

Université de Montréal

2 M11. 2751. 6

11301937  
V. 140

**Importance des sélectines dans la physiopathologie  
de la thrombose artérielle post-angioplastie**

par

Patrick Chauvet

**Programme de pathologie et biologie cellulaire  
(option système cardiovasculaire)**

Faculté des études supérieures

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

novembre 1998

©Patrick Chauvet, 1998



2011.12.21.6

W  
4  
U58  
1999  
V.140

Journal de l'Association

de la physiologie des cellules et des tissus  
de la circulation artérielle post-angiotensine

1999

Volume 140

Programme de biologie et physiologie cellulaires  
(option système cardiovasculaire)

Faculté des études supérieures

Membre associé à l'Institut de cardiologie  
de l'Université de Montréal  
Membre associé (M.Sc.)  
en physiologie cellulaire  
et physiologie cardiovasculaire



Professeur de  
Physiologie Cellulaire

**Page d'identification du jury**

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Importance des sélectines dans la physiopathologie  
de la thrombose artérielle post-angioplastie**

présenté par:

Patrick Chauvet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

**Dr Lucian Ghitescu      Président-rapporteur**

**Dr Yahye Merhi      Directeur de recherche**

**Dr Jean-Gilles Latour      Codirecteur**

**Dr Tack Ki Leung      Membre du jury**

Mémoire accepté le:.....**99.09.27**.....

## SOMMAIRE

L'angioplastie est une procédure fréquemment utilisée afin de rétablir la lumière des artères présentant un rétrécissement ou une occlusion de nature athéromateuse. Cependant, cette technique invasive comporte des risques et plus de 30% des patients développent au foyer d'angioplastie des vasospasmes, une thrombose ou une resténose. L'intérêt du présent mémoire est de documenter les phénomènes physiopathologiques associés au développement de ces complications.

Suite à une lésion vasculaire produite par angioplastie, les plaquettes et les neutrophiles se déposent à la surface de l'artère afin de maintenir l'intégrité du vaisseau. L'adhésion des plaquettes aux surfaces artérielles se fait par l'intermédiaire des intégrines, du facteur de von Willebrand ainsi que d'autres protéines adhésives. L'adhésion des neutrophiles se fait d'abord par les sélectines (L et P-sélectines) sur lesquelles ils roulent, puis par les intégrines qui leur permettent une adhésion ferme. Les plaquettes et les neutrophiles peuvent également se lier les uns aux autres via, entre autres, la P-sélectine. La P-sélectine se trouvant à la surface des plaquettes activées peut lier le PSGL-1 (ligand glycoprotéique de la P-sélectine-1) ou le sialyl Lewis<sup>x</sup> des neutrophiles. Ces interactions favorisent l'activation des neutrophiles qui sécrètent à leur tour des substances activatrices des plaquettes. L'activation des plaquettes et des neutrophiles augmente le risque de vasospasmes, de thrombose et de resténose au site de la lésion vasculaire. Comme les sélectines et leurs récepteurs médient la première étape de la liaison plaquette-neutrophile, nous formulons l'hypothèse suivante: les interactions plaquettes-neutrophiles médiées par les sélectines contribuent à leur activation et à leur recrutement au site de la lésion vasculaire ainsi qu'aux complications pathologiques associées à l'angioplastie.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons choisi un modèle porcin qui nous permet de mesurer l'adhésion de plaquettes-Cr<sup>51</sup> et de neutrophiles-In<sup>111</sup>, aux sites des lésions artérielles produites par angioplastie, en l'absence ou en présence d'un bloqueur des sélectines. Nous avons également mesuré l'effet de ce bloqueur des sélectines sur la vasoconstriction artérielle et dans un modèle in vitro de circulation, où des suspensions

pures de plaquettes-Cr<sup>51</sup> et/ou de neutrophiles-In<sup>111</sup> ont été perfusées à la surface de segments artériels dénudés.

Le rôle principal du CY-1503, un analogue du sialyl Lewis<sup>x</sup>, est de bloquer la liaison entre la P-sélectine plaquettaire et le sialyl Lewis<sup>x</sup> des neutrophiles. Dans notre première étude, nous avons démontré que l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles augmente avec la sévérité de la lésion artérielle ( $P < 0.05$ ). Le traitement au CY-1503 a permis de réduire l'adhésion neutrophilique aux segments présentant des lésions sévères seulement. Il n'y a cependant pas eu d'effets sur l'adhésion des plaquettes sur ces mêmes segments. Le traitement n'a pas diminué l'adhésion des neutrophiles ni des plaquettes aux segments intacts et ceux présentant des lésions légères. Dans les expériences *in vitro* en chambres de perfusion, le CY-1503 inhibe l'adhésion des neutrophiles aux surfaces artérielles endommagées seulement lorsqu'ils sont en présence des plaquettes. Ces expériences démontrent l'implication de la P-sélectine des plaquettes et des récepteurs sialyl Lewis<sup>x</sup> neutrophiliques dans le recrutement de neutrophiles par les plaquettes adhérentes et activées au site de la lésion sévère.

La fucoïdine est également un analogue du sialyl Lewis<sup>x</sup> qui a été préalablement utilisé pour déterminer l'importance des sélectines dans le processus de roulement et d'adhésion des neutrophiles aux surfaces endothéliales intactes dans des conditions d'inflammation. Dans notre seconde étude, nous avons de nouveau observé que l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles augmente significativement ( $P < 0.05$ ) avec la sévérité de la lésion. Cette augmentation n'a pas été influencée par le traitement avec 1 mg/kg de fucoïdine. Par contre, le traitement avec 5 mg/kg de fucoïdine a eu les effets suivants: l'adhésion des plaquettes aux surfaces artérielles sévèrement endommagées a diminué de 73%. L'adhésion des neutrophiles aux surfaces artérielles présentant des lésions superficielles et sévères a été réduite de 92% et de 84%, respectivement. La vasoconstriction artérielle associée à l'endommagement post-angioplastie a été réduite de 51%. *In vitro*, l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles en suspension mixte a augmenté par rapport à la perfusion de suspensions seules et cette augmentation a été inhibée par les deux doses de fucoïdine testées (20 et 100 µg/ml).

