intern. Med., vol 22, p. 319-353.

- 11- Hearse, D.J., Humphrey, S.M., Nayler, W.G., Slade, A., Border, D., Ultrastructural damage associated with reoxygenation of the anoxic myocardium, 1975, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol 7, p. 315-324.
- 12- Hearse, D.J., Reperfusion of the ischemic myocardium, 1977, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol 9, p. 605-616.
- 13- Engler, R.L., Dahlgren, M.D., Morris, D.D., Peterson, M.A., Schmid-Schonbein, G.W., Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs, 1986, *Am. J. Physiol.*, vol 251, p. H314-H323.
- 14- Hearse, D.J., Bolli, R., Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance, 1992, *Cardiovasc. Res.*, vol 26, p. 101-108.
- 15- Jolly, S.R., Kane, W.J., Bailie, M.B., Abrams, G.D., Lucchesi, B.R., Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase, 1984, *Circ. Res.*, vol 54, p. 277-285.
- 16- Romson, J.L., Hook, B.G., Kunkel, S.L., Abrams, G.D., Schork, M.A., Lucchesi, B.R., Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog, 1983, *Circulation*, vol 67, p. 1016-1023.
- 17- Bednar, M., Smith, B., Pinto, A., Mullane, K.M., Nafazatrom-induced salvage of ischemic myocardium in anesthetized dogs is mediated through inhibition of neutrophil function, 1985, *Circ. Res.*, vol 57, p. 131-141.
- 18- De Lorgeril, M., Basmadjan, A., Lavallée, M., Clément, R., Milette, D., Rousseau, G., Latour, J.G., Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation and infarct size in dogs, 1989, *Am. Heart J.*, vol 117, p. 523-532.

- 19- De Lorgeril, M., Rousseau, G., Basmadjian, A., St-Jean, G., Tran, D., Latour, J.G., Spatial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium, 1990, *Am. J. Cardiovasc. Pathol.*, vol 3, p.143-154.
- 20- Roos, D., Homan-Muller, J.W., Weening, R.S., Effect of cytochalasin B on the oxidative metabolism of human peripheral blood granulocytes, 1976, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol 12, p. 43-50.
- 21- McPhail, L.C., DeChatelet, L.R., Shirley, P.S., Further characterization of NADPH oxidase activity of human polymorphonuclear leukocytes, 1976, *J. Clin. Invest.*, vol 58, p. 775-780.
- 22- Babior, B.M., The respiratory burst of phagocytes, 1984, *J. Clin. Invest.*, vol 73, p. 599-601.
- 23- Salin, M.L., McCord, J.M., Superoxide dismutases in polymorphonuclear leukocytes, 1974, *J. Clin. Invest.*, vol 54, p. 1005-1009.
- 24- Thompson-Gorman, S.L., Zweier, J.L., Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury, 1990, *J. Biol. Chem.*, vol 265, p. 6656-6663.
- 25- Ambruso, D.R., Johnston, R.B.Jr., Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions, and an enzymatic generating system, 1981, *J. Clin. Invest.*, vol 67, p. 352-360.
- 26- Klebanoff, S.J., Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system, 1968, *J. Bacteriol.*, vol 95, p. 2131-2138.
- 27- Harrison, J.E., Schultz, J., Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase, 1976, *J. Biol. Chem.*, vol 251, p. 1371-1374.
- 28- Fantone, J.C., Ward, P.A., Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions, 1982, *Am. J. Pathol.*, vol 107, p. 395-418.

- 29- Sacks, T., Moldow, C.F., Craddock, P.R., Bowers, T.K., Jacob, H.S., Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. An in vitro model of immune vascular damage, 1978, *J. Clin. Invest.*, vol 61, p. 1161-1167.
- 30- Clark, R.A., Klebanoff, S.J., Myeloperoxidase-mediated platelet release reaction, 1979, *J. Clin. Invest.*, vol 63, p. 177-183.
- 31- Mead, J.F., in *Free Radicals Research*, éditeur Pryor, W.A., Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes, 1976, vol 1, p. 51-68, New York, Academic.
- 32- Pryor, W.A., in *Free Radicals Research*, éditeur Pryor, W.A., The role of free radicals reactions in biological systems : free radical initiated reactions, 1976, vol 1, p. 1-49, New York, Academic.
- 33- Gauduel, Y., Duvelleroy, M.A., Role of oxygen radicals in cardiac injury due to reoxygenation, 1984, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol 16, p. 459-470.
- 34- Rechnagel, R.O., Carbon tetrachloride hepatotoxicity, 1967, *Pharmacol. Rev.*, vol 19, p. 145-208.
- 35- Duncan, C.J., The role of oxygen radicals in ischaemia-reperfusion injury in the heart, 1994, *Med. Sci. Res.*, vol 22, p. 609-611.
- 36- Guarnieri, C., Flamigni, F., Rossoni-Caldarera, C., Glutathione peroxidase activity and release of glutathione from oxygen-deficient perfused rat heart, 1979, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol 89, p. 678-684.
- 37- Julicher, R.H., Tjiburg, L.B., Sterrenberg, L., Bast, A., Koomen, J.M., Noordhoek, J., Decreased defence against free radicals in rat heart during normal reperfusion after hypoxic, ischemic and calcium-free perfusion, 1984, *Life Sci.*, vol 35, p. 1281-1288.

- 38- Hay, E.D., Cell biology of the extracellular matrix, éditeur Hay, E.D., 1981, New York, Plenum Press.
- 39- Bolli, R., Davenport, N.J., Goldstein, R.E., Epstein, S.E., Myocardial proteolysis during acute myocardial ischaemia, 1983, *Cardiovasc. Res.*, vol 17, p. 274-281.
- 40- Cannon, R.O. 3d, Butany, J.W., McManus, B.M., Speir, E., Kravitz, A.B., Bolli, R., Ferrans, V.J., Early degradation of collagen after acute myocardial infarction in the rat, 1983, *Am. J. Cardiol.*, vol 52, p. 390-395.
- 41- Bolli, R., Cannon, R.O., Speir, E., Goldstein, R.E., Epstein, S.E., Role of cellular proteinases in acute myocardial infarction. I. Proteolysis in nonischemic and ischemic rat myocardium and the effects of antipain, leupeptin, pepstatin and chymostatin administered in vivo, 1983, *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol 2, p. 671-680.
- 42- Bolli, R., Cannon, R.O., Speir, E., Goldstein, R.E., Epstein, S.E., Role of cellular proteinases in acute myocardial infarction. II. Proteolysis in nonischemic and ischemic rat myocardium and the effects of antipain, leupeptin, pepstatin and chymostatin administered in vivo, 1983, *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol 2, p. 681-688.
- 43- Rousseau, G., Hébert, D., Libersan, D., Khalil, A., St-Jean, G., Latour, J.G., Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs, 1993, *Am. Heart J.*, vol 125, p. 1553-1563.
- 44- Libersan, D., Khalil, A., Dagenais, P., Quan, E., Delorme, F., Uzan, A., Latour, J.G., The low molecular weight heparin, enoxaparin, limits infarct size at reperfusion in the dog, 1998, *Cardiovasc. Res.*, vol 37, p. 656-666.
- 45- Dinerman, J.L., Mehta, J.L., Endothelial, platelet and leukocyte interactions in ischemic heart disease : insights into potential mechanisms and their clinical relevance, 1990, *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol 16, p. 207-222.

46- Siminiak, T., Flores, N.A., Sheridan, D.J., Neutrophil interactions with endothelium and platelets : possible role in the development of cardiovascular injury, 1995, *Eur. Heart J.*, vol 16, p. 160-170.

47- Thiagarajan, R.R., Winn, R.K., Harlan, J.M., The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia-reperfusion injury, 1997, *Thromb. and Haemos.*, vol 78, p. 310-314.

48- Alloatti, G., Montrucchio, G., Emanuelli, G., Camussi, G., Platelet-activating factor (PAF) induces platelet/neutrophil co-operation during myocardial reperfusion, 1992, *J. Mol. Cell Cardiol.*, vol 24 , p. 163-171.

49- Hought, W.H., Mansour, M., Rotlein, R., Kishimoto, T.K., Mainolfi. E.A., Hendricks, J.B., Hendricks, C., Mehta, J.L., Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin : further evidence for chronic inflammation in ischemic disease, 1996, *Am. Heart J.*, vol 132, p. 1-8.

50- Meisel, S.R., Shapiro, H., Radnay, J., Neuman, Y., Khaskia, A-R., Gruener, N., Pazner, H., David, D., Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules LFA-1 and MAC-1 and their ligand ICAM-1 and VLA-4 throughout the acute phase of myocardial infarction. Possible implications for leukocyte aggregation and microvascular plugging, 1998, *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol 31, p. 120-125.

51- Steele, P.M., Chesebro, J.H., Stanson, A.W., Holmes, D.R., Dewanjee, M.K., Badimon, L., Fuster, V., Balloon angioplasty. Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model, 1985, *Circ. Res.*, vol 57, p. 105-112.

52- Merhi, Y., Guidoin, R., Provost, P., Leung, T-K., Lam, J.Y.T., Increase of neutrophil adhesion and vasoconstriction with platelet deposition after deep arterial injury by angioplasty, 1995, *Am. Heart J.*, vol 129, p. 445-451.

53- Lam, J.Y.T., Chesebro, J.H., Steele, P.M., Badimon, L., Fuster, V., Is vasospasm related to platelet deposition? Relationship in a porcine preparation of arterial injury in vivo, 1987, *Circulation*, vol 75, p. 243-248.

54- Merhi, Y., Lam, J.Y.T., Lacoste, L.L., Latour, J.G., Guidoin, R., Waters, D., Effects of thrombocytopenia and shear rate on neutrophil and platelet deposition on endothelial and medial arterial surfaces, 1993, *Arterioscler. and Thromb.*, vol 13, p. 951-957.

55- Kirchlofer, D., Riederer, M.A., Baumgartner, H.R., Specific accumulation of circulating monocyte and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model, 1997, *Blood*, vol 89, p. 1270-1278.

56- Merhi, Y., Lacoste, L.L., Lam, J.Y.T., Neutrophil implication in platelet deposition and vasoconstriction after deep arterial injury by angioplasty in pigs, 1994, *Circulation*, vol 90, p. 997-1002.

57- Mickelson, J.K., Lakkis, N.M., Villarreal-Levy, G., Hughes, B.J., Smith, C.W., Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty : a mechanism for recurrent disease?, 1996, *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol 28, 345-353.

58- Provost, P., Borgeat, P., Merhi, Y., Platelets, neutrophils, and vasoconstriction after injury by angioplasty in pigs, effects of MK-886, a leukotriene biosynthesis inhibitor, 1998, *Br. J. Pharmacol.*, vol 123, p. 251-258.

59- Provost, P., Merhi, Y., Endothelium-derived nitric oxide decreases polymorphonuclear leukocyte interaction with deeply injured arterial wall under intermediate and high shear conditions, 1997, *Thromb. and Haemos.*, vol 78, p. 939-946.

60- Provost P., Tremblay J., Merhi, Y., The antiadhesive and antithrombotic effects of the nitric oxide donor SIN-1 are combined with a decreased vasoconstriction in a porcine model of balloon angioplasty, 1997, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol 17, p. 1806-1812.

- 61- Ghigliotti, G., Weissbluth, A.R., Speidel, C., Abendschein, D.R., Eisenberg, P.R, Prolonged activation of prothrombin on the vascular wall after arterial injury, 1998, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol 18, p. 250-257.
- 62- Powell, J.S., Clozel, J.P., Muller, R.K., Kuhn, H., Hefti, F., Hosang, M., Baumgartner, H.R., Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury, 1989, *Science*, vol 245, p. 186-188.
- 63- Fingerle, J., Sanders, K.H., Fotev, Z., Alpha 1-receptor antagonists urapidil and prazosin inhibit neointima formation in rat carotid artery induced by balloon catheter injury, 1991, *Basic Res. Cardiol.*, vol 86, suppl 1, p. 75-81.
- 64- Hirosumi, J., Nomoto, A., Ohkubo, Y., Sekiguchi, C., Mutoh, S., Yamaguchi, I., Aoki, H., Inflammatory responses in cuff-induced atherosclerosis in rabbits, 1987, *Atheroscler.*, vol 64, p. 243-254.
- 65- Kondo, K., Umemura, K., Ohmura, T., Hashimoto, H., Nakashima, M., Suppression of intimal hyperplasia by a 5-lipoxygenase inhibitor, MK-886 : studies with a photochemical model of endothelial injury, 1998, *Thromb. and Haemos.*, vol 79, p. 635-639.
- 66- Inoue, T., Sakai, Y., Hoshi, K., Yaguchi, I., Fujito, T., Morooka, S., Lower expression of neutrophil adhesion molecule indicates less vessel wall injury and might explain lower restenosis rate after cutting balloon angioplasty, 1998, *Circulation*, vol 97, p. 2511-2518.
- 67- Ricevuti, G., De Servi, S., Mazzone, A., Angoli, L., Ghio, S., Specchia, G., Increased neutrophil aggregability in coronary artery disease, 1990, *Eur. Heart. J.*, vol 11, p. 814-818.
- 68- Nash, G.B., Adhesion between neutrophils and platelets : a modulator of thrombotic and inflammatory events ?, 1994, *Thrombos. Res.*, vol 74, suppl 1, p. S3-S11.

69- Faint, R.W., Platelet-neutrophil interactions : their significance, 1992, Blood Reviews, vol 6, p. 83-91.

70- Siegelman, M.H., van de Rijn, M., Weissman, I.L., Mouse lymph node homing receptor cDNA clone encodes a glycoprotein revealing tandem interaction domains, 1989, Science, vol 243, p. 1165-1172.

71- Lasky, L.A., Singer, M.S., Yednock, T.A, Dowbenko, D., Fennie, C., Rodriguez, H., Nguyen, T., Stachel, S., Rosen, S.D., Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain, 1989, Cell, vol 56, p. 1045-1055.

72- Johnston, G.I., Cook, R., McEver, R.P., Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium : sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation, 1989, Cell, vol 56, p. 1033-1044.

73- Bevilacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone, M.A., Seed, B., Endothelial leukocyte adhesion molecule 1 : an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins, 1989, Science, vol 243, p. 1160-1165.

74- Bevilacqua, M.P., Endothelial leukocyte adhesion molecule 1 : An inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins, 1989, Circulation, vol 80, p. II-1.

75- Bevilacqua, M., Butcher, E., Furie, B, Furie, B., Gallatin, M., Gimbrone, M., Harlan, J., Kishimoto, K., Lasky, L., McEver, R., Paulson, J., Rosen, S., Seed, B., Siegelman, M., Springer, T., Stoolman, L., Tedder, T., Varki, A., Wagner, D., Weissman, I., Zimmerman, G., Selectins a family of adhesion receptors, 1991, Cell, vol 67 p. 233.

76- Drickamer, K., Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins, 1988, J. Biol. Chem., vol 263, p. 9557-9560.

77- Lowe, J.B., Stoolman, L.M., Nair, R.P., Larsen, R.D., Berhend, T.L., Marks, R.M., ELAM-1-dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by transfected human fucosyltransferase cDNA, 1990, *Cell*, vol 63, p. 475-484.

78- Larsen, E., Palabrica, T., Sajer, S., Gilbert, G.E., Wagner, D.D., Furie, B.C., Furie, B., PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15), 1990, *Cell*, vol 63, p. 467-474.

79- Goetz, S.E., Hession, C., Goff, D., Griffiths, B., Tizard, R., Newman, B., Chi-Rosso, G., Lobb, R., ELFT : a gene that directs the expression of an ELAM-1 ligand, 1990, *Cell*, vol 63, p. 1349-1356.

80- Tiemeyer, M., Swiedler, S.J., Ishihara, M., Moreland, M., Schweingruber, H., Hirtzer, P., Brandley, B.K., Carbohydrate ligands for endothelial-leukocyte adhesion molecule-1, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 98, p. 1138-1142.

81- Phillips, M.L., Nudelman, E., Gaeta, F.C.A., Perez, M., Singhal, A.K., Hakomori, S-I., Paulson, J.C., ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand sialyl-LeX, 1990, *Science*, vol 250, p. 1130-1132.

82- Walz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M., Seed, B., Recognition by ELAM-1 of the sialyl-LeX determinant on myeloid and tumor cells, 1990, *Science*, vol 250, p. 1132-1135.

83- Stenberg, P.E., McEver, R.P., Shuman, M.A., Jacques, Y.V., Bainton, D.F., A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation, 1985, *J. Cell Biol.*, vol 101, p. 880-886.

84- Hsu-Lin, S-C., Berman, C.L., Furie, B.C., August, D., Furie, B., A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets, 1984, *J. Biol. Chem.*, vol 259, p. 9121-9126.

- 85- McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L., Bainton, D.F., GMP-140, a platelet α -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel Palade bodies, 1989, *J. Clin. Invest.*, vol 84 p. 92-99.
- 86- Bonfanti, R., Furie, B.C., Furie, B., Wagner, D.D., PADGEM (GMP140) is a component of the Weibel-Palade bodies of human endothelial cells, 1989, *Blood*, vol 73, p. 1109-1112.
- 87- Koedam, J.A., Cramer, E.M., Briend, E., Furie, B., Furie, B.C., Wagner, D.D., P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulated secretory pathway in AtT-20 cells, 1992, *J. Cell Biol.*, vol 116, p. 617-625.
- 88- Disdier, M., Morissey, J.H., Fugate, R.D., Bainton, D.F., McEver, R.P., Cytoplasmic domain of P-selectin (CD62) contains the signal for sorting into the regulated secretory pathway, 1992, *Mol. Biol. Cell*, vol 3, p. 309-321.
- 89- Handa, K., Igarashi, Y., Nisar, M., Hakomori, S-I., Downregulation of GMP-140 (CD62 or PADGEM) expression on platelets by N,N-dimethyl and N,N,N-trimethyl derivatives of sphingosine, 1991, *Biochemistry*, vol 30, p. 11682-11686.
- 90- Carlos, T.M., Harlan, J.M., Leukocyte-endothelial adhesion molecules, 1994, *Blood*, vol 84, p. 2068-2101.
- 91- Ahearn, J.M., Fearon, D.T., Structure and function of the complement receptors CR1 (CD35) and CR2 (CD21), 1989, *Adv. Immunol.*, vol 46, p. 183-219.
- 92- Weis, J.J., Toothaker, L.F., Smith, J.A., Weis, J.H., Fearon, D.T., Structure of the human B lymphocyte receptor for C3d and the Epstein-Barr virus and relatedness to other members of the family of C3/C4 binding proteins, 1988, *J. Exp. Med.*, vol 167, p. 1047-1066.
- 93- Crovello, C.S., Furie, B.C., Furie, B., Rapid phosphorylation and selective dephosphorylation of P-selectin accompanies platelet activation, 1993, *J. Biol. Chem.*, vol 268, p. 14590-14593.

- 94- Fujimoto, T., McEver, R.P., The cytoplasmic domain of P-selectin is phosphorylated on serine and threonine residues, 1993, *Blood*, vol 82, p. 1758-1766.
- 95- Modderman, P.W., von dem Borne, A.E.G.K., Sonnenberg, A., Tyrosine phosphorylation of P-selectin in intact platelet and in a disulfide-linked complex with immunoprecipitated pp60c-src, 1994, *Biochem. J.*, vol 299, p. 613-621.
- 96- Crovello, C.S., Furie, B.C., Furie, B., Histidine phosphorylation of P-selectin upon stimulation of human platelets : a novel pathway for activation-dependent signal transduction, 1995, *Cell*, vol 82, p. 279-286.
- 97- Fujimoto, T., Stroud, E., Whatley, R.E., Prescott, S.M., Muszbek, L., Laposata, M., McEver, R.P., P-selectin is acylated with palmitic acid and stearic acid at cysteine 766 through a thioester linkage, 1993, *J. Biol. Chem.*, vol 268, p. 11394-11400.
- 98- Green, S.A., Setiadi, H., McEver, R.P., Kelly, R.B., The cytoplasmic domain of P-selectin contains a sorting determinant that mediates rapid degradation in lysosomes, 1994, *J. Cell Biol.*, vol 124, p. 435-448.
- 99- Subramaniam, M., Koedam, J.A., Wagner, D.D., Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane, 1993, *Mol. Biol. Cell*, vol 4, 791-801.
- 100- Dunlop, L.C., Skinner, M.P., Bendall, L.J., Favaloro, E.J., Castaldi, P.A., Gorman, J.J., Gamble, J.R., Vadas, M.A., Berndt, M.C., Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein, 1992, *J. Exp. Med.*, vol 175, p. 1147-1150.
- 101- Gotsch, U., Jager, U., Dominis, M., Vestweber, D., Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo, 1994, *Cell Adhes. Commun.*, vol 2, p. 7-14.
- 102- Bischoff, J., Brasel, C., Regulation of P-selectin by tumor necrosis factor, 1995, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol 210, p. 174-180.

- 103- Sanders, W.E., Wilson, R.W., Ballantyne, C.M., Beaudet, A.L., Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin, 1992, *Blood*, vol 80, p. 795-800.
- 104- Gallatin, W.M., Weismann, I.L., Butcher, E.C., A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes, 1983, *Nature*, vol 304, p. 30-34.
- 105- Lewinsohn, D.M., Bargatze, R.F., Butcher, E.C., Leukocyte-endothelial cell recognition : evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes and other leukocytes, 1987, *J. Immunol.*, vol 138, p. 4313-4321.
- 106- Lanier, L.L., Engleman, E.G., Gatenby, P., Babcock, G.F., Warner, N.L., Herzenberg, L.A., Correlation of functional properties of human lymphoid cell subsets and surface marker phenotypes using multiparameter analysis and flow cytometry, 1983. *Immunological Rev.*, vol 74, p. 143-160.
- 107- Kansas, G.S., Wood, G.S., Fishwild, D.M., Engleman, E.G., Functional characterization of human T lymphocyte subsets distinguished by monoclonal anti-Leu-8, 1985, *J. Immunol.*, vol 134, p. 2995-3002.
- 108- Poletti, A., Manconi, R., de Paoli, P., Double labeling immunohistologic and flow cytometric analysis of human B cells with particular reference to Leu-8 expression, 1988, *Hum. Pathol.*, vol 19, p. 1001-1007.
- 109- Camerini, D., James, S.P., Stamenkovic, I., Seed, B., Leu-8/TQ1 is the human equivalent of the MEL-14 lymph node receptor, 1989, *Nature*, vol 342, p. 78-82.
- 110- Jung, T.M., Dailey, M.O., Rapid modulation of homing receptors (gp90mel-14) induced by activation of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface, 1990, *J. Immunol.*, vol 144, p. 3130-3136.

- 111- Berg, M., James, S.P., Human neutrophils release the Leu-8 lymph node homing receptor during cell activation, 1990, *Blood*, vol 76, p. 2381-2388.
- 112- Zouki, C., Beauchamp, M., Baron, C., Filep, J.G., Prevention of in vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptide derived from C-reactive protein, 1997, *J. Clin. Invest.*, vol 100, p. 522-529.
- 113- Endemann, G., Abe, Y., Bryant, C.M., Feng, Y., Smith, C.W., Liu, D.Y., Novel anti-inflammatory compounds induce shedding of L-selectin and block primary capture of neutrophils under flow conditions, 1997, *J. Immunol.*, vol 158, p. 4879-4885.
- 114- Kuijper, P.H.M., Torres, H.I.G., van der Linden, J.A.M., Lammers, J-W.J., Sixma, J.J., Zwaginga, J.J., Koenderman, L., Neutrophil adhesion to fibrinogen and fibrin under flow conditions is diminished by activation and L-selectin shedding, 1997, *Blood*, vol 89, p. 2131-2138.
- 115- Allport, J.R., Ding, H.T., Ager, A., Steeber, D.A., Tedder, T.F., Luscinskas, F.W., L-selectin shedding does not regulate human neutrophil attachment, rolling, or transmigration across human vascular endothelium in vitro, 1997, *J. of Immunol.*, vol 158, p. 4365-4372.
- 116- Spertini, O., Kansas, G.S., Munro, J.M., Griffin, J.D., Tedder, T.F., Regulation of leukocyte migration by activation of the leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1) selectin, 1991, *Nature*, vol 349, p. 691-694.
- 117- Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Wheeler, M.E., Cotran, R.S., Gimbrone, M.A., Interleukin1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and related leukocyte cell line, 1985, *J. Clin. Invest.*, vol 76, p. 2003-2011.
- 118- Pober, J.S., Bevilacqua, M.P., Mendrick, D.L., Lapiere, L.A., Fiers, W., Gimbrone, M.A., Two distinct monokines interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells, 1986, *J. Immunol.*, vol 136, p. 1680-1687.

- 119- Cotran, R.S., Gimbrone, M.A., Bevilacqua, M.P., Mendrick, D.L., Pober, J.S., Induction and detection of a human endothelial activation antigen in vivo, 1986, *J. Exp. Med.*, vol 164, p. 661-666.
- 120- Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S., Gimbrone, M.A., Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 84, p. 9238-9242.
- 121- Haraldsen, G., Kvale, D., Lien, B., Farstad, I.N., Brandtzaeg, P., Cytokine-regulated expression of the E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human intestinal microvascular endothelial cells, 1996, *J. Immunol.*, vol 156, p. 2558-2565.
- 122- Ghersa, P., van Huijsduijnen, R.H., Whelan, J., DeLamarter, J.F., Labile proteins play a dual role in the control of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) gene regulation, 1992, *J. Biol. Chem.*, vol 267, p. 19226-19232.
- 123- Smeets, E.E., de Vries, T., Leeuwenberg, J.E.M., van den Eijnden, D.H., Bourman, W.A., Neefjes, J.J., Phosphorylation of surface E-selectin and the effect of soluble ligand (Sialyl LewisX) on the half-life of E-selectin, 1993, *Eur. J. Immunol.*, vol 23, p. 147-151.
- 124- von Asmuth, E.J.U., Smeets, E.E., Ginsel, L.A., Onderwater, J.J.M., Leeuwenberg, J.F.M., Bourman, W.A., Evidence for endocytosis of E-selectin in human endothelial cells, 1992, *Eur. J. Immunol.*, vol 22, p. 2519-2526.
- 125- Schindler, U., Baichwal, V.R., Three NF-kB binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression, 1994, *Mol. Cell. Biol.*, vol 14, p. 5820-5831.

- 126- Read, M.A., Whitley, M.Z., Williams, A.J., Collins, T., NF-kB and I κ B α : an inducible regulatory system in endothelial activation, 1994, *J. Exp. Med.*, vol 170, p. 503-512.
- 127- Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D., Maniatis, T., Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules : NF-kB and cytokine-inducible enhancers, 1995, *Faseb J.*, vol 9, p. 899-909.
- 128- Thanos, D., Maniatis, T., NF-kB : a lesson in family values, 1995, *Cell*, vol 80, p. 529-532.
- 129- Picker, L.J., Kishimoto, T.K., Smith, C.W., Warnock, R.A., Butcher, E.C., ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells, 1991, *Nature*, vol 349, p. 796-799.
- 130- Chu, W., Presky, D.H., Swerlick, R.A., Burns, D.K., Alternatively processed human E-selectin transcripts linked to chronic expression of E-selectin in vivo, 1994, *J. Immunol.*, vol 153, p. 4179-4189.
- 131- Kansas, G.S., Selectins and their ligands : current concepts and controversies, 1996, *Blood*, vol 88, p. 3259-3287.
- 132- Varki, A., Selectin ligands, 1994, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, vol 91, p. 7390-7397.
- 133- Foxall, C., Watson, S.R., Dovbenko, D., Fennie, C., Lasky, L.A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D., Brandley, B.K., The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl lewisX oligosaccharide, 1992, *J. Cell Biol.*, vol 117, p. 895-902.
- 134- Fukuda, M., Spooncer, E., Oates, J.E., Dell, A., Klock, J.C., Structure of sialylated fucosyl lactosaminoglycan isolated from human granulocytes, 1984, *J. Biol. Chem.*, vol 259, p. 10925-10935.
- 135- Macher, B.A., Klock, J.C., Isolation and chemical characterization of neutral glycosphingolipids of human neutrophils, 1980, *J. Biol. Chem.*, vol 255, p. 2092-2096.