Les conclusions que nous pouvons tirer de ces expériences sont les suivantes:  
1) à la suite d'une lésion légère, les sélectines sont impliquées dans les phénomènes de

roulement et de recrutement des neutrophiles par les plaquettes activées adhérees au sous-endothélium. 2) À la suite d'une lésion sévère, les sélectines participent à l'augmentation de l'adhésion à la fois des plaquettes et des neutrophiles. Cette amplification de la réaction thrombotique est probablement due à une potentialisation des interactions plaquettes-neutrophiles causée par les conditions locales de flot et la présence de substances très thrombogènes provenant de la média. Ces interactions, en partie médiées par les sélectines, favorisent la coactivation des plaquettes et des neutrophiles. 3) La diminution de l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles après endommagement vasculaire limite la réaction vasoconstrictrice associée.

Ces expériences soulignent l'importance des sélectines dans les phénomènes aigus de vasospasmes et de thrombose artérielle post-angioplastie, et suggèrent un rôle pour ces molécules dans l'évolution physiopathologique de la resténose.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Sommaire.....</b>	<b>iii</b>
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xii
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE PREMIER: PATHOLOGIES VASCULAIRES.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Athérosclérose.....</b>	<b>3</b>
1.1. L'artère intacte.....	3
1.2. Physiopathologie de l'athérosclérose.....	4
<b>2. Angioplastie.....</b>	<b>9</b>
2.1. Introduction.....	9
2.2. Le phénomène de <i>Recoil</i> .....	11
2.3. Thrombose .....	12
2.3.1. Déposition plaquettaire.....	13
2.3.2. Adhésion neutrophilique.....	14
2.3.3. Interactions plaquettes-neutrophiles.....	15
2.3.4. La cascade de coagulation.....	16
2.4. Resténose.....	17
2.4.1. Formation neointimale.....	17
<b>CHAPITRE II: LES MOLÉCULES D'ADHÉSION ET LEURS LIGANDS.....</b>	<b>19</b>
<b>1. Les sélectines.....</b>	<b>19</b>
1.1. L-sélectine.....	21
1.2. P-sélectine.....	24

1.3.	E-sélectine.....	26
<b>2.</b>	<b>Les intégrines.....</b>	<b>28</b>
2.1.	Les intégrines leucocytaires.....	29
2.1.1.	Les $\beta_1$ -intégrines.....	29
2.1.1.1.	$\alpha_4\beta_1$ .....	29
2.1.2.	Les $\beta_2$ -intégrines.....	30
2.1.2.1.	LFA-1.....	30
2.1.2.2.	MAC-1.....	32
2.1.2.3.	p150,95.....	33
2.2.	Les intégrines plaquettaires.....	33
2.2.1.	Les $\beta_1$ -intégrines.....	33
2.2.1.1.	$\alpha_2\beta_1$ .....	33
2.2.1.2.	$\alpha_5\beta_1$ .....	34
2.2.1.3.	$\alpha_6\beta_1$ .....	34
2.2.2.	Les $\beta_3$ -intégrines.....	34
2.2.2.1.	$\alpha_v\beta_3$ .....	34
2.2.2.2.	$\alpha_{IIb}\beta_3$ .....	35
2.3.	L'axe GPIb/facteur von Willebrand.....	38
<b>3.</b>	<b>Les immunoglobulines.....</b>	<b>40</b>
<b>CHAPITRE III: LES INHIBITEURS DES SÉLECTINES.....</b>		<b>41</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>41</b>
<b>2.</b>	<b>Le CY-1503.....</b>	<b>41</b>
<b>3.</b>	<b>La fucoïdine.....</b>	<b>42</b>
3.1.	Présentation.....	42



3.2.	Propriétés.....	43
3.2.1.	Bloqueur des sélectines.....	43
3.2.2.	Anticoagulant.....	43
3.2.2.1.	Effets sur la coagulation.....	43
3.2.2.2.	Effets sur la fibrinolyse.....	44
3.2.3.	Autres propriétés.....	45
<b>CHAPITRE IV: PREMIÈRE CONTRIBUTION.....</b>		<b>47</b>
1.	<b>Résumé.....</b>	<b>47</b>
2.	<i>Selectin Blockade Reduces Neutrophil Interaction with Platelets at the Site of Deep Arterial Injury by Angioplasty in Pigs.....</i>	<i>49</i>
<b>CHAPITRE V: SECONDE CONTRIBUTION.....</b>		<b>77</b>
1.	<b>Résumé.....</b>	<b>77</b>
2.	<i>Inhibition of Platelet-Neutrophil Interactions by Fucoidan Reduces Adhesion and Vasoconstriction after Arterial Injury by Angioplasty in Pigs.....</i>	<i>79</i>
<b>CHAPITRE VI: DISCUSSION.....</b>		<b>114</b>
<b>Sources documentaires.....</b>		<b>118</b>
Remerciements.....		vix

## Liste des tableaux

### PREMIÈRE CONTRIBUTION

- Tableau 1.** Caractéristiques des procédures d'isolation et de marquage des plaquettes et des neutrophiles dans le groupe témoin et le groupe traité au CY-1503.....70
- Tableau 2.** Paramètres hématologiques et hémodynamiques dans le groupe témoin et le groupe traité au CY-1503.....71
- Tableau 3.** Caractéristiques des artères dilatées dans le groupe témoin et le groupe traité au CY-1503.....72

### SECONDE CONTRIBUTION

- Tableau 1.** Paramètres hématologiques et hémodynamiques dans le groupe témoin et les groupes traités à la fucoïdine.....107
- Tableau 2.** Caractéristiques des animaux et des artères dilatées dans le groupe témoin et les groupes traités à la fucoïdine.....108