- 136- Macher, B.A., Beckstead, J.H., Distribution of VIM-2 and SSEA-1 glycoconjugate epitopes among human leukocytes and leukemia cells, *Leuk. Res.*, vol 14, p. 119-130.
- 137- Handa, K., Nudelman, E.D., Stroud, M.R., Shiozawa, T., Hakomori, S-I., Selectin GM-140 (CD62; PADGEM) binds to sialosyl-Le^a and sialosyl-Le^x, and sulfated glycans modulate this binding, 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol 181, p. 1223-1230.
- 138- Berg, E.L., Robinson, M.K., Mansson, O., Butcher, E.C., Magnani, J.L., A carbohydrate domain common to both sialyl lewisA and sialyl lewisX is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1, 1991, *J. Biol. Chem.*, vol 266, p. 14869-14872.
- 139- Paavonen, T., Renkonen, R., Selective epitope of sialyl-Lewis X and Lewis A epitopes, putative ligands for L-selectin, on peripheral lymph-node high endothelial venules, 1992, *Am. J. Pathol.*, vol 141, p. 1259-1264.
- 140- Rice, G.E., Bevilacqua, M.P., An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion, 1989, *Science*, vol 245, p. 1303-1306.
- 141- Lauri, D., Needham, L., Martin-Padura, I., Dejana, E., Tumor cell adhesion to endothelial cells : endothelial leukocyte adhesion molecule-1 as an inducible adhesive receptor specific for colon carcinoma cells, 1991, *Nature*, vol 83, p. 1321-1324.
- 142-Kojima, N., Handa, K., Newman, W., Hakomori, S-I., Inhibition of selectin-dependent tumor cell adhesion to endothelial cells and platelets by blocking o-glycosylation of these cells, 1992, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol 182, p. 1288-1295.
- 143- Takada, A., Ohmori, K., Takahashi, N., Tsuyuoka, K., Yago, A., Zenita, K., Hasegawa, A., Kannagi, R., Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis A, 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol 179, p. 713-719.

- 144- Majuri, M-L., Mattila, P., Renkonen, R., Recombinant E-selectin-protein mediates tumor cell adhesion via sialyl-Le^a and sialyl-Le^x, 1992, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol 182, p. 1375-1382.
- 145- Dejana, E., Martin-Padura, I., Lauri, D., Bernasconi, S., Bani, M.R., Garofalo, A., Giavazzi, R., Magnani, J., Mantovani, A., Menard, S., Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-dependent adhesion of colon carcinoma cells to vascular endothelium is inhibited by an antibody to lewis fucosylated type 1 carbohydrate chain, 1992, *Lab. Invest.*, vol 66, p. 324-330.
- 146- Wagers, A.J., Stoolman, L.M., Craig, R., Knibbs, R.N., Kansas, G.S., An sLe^x-deficient variant of HL60 cells exhibits high levels of adhesion to vascular selectins : further evidence that HECA-452 and CSLEX1 monoclonal antibody epitopes are not essential for high avidity binding to vascular selectins, 1998, *J. Immunol.*, vol 160, p. 5122-5129.
- 147- Lasky, L.A., Singer, M.S., Dowbenko, D., Imai, Y., Henzel, W.J., Grimley, C., Fennie, C., Gillett, N., Watson, S.R., Rosen, S.D., An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule, 1992, *Cell*, vol 69, p. 927-938.
- 148- Moore, K.L., Stults, N.L., Diaz, S., Smith, D.F., Cummings, R.D., Varki, A., McEver, R.P., Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells, 1992, *J. Cell Biol.*, vol 118, p. 445-456.
- 149- Moore, K.L., Varki, A., McEver, R.P., GMP-140 binds to a glycoprotein receptor on human neutrophils : evidence for a lectin-like interaction, 1991, *J. Cell Biol.*, vol 112, p. 491-499.
- 150- Imai, Y., Singer, M.S., Fennie, C., Lasky, L.A., Rosen, S.D., Identification of a carbohydrate-based endothelial ligand for a lymphocyte homing receptor, 1991, *J. Cell Biol.*, vol 113, p. 1213-1221.

- 151- Norgard, K.E., Moore, K.L., Diaz, S., Stults, N.L., Ushiyama, S., McEver, R.P., Cummings, R.D., Varki, A., Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells : a minor glycoprotein with sialylated o-linked oligosaccharides, 1993, J. Biol. Chem., vol 268, p. 12764-12774.
- 152- Hidari, K.I-P.J., Weyrich, A.S., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils, 1997, J. Biol. Chem., vol 272, p. 58750-28756.
- 153- Neumann, F-J., Marx, N., Gawaz, M., Brand, K., Ott, I., Rokitta, C., Sticherling, C., Meinl, C., May, A., Schomig, A., Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets, 1997, Circulation, vol 95, p. 2387-2394.
- 154- Losche, W., Redlich, H., Krause, S., Bergmann, I., Spangenberg, P., Platelets activate neutrophils via cell-cell contact, 1992, Ann. Hematol., vol 64, p. A14.
- 155- Larsen, G.R., Sako, D., Ahern, T.J., Shaffer, M., Erban, J., Sajer, S.A., Gibson, R.M., Wagner, D.D., Furie, B.C., Furie, B., P-selectin and E-selectin. Distinct but overlapping leukocyte ligand specificities, 1992, J. Biol. Chem., vol 267, p. 11104-11110.
- 156- Ushiyama, S., Laue, T.M., Moore, K.L., Erickson, H.P., McEver, R.P., Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin, 1993, J. Biol. Chem., vol 268, p. 15229-15237.
- 157- Steininger, C.N., Eddy, C.A., Leimgruber, R.M., Mellors, A., Welply, J.K., The glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 eliminates binding of myeloid cells to P-selectin but not to E-selectin, 1992, Biochem. Biophys. Res. Commun., vol 188, p. 760-766.
- 158- Picker, L.J., Warnock, R.A., Burns, A.R., Doerschuk, C.M., Berg, E.L., Butcher, E.C., The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140, 1991, Cell, vol 86, p. 921-933.

159- Sako, D., Chang, X-J., Barone, K.M., Vachino, G., White, H.M., Shaw, G., Veldman, G.M., Bean, K.M., Ahern, T.J., Furie, B., Cumming, D.A., Larsen, G.R., Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin, 1993, *Cell*, vol 75, p. 1179-1186.

160- Rehemtulla, A., Kaufman, R.J., Protein processing within the secretory pathway, 1992, *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol 3, p. 560-565.

161- Huttner, W.B., Baeuerle, P.A., Protein sulfation on tyrosine, 1988, *Mol. Cell Biol.*, vol 6, p. 97-140.

162- Li, F., Wilkins, P.P., Crawley, S., Weinstein, J., Cummings, R.D., McEver, R.P., Post-transcriptional modifications of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P- and E-selectin, 1996, *J. Biol. Chem.*, vol 271, p. 3255-3264.

163- Moore, K.L., Eaton, S.F., Lyons, D.E., Lichenstein, H.S., Cummings, R.D., McEver, R.P., The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated fucosylated O-linked poly-N-acetyllactosamine, 1994, *J. Biol. Chem.*, vol 269, p. 23318-23327.

164- Varki, A., Diaz, S., A neuraminidase from *Streptococcus sanguis* that can release O-acetylated sialic acids, 1983, *J. Biol. Chem.*, vol 258, p. 12465-12471.

165- Wilkins, P.P., Moore, K.L., McEver, R.P., Cummings, R.D., Tyrosine sulfation of P-selectin glycoprotein ligand-1 is required for high affinity binding to P-selectin, 1995, *J. Biol. Chem.*, vol 270, p. 22677-22680.

166- Pouyani, T., Seed, B., PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus, 1995, *Cell*, vol 83, p. 333-343.

- 167- Sako, D., Comesa, K.M., Barone, K.M., Camphausen, R.T., Cumming, D.A., Shaw, G.D., A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding, 1995, *Cell*, vol 83, p. 323-331.
- 168- De Luca, M., Dunlop, L.C., Andrews, R.K., Flannery, J.V., Ettl, R., Cumming, D.A., Veldman, G.M., Berndt, M.C., A novel cobra venom metalloproteinase, mocoarhagin cleaves a 10-amino acid peptide from the mature N terminus of P-selectin glycoprotein ligand receptor, PSGL-1 and abolishes P-selectin binding, 1995, *J. Biol. Chem.*, vol 270, p. 26734-26737.
- 169- Liu, W.-J., Ramachandran, V., Kang, J., Kishimoto, T.K., Cummings, R.D., McEver, R.P., Identification of N-terminal residues on P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P-selectin, 1998, *J. Biol. Chem.*, vol 273, p. 7078-7087.
- 170- Moore, K.L., Patel, K.D., Bruehl, R.E., Fugang, L., Johnson, D.A., Lichenstein, H.S., Cummings, R.D., Bainton, D.F., McEver, R.P., P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin, 1995, *J. Cell. Biol.*, vol 128, p. 661-671.
- 171- Skinner, M.P., Lucas, C.M., Burns, G.F., Chesterman, C.N., Berndt, M.C., GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans, 1991, *J. Biol. Chem.*, vol 266, p. 5371-5374.
- 172- Watson, S.R., Imai, Y., Fennie, C., Geoffroy, J.S., Rosen, S.D., Lasky, L.A., A homing receptor-IgG chimera as a probe for adhesive ligands of lymph node high endothelial venules, 1990, *J. Cell Biol.*, vol 110, p. 2221-2229.
- 173- Kikuta, A., Rosen, S.D., Localization of ligand for L-selectin in mouse peripheral lymph node high endothelial cells by colloidal gold conjugates, 1994, *Blood*, vol 84, p. 3766-3775.
- 174- Brustein, M., Kraal, G., Mebius, R.E., Watson, S.R., Identification of a soluble form of a ligand for the lymphocyte homing receptor, 1992, *J. Exp. Med.*, vol 176, p. 1415-1419.

175- Fina, L., Molgaard, H.V., Robertson, D., Bradley, N.J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D.R., Baker, M.A., Greaves, M.F., Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells, 1990, *Blood*, vol 75, p. 2417-2426.

176- Streeter, P.R., Berg, E.L., Rouse, B.T.N., Bargatze, R.F., Butcher, E.C., A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing, 1988, *Nature*, vol 331, p. 41-46.

177- Puri, K.D., Finger, E.B., Gaudernack, G., Springer, T.A., Sialomucin CD34 is the major L-selectin ligand in human tonsil high endothelial venules, 1995, *J. Cell Biol.*, vol 131, p. 261-270.

178- Picker, L.J., Michie, S.A., Rott, L.S., Butcher, E.C., A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites, 1990, *Am. J. Pathol.*, vol 136, p. 1053-1068.

179- Sawada, M., Takada, A., Ohwaki, I., Takahashi, N., Tateno, H., Sakamoto, J., Kannagi, H., Specific expression of a complex sialyl lewis X antigen on high endothelial venules of human lymph nodes : possible candidate for L-selectin ligand, 1993, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol 193, p. 337-347.

180- Spertini, O., Luscinskas, F.W., Kansas, G.S., Munro, J.M., Griffin, J.D., Gimbrone, M.A., Tedder, T.F., Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion, 1991, *J. Immunol.*, vol 147, p. 2565-2573.

181- Snapp, K.R., Ding, H., Atkins, K., Warnke, R., Luscinskas, F.W., Kansas, G.S., A novel P-selectin glycoprotein ligand-1 monoclonal antibody recognizes an epitope within the tyrosine sulfated motif of human PSGL-1 and blocks recognition of both P- and L-selectin, 1998, *Blood*, vol 91, p. 154-164.

- 182- Ramos, C.L., Smith, M.J., Snapp, K.R., Kansas, G.S., Stickney, G.W., Ley, K., Lawrence, M.B., Functional characterization of L-selectin ligands on human neutrophils and leukemia cell lines : evidence for mucinlike ligand activity distinct from P-selectin glycoprotein ligand-1, 1998, *Blood*, vol 91, p. 1067-1075.
- 183- Kotovuori, P., Tontti, E., Pigott, R., Shepherd, M., Kiso, M., Hasegawa, A., Renkonen, R., Nortamo, P., Altieri, D.C., Gahmberg, C.G., The vascular E-selectin binds to the leukocyte integrins CD11/CD18, 1993, *Glycobiology*, vol 3, p. 131-136.
- 184- Asa, D., Raycroft, L., Ma, L., Aeed, P.A., Kaytes, P.S., Elhammer, A.P., Geng, J-G., The P-selectin glycoprotein ligand functions as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectins, 1995, *J. Biol. Chem.*, vol 270, p. 11662-11670.
- 185- Nelson, R.M., Dolich, S., Aruffo, A., Cecconi, O., Bevilacqua, M.P., Higher-affinity oligosaccharide ligand for E-selectin, 1993, *J. Clin. Invest.*, vol 91, p. 1157-1166.
- 186- Levinovitz, A., Muhlhoff, J., Isenmann, S., Vestweber, D., Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells, 1993, *J. Cell Biol.*, vol 121, p. 449-459.
- 187- Lenter, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Vestweber, D., Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells, 1994, *J. Cell Biol.*, vol 125, p. 471-481.
- 188- Steegmaier, M., Borges, E., Berger, J., Schwartz, H., Vestweber, D., The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface, 1997, *J. Cell Sci.*, vol 110, p. 687-694.
- 189- Steegmaier, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lenter, M., Kocher, H.P., Kleuser, B., Vestweber, D., The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor, 1995, *Nature*, vol 373, p. 615-620.