## Liste des figures

### PREMIÈRE CONTRIBUTION

- Figure 1.** Graphique montrant la déposition des plaquettes sur des segments artériels intacts et présentant des lésions légères et sévères dans le groupe témoin et le groupe traité au CY-1503 in vivo.....74
- Figure 2.** Graphique montrant l'adhésion des neutrophiles sur des segments artériels intacts et présentant des lésions légères et sévères dans le groupe témoin et le groupe traité au CY-1503 in vivo.....75
- Figure 3.** Graphique montrant les effets du CY-1503 sur l'adhésion de neutrophiles isolés en l'absence et en présence de plaquettes en chambres de perfusion.....76

### SECONDE CONTRIBUTION

- Figure 1.** Déposition plaquettaire sur des segments artériels intacts et présentant des lésions légères et sévères dans le groupe témoin et les groupes traités à la fucoïdine. La déposition plaquettaire augmente avec la sévérité de la lésion dans le groupe témoin. Le traitement avec la fucoïdine 5 mg/kg réduit la déposition plaquettaire aux segments avec lésions sévères de 73%.....110

- Figure 2.** Adhésion neutrophilique sur des segments artériels intacts et présentant des lésions légères et sévères dans le groupe témoin et les groupes traités à la fucoïdine. L'adhésion des neutrophiles augmente avec la sévérité de la lésion dans le groupe témoin. Le traitement avec la fucoïdine 5 mg/kg réduit l'adhésion neutrophilique de 92% sur les segments présentant des lésions légères et de 84% sur les segments présentant des lésions sévères.....111
- Figure 3.** Effets de la fucoïdine sur la déposition plaquettaire à la média artérielle dans des chambres de perfusion, en absence et en présence de neutrophiles. Les deux doses de fucoïdine réduisent la déposition plaquettaire à la média artérielle.....112
- Figure 4.** Effets de la fucoïdine sur l'adhésion neutrophilique à la média artérielle dans des chambres de perfusion, en absence et en présence de plaquettes. Les deux doses de fucoïdine réduisent l'adhésion neutrophilique à la média artérielle.....113

## Liste des sigles et abréviations

<b>Ac:</b>	Anticorps
<b>ACT:</b>	Temps de coagulation activé
<b>ADP:</b>	Adénosine diphosphate
<b>ARN:</b>	Acide ribonucléique
<b>AT-III:</b>	Antithrombine-III
<b>ATP:</b>	Adénosine triphosphate
<b>EDGF:</b>	Facteur de croissance dérivé de l'endothélium
<b>EGF:</b>	Facteur de croissance endothélial
<b>ESL:</b>	Ligand de la E-sélectine
<b>FAK:</b>	Kinase d'adhésion focale
<b>FGF:</b>	Facteur de croissance fibroblastique
<b>HC-II:</b>	Cofacteur de l'héparine
<b>HEV:</b>	Veinules endothéliales élevées ( <i>High endothelial venules</i> )
<b>ICAM:</b>	Molécule d'adhésion intercellulaire
<b>IL:</b>	Interleukine
<b>LDL:</b>	Lipoprotéines de basse densité
<b>Lea:</b>	Lewis <sup>a</sup>
<b>Lex:</b>	Lewis <sup>x</sup>
<b>LPS:</b>	Lipopolysaccharides bactériens
<b>LT:</b>	Leucotrienne
<b>Mo:</b>	Monoclonal
<b>NF:</b>	Facteur nucléaire
<b>NK:</b>	Tueuse naturelle ( <i>Natural Killer</i> )
<b>NO:</b>	Monoxide d'azote
<b>PAF:</b>	Facteur d'activation plaquettaire
<b>PAI-1:</b>	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
<b>PDGF:</b>	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
<b>PSGL-1:</b>	Ligand glycoprotéique de la P-sélectine
<b>SCR:</b>	Séquences consensus courtes répétées

<b>sLea:</b>	Sialyl Lewis <sup>a</sup>
<b>sLex:</b>	Sialyl Lewis <sup>X</sup>
<b>TNF:</b>	Facteur de nécrose tumorale
<b>t-PA:</b>	Activateur du plasminogène tissulaire
<b>VCAM:</b>	Molécule d'adhésion de cellule vasculaire

## INTRODUCTION

La compréhension des phénomènes physiopathologiques entourant les maladies cardiovasculaires a une importance certaine puisque ces dernières représentent la première cause de décès en Amérique du Nord (1). Les pathologies vasculaires responsables de l'occlusion partielle ou totale des artères, comme l'athérosclérose et la thrombose, peuvent causer l'ischémie des tissus desservis, l'infarctus et la mort (2). Les facteurs entraînant ces conditions sont multiples dont la prédisposition génétique, la consommation de produits du tabac, le sexe, l'âge et l'alimentation (3). Certains traitements, comme l'aspirine (4, 5), peuvent aider à prévenir ces conditions; la thrombolyse est couramment utilisée chez les patients en infarctus afin de détruire un thrombus occlusif (6), et l'angioplastie permet d'agrandir la lumière d'une artère sténosée (7). Le gonflement d'un ballon dans l'artère sténosée est une procédure efficace et couramment utilisée pour rétablir la circulation sanguine normale d'une artère. Cependant, plus de 30% des patients qui y ont recours développent des complications suite à l'endommagement de la paroi vasculaire causée par cette technique (8). Les mécanismes cellulaires des multiples phénomènes physiopathologiques qui en résultent ne sont pas encore totalement élucidés, mais les plaquettes, les neutrophiles et d'autres facteurs sanguins contribuent aux réactions thrombotiques qui augmentent les risques de réocclusion et de resténose de l'artère (9).

Les sélectines et les intégrines sont deux classes de molécules d'adhésion hautement impliquées dans les réactions thrombotiques puisqu'elles permettent aux plaquettes et aux neutrophiles d'adhérer à la paroi artérielle (10). La présence d'une lésion vasculaire expose des protéines de la matrice sous-endothéliale (facteur von Willebrand, collagène I-IV, fibronectine) qui sont reconnues principalement par les intégrines plaquettaires. Leur liaison entraîne l'adhésion et l'activation des plaquettes (11). Cette étape est caractérisée par l'expression de la P-sélectine (12) et l'activation des intégrines (GPIIb/IIIa) (13). Les neutrophiles circulants présentent à leur surface la L-sélectine, le PSGL-1 (ligand glycoprotéique de la P-sélectine), le sialyl Lewis<sup>x</sup> (sLex) et certaines intégrines (CD11b/CD18, CD11c/CD18) (14). Les neutrophiles se servent de la L-sélectine, du PSGL-1 et du sLex pour rouler sur la P-sélectine des plaquettes et ralentir

(15, 16, 17). Ceci permet une adhésion ferme entre les intégrines des neutrophiles et celles des plaquettes (18) ce qui entraîne l'activation des neutrophiles (19, 20). Les plaquettes et les neutrophiles activés relâchent des substances chemotactiques et activatrices puissantes (ADP, sérotonine, prostaglandines, PAF, leucotriennes, élastase, radicaux libres) qui amplifient le recrutement ainsi que l'activation (21, 22). Cette cascade d'événements permet également l'activation de la coagulation (23) et la vasoconstriction de l'artère (24, 25, 26).

Étant donné que les sélectines sont impliquées dans le phénomène de recrutement des neutrophiles par les plaquettes, nous avons tenté d'identifier le rôle des sélectines dans les interactions plaquettes-neutrophiles aux sites de lésions vasculaires produites par angioplastie.

Dans le présent mémoire, nous présenterons un survol des pathologies vasculaires qui nous intéressent. Nous expliquerons les bénéfices et les limites d'une procédure telle que l'angioplastie et nous examinerons les mécanismes présentement connus de la thrombose artérielle post-angioplastie ainsi que son implication dans le développement de la resténose. Nous présenterons ensuite une série d'expériences qui nous permettra de mieux cerner le rôle des sélectines dans les interactions entre plaquettes et neutrophiles et de mieux comprendre la physiopathologie de la thrombose.



## CHAPITRE PREMIER: PATHOLOGIES VASCULAIRES

### 1. Athérosclérose

#### 1.1. L'artère intacte

Une artère est composée de trois couches principales. De la lumière de l'artère vers l'extérieur on retrouve l'intima, la média et l'adventice. L'intima est composée d'abord d'une couche unicellulaire, l'endothélium, qui tapisse l'intérieur du vaisseau. Celle-ci repose sur une matrice extracellulaire et une lame élastique interne qui composent le sous-endothélium. Sous cette lame se trouve la média, composée principalement de cellules musculaires lisses et de tissus fibreux. L'adventice, quant à elle, est composée de tissu conjonctif et de nerfs. Elle est délimitée par la lame élastique externe.

L'endothélium est une structure tissulaire qui recouvre l'intérieur de tous les vaisseaux sanguins. Bien qu'il ne soit composé que d'une seule couche de cellules, les cellules endothéliales, l'endothélium a plusieurs rôles. Il contrôle le tonus vasculaire par voie paracrine en relâchant des substances vasodilatatrices ou vasoconstrictrices (27). Les vasodilatateurs sont le NO et la PGI<sub>2</sub>. Les substances vasoconstrictrices sont l'endothéline-I, la PGH<sub>2</sub>, la TXA<sub>2</sub> et l'angiotensine-II. L'endothélium est également une surface anticoagulante et antithrombotique qui empêche l'accumulation de composantes sanguines et de dépôts lipidiques (28). En temps normal, les cellules endothéliales présentent peu de molécules à leur surface et donc interagissent peu avec les composantes sanguines. Elles relâchent des substances actives en circulation qui ont pour effets d'inhiber la coagulation et l'adhésion cellulaire (NO)(29, 30) et d'activer la fibrinolyse (activateur du plasminogène de type tissulaire, NO) (31, 32). En cas d'activation par un pathogène ou en cas de dysfonction, les cellules endothéliales expriment des molécules d'adhésion cellulaire qui favorisent l'émigration des leucocytes (monocytes, neutrophiles) vers les sites inflammatoires (33, 34). Elles peuvent également relâcher des facteurs stimulant la croissance et le développement des tissus, comme l'EDGF (facteur de croissance dérivé de l'endothélium) ou des substances qui inhibent la fibrinolyse et favorisent la coagulation comme le PAI-1 (inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1) (35). Finalement, l'endothélium repose sur une matrice

extracellulaire et la lame élastique interne qui lui donnent du support. Cette matrice contient plusieurs protéines adhésives qui permettent l'adhésion des plaquettes dans le cas d'une lésion endothéliale favorisant ainsi le maintien de l'intégrité du vaisseau. Parmi celles-ci on retrouve le facteur von Willebrand, la fibronectine, la vitronectine et le collagène (11, 36).

La média est composée principalement de tissu fibreux, de fibroblastes et de cellules musculaires lisses. Le tissu fibreux (Collagène I-IV, fibronectine), organisé en matrice et produit par les fibroblastes, donne une élasticité et une protection contre les pressions artérielles élevées. Les cellules musculaires lisses sont responsables de moduler les forces qui résistent à ces pressions et contrôlent ainsi le tonus vasculaire. Les deux types de cellules sont sensibles aux signaux chimiques et mécaniques et peuvent être rapidement stimulés (37). Ils prolifèrent ensuite très rapidement et produisent du collagène, de l'élastine, des proteoglycans ainsi que d'autres facteurs de croissance pour réparer des dommages tissulaires (38). Différentes lignées cellulaires composent donc la tunica média, ce qui a d'importantes répercussions lors du développement de certaines pathologies comme l'athérosclérose ou la resténose (39).

L'adventice est délimitée par la lame élastique externe et est composée de tissu fibroélastique dense et de nerfs. Dans les plus grosses artères, un réseau de petits vaisseaux sanguins, le *vasa vasorum*, parcourt l'adventice avec un réseau lymphatique parallèle. Les branches du *vasa vasorum* s'infiltrent dans la média, et quelquefois jusque dans l'intima, afin de nourrir les cellules de la paroi artérielle (40).