- 190- Lo, S.K., Lee, S., Ramos, R.A., Lobb, R., Rosa, M., Chi-Rosso, G., Wright, S.D., Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18, MAC-1, amB2) on human neutrophils, 1991, *J. Exp. Med.*, vol 173, p. 1493-1500.
- 191- Spertini, O., Luscinckas, F.W., Gimbrone, M.A., Tedder, T.F., Monocyte attachment to activated human vascular endothelium in vitro is mediated by leukocyte adhesion molecule-1 (L-selectin) under nonstatic conditions, 1992, *J. Exp. Med.*, vol 175, p. 1789-1792.
- 192- Hallman, R., Jutila, M.A., Smith, C.W., Anderson, D.C., Kishimoto, T.K., Butcher, E.C., The peripheral lymph node homing receptor, LECAM-1, is involved in CD18-independent adhesion of human neutrophils to endothelium, 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol 174, p. 236-243.
- 193- Abbassi, O., Lane, C.L., Krater, S., Kishimoto, T.K., Anderson, D.C., McIntire, L.V., Smith, C.W., Canine neutrophil margination mediated by lectin adhesion molecule-1 in vitro, 1991, *J. Immunol.*, vol 147, p. 2107-2115.
- 194- Shimaoka, M., Ikeda, M., Iida, T., Taenaka, N., Yoshiya, I., Honda, T., Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lungs, 1996, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol 153, p. 307-311.
- 195- Ley, K., Linnemann, G., Meinen, M., Stoolman, L.M., Gaehtgens, P., Fucoidin, but not yeast polyphosphomannan PPME, inhibits leukocyte rolling in venules of the rat mesentery, 1993, *Blood*, vol 81, p. 177-185.
- 196- Tangelder, G.J., Arfors, K-E., Inhibition of leukocyte rolling in venules by protamine and sulfated polysaccharides, 1991, *Blood*, vol 77, p. 1565-1571.
- 197- Watson, S.R., Fennie, C., Lasky, L.A., Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by a soluble homing receptor-IgG chimera, *Nature*, 1991, vol 349, p. 164-167.

198- von Andrian, U.H., Chambers, J.D., Berg, E.L., Michie, S.A., Brown, D.A., Karolak, D., Ramezani, L., Berger, E.M., Arfors, K-E., Butcher, E.C., L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl Lewis^x-dependent and -independent recognition pathways, 1993, *Blood*, vol 82, p. 182-191.

199- Norman, K.E., Moore, K.L., McEver, R.P., Ley, K., Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1, 1995, *Blood*, vol 86, p. 4417-4421.

200- Ramos, C.L., Kunkel, E.J., Lawrence, M.B., Jung, U., Vestweber, D., Bosse, R., McIntyre, K.W., Gillooly, K.M., Norton, C.R., Wolitzky, B.A., Ley, K., Differential effect of E-selectin antibodies on neutrophil rolling and recruitment to inflammatory sites, 1997, *Blood*, vol 89, p. 3009-3018.

201- Norman, K.E., Anderson, G.P., Kolb, H.C., Ley, K., Ernst, B., Sialyl Lewis^x (sLe^x) and an sLe^x mimetic, CGP69669A, disrupt E-selectin-dependent leukocyte rolling in vivo, 1998, *Blood*, vol 91, p. 475-483.

202- Lawrence, M.B., Kansas, G.S., Kunkel, E.J., Ley, K., Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E), 1997, *J. Cell Biol.*, vol 136, p. 717-727.

203- Puri, K.D., Finger, E.B., Springer, T.A., The faster kinetics of L-selectin than E-selectin and P-selectin rolling at comparable binding strength, 1997, *J. Immunol.*, vol 158, p. 405-413.

204- Patel, K.D., Nollert, M.U., McEver, R.P., P-selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils, 1995, *J. Cell Biol.*, vol 131, p. 1893-1902.

205- Buttrum, S.M., Hatton, R., Nash, G.B., Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets, 1993, *Blood*, vol 82, p. 1165-1174.

206- Doré, M., Burns, A.R., Hughes, B.J., Entman, M.L., Smith, C.W., Chemoattractant-induced changes in surface expression and redistribution of a functional ligand for P-selectin on neutrophil, 1996, *Blood*, vol 87, p. 2029-2037.

207- Lorant, D.E., McEver, R.P., McIntire, T.M., Moore, K.L., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Activation of polymorphonuclear leukocytes reduces their adhesion to P-selectin and causes redistribution of ligands for P-selectin on their surfaces, 1995, *J. Clin. Invest.*, vol 96, p. 171-182.

208- Bruehl, R.E., Moore, K.L., Lorant, D.E., Borregaard, N., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Bainton, D.F., Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1, 1997, *J. Leukoc. Biol.*, vol 61, p. 489-499.

209- Bargatze, R.F., Kurk, S., Butcher, E.C., Jutila, M.A., Neutrophil roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells, 1994, *J. Exp. Med.*, vol 180, p. 1785-1792.

210- McEver, R.P., Cummings, R.D., Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment, 1997, *J. Clin. Invest.*, vol 100, suppl, S97-S103.

211- Helmke, B.P., Bremner, S.N., Zweifach, B.W., Skalak, R., Schmid-Schonbein, G.W., Mechanisms for increased blood flow resistance due to leukocytes, 1997, *Am. J. Physiol.*, vol 273, p. H2884-H2890.

212- Kunkel, E.J., Chomas, J.E., Ley, K., Role of primary and secondary capture for leukocyte accumulation in vivo, 1998, *Circ. Res.*, vol 82, p. 30-38.

213- Rochon, Y.P., Simon, S.I., Lynam, E.B., Sklar, L.A., A role for lectin interactions during human neutrophil aggregation, 1994, *J. Immunol.*, vol 152, p. 1385-1393.

214- Simon, S.I., Rochon, Y.P., Lynam, E.B., Smith, C.W., Anderson, D.C., Sklar, L.A., B2-integrin and L-selectin are obligatory receptors in neutrophil aggregation, 1993, *Blood*, vol 82, p. 1097-1106.

- 215- Walcheck, B., Moore, K.L., McEver, R.P., Kishimoto, T.K., Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1, 1996, *J. Clin. Invest.*, vol 98, p. 1081-1087.
- 216- Guyer, D.A., Moore, K.L., Lynam, E.B., Schammel, C.M.G., Rogelj, S., McEver, R.P., Sklar, L.A., P-selectin-glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) is a ligand for L-selectin in neutrophil aggregation, 1996, *Blood*, vol 88, p. 2415-2421.
- 217- Hynes, R.O., Integrins : A family of cell surface receptors, 1987, *Cell*, vol 48, p. 549-554.
- 218- Hynes, R.O., Integrins : Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, 1992, *Cell*, vol 69, p. 11-25.
- 219- Hemler, M.E., VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes, 1990, *Annu. Rev. Immunol.*, vol 8, p. 365-400.
- 220- Larson, R.S., Springer, T.A., Structure and function of leukocyte integrins, 1990, *Immunol. Rev.*, vol 114, p. 181-217.
- 221- Phillips, D.R., Charo, I.F., Parise, L.V., Fitzgerald, L.A., The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex, 1988, *Blood*, vol 71, p. 831-843.
- 222- Cheresh, D.A., Smith, J.W., Cooper, H.M., Quaranta, V., A novel vitronectin receptor integrin ($\alpha v \beta x$) is responsible for distinct adhesive properties of carcinoma cells, 1989, *Cell*, vol 57, p. 59-69.
- 223- Todd, R.F. 3d., Arnaout, M.A., Rosin, R.E., Crowley, C.A., Peters, W.A., Babior, B.M., Subcellular localization of the large subunit of Mo1 (Mo1 α ; formerly gp 110), a surface glycoprotein associated with neutrophil adhesion, 1984, *J. Clin. Invest.*, vol 74, p. 1280-1290.

224- Miller, L.J., Bainton, D.F., Borregaard, N., Springer, T.A., Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface, 1987, *J. Clin. Invest.*, vol 80, p. 535-544 .

225- Keizer, G.D., Visser, W., Vliem, M., Figdor, C.G., A monoclonal antibody (NKI-L16) directed against a unique epitope on the alpha-chain of human leukocyte function-associated antigen 1 induces homotypic cell-cell interactions, 1988, *J. Immunol.*, vol 140, p. 1393-1400.

226- Wright, S.D., Weitz, J.I., Huang, A.J., Levin, S.M., Silverstein, S.C., Loike, J.D., Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol 85, p. 7734-7738.

227- Wright, S.D., Licht, M.R., Craigmyle, L.S., Silverstein, S.C., Communication between receptors for different ligands on a single cell: ligation of fibronectin receptors induces a reversible alteration in the function of complement receptors on cultured human monocytes, 1984, *J. Cell Biol.*, vol 99, p. 336-339.

228- Dustin, M.L., Springer, T.A., T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1, 1989, *Nature*, vol 341, p. 619-624.

229- Valmu, L., Autero, M., Siljander, P., Patarroyo, M., Gahmberg, C.G., Phosphorylation of the B-subunit of CD11/CD18 integrins by protein kinase C correlates with leukocyte adhesion, 1991, *Eur. J. Immunol.*, vol 21, p. 2857-2862.

230- Chatila, T.A., Geha, R.S., Arnaout, M.A., Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11/CD18 leukocyte adhesion molecules, 1989, *J. Cell Biol.*, vol 109, p. 3435-3444.

231- Buyon, J.P., Slade, S.G., Reibman, J., Abramson, S.B., Philips, M.R., Weissmann, G., Winchester, R., Constitutive and induced phosphorylation of the alpha- and beta-chains of the CD11/CD18 leukocyte integrin family. Relationship to adhesion-dependent functions, 1990, *J. Immunol.*, vol 144, p. 191-197.

- 232- Hibbs, M.L., Jakes, S., Staker, S.A., Wallace, R.W., Springer, T.A., The cytoplasmic domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen 1 B subunit : sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and phorbol ester-stimulated phosphorylation site, 1991, *J. Exp. Med.*, vol 174, p. 1227-1238.
- 233- Powell, W.S., Gravel, S., Halwani, F., Hii, C.S., Huang, Z.H., Tan, A-M., Ferrante, A., Effects of 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid on expression of CD11b, actin polymerisation and adherence in human neutrophils, 1997, *J. Immunol.*, vol 159, p. 2952-2959.
- 234- Burn, P., Kupfer, A., Singer, S.J., Dynamic membrane-cytoskeletal interactions : specific association of integrin and talin arises in vivo after phorbol ester treatment of peripheral blood lymphocytes, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol 85, p. 497-501.
- 235- Pardi, R., Inverardi, L., Rugarli, C., Bender, J.R., Antigen-receptor complex stimulation triggers protein kinase C-dependent CD11a/CD18-cytoskeleton association in T lymphocytes, 1992, *J. Cell Biol.*, vol 116, p. 1211-1220.
- 236- Smyth, S.S., Joneckis, C.C., Parise, L.V., Regulation of vascular integrins, 1993, *Blood*, vol 81, p. 2827-2843.
- 237- Phillips, D.R., Charo, I.F., Parise, L.V., Fitzgerald, L.A., The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex, 1988, *Blood*, vol 71, p. 831-843.
- 238- Lam, S.C-T., Isolation and characterization of a chymotryptic fragment of platelet glycoprotein IIb-IIIa retaining Arg-Gly-Asp binding activity, 1992, *J. Biol. Chem.*, vol 267, p. 5649-5655.
- 239- Fujimura, K., Phillips, D.R., Calcium cation regulation of glycoprotein IIb-IIIa complex formation in platelet plasma membrane, 1983, *J. Biol. Chem.*, vol 258, p. 10247-10252.

240- Kunicki, T.J., Pidard, D., Rosa, J-P., Nurden, A.T., The formation of Ca^{2+} -dependent complexes of platelet membrane glycoprotein IIb and IIIa in solution as determined by crossed immunoelectrophoresis, 1981, *Blood*, vol 58, p. 268-278.

241- Jennings, L.K., Phillips, D.R., Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-IIIa complex, 1982, *J. Biol. Chem.*, vol 257, p. 10458-10466.

242- Woods, V.L. Jr, Wolff, L.E., Keller, D.M., Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins, 1986, *J. Biol. Chem.*, vol 261, p. 15242-15251.

243- Wencel-Drake, J.D., Plow, E.F., Kunicki, T.J., Woods, V.I., Keller, D.M., Ginsberg, M.H., Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive response, 1986, *Am. J. Pathol.*, vol 124, p. 324-334.

244- Brass, L.F., Shattil, S.J., Kunicki, T.J., Bennett, J.S., Effect of calcium on the stability of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex, 1985, *J. Biol. Chem.*, vol 260, p. 7875-7881.

245- Fitzgerald, L.A., Phillips, D.R., Calcium regulation of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex, 1985, *J. Biol. Chem.*, vol 260, p. 11366-11374.

246- Rittenhouse-Simmons, S., Production of diglyceride from phosphatidylinositol in activated human platelets, 1979, *J. Clin. Invest.*, vol 63, p. 580-587.

247- Leung, N.L., Vickers, J.D., Kinlough-Rathbone, R.L., Reimers, H-J., Mustard, J.F., ADP-induced changes in [^{32}p]phosphate labeling of phosphatidylinositol-4,5-biphosphate in washed rabbit platelets made refractory by prior ADP stimulation, 1983, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol 113, p. 483-490.

- 248- Siess, W., Boehlig, B., Weber, P.C., Lapetina, E.G., Prostaglandin endoperoxide analogues stimulate phospholipase C and protein phosphorylation during platelet shape change, 1985, *Blood*, vol 65, p. 1141-1148.
- 249- Zhang, J., Zhang, J., Shattil, S.J., Cunningham, M.C., Rittenhouse, S.E., Phosphoinositide 3-kinase gamma and p85/phosphoinositide 3-kinase in platelets. Relative activation by thrombin receptor or β -phorbol myristate acetate and roles in promoting the ligand-binding function of $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin, 1996, *J. Biol. Chem.*, vol 271, p. 6265-6272.
- 250- Shattil, S.J., Brass, L.F., Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators, 1987, *J. Biol. Chem.*, vol 262, p. 992-1000.
- 251- Narumiya, S., The small GTPase Rho : cellular functions and signal transduction, *J. Biochem.*, 1996, vol 120, p. 215-228.
- 252- Hartwig, J.H., Kung, S., Kovacsovics, T., Janmey, P.A., Cantley, L.C., Stossel, T.P., Toker, A., D3 phosphoinositides and outside-in integrin signaling by glycoprotein IIb/IIIa mediate platelet actin assembly and filopodal extension induced by phorbol 12-myristate 13-acetate, 1996, *J. Biol. Chem.*, vol 271, p. 32986-32993.
- 253- Hillery, C.A., Smyth, S.S., Parise, L.V., Phosphorylation of human platelet glycoprotein IIIa (GPIIIa). Dissociation from fibrinogen receptor activation and phosphorylation of GPIIIa in vitro, 1991, *J. Biol. Chem.*, vol 266, p. 14663-14669 .
- 254- Morii, N., Teru-uchi, T., Tominaga, T., Kumagai, N., Kozaki, S., Ushikubi, F., Narumiya, S., A rho gene product in human blood platelets. II. Effects of the ADP-ribosylation by botulinum C3 ADP-ribosyltransferase on platelet aggregation, 1992, *J. Biol. Chem.*, vol 267, p. 20921-20926.
- 255- Kovacsovics, T.J., Bachelot, C., Toker, A., Vlahos, C.J., Duckworth, B., Cantley, L.C., Hartwig, J.H., Phosphoinositide 3-kinase inhibition spares actin assembly in activating platelets but reverses platelet aggregation, 1995, *J. Biol. Chem.*, vol 270, p. 11358-11366.