## 1.2 Physiopathologie de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie caractérisée par la présence de dépôts lipidiques au niveau de l'intima. En 1973, Ross et Glomset ont formellement proposé l'hypothèse, largement acceptée de nos jours, qui explique le développement de ces lésions (41). Selon cette hypothèse du '*Response-to-Injury*' (en réaction à l'endommagement vasculaire), les lésions athérosclérotiques se développent suite à l'adhésion des plaquettes aux sites de lésions endothéliales. Les plaquettes adhérentes libèrent ensuite des facteurs qui causent la prolifération des cellules musculaires lisses. Selon eux, ces

lésions seraient majoritairement induites par l'hypercholestérolémie (42, 43). Aujourd'hui, cette hypothèse tient également compte des autres facteurs pouvant causer des lésions endothéliales comme la cigarette (44), et prend en considération de nouveaux mécanismes cellulaires et moléculaires. Les plaquettes, les neutrophiles et leurs médiateurs chimiques (45), la cascade de coagulation et la fibrine (46), le complément (47), le facteur tissulaire (48), les molécules d'adhésion (49) et l'apoptose (50) sont tous impliqués et interdépendants dans le processus athérosclérotique (9, 28).

Dans une artère normale, l'endothélium intact retarde le développement de l'athérosclérose de par ses propriétés antithrombotiques ainsi que par le relâchement de substances antiplaquettaires (NO et PGI<sub>2</sub>) et antiprolifératrices (NO) (51, 52). Une lésion peut cependant se produire si les cellules endothéliales sont attaquées par des infections comme le virus de l'herpes (53). Certains agents sont des toxines pour l'endothélium, comme les produits de dégradation glycosylés chez les patients diabétiques ou les irritants dans la fumée de cigarette (44). Les lésions athérosclérotiques semblent se développer préférentiellement aux sites d'embranchements des artères ce qui suggère que le stress mécanique causé par le flot sanguin à ces endroits favorise l'endommagement endothélial (54). Cependant, la plus importante cause de lésions endothéliales en Amérique du Nord serait l'effet des LDL oxydés (LDL-ox) (55). Les LDL circulant transportent du cholestérol et sont endocytés par les cellules endothéliales puis peroxydés. Les LDL-ox ainsi fabriqués sont cependant des produits cytotoxiques pour les cellules endothéliales (56). Les cellules endothéliales dysfonctionnelles expriment alors des molécules d'adhésion comme la P-sélectine (57) et cessent de produire du NO. Ceci favorise l'adhésion de plaquettes, neutrophiles, monocytes et lymphocytes T au site de la lésion (42, 58). Les monocytes se transforment en macrophages et migrent dans l'intima. Les LDL-ox attirent les monocytes circulant en augmentant la production de MCP-1 par les cellules endothéliales et inhibent la motilité des macrophages. Les LDL-ox sont ensuite endocytés par les macrophages et forment des gouttelettes lipidiques intracellulaires. Les macrophages se transforment alors en cellules spumeuses (59).

Les lésions athérosclérotiques sont divisées en différents types selon leur évolution (60). La lésion de type I est caractérisée par une accumulation sous-

endothéliale de macrophages avec des gouttelettes lipidiques intracellulaires. Ces lésions ne sont cependant pas détectables et peuvent se former très tôt au courant de la vie. Ensuite, l'endommagement endothélial répété cause une augmentation marquée de l'expression des molécules d'adhésion endothéliales. Une étude importante a également confirmé le rôle de plusieurs molécules dans le développement de l'athérosclérose dont la P-sélectine, ICAM-1 et les  $\beta_2$ -intégrines (61). L'expression de ces molécules favorise les interactions cellulaires ainsi que l'adhésion des plaquettes et des monocytes. Les plaquettes, les cellules endothéliales et les macrophages produisent des facteurs de croissance comme le PDGF et l'EDGF qui stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses (62). Ces cellules migrent alors de la média vers l'intima et forment le néointima. La lésion de type II est alors caractérisée par un néointima ainsi qu'une plus forte accumulation de cellules spumeuses qui forment des stries lipidiques, les premiers signes visibles de la pathologie (60).

L'évolution d'une lésion de type II vers une lésion de type III est caractérisée par la rupture des cellules spumeuses causant des dépôts extracellulaires de lipides. Les cellules musculaires lisses commencent alors eux aussi à stocker les lipides et se transforment à leur tour en cellules spumeuses (60).

Le type IV montre la présence d'un centre de lipides extracellulaires causé par la convergence et l'accumulation de lipides extracellulaires. En général, la couche de cellules endothéliales est toujours présente mais l'espace sous-endothélial contient énormément de macrophages, de lymphocytes T et de cellules spumeuses (60). Ces plaques athéromateuses, particulièrement dangereuses, sont prônes à rompre puisqu'elles ne sont pas encore recouvertes de tissu fibreux caractéristique des plaques de type V.

Les cellules spumeuses commencent ensuite à sortir de la plaque en s'insérant entre les jonctions endothéliales causant des microthrombi plaquettaires à leur surface. Les cellules musculaires lisses continuent de migrer à travers toute la lésion, formant le chapeau fibreux composé de collagènes, de protéoglycans, de fibres élastiques, de macrophages et de lymphocytes T. On peut alors distinguer trois lésions de types V selon leur structure. Le type Va est une plaque athéromateuse caractérisée par un chapeau de collagène et de cellules musculaires avec un centre formé de lipides. Le type Vb est un amas de ces trois éléments avec une calcification prononcée et le type Vc est

principalement composé de collagène et de tissus fibreux. Les lésions de type IV peuvent progresser rapidement en l'une ou l'autre de type V et diminuent de façon importante la lumière de l'artère et le flot sanguin (60).

Plusieurs complications peuvent également survenir lors du développement de l'athérosclérose. Comme mentionné ci-haut, une plaque atherosclérotique peut subir une certaine calcification. L'étendue de cette calcification peut varier du centre lipidique jusque dans les tissus fibreux avoisinants. Occasionnellement, la calcification d'un thrombus en surface peut également se produire. Les mécanismes de la calcification ne sont pas encore éclaircis, mais il semblerait qu'un mécanisme vésiculaire mène à la déposition progressive de minerais de carbonate de calcium, de sodium et de magnésium (63). Ce processus est responsable de la rigidité des vaisseaux atherosclérotiques et rend les procédures d'angioplastie plus délicates. Sous les effets du stress hémodynamique ou de spasmes artériels, la surface d'une plaque peut aussi s'éroder, se fissurer ou faire des ulcérations (64, 65, 66). Ces complications peuvent mener à de sérieuses conséquences comme une thrombose aiguë, une hémorragie à l'intérieur de la plaque ou une embolie. Si une plaque se fissure suffisamment, ses composantes sont immédiatement exposées au flot sanguin. Suite à une hémorragie intraplaque, un hématome se forme dans la fissure et un thrombus peut se former en surface. Ces lésions complexes risquent alors de compromettre sévèrement le flot sanguin, ou l'occlure, causant une période d'ischémie ou un infarctus. D'ailleurs, 90% des patients qui décèdent d'infarctus myocardiques aigus ont un thrombus occlusif dans une de leurs artères coronaires (65, 67). L'hémorragie intraplaque peut également survenir suite à l'érosion, causant l'infiltration de plasma et de cellules sanguines dans la plaque. Ceci risque de faire augmenter la pression à l'intérieur de la plaque et augmente les risques de rupture (68). Une seconde cause moins importante pourrait provenir des capillaires du *vasa vasorum* qui irriguent les régions basales de la plaque (69). Finalement, une artère athérosclérotique peut donner un anévrisme. Ceci est le plus souvent causé par l'amincissement de la média sous-jacente à la plaque et/ou son remplacement par du tissu fibreux. L'artère devient alors plus faible et commence à s'étirer sous les fortes pressions causées par la sténose ou la présence d'hypertension. Un anévrisme sacculaire ou fusiforme, souvent avec des thrombis laminaires frais et propices à se détacher, est alors créé (70, 71). Les

anévrismes comportent les risques de compresser des structures, organes ou autres vaisseaux sanguins, de s'infecter ou de se rompre.

La stabilité d'une plaque dépendra donc de sa morphologie ainsi que de sa composition (72, 73). Les forces et pressions que l'on retrouve à ces niveaux sont anormalement élevées et contribuent au risque de rupture de la plaque. La dynamique du sang circulant à travers des artères normales versus sténosées a d'ailleurs été longuement étudiée (74). D'autres indices permettent d'évaluer cliniquement la sévérité des lésions athérosclérotiques comme l'activateur du plasminogène de type urokinase (75), les taux de molécules d'adhésion solubles (76) et l'expression de molécules dépendantes de l'activation des plaquettes (77).

Les conséquences possibles de l'athérosclérose sont donc l'ischémie des tissus desservis par l'artère, la thrombose aiguë, l'embolie, l'anévrisme, l'infarctus et la mort. Lorsqu'il y a obstruction partielle d'une artère ou pendant les premiers instants d'une occlusion totale, le tissu desservi par l'artère manque de sang oxygéné et les cellules composant ce tissu subissent des changements biochimiques et morphologiques importants qui compromettent leur survie (78). Ces changements sont réversibles et le tissu peut complètement récupérer si l'apport de sang est rétabli rapidement. Lorsqu'il y a obstruction complète d'une artère causée par une thrombose aiguë ou une embolie, le tissu desservi est privé d'oxygène et de nutriments causant la mort cellulaire caractéristique de l'infarctus (78). L'occlusion totale d'une artère par un thrombus, une embolie ou même une ischémie prolongée provoquera un infarctus qui sera d'autant plus répandu que la durée avant la reperfusion sera longue. En général, un infarctus du myocarde est causé par un thrombus occlusif formé spontanément dans une artère coronaire après la rupture d'une plaque athéromateuse (65, 67). Si le thrombus n'est pas totalement occlusif, les forces de cisaillement augmentent dans l'artère sténosée et risquent de faire détacher une partie du thrombus qui se logera alors dans un petit vaisseau en aval du site causant une embolie. Ceci risque de causer un infarctus localisé dans d'autres tissus comme dans les cas d'embolies pulmonaire ou cérébrale.

## 2. Angioplastie

### 2.1. Introduction

Sous anesthésie locale, un cathéter-ballon est introduit dans l'artère fémorale du patient et est conduit sous contrôle fluoroscopique jusqu'au site de la sténose. Le ballon est sélectionné selon sa grosseur en proportion avec le diamètre de l'artère. En général, le ballon sera d'une fois à 1.2 fois la grosseur de l'artère normale. Le ballon peut être gonflé plusieurs fois avec intervalles pour permettre le passage du sang. L'on peut également régler la pression à l'intérieur du ballon et donc la pression exercée sur les parois du vaisseau (79). Certains ballons sont doubles de façon à dilater un segment plus important ou même pour envoyer un traitement local par le cathéter pendant la dilatation (cathéter barophoretique). Ces cathéters peuvent également contenir un conduit interne qui permet la circulation sanguine d'un côté du site de dilatation à l'autre. Certains ballons ont été créés afin de pouvoir injecter un traitement directement dans la paroi vasculaire (ballon iontophoretique). Ce cathéter utilise un courant électrique pour projeter et ainsi augmenter les concentrations intravasculaires du traitement (79).

La première angioplastie clinique fut réalisée par Dotter et Judkins en 1964 (80, 81). Aujourd'hui aux États-Unis, plus de 300 000 patients ont recours à cette technique chaque année. En clinique, l'angioplastie a d'abord un succès important puisque dans 90% des cas, la lumière de l'artère est plus grande après l'angioplastie qu'avant. Mais l'angioplastie d'une artère sténosée est délicate et comporte le risque de faire rompre l'artère, de causer un anévrisme ou une thrombose aiguë. On remarque cependant que même si une réaction thrombotique aiguë ne se produit pas souvent après l'angioplastie, 30 à 40% des patients développeront une resténose à l'intérieur des 6 premiers mois. Cette resténose n'est pas seulement la continuité d'une pathologie déjà présente dans l'artère mais est exacerbée par l'endommagement vasculaire et la réaction thrombotique causés par la procédure elle-même (79).