- 256- Hawiger, J., Parkinson, S., Timmons, S., Prostacyclin inhibits mobilisation of fibrinogen-binding sites on human ADP- and thrombin-treated platelets, 1980, *Nature*, vol 283, p. 195-197.
- 257- Phillips, D.R., Baughan, A.K., Fibrinogen binding to human platelet plasma membrane. Identification of two steps requiring divalent cations, 1983, *J. Biol. Chem.*, vol 258, p. 10240-10246.
- 258- Parise, L.V., Criss, A.B., Nannizzi, L., Wardell, M.R., Glycoprotein IIIa is phosphorylated in intact human platelets, 1990, *Blood*, vol 75, p. 2363-2368.
- 259- Shattil, S.J., Ginsberg, M.H., Brugge, J.S., Adhesive signaling in platelets, 1994, *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol 6, p. 695-704.
- 260- Schwartz, M.A., Schaller, M.D., Ginsberg, M.H., Integrins: emerging paradigms of signal transduction, 1995, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol 11, p. 549-599.
- 261- Du, X., Ginsberg, M.H., Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and platelet function, 1997, *Thromb. and Haemos.*, vol 78, p. 96-100.
- 262- Jang, Y., Lincoff, M., Plow, E.F., Topol, E.J., Cell adhesion molecules in coronary artery disease, 1994, *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol 24, p. 1591-1601.
- 263- Diacovo, T.G., de Fougères, A.R., Bainton, D.F., Springer, T.A., A functional integrin ligand on the surface of platelets : intercellular adhesion molecule-2, 1994, *J. Clin. Invest.*, vol 94 p. 1243-1251.
- 264- Hernandez-Caselles, T., Rubio, G., Campanero, M.R., del Pozo, M.A., Muro, M., Sanchez-Madrid, F., Aparicio, P., ICAM-3, the third LFA-1 counterreceptor, is a co-stimulatory molecule for both resting and activated T lymphocytes, 1993, *Eur. J. Immunol.*, vol 23, p. 2799-2806.

265- Cordell, J.L., Pulford, K., Turley, H., Jones, M., Micklem, K., Doussis, I.A., Tyler, X., Mayne, K., Gatter, K.C., Mason, D.Y., Cellular distribution of human leucocyte adhesion molecule ICAM-3, 1994, *J. Clin. Pathol.*, vol 47, p. 143-147.

266- Altieri, D.C., Agbanyo, F.R., Plescia, J., Ginsberg, M.H., Edgington, T.S., Plow, E.F., A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin MAC-1 (CD11b/CD18), 1990, *J. Biol. Chem.*, vol 265, p. 12119-12122.

267- Loike, J.D., Sodeik, B., Cao, L., Leucona, S., Weitz, J.I., Detmers, P.A., Wright, S.D., Silverstein, S.C., CD11c/CD18 on neutrophils recognize a domain at the N terminus of the A α chain of fibrinogen, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol 88, p. 1044-1048.

268- Hugli, T.E., Muller-Eberhard, H.J., Anaphylatoxins : C3a and C5a, 1978, *Adv. Immunol.*, vol 261, p. 1-53.

269- Glovsky, M.M., Hugli, T.E., Ishizaka, T., Lichtenstein, L.M., Erickson, B.W., Anaphylatoxin-induced histamine release with human leukocytes: studies of C3a leukocyte binding and histamine release, 1979, *J. Clin. Invest.*, vol 64, p. 804-811.

270- Altieri, D.C., Bader, R., Mannucci, P.M., Edgington, T.S., Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen, 1988, *J. Cell Biol.*, vol 107, p. 1893-1900.

271- Ruoslahti, E., Pierschbacher, M.D., New perspectives in cell adhesion : RGD and integrins, 1987, *Science*, vol 238, p. 491-496.

272- Wright, S.D., Reddy, P.A., Jong, M.T.C., Erickson, B.W., C3bi receptor (complement receptor type 3) recognizes a region of complement protein C3 containing the sequence Arg-Gly-Asp, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol 84, p. 1965-1968.

- 273- Taniguchi-Sidle, A., Isenmann, D.E., Mutagenesis of the Arg-Gly-Asp-triplet in human complement component C3 does not abolish binding of iC3b to the leukocyte integrin complement receptor type III (Cr3, CD11b/CD18), 1992, *J. Biol. Chem.*, vol 267, p. 635-643.
- 274- Collier, B.S., Platelets and thrombolytic therapy, 1990, *New Eng. J. Med.*, vol 322, p. 33-42.
- 275- Rainger, G.E., Fisher, A.C., Nash, G.B., Endothelial-borne platelet activating factor and interleukin-8 rapidly immobilize rolling neutrophils, 1997, *Am. J. Physiol.*, vol 272, p. H114-H122.
- 276- Kuijpers, T.W., Hakkert, B.C., Hart, M.H., Roos, D., Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: a role for platelet-activating factor and IL-8, 1992, *J. Cell Biol.*, vol 117, p. 565-572.
- 277- Rainger, G.E., Fisher, A., Shearman, C., Nash, G.B., Adhesion of flowing neutrophils to cultured endothelial cells after hypoxia and reoxygenation in vitro, 1995, *Am. J. Physiol.*, vol 269, p. H1398-H1406.
- 278- Springer, T.A., Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, 1994, *Cell*, vol 76, p. 301-314.
- 279- Schmid, E., Muller, T.M., Budzinski, R-M., Binder, K., Pfizenmaier, K., Signaling by E-selectin and ICAM-1 induces endothelial tissue factor production via autocrine secretion of platelet-activating factor and tumor necrosis factor α , 1995, *J. Interferon and Cytokine Res.*, vol 15, p. 819-825.
- 280- Crockett-Torabi, E., Sulenbarger, B., Smith, C.W., Fantone, J.C., Activation of human neutrophils through L-selectin and MAC-1 molecules, 1995, *J. Immunol.*, vol 154, p. 2291-2302.
- 281- Ng-Sikorski, J., Linden, L., Elerman, D., Franzen, L., Molony, L., Andersson, T., Engagement of L-selectin impairs the actin polymerizing capacity of β 2-integrins on neutrophils, 1996, *J. Cell Science*, vol 100, p. 2361-2369.

282- Gopalan, P.K., Smith, C.W., Lu, H., Berg, E.L., McIntire, L.V., Simon, S.I., Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin, 1997, *J. Immunol.*, vol 158, p. 367-375.

283- Taylor, A.D., Neelamegham, S., Hellums, J.D., Smith, C.W., Simon, S.I., Molecular dynamics of the transition from L-selectin- to β 2-integrin-dependent neutrophil adhesion under defined hydrodynamic shear, 1996, *Biophys. J.*, vol 71, p. 3488-3500.

284- Tsang, Y.T.M., Neelamegham, S., Hu, Y., Berg, E.L., Burns, A.R., Smith, C.W., Simon, S.I., Synergy between L-selectin signaling and chemotactic activation during neutrophil adhesion and transmigration, 1997, *J. Immunol.*, vol 159, p. 4566-4577.

285- Sheikh, S., Nash, G.B., Continuous activation and deactivation on integrin CD11b/CD18 during de novo expression enables rolling neutrophils to immobilize on platelets, 1996, *Blood*, vol 87, p. 5040-5050.

286- Kuijper, P.H.M., Torres, H.I.G., Lammers, J-W.J., Sixma, J.J., Koenderman, L., Zwaginga, J.J., Platelet and fibrin deposition at the damaged vessel wall : cooperative substrates for neutrophil adhesion under flow conditions, 1997, *Blood*, vol 89, p. 166-175.

287- Kuijper, P.H.M., Torres, H.I.J., van der Linden, J.A.M., Lammers, J-W.J., Sixma, J.J. Koenderman, L., Zwaginga, J.J., Platelet-dependent primary Hemostasis promotes selectin- and integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions, 1998, *Blood*, vol 87, p. 3271-3281.

288- Evangelista, V., Manarini, S., Rotondo, S., Martelli, N., Polischuk, R., McGregor, J.L., de Gaetano, G., Cerletti, C., Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions : evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the β 2 integrin CD11b/CD18, 1996, *Blood*, vol 88, p. 4183-4194.

- 289- Spangenberg, P., Redlich, H., Gergmann, I., Losche, W., Gotzrath, M., Kehrel, B., The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes, 1993, *Thromb. and Haemos.*, vol 70, p. 514-521.
- 290- Kroll, M.H., Harris, T.S., Moake, J.L., Handin, R.I., Schafer, A.I., von Willebrand factor binding to platelet GPIb initiates signals for platelet activation, 1991, *J. Clin. Invest.*, vol 88, p. 1568-1573.
- 291- Hantgan, R.R., Hindriks, G., Taylor, R.G., Sixma, J.J., de Groot, P., Glycoprotein Ib, von Willebrand factor and glycoprotein IIb-IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood, 1990, *Blood*, vol 76, p. 345-353.
- 292- Lefkovits, J., Plow, E.F., Topol, E.J., Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine, 1995, *New Eng. J. Med.*, vol 332, p. 1553-1559.
- 293- Oda, A., Yokoyama, K., Murata, M., Tokuhira, M., Nakamura, K., Handa, M., Watanabe, K., Ikeda, Y., Protein tyrosine phosphorylation in human platelets during shear stress-induced platelet aggregation (SIPA) is regulated by glycoprotein (GP) Ib/IX as well as GP IIb/IIIa and requires intact cytoskeleton and endogenous ADP, 1995, *Thromb. and Haemos.*, vol 74, p. 736-742.
- 294- Chow, T.W., Hellums, J.D., Moake, J.L., Kroll, M.H., Shear-stress-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib initiates calcium influx associated with aggregation, 1990, *Blood*, vol 80, p. 113-120.
- 295- Nachman, R.L., Leung, L.L., Complex formation of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa with fibrinogen, 1982, *J. Clin. Invest.*, vol 69, p. 263-269.
- 296- Ross, J.M., McIntire, L.V., Moake, J.L., Rand, J.H., Platelet adhesion and aggregation on human type VI collagen surfaces under physiologic flow conditions, 1995, *Blood*, vol 85, p. 1826-1835.

- 297- Savage, B., Saldivar, E., Ruggeri, Z.M., Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor, 1996, *Cell*, vol 84, p. 289-297.
- 298- Moroi, M., Jung, S.M., Shinmyozu, K., Tomiyama, Y., Ordinas, A., Diaz-Ricart, M., Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions : the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion, 1996, *Blood*, vol 88, p. 2081-2092.
- 299- Endenburg, S.C., Hantgan, R.R., Lindeboom-Blokzijl, L., Lankhof, H., Jerome, W.G., Lewis, J.C., Sixma, J.J., de Groot, P.G., On the role of von Willebrand factor in promoting platelet adhesion to fibrin in flowing blood, 1995, *Blood*, vol 86, p. 4158-4165.
- 300- Gralnick, H.R., Kramer, W.S., McKeown, L.P., Garfinkel, L., Pinot, A., Williams, S.B., Krutzsch, H., Platelet adhesion at high shear rates : the roles of von Willebrand factor/GPIb and the β_1 integrin $\alpha_2\beta_1$, 1996, *Thromb. Res.*, vol 81, p. 113-119.
- 301-Moroi, M., Jung, S.M., Nomura, S., Sekiguchi, S., Ordinas, A., Diaz-Ricart, M., Analysis of the involvement of the von Willebrand factor-glycoprotein Ib interaction in platelet adhesion in collagen-coated surface under flow conditions, 1997, *Blood*, vol 90, p. 4413-4424.
- 302- Lynam, E.B., Rogelj, S., Edwards, B.S., Sklar, L.A., Enhanced aggregation of human neutrophils by $MnCl_2$ or DTT differentiates the roles of L-selectin and β_2 -integrins, 1996, *J. Leukoc. Biol.*, vol 60, p. 356-364.
- 303- Bennett, J.S., Vilaire, G., Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine, 1979, *J. Clin. Invest.*, vol 64, p. 1393-1401.
- 304- Marguerie, G.A., Plow, E.F., Edgington, T.S., Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen, 1979, *J. Biol. Chem.*, vol 254, p. 5357-5363.
- 305- Peerschke, E.I., Zucker, M.B., Grant, R.A., Egan, J.J., Johnson, M.M., Correlation between fibrinogen binding to human platelets and platelet aggregability, 1980, *Blood*, vol 55, p. 841-847.