Jusqu'à 1979 il n'y a eu que très peu de recherche effectuée sur le fonctionnement de l'angioplastie et les théories avancées par les pionniers de cette technique, Dotter, Judkins et Grüntzig, étaient donc largement acceptées. Selon eux, le premier mécanisme de l'angioplastie était la compression puis le remodelage de la

plaque résultant en une sténose uniforme et circulaire à l'intérieur de l'artère, sans étirement de la paroi artérielle (82). Ce mécanisme aurait eut en effet l'avantage de préserver la structure de la paroi de l'artère tout en élargissant sa lumière. Cependant, la compression d'une plaque athéromateuse sans extraction des substances qui la composent est impossible. De plus, aucun remodelage longitudinal ne se produit avec les cathéters-ballon courants, bien qu'un effet 'chasse neige' fut observé avec certains des premiers cathéters développés par Dotter (83). Il a donc fallu reformuler l'hypothèse en tenant compte de ces facteurs et ce n'est qu'à partir de 1979 que les expériences sur les effets morphologiques et histologiques de l'angioplastie ont permis d'en déterminer les principaux mécanismes. Des observations importantes furent faites sur des artères iliaques de cadavres avec athérosclérose bilatérale (84, 85, 86). Une des deux artères fut placée dans un tube en verre, empêchant ainsi le diamètre externe d'augmenter, et l'angioplastie des deux branches fut faite. Dans l'artère placée dans le tube, la plaque ne s'est pas comprimée ni ne s'est étendue. Le tube en verre a également empêché la plaque de se fissurer, mais l'angioplastie ne produisit pas de changements notables de la lumière. De l'autre côté, la dilatation de la branche non restreinte causa l'élargissement du diamètre extérieur avec étirement de l'adventice et de la média. De plus, des ruptures de l'intima avec son décollement de la média étaient visibles. Il apparaît donc que l'angioplastie réussie nécessite l'étirement et même la rupture de certaines portions de l'artère afin de créer une zone plus souple permettant l'élargissement de la lumière (87, 88, 89). Ces observations furent confirmées ensuite in-vivo dans un modèle de lapin athérosclérotique (90): Les examens histologiques ont révélé que la plaque 'protégeait' la média des effets du ballon étant donné sa rigidité. Les ruptures, qui pouvaient se limiter à l'intima ou bien briser la lame élastique interne et se prolonger dans la média, se produisirent entre les plaques. Cependant, il semblerait que les endroits les plus fragiles seraient au niveau du bord de la plaque où elle rencontre une section d'artère normale. À ce niveau, les forces exercées par le ballon causent la rupture de la plaque suivi de son décollement de la média. Dans les cas où la circonférence de l'artère est atteinte les ruptures se produisent aux endroits où la plaque est la plus mince. Un certain décollement de la plaque avec une rupture plus profonde dans la média, pouvant dans certains cas atteindre l'adventice, est également observé. Cependant, à cause de



l'hétérogénéité des lésions et des caractéristiques hémodynamiques et structurelles des artères athérosclérosées, aucune corrélation n'a pu être établie entre le degré ou le temps de gonflement d'un ballon et l'endommagement créé. En bref, il semblerait que l'angioplastie permet un agrandissement de la lumière en causant d'abord des ruptures et un décollement de la plaque, puis l'étirement des portions normales de l'artère (91, 92, 93).

L'angioplastie cause donc des lésions vasculaires qui peuvent être légères, avec endommagement de l'intima, ou sévères, avec brisure de la lame élastique interne et exposition de la média ainsi que des composantes de la plaque. Les plaquettes et les neutrophiles sont activés par contact avec ces surfaces thrombogènes et y adhèrent. Les niveaux d'adhésion augmentent d'ailleurs significativement lorsque la lésion se prolonge dans la média (24). Il en est de même pour la vasoconstriction de l'artère, qui semble dépendre du niveau d'adhésion des neutrophiles (25). Des études effectuées sur un modèle porcin d'angioplastie démontrent également l'importance des plaquettes dans le recrutement des neutrophiles suite à la lésion (24, 26, 94). Chez l'homme, les leucocytes et les plaquettes sont activés suite à l'angioplastie et montrent une présence accrue de certaines molécules comme MAC-1 et le sLex. Une baisse de l'expression de la L-sélectine (95) ainsi qu'une activation de la GPIIb/IIIa (96) ont également été observés. L'angioplastie augmente la mobilisation nucléaire du facteur NF- $\kappa$ B et l'expression de ICAM-1 (97) ainsi que du récepteur du PDGF (98) chez les cellules musculaires lisses, favorisant leur implication dans les réactions vasculaires. Ces résultats suggèrent que les molécules d'adhésion ont un rôle important dans la thrombose artérielle post-angioplastie et la resténose (99, 100).

## 2.2. Le phénomène de *Recoil*

Le phénomène de *recoil* est une diminution presque immédiate (premier 24h) de la lumière de l'artère et qui semble être une conséquence des propriétés élastiques des parois artérielles. Ce phénomène peut être expliqué par deux processus. Les artères contiennent deux lames élastiques, du tissu conjonctif et de la matrice extracellulaire qui ont pour rôle de résister aux pressions intravasculaires et ont tendance à reprendre leur forme initiale après l'étirement. Les cellules vasculaires et tout particulièrement les

cellules musculaires lisses (qui peuvent faire partie de la plaque ou de la média) réagissent physiquement à un trop grand étirement en se contractant et peuvent ainsi réduire activement la lumière de l'artère (79). Évidemment, si le degré de dommage occasionné par le ballon est si sévère que la rupture de la lame élastique interne se prolonge dans la média, les propriétés élastiques de la paroi seront amoindries.