- 306- Caen, J.P., Castaldi, P.A., Leclerc, J.C., Inceman, S., Larrieu, M.J., Probst, M., Bernard, J., Congenital bleeding disorders with long bleeding time and normal platelet count. I Glanzmann's thrombasthenia (report of fifteen patients), 1966, *Am. J. Med.*, vol 41, p.4-24.
- 307- Phillips, D.R., Agin, P.P., Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthenia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins, 1977, *J. Clin. Invest.*, vol 60, p.535-545.
- 308- Nurden, A.T., Rosa, J.P., Fournier, D., Legrand, C., Didry, D., Parquet, A., Pidard, D., A variant of Glanzmann's thrombasthenia with abnormal glycoprotein IIb-IIIa complexes in the platelet membrane, 1987, *J. Clin. Invest.*, vol 79, p. 962-969.
- 309- Ginsberg, M.H., Lightsey, A., Kunicki, T.J., Kaufmann, A., Marguerie, G., Plow, E.F., Divalent cation regulation of the surface orientation of platelet membrane glycoprotein IIb. Correlation with fibrinogen binding function and definition of a novel variant of Glanzmann's thrombasthenia, 1986, *J. Clin. Invest.*, vol 78, p. 1103-1111.
- 310- Bennett, J.S., Vilaire, G., Cines, D.B., Identification of the fibrinogen receptor on human platelets by photoaffinity labeling, 1982, *J. Biol. Chem.*, vol 257, p. 8049-8054.
- 311- Collier, B.S., Peerschke, E.I., Scudder, L.E., Sullivan, C.A., A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa, 1983, *J. Clin. Invest.*, vol 72, p. 325-338.
- 312- Bennett, J.S., Hoxie, J.A., Leitman, S.F., Vilaire, G., Cines, D.B., Inhibition of fibrinogen binding to stimulated human platelets by a monoclonal antibody, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 80, p. 2417-2421.

- 313- McEver, R.P., Bennett, E.M., Martin, M.N., Identification of two structurally and functionally distinct sites on human platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa using monoclonal antibodies, 1983, *J. Biol. Chem.*, vol 258, p. 5269-5275.
- 314- Parise, L.V., Phillips, D.R., Reconstitution of the purified platelet fibrinogen receptor. Fibrinogen binding properties of the glycoprotein IIb-IIIa complex, 1985, *J. Biol. Chem.*, vol 260, p. 10698-10707.
- 315- Nachman, R.L., Leung, L.L., Kloczewiak, M., Hawiger, J., Complex formation of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa with the fibrinogen D domain, 1984, *J. Biol. Chem.*, vol 259, p. 8584-8588.
- 316- Steele, P.M., Chesebro, J.H., Stanson, A.W., Holmes, D.R., Dewanjee, M.K., Badimon, L., Fuster, V., Balloon angioplasty. Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model, 1985, *Circ. Res.*, vol 57, p. 105-112.
- 317- Neumann, F-J., Ott, I., Gawaz, M., Puchner, G., Schomig, A., Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty, 1996, *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol 27, p. 819-824.
- 318- Serrano, C.V., Ramires, J.A.F., Venturelli, M., Arie, S., D'Amico, E., Zweier, J.L., Pileggi, F., Da Luz, P.L., Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression, 1997, *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol 29, p. 1276-1283.
- 319- Entman, M.L., Ballantyne, C.M., Association of neutrophils with platelet aggregates in unstable angina, 1996, *Circulation*, vol 94, p. 1206-1208.
- 320- Ott, I., Neumann, F-J., Gawaz, M., Schmitt, M., Schomig, A., Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina, 1996, *Circ.*, vol 94, p. 1239-1246.

321- Furman, M.I., Benoit, S.E., Barnard, M.R., Valeri, C.R., Borbone, M.L., Becker, R.C., Hechtman, H., Michelson, A.D., Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease, 1998, *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol 31, p. 352-358.

322- Moon, D.G., van der Zee, H., Weston, L.K., Gudewicz, P.W., Fenton, J.W., Kaplan, J.E., Platelet modulation of neutrophil superoxide anion production, 1990, *Thromb. and Haemos.*, vol 63, p. 91-96.

323- Bengtsson, T., Zalavary, S., Stendahl, O., Grenegard, M., Release of oxygen metabolites from chemoattractant-stimulated neutrophils is inhibited by resting platelets : role of extracellular adenosine and actin polymerisation, 1996, *Blood*, vol 87, p. 4411-4423.

324- Nagata, K., Tsuji, T., Todoroki, N., Katagiri, Y., Tanoue, K., Yamazaki, H., Hanai, N., Irimura, T., Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62), 1993, *J. Immunol.*, vol 151, p. 3267-3273.

325- Ruf, A., Schlenk, R.F., Maras, A., Morgenstern, E., Patscheke, H., Contact-induced neutrophil activation by platelets in human cell suspensions and whole blood, 1992, *Blood*, vol 80, p. 1238-1246.

326- Deuel, T.F., Senior, R.M., Huang, J.S., Griffin, G.L., Chemotaxis of monocyte and neutrophils to platelet-derived growth factor, 1982, *J. Clin. Invest.*, vol 69, p. 1046-1049.

327- Deuel, T.F., Senior, R.M., Chang, D., Griffin, G.L., Heinrikson, R.L., Kaiser, E.T., Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes, 1981, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, vol 78, p. 4584-4587.

328- Fretland, D.J., Widomski, D.L., Zemaitis, J.M., Tsai, B.S., Djuric, S.W., Penning, T.D., Miyashiro, J.M., Bauer, R.F., 12(R)-hydroxyeicosatetraenoic acid is a neutrophil chemoattractant in the cavine, lapine, murine and canine dermis, 1989, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, vol 37, p. 79-81.

- 329- Rhee, B-G., Hall, E.R., McIntire, L.V., Platelet modulation of polymorphonuclear leukocyte shear induced aggregation, 1986, *Blood*, vol 67, p. 240-246.
- 330- Del Maschio, A., Bazzoni, G., Dejana, E., Polymorphonuclear leukocyte adhesion to endothelial cells is inhibited by resting platelets, 1992, *Arterioscler. Thromb.*, vol 12, p. 1420-1427.
- 331- Godin, C., Caprani, A., Dufaux, J., Flaud, P., Interactions between neutrophils and endothelial cells, 1993, *J. Cell Sci.*, vol 106, p. 441-451.
- 332- Redl, H., Hammerschmidt, D.E., Schlag, G., Augmentation by platelets of granulocyte aggregation in response to chemotaxins : studies utilizing an improved cell preparation technique, 1983, *Blood*, vol 61, p. 125-131.
- 333- Forslid, J., Hed, J., Stendhal, O., Erythrocyte enhancement of C3b-mediated phagocytosis by human neutrophils in vitro : a combined effect of the erythrocyte complement receptors CR1 and erythrocyte scavengers to reactive oxygen metabolites (ROM), 1985, *Immunol.*, vol 35, p. 97-103.
- 334- Pratico, D., Iuliano, L., Alessandri, C., Camastra, C., Violi, F., Polymorphonuclear leukocyte-derived O₂-reactive species activate primed platelets in human whole blood, 1993, *Am. J. Physiol.*, vol 264, p. H1582-H1587.
- 335- Handin, R.I., Karabin, R., Boxer, G.J., Enhancement of platelet function by superoxide anion, 1977, *J. Clin. Invest.*, vol 59, p. 959-965.
- 336- Clark, R.A., Klebanoff, S.J., Neutrophil-platelet interactions mediated by myeloperoxidase and hydrogen peroxide, 1980, *J. Immunol.*, vol 124, p. 399-405.
- 337- Chignard, M., Selak, M.A., Smith, J.B., Direct evidence for the existence of a neutrophil-derived platelet activator (neutrophilin), 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 83, p. 8609-8613.

338- Francis, C.W., Marder, V.J., Degradation of cross-linked fibrin by human leukocyte proteases, 1986, *J. Lab. Clin. Med.*, vol 107, p. 342-352.

339- Gadek, J.E., Fells, G.A., Wright, D.G., Crystal, R.G., Human neutrophil elastase functions as a type III collagen collagenase, 1980, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol 95, p. 1818-1822.

340- Pipoly, D.J., Crouch, E.C., Degradation of native type IV procollagen by human neutrophil elastase. Implications for leukocyte-mediated degradation of basement membrane, 1987, *Biochem.*, vol 26, p. 5748-5754.

341- McDonald, J.A., Kelley, D.G., Degradation of fibronectin by human leukocyte elastase. Release of biologically active fragments, 1980, *J. Biol. Chem.*, vol 255, p. 8848-8858.

342- Mainardi, C.L., Dixit, S.N., Kang, A.H., Degradation of type IV (basement membrane) collagen by a proteinase isolated from human polymorphonuclear leukocyte granules, 1980, *J. Biol. Chem.*, vol 255, p. 5435-5441.

343- Mainardi, C.L., Hasty, D.L., Seyer, J.M., Kang, A.H., Specific cleavage of human type III collagen by human polymorphonuclear leukocyte elastase, 1980, *J. Biol. Chem.*, vol 255, p. 12006-12010.

344- Brozna, J.P., Senior, R.M., Kreutzer, D.L., Ward, P.A., Chemotactic factor inactivators of human granulocytes, 1977, *J. Clin. Invest.*, vol 60, p. 1280-1288.

345- Taylor, J.C., Crawford, I.P., Hugli, T.E., Limited degradation of the third component (C3) of human complement by human leukocyte elastase (HLE) : partial characterization of C3 fragments, 1977, *Biochem.*, vol 16, p. 3390-3396.

346- Orr, F.W., Varani, J., Kreutzer, D.L., Senior, R.M., Ward, P.A., Digestion of the fifth component of the complement by leukocyte enzymes. Sequential generation of chemotactic activities for leukocytes and for tumor cells, 1979, *Am. J. Pathol.*, vol 94, p. 75-84.

- 347- Brower, M.S., Walz, D.A., Garry, K.E., Fenton, J.W., Human neutrophil elastase alters human a-thrombin function : limited proteolysis near the γ -cleavage site results in decreased fibrinogen clotting and platelet-stimulatory activity, 1987, *Blood*, vol 69, p. 813-819.
- 348- Boudier, C., Holle, C., Bieth, J.G., Stimulation of the elastolytic activity of leukocyte elastase by leukocyte cathepsin G, 1981, *J. Biol. Chem.*, vol 256, p. 10256-10258.
- 349- Peterson, M.W., Neutrophil cathepsin G increases transendothelial albumin flux, 1989, *J. Lab. Clin. Med.*, vol 113, p. 297-308.
- 350- Vartio, T., Seppa, H., Vaheri, A., Susceptibility of soluble and matrix fibronectins to degradation by tissue proteinases, mast cell chymase and cathepsin G, 1981, *J. Biol. Chem.*, vol 256, p. 471-477.
- 351- Snyder, R.A., Kaempfer, C.E., Wintroub, B.U., Chemistry of a human monocyte-derived cell line (U937) : identification of the angiotensin 1-converting activity as leukocyte cathepsin G, 1985, *Blood*, vol 65, p.176-182.
- 352- Rochat, T., Casale, J., Hunninghake, G.W., Peterson, M.W., Neutrophil cathepsin G increases permeability of cultured type II pneumocytes, 1988, *Am. J. Physiol.*, vol 255, p. C603-C611.
- 353- Si-Tahar, M., Pidard, D., Balloy, V., Moniatte, M., Kieffer, N., van Dorsselaer, A., Chignard, M., Human neutrophil elastase proteolytically activates the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ through cleavage of the carboxyl terminus of the α_{IIb} subunit heavy chain, 1997, *J. Biol. Chem.*, vol 272, p. 11636-11647.
- 354- Renesto, P., Chignard, M., Enhancement of cathepsin G-induced platelet activation by leukocyte elastase : consequence for the neutrophil-mediated platelet activation, 1993, *Blood*, vol 82, p. 139-144.

- 355- Ferrer-Lopez, P., Renesto, P., Schattner, M., Bassot, S., Laurent, P., Chignard, M., Activation of human platelets by C5a-stimulated neutrophils : a role for cathepsin G, 1990, *Am. J. Physiol.*, vol 258, p. C1100-C1107.
- 356- Del Mashio, A., Evangelista, V., Rajtar, G., Chen, Z.M., Cerletti, C., De Gaetano, G., Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes exposed to chemotactic agents, 1990, *Am. J. Physiol.*, vol 258, p. H870-H879.
- 357- Cohen, A.B., Stevens, M.D., Miller, E.J., Atkinson, M.A.L., Mullenbach, G., Generation of the neutrophil-activating peptide-2 by cathepsin G and cathepsin G-treated human platelets, 1992, *Am. J. Physiol.*, vol 263, p. L249-L256.
- 358- Molino, M., Di Lallo, M., Martelli, N., de Gaetano, G., Cerletti, C., Effects of leukocyte-derived cathepsin G on platelet membrane glycoprotein Ib-IX and IIb-IIIa complexes : a comparison with thrombin, 1993, *Blood*, vol 82, p. 2442-2451.
- 359- LaRosa, C.A., Rohrer, M.J., Benoit, S.E., Barnard, M.R., Michelson, A.D., Neutrophil cathepsin G modulates the platelet surface expression of the glycoprotein (GP) Ib-IX complex by proteolysis of the von Willebrand factor binding site on GPIb α and by cytoskeletal-mediated redistribution of the remainder of the complex, 1994, *Blood*, vol 84, p. 158-168.
- 360- Cerletti, C., Evangelista, V., Molino, M., de Gaetano, G., Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes : role of cathepsin G and P-selectin, 1995, *Thromb. and Haemos.*, vol 74, p. 218-223.
- 361- Molino, M., Di Lallo, M., de Gaetano, G., Cerletti, C., Platelet protein kinase C (PKC) activation by neutrophil derived cathepsin G, 1993, *Thromb. and Haemos.*, vol 69, p. 1163.
- 362- Schattner, M.A., Geffner, J.R., Isturiz, M.A., Lazzari, M.A., Inhibition of human platelet activation by polymorphonuclear leukocytes, 1990, *Br. J. Pharmacol.*, vol 101, p. 253-256.

- 363- Zatta, A., Prosdocimi, M., Bertele, V., Bazzoni, G., del Mashio, A., Inhibition of platelet function by polymorphonuclear leukocytes, 1990, *J. Lab. Clin. Med.*, vol 116, p. 651-660.
- 364- Salvemini, D., De Nucci, G., Gryglewski, R.J., Vane, J.R., Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 86, p. 6328-6332.
- 365- McCall, T.B., Boughton-Smith, N.K., Palmer, R.M.J., Whittle, B.J.R., Moncada, S., Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils : release and interaction with superoxide anion, 1989, *Biochem. J.*, vol 261, p. 293-296.
- 366- Goetzl, E.J., Mediators of immediate hypersensitivity derived from arachidonic acid, 1980, *New Engl. J. Med.*, vol 303, p. 822-825.
- 367- Serhan, C.N., Radin, A., Smolen, J.E., Korchak, H., Samuelsson, B., Weissmann, G., Leukotriene B₄ is a complete secretagogue in human neutrophils: a kinetic analysis, 1982, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol 107, p. 1006-1012.
- 368- Lindgren, J.A., Hansson, G., Samuelsson, B., Formation of novel hydroxylated eicosatetraenoic acids in preparations of human polymorphonuclear leukocytes, 1981, *FEBS Lett.*, vol 128, p. 329-335.
- 369- Dahlen, S.E., Bjork, J., Hedqvist, P., Arfors, K.E., Hammarstrom, S., Lindgren, J.A., Samuelsson, B., Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 78, p. 3887-3891.
- 370- Peck, M.J., Piper, P.J., Williams, T.J., The effect of leukotrienes C₄ and D₄ on the microvasculature of guinea-pig skin, 1981, *Prostaglandins*, vol 21, p. 315-321.

371- Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V., Shipley, M.E., Smith, M.J., Leukotriene B₂, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes, 1980, *Nature*, vol 286, p. 264-265.

372- Lewis, R.A., Austen, K.F., Mediation of local homeostasis and inflammation by leukotrienes and other mast cell-dependent compounds, 1981, *Nature*, vol 293, p. 103-108.

373- Marcus, A.J., Broekman, M.J., Safier, L.B., Ullman, H.L., Islam, N., Formation of leukotrienes and other hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro, 1982, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, vol 109, p. 130-137.

374- Maclouf, J.A., Murphy, R.C., Transcellular metabolism of neutrophil-derived leukotriene A₄ by human platelets : a potential cellular source of leukotriene C₄, 1988, *J. Biol. Chem.*, vol 263, p. 174-181.

375- Tornhamre, S., Sjolinder, M., Lindberg, A., Ericsson, I., Nasman-Glaser, B., Griffiths, W.J., Lindgren, J.A., Demonstration of leukotriene-C₄ synthase in platelets and species distribution of the enzyme activity, 1998, *Eur. J. Biochem.*, vol 251, p. 227-235.

376- Maclouf, J., Folco, G., Patrono, C., Eicosanoids and iso-eicosanoids : constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease, 1998, *Thromb. and Haemos.*, vol 79, p. 691-705.

377- Maugeri, N., Evangelista, V., Piccardoni, P., Dell'Elba, G., Celardo, A., de Gaetano, G., Cerletti, C., Transcellular metabolism of arachidonic acid: increased platelet thromboxane generation in the presence of activated polymorphonuclear leukocytes, 1992, *Blood*, vol 80, p. 447-451.

378- Sala, A., Bolla, M., Zarini, S., Muller-Peddinghaus, R., Folco, G., Release of leukotriene A₄ versus leukotriene B₄ from human polymorphonuclear leukocytes, 1996, *J. Biol. Chem.*, vol 271, p. 17944-17948.

- 379- McGee, J.E., Fitzpatrick, F.A., Erythrocyte-neutrophil interactions: formation of leukotriene B₄ by transcellular biosynthesis, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 83, p. 1349-1353.
- 380- Evangelista, V., Rajtar, G., De Gaetano, G., White, J.G., Cerletti, C., Platelet activation by fMLP-stimulated polymorphonuclear leukocytes: the activity of cathepsin G is not prevented by antiproteinases, 1991, Blood, vol 77, p. 2379-2388.
- 381- Evangelista, V., Piccardoni, P., White, J.G., De Gaetano, G., Cerletti, C., Cathepsin-G-dependent platelet stimulation by activated polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by antiproteinases : role of P-selectin-mediated cell-cell adhesion, 1993, Blood, vol 81, p. 2947-2957.
- 382- Maugeri, N., Evangelista, V., Celardo, A., Dell'Elba, G., Martelli, N., Piccardoni, P., de Gaetano, G., Cerletti, C., Polymorphonuclear leukocyte-platelet interaction: role of P-selection in thromboxane B₂ and leukotriene C₄ cooperative synthesis, 1994, Thromb. Haemost., vol 72, p. 450-456.
- 383- Ilton, M.K., Taylor, M.L., Misso, N.L.A., Thompson, P.J., Hung, J., Neutrophil cathepsin G modulates platelet P-selectin expression and inhibits P-selectin-mediated platelet-neutrophil adhesion, 1998, Clin. Sci., vol 94, p. 437-445.
- 384- Brady, H.R., Serhan, C.N., Adhesion promotes transcellular leukotriene biosynthesis during neutrophil-glomerular endothelial cell interactions: inhibition by antibodies against CD18 and L-selectin, 1992, Biochem. Biophys. Res. Commun., vol 186, p. 1307-1314.
- 385- Field, E.J., MacLeod, I., Platelet adherence to polymorphs, 1963, Br. Med. J., p.388-389.
- 386- Greipp, P.R., Gralnick, H.R., Platelet to leukocyte adherence phenomena associated with thrombocytopenia, 1976, Blood, vol 47, vol p. 513-521.
- 387- Prchal, J.T., Blakely, J., Granulocyte platelet rosettes, 1973, New Engl. J. Med., vol 289, p. 1146.

- 388- Kjeldsberg, C.R., Swanson, J., Platelet satellitism, 1974, *Blood*, vol 43, p. 831-836.
- 389- Bauer, H.M., In-vitro platelet-neutrophil adherence, 1975, *Am. J. Clin. Pathol.*, vol 63, p. 824-827.
- 390- Yoo, D., Weems, H., Lessin, L.S., Platelet to leukocyte adherence phenomena, 1982, *Acta Haematol.*, vol 68, p. 142-148.
- 391- Jungi, T.W., Spycher, M.O., Nydegger, U.E., Barandun, S., Platelet-Leukocyte interaction : selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes and related cell lines, 1986, *Blood*, vol 67, p. 629-636.
- 392- Christopoulos, C., Mattock, C., Platelet satellitism and α granule proteins, 1991, *J. Clin. Pathol.*, vol 44, p. 788-789.
- 393- Larsen, E., Celi, A., Gilbert, G.E., Furie, B.C., Erban, J.K., Bonfanti, R., Wagner, D.D., Furie, B., PADGEM protein : a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes, 1989, *Cell*, vol 59, p. 305-312.
- 394- Hamburger, S.A., McEver, R.P., GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils, 1990, *Blood*, vol 75, p. 550-554.
- 395- Dembinska-Kiec, A., Zmuda, A., Wenhryniewicz, O., Stachura, J., Peskar, B.A., Gryglewski, R.J., Selectin-P-mediated adherence of platelets to neutrophils is regulated by prostanoids and nitric oxide, 1993, *Int. J. Tiss. Reac.*, vol 15, p. 55-64.
- 396- Estensen, R.D., Hill, H.R., Quie, P.G., Gogan, N., Goldberg, N.D., Cyclic GMP and cell movement, 1973, *Nature*, vol 245, p. 458-460.
- 397- Sandler, J.A., Gallin, J.I., Vaughan, M., Effects of serotonin, carbamylcholine, and ascorbic acid on leukocyte cyclic GMP and chemotaxis, 1975, *J. Cell Biol.*, vol 67, p. 480-484.

- 398-Kaplan, S.S., Billiar, T., Curran, R.D., Zdziarski, U.E., Simmons, R.L., Basford, R.E., Inhibition of chemotaxis Ng-monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP, 1989, *Blood*, vol 74, p. 1885-1887.
- 399- Appelboom, T., Gortz, R., Modulation of polymorphonuclear cell adherence by cyclic nucleotides, 1984, *Agents Actions*, vol 15, p.98.
- 400- Spagnuolo, P.J., Ellner, J.J., Hassid, A., Dunn, M.J., Mediation of augmented monocyte adhesiveness by thromboxane, 1988, *Inflammation*, vol 12, p. 1-9.
- 401- Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D.N., Nitric oxide : an endogenous modulator of leukocyte adhesion, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol 88, p. 4651-4655.
- 402- Doré, M., Platelet-leukocyte interactions, 1998, *Am. Heart J.*, vol 135, p. S146-S151.
- 403- Brown, K.K., Henson, P.M., Maclouf, J., Moyle, M., Ely, J.A., Worthen, G.S., Neutrophil-platelet adhesion : relatives roles of platelet P-selectin and neutrophil β_2 (CD18) integrins, 1998, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol 18, p. 100-110.
- 404- Spangenberg, P., Adhesion of activated platelets to polymorphonuclear leukocytes, 1994, *Thromb. Res.*, vol 74, p. S35-S44.
- 405- Redlich, H., Vickers, J., Losche, W., Heptinstall, S., Kehrel, B., Spangenberg, P., Formation of platelet-leukocyte conjugates in whole blood, 1997, *Platelets*, vol 8, p. 419-425.
- 406- Silverstein, R.L., Leung, L.L., Nachman, R.L., Thrombospondin: a versatile multifunctional glycoprotein, 1986, *Arterioscler.*, vol 6, p. 245-253.
- 407- Hagen, I., Effects of thrombin on washed, human platelets: changes in the subcellular fractions, 1975, *Biochim. Biophys. Acta.*, vol 392, p. 242-254.

408- Leung, L.L., Role of thrombospondin in platelet aggregation, 1984, *J. Clin. Invest.*, vol 74, p. 1764-1772.

409- Mosher, D.F., Doyle, M.J., Jaffe, E.A., Synthesis and secretion of thrombospondin by cultured human endothelial cells, 1982, *J. Cell. Biol.*, vol 93, p. 343-348.

410- Jaffe, E.A., Ruggiero, J.T., Leung, L.K., Doyle, M.J., McKeown-Longo, P.J., Mosher, D.F., Cultured human fibroblasts synthesize and secrete thrombospondin and incorporate it into extracellular matrix, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 80, p. 998-1002.

411- Raugi, G.J., Mumby, S.M., Abbott-Brown, D., Bornstein, P., Thrombospondin: synthesis and secretion by cells in culture, 1982, *J. Cell Biol.*, vol 95, p. 351-354.

412- Jaffe, E.A., Ruggiero, J.T., Falcone, D.J., Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin, 1985, *Blood*, vol 65, p. 79-84.

413- Kreis, C., La Fleur, M., Menard, C., Paquin, R., Beaulieu, A.D., Thrombospondin and fibronectin are synthesized by neutrophils in human inflammatory joint disease and in a rabbit model of in vivo neutrophil activation, 1989, *J. Immunol.*, vol 143, p. 1961-1968.

414- Wight, T.N., Raugi, G.J., Mumby, S.M., Bornstein, P., Light microscopic immunolocalization of thrombospondin in arterial thrombi, 1983, *J. Histochem. Cytochem.*, vol 33, p. 291-302.

415- Perlman, S.B., Felts, J.D., Hammer, R.J., Besozzi, M.C., Moser, D.F., Accumulation of I-131 labeled thrombospondin in arterial thrombi, 1985, *Thromb. And Haemost.*, vol 54, p. 1562a.

416- Lawler, J.W., Slayter, H.S., Coligan, J.E., Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets, 1978, *J. Biol. Chem.*, vol 253, p. 8609-8616.

- 417- Jaffe, E.A., Leung, L.L., Nachman, R.L., Levin, R.I., Mosher, D.F., Thrombospondin is the endogenous lectin of human platelets, 1982, *Nature*, vol 295, p. 246-248.
- 418- Silverstein, R.L., Nachman, R.L., Thrombospondin binds to monocytes-macrophages and mediates platelet-monocyte adhesion, 1987, *J. Clin. Invest.*, vol 79, p. 867-874.
- 419- Lawler, J., Hynes, R.O., The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins, 1986, *J. Cell Biol.*, vol 103, p. 1635-1648.
- 420- Pierschbacher, M.D., Rouslahti, E., Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic ragments of the molecule, 1984, *Nature*, vol 309, p. 30-33.
- 421- Wolff, R., Plow, E.F., Ginsberg, M.H., Interaction of thrombospondin with resting and stimulated human platelets, 1986, *J. Biol. Chem.*, vol 261, p. 6840-6846.
- 422- Leung, L.L., Nachman, R.L., Complex formation of platelet thrombospondin with fibrinogen, 1982, *J. Clin. Invest.*, vol 70, p. 542-549.
- 423- Plow, E.F., McEver, R.P., Collier, B.S., Woods, V.L. Jr, Marguerie, G.A., Ginsberg, M.H., Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets, 1985, *Blood*, vol 66, p. 724-727.
- 424- Silverstein, R.L., Asch, A.S., Nacham, R.L., Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion, 1989, *J. Clin. Invest.*, vol 84, p. 546-552.
- 425- Phillips, D.R., Agin, P.P., Platelet plasma membrane glycoproteins. Evidence for the presence of nonequivalent disulfide bonds using nonreduced-reduced two-dimensional gel electrophoresis, 1977, *J. Biol. Chem.*, vol 252, p. 2121-2126.

- 426- McGregor, J.L., Clemetson, K.J., James, E., Capitanio, A., Greenland, T., Luscher, E.F., Dechavanne, M., Glycoproteins of platelet membranes from Glanzmann's thrombasthenia. A comparison with normal using carbohydrate-specific or protein-specific labelling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis, 1981, *Eur. J. Biochem.*, vol 116, p. 379-388.
- 427- Murphy-Ullrich, J.E., Mosher, D.F., Interactions of thrombospondin with endothelial cells: receptor-mediated binding and degradation, 1987, *J. Cell Biol.*, vol105, p. 1603-1611.
- 428- Roberts, D.D., Haverstick, D.M., Dixit, V.M., Frazier, W.A., Santoro, S.A., Ginsburg, V., The platelet glycoprotein thrombospondin binds specifically to sulfated glycolipids, 1985, *J. Biol. Chem.*, vol 260, p. 9405-9411.
- 429- Roberts, D.D., Interactions of thrombospondin with sulfated glycolipids and proteoglycans of human melanoma cells, 1988, *Cancer Res.*, vol 48, p. 6785-6793 .
- 430- Roberts, D.D., Sherwood, J.A., Ginsburg, V., Platelet thrombospondin mediates attachment and spreading of human melanoma cells, 1987, *J. Cell Biol.*, vol 104, p. 131-139.
- 431- Taraboletti, G., Roberts, D.D., Liotta, L.A., Thrombospondin-induced tumor cell migration: haptotaxis and chemotaxis are mediated by different molecular domains, 1987, *J. Cell Biol.*, vol 105, p. 2409-2415.
- 432- Majack, R.A., Cook, S.C., Bornstein, P., Platelet-derived growth factor and heparin-like glycosaminoglycans regulate thrombospondin synthesis and deposition in the matrix by smooth muscle cells, 1985, *J. Cell Biol.*, vol 101, p. 1059-1070.
- 433- McKeown-Longo, P.J., Hanning, R., Mosher, D.F., Binding and degradation of platelet thrombospondin by cultured fibroblasts, 1984, *J. Cell Biol.*, vol 98, p. 22-28.

- 434- Dixit, V.M., Haverstick, D.M., O'Rourke, K.M., Hennessy, S.W., Grant, G.A., Santoro, S.A., Frazier, W.A., A monoclonal antibody against human thrombospondin inhibits platelet aggregation, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 82, p. 3472-3476.
- 435- Suchard, S.J., Boxer, L.A., Dixit, V.M., Activation of human neutrophils increases thrombospondin receptor expression, 1991, J. Immunol., vol 147, p. 651-659.
- 436- Suchard, S.J., Burton, M.J., Stoehr, S.J., Thrombospondin receptor expression in human neutrophils coincides with the release of a subpopulation of specific granules, 1992, Biochem. J., vol 284, p. 513-520.
- 437- Agbanyo, F.R, Sixma, J.J., de Groot, P.G., Languino, L.R., Plow, E.F., Thrombospondin-platelet interactions : role for divalent cations, wall shear rate, and platelet membrane glycoproteins, 1993, J. Clin. Invest., vol 92, p. 288-296.
- 438- Ravetch, J.V., Kinet, J.P., Fc receptors, 1991, Annu. Rev. Immunol., vol 9, p. 457-492.
- 439- van de Winkel, J.G., Capel, P.J., Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications, 1993, Immunol. Today, vol 14, p. 215-221.
- 440- Huizinga, T.W.J., de Haas, M., Kleijer, M., Nuijens, J.H., Roos, D., von dem Borne, A.E.G.Kr., Soluble Fc γ receptor III in human plasma originates from release by neutrophils, 1990, J. Clin. Invest., vol 86, p. 416-423.
- 441- Sullam, P.M., Hyun, W.C., Szöllösi, J., Dond, J-F., Foss, W.M., Lopez, J.A., Physical proximity and functional interplay of the glycoprotein Ib-IX-V complex and the Fc receptor FC γ RIIA on the platelet plasma membrane, 1998, J. Biol. Chem., vol 273, p. 5331-5336.

- 442- Vely, F., Gruel, N., Moncuit, J., Cochet, O., Rouard, H., Dare, S., Galon, J., Sautes, C., Fridman, W-H., Teillaud, J-L., A new set of monoclonal antibodies against human Fc γ RII (CD32) and Fc γ RIII (CD16) : characterization and use in various assays, 1997, *Hybridoma*, vol 16, p. 519-528.
- 443- Richard, S., Shaw, A.S., Showell, H.J., Connelly, P.A., The role of individual Fc γ receptors in aggregated IgG-stimulated protein tyrosine phosphorylation in the human neutrophil, 1994, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, vol 189, p. 653-661.
- 444- Ware, J., Molecular analyses of the platelet glycoprotein Ib-IX-V, 1998, *Thromb. Haemos.*, vol 79, p. 466-478.
- 445- Chong, B.H., Fawaz, I., Chesterman, C.N., Berndt, M.C., Heparin-induced thrombocytopenia: mechanism of interaction of the heparin-dependent antibody with platelets, 1989, *Br. J. Haematol.*, vol 73, p. 235-240.
- 446- Adelman, B., Sobel, M., Fujimura, Y., Ruggeri, Z.M., Zimmerman, T.S., Heparin-associated thrombocytopenia: observations on the mechanism of platelet aggregation, 1989, *J. Lab. Clin. Med.*, vol 113, p. 204-210.
- 447- Zeigler, Z., In vitro granulocyte-platelet rosette formation mediated by an IgG immunoglobulin, 1974, *Haemostasis*, vol 3, p. 282-287.
- 448- Bizzaro, N., Platelet satellitosis to polymorphonuclears : cytochemical, immunological, and ultrastructural characterization of eight cases, 1991, *Am. J. Hematol.*, vol 36, p. 235-242.
- 449- Alonso, A., Bayon, Y., Mateos, J.J., Crespo, M.S., Signaling by leukocyte chemoattractant and Fc γ receptors in immune-complex tissue injury, 1998, *Lab. Invest.*, vol 78, p. 377-392.
- 450- Rinder, H.M., Bonan, J.L., Rinder, C.S., Ault, K.A., Smith, B.R., Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood, 1991, *Blood*, vol 78, p. 1730-1737.

- 451- Michelson, A.D., Flow cytometry : a clinical test of platelet function, 1998, *Blood*, vol 87, p. 4925-4936.
- 452- Shattil, S.J., Cunningham, M., Hoxie, J.A., Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry, 1987, *Blood*, vol 70, p. 307-315.
- 453- Knight, C.J., Panesar, M., Wright, C., Clarke, D., Butowski, P.S., Patel, D., Patrinely, A., Fox, K., Goodall, A.H., Altered platelet function detected by flow cytometry. Effects of coronary artery disease and age, 1997, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol 17, p. 2044-2053.
- 454- Rinder, H.M., Bonan, J.L., Rinder, C.S., Ault, K.A., Smith, B.R., Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils, 1991, *Blood*, vol 78, p. 1760-1769.
- 455- Waddell, T.K., Fialkow, L., Chan, C.K., Kishimoto, T.K., Downey, G.P., Signaling functions of L-selectin. Enhancement of tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase, 1995, *J. Biol. Chem.*, vol 270, p. 15403-15411.
- 456- Seger, R., Krebs, E.G., The MAPK signaling cascade, 1995, *FASEB J.*, vol 9, p. 726-735.
- 457- Blanks, J.E., Moll, T., Eylner, R., Vestweber, D., Stimulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 on mouse neutrophils activates β_2 -integrin mediated cell attachment to ICAM-1, 1998, *Eur. J. Immunol.*, vol 28, 433-443.
- 458- Ferrer-Lopez, P., Renesto, P., Prevost, M-C., Gounon, P., Chignard, M., Heparin inhibits neutrophil-induced platelet activation via cathepsin G, 1992, *J. Lab. Clin. Med.*, vol 119, p. 231-239.
- 459- Redini, F., Lafuma, C., Hornebeck, W., Choay, J., Robert, L., Influence of heparin fragments on the biological activities of elastase(s) and α -1-proteinase inhibitor, 1988, *Biochem. Pharmacol.*, vol 37, p. 4257-4261.

460- Redini, F., Tixier, J.M., Petitou, M., Choay, J., Robert, L., Hornebeck, W., Inhibition of leucocyte elastase by heparin and its derivatives, 1988, *Biochem. J.*, vol 252, p. 515-519.

461- Nelson, R.M., Cecconi, O., Roberts, W.G., Aruffo, A., Linhardt, R.J., Bevilacqua, M.P., Heparin oligasaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation, 1993, *Blood*, vol 82, p. 3253-3258.

462- Yanaka, K., Spellman, S.B., McCarthy, J.B., Oegema, T.R., Low, W.C., Camarata, P.J., Reduction of brain injury using heparin to inhibit leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia, 1996, *J. Neurosurg.*, vol 85, p. 1102-1107.

463- Dagenais, P., Théorêt, J.-F., Merhi, Y., Latour, J.G., Comparative study of unfractionated and a low molecular weight heparin (enoxaparin) as P-selectin inhibitors. *FASEB J.*, 1997, vol 11, p. A-311.

464- Flynn, D.M., Buda, A.J., Jeffords, P.R., Lefer, D.J., A sialyl LewisX-containing carbohydrate reduces infarct size : role of selectins in myocardial reperfusion injury, 1996, *Am. J. Physiol.*, vol 271, p. H2086-H2096.

465- Birnbaum, Y., Patterson, M., Kloner, R.A., The effect of CY1503, a sialyl lewis^x analog blocker of the selectin adhesion molecules on infarct size and no-reflow in rabbit model of acute myocardial infarction/reperfusion, 1997, *J. Mol. Cell Cardiol.*, vol 29, p. 2013-2025.

466- Kilgore, K.S., Park, J.L., Chi, L. Musser, J.H., Date, V., Abras, S., Lucchesi, B.R., Reduction of myocardial infarct size in the rabbit by a carbohydrate analog of Sialyl Lewis^x, 1996, *J. Cardiovasc. Pharmacol. Therapeut.*, vol 1, p. 49-56.

467- Buerke, M., Weyrich, A.S., Zheng, Z., Gaeta, F.C., Forrest, M.J., Lefer, A.M., Sialyl Lewis^x-containing oligosaccharide attenuates myocardial reperfusion injury in cats, 1994, *J. Clin. Invest.*, vol 93, p. 1140-1148.

468- Lefer, D.J., Flynn, D.M., Phillips, M.L., Ratcliffe, M., Buda, A.J., A novel sialyl Lewis^x analog attenuates neutrophil accumulation and myocardial necrosis after ischemia and reperfusion, 1994, *Circulation*, vol 90, p. 2390-2401.

469- Silver, M.J., Sutton, J.M., Hook, S., Lee, P., Malvycky, J.L., Phillips, L., Ellis, S.G., Topol, E.J., Nicolini, F.A., Adjunctive selecting blockade successfully reduces infarct size beyond thrombolysis in the electrolytic canine coronary artery model, 1995, *Circulation*, vol 92, p. 492-499.

470- Yamada, K., Tojo, S.J., Hayashi, M., Morooka, S., The role of P-selectin, sialyl Lewis X and sulfatide in myocardial ischemia and reperfusion injury, 1998, *Eur. J. Pharmacol.*, vol 346, p. 217-225.

471- Merhi, Y., Provost, P., Chauvet, P., Théorêt, J-F., Phillips, M.L., Latour, J.G., Selectin blockade reduces neutrophil interaction with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs, *soumis Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* et accepté.

472- Ley, K., Gaehtgens, P., Fennie, C., Singer, M.S., Lasky, L.A., Rosen, S.D., Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo, 1991, *Blood*, vol 77, p. 2553-2555.

473- von Andrian, U.H., Chambers, J.D., McEvoy, L.M., Bargatze, R.F., Arfors, K.E., Butcher, E.C., Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte β_2 integrins in vivo, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 88, p. 7538-7542.

474- Stoolman, L.M., Rosen, S.D., Possible role for cell-surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation, 1983, *J. Cell Biol.*, vol 96, p. 722-729.

475- Yednock, T.A., Stoolman, L.M., Rosen, S.D., Phosphomannosyl-derivatized beads detect a receptor involved in lymphocyte homing., 1987, *J. Cell Biol.*, vol 104, p. 713-723.

- 476- Yednock, T.A., Butcher, E.C., Stoolman, L.M., Rosen, S.D., Receptors involved in lymphocyte homing: relationship between a carbohydrate-binding receptor and the MEL-14 antigen, 1987, *J. Cell Biol.*, vol 104, p. 725-731.
- 477- Omata, M., Matsui, N., Inomata, N., Ohno, T., Protective effects of polysaccharide fucoidin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats, 1997, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol 30, p. 717-724.
- 478- Chauvet, P., Bienvenu, J.-G., Théorêt, J.-F., Latour, J.G., Merhi, Y., Inhibition of platelet-neutrophil interactions by fucoidan reduces adhesion and vasoconstriction after arterial injury by angioplasty in pigs, *soumis J. Pharmacol. Exp. Therap.*
- 479- Théorêt, J.-F., Bienvenu, J.-G., Kumar, A., Latour, J.G., Merhi, Y., Importance of P-selectin and PSGL-1 in platelet binding to neutrophils following exposure to damaged arterial surfaces, *soumis Circ. Res.*
- 480- Granert, C., Raud, J., Xie, X., Lindquist, L., Lindbom, L., Inhibition of leukocyte rolling with polysaccharide fucoidin prevents pleocytosis in experimental meningitis in the rabbit, 1994, *J. Clin. Invest.*, vol 93, p. 929-936.
- 481- Dulkanchainun, T.S., Goss, J.A., Imagawa, D.K., Shaw, G.D., Anselmo, D.M., Kaldas, F., Wang, T., Zhao, D., Busuttill, A.A., Kato, H., Murray, N.G.B., Kupiec-Weglinski, J.W., Busuttill, R.W., Reduction of hepatic ischemia/reperfusion injury by a soluble P-selectin glycoprotein ligand-1, 1998, *Ann. Surgery*, vol 227, p. 832-840.
- 482-Takada, M., Nadeau, K.C., Shaw, G.D., Marquette, K.A., Tilney, N.L., The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand, 1997, *J. Clin. Invest.*, vol 99, p. 2682-2690.
- 483- Yeo, E.L., Sheppard, J-A.I., Feuerstein, I.A., Role of P-selectin and leukocytes activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (An injury vessel wall model), 1994, *Blood*, vol 83, p.2498-2507.

484- Harrison, D.G., Perspective series : nitric oxide and nitric oxide synthases ; cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction, 1997, *J. Clin. Invest.*, vol 100, p. 2153-2157.

485- Merhi, Y., Provost, P., Guidoin, R., Latour, J.G., Importance of platelets in neutrophil adhesion and vasoconstriction after deep carotid arterial injury by angioplasty in pigs, 1997, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol 17, p. 1185-1191.

486- Bizzaro, N., Goldschmeding, R., von dem Borne, A.E.G.Kr., Platelet satellitism is Fc γ RIII (CD16) receptor-mediated, 1995, *Am. J. Clin. Pathol.*, vol 103, p. 740-744.

487- Goto, S., Ikeda, Y., Saldivar, E., Ruggeri, Z.M., Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions, 1998, *J. Clin. Invest.*, vol 101, p. 479-486.