### 2.3. La thrombose

La thrombose est le dépôt de plaquettes et de leucocytes ou la formation d'un caillot qui obstrue la lumière d'une artère ou d'une veine, suite à une lésion vasculaire ou la rupture d'une plaque athérosclérotique. Les thrombi sont généralement formés de plaquettes, de leucocytes, de globules rouges et de filaments de fibrine. La concentration de ces différents éléments peut cependant varier. Ainsi, on peut trouver des thrombi rouges à forte teneur en globules rouges (veines) ou des thrombi blancs à forte teneur en plaquettes (artères). La thrombose homéostatique peut se produire lorsqu'il y a une petite lésion ou dysfonction de l'endothélium, causée par exemple par un pathogène. Dans ce cas, la surface exposée sera recouverte par une fine couche de plaquettes le temps de régénérer l'endothélium. Si la lésion est plus importante ou si l'artère est déjà pathologique, il y aura une plus forte réaction et le thrombus peut devenir important et même occlusif. Dans le cas d'une plaque athéromateuse, la rupture peut être causée spontanément par les forces de cisaillement et pressions élevées ou physiquement lors d'une procédure d'angioplastie. La technique d'angioplastie est souvent nécessaire afin de rétablir la lumière d'une artère sténosée, mais l'ampleur de la réaction thrombotique qui suivra l'angioplastie dépendra de l'endommagement induit par celle-ci. Ainsi, le type et la pression du ballon, la sévérité de la sténose, la composition et la forme de la plaque, le risque de rupture, les forces de cisaillement locales, le niveau d'activation des plaquettes et des leucocytes ainsi que les traitements adjuvants sont d'autant de paramètres à être évalués soigneusement.

### 2.3.1 Déposition plaquettaire

Après l'angioplastie, des substances thrombogènes qui proviennent du sous-endothélium (Facteur von Willebrand, fibronectine) et/ou de la plaque (collagène, lipides) sont exposées à la circulation. Les lipides sont les éléments les plus thrombogènes et une rupture d'une plaque de type Va est donc très dangereuse. Le collagène est également un élément qui stimule la formation de thrombus lorsque exposé à la circulation. Les plaquettes se déposent à ces endroits afin de recouvrir la surface endommagée et sont activées (11). Les mécanismes moléculaires de la déposition plaquettaire sont décrits dans plusieurs résumés (36). En bref, les intégrines plaquettaires GPIIb et GPIIb/IIIa peuvent lier le facteur von Willebrand, le GPIIb/IIIa se lie au collagène et le GPIIb/IIIa peut lier la fibronectine. Ces liaisons activent les plaquettes qui sécrètent, de l'intérieur des granules  $\alpha$  vers la surface, la P-sélectine, et transforment le GPIIb/IIIa de sa forme inactive à sa conformation active. En fait, toute une redistribution et une augmentation des molécules de surfaces se produisent lors de l'activation, favorisant les interactions cellulaires (13). L'agrégation plaquettaire devient évidemment primordiale car elle permet d'accumuler d'importantes quantités de plaquettes au site de la lésion et augmente la taille du thrombus. L'agrégation est principalement provoquée par l'interaction de la GPIIb/IIIa activée avec le fibrinogène mais peut être facilitée par le GPIIb, le facteur von Willebrand (101) et la thrombospondine (102). Plusieurs études cliniques importantes ont été menées afin de vérifier l'importance de l'inhibition de la GPIIb/IIIa dans le traitement de différentes pathologies vasculaires comme l'angine, la thrombose coronaire, lors de l'angioplastie et contre la resténose (103, 104). Les plaquettes activées, de même que les cellules endothéliales dysfonctionnelles, relâchent aussi d'importantes quantités de PAI-1. La présence de cet inhibiteur de la fibrinolyse favorise la consolidation du thrombus (105). De plus, une étude a montré que les plaquettes liées au collagène favorisent l'activation de la coagulation par le facteur X (106). In vivo, les plaquettes peuvent également être activées par les forces de cisaillement présentes au site où le thrombus se développe (107). Les plaquettes activées qui demeurent néanmoins dans la circulation peuvent former des microagrégats ou relâcher d'importantes quantités de substances activatrices. La présence de ces agrégats

ou de marqueurs de l'activation plaquettaire comme la P-sélectine ou la GPIIb/IIIa activée sont des indicateurs des risques d'infarctus (107, 108).

### 2.3.2 Adhésion neutrophilique

Les leucocytes et particulièrement les neutrophiles qui entrent en contact avec les plaquettes roulent à leur surface. Ce roulement est la première étape de l'adhésion leucocytaire et implique la L-sélectine, le PSGL-1 et le sLex. Ces dernières, en se liant à la P-sélectine, permettent aux leucocytes de ralentir et de se lier fermement via leurs intégrines (109). La liaison de l'antigène Lex sur les monocytes (19) et de la L-sélectine (110) induit l'activation des récepteurs CD11/CD18, favorisant les interactions subséquentes. La liaison des intégrines leucocytaires (CD11b/CD18 et CD11c/CD18) aux intégrines plaquettaires (GPIIb/IIIa) via le fibrinogène entraîne l'activation des leucocytes (14, 20, 111). Comme avec les plaquettes, l'activation leucocytaire entraîne une redistribution de certaines molécules d'adhésion, dont le PSGL-1 (112, 113), ainsi que la perte de la L-sélectine (114). Les leucocytes relâchent alors des substances chemotactiques (leucotriennes) et activatrices (élastase, PAF) qui amplifient la réaction thrombotique et la réaction vasoconstrictrice de l'artère. Les cellules musculaires de l'artère sont sensibles à ces signaux chimiques et en se contractant réduisent le diamètre de l'artère. Certaines substances peuvent même directement activer des récepteurs des plaquettes, comme c'est le cas avec l'élastase et la GPIIb/IIIa (115). Les neutrophiles activés relâchent également des substances qui endommagent davantage la paroi artérielle comme les radicaux libres de l'oxygène. Les cellules endothéliales dysfonctionnelles, les plaquettes activées ainsi que les cellules fibroblastiques sous-jacentes produisent également d'importantes quantités de facteurs de croissance (EDGF, PDGF et FGF (facteur de croissance fibroblastique)) qui entraîneront subséquentement la prolifération des cellules de la média et la formation du néointima. La dysfonction endothéliale entraîne de plus une baisse de la production de NO qui aura pour effet direct d'augmenter l'adhésion neutrophilique (116). Une infusion de NO au site de la thrombose permet non seulement d'inhiber l'adhésion des neutrophiles et des plaquettes (29, 30, 117) mais aussi la vasoconstriction artérielle (117). De plus, les neutrophiles adhérents et activés peuvent servir au recrutement d'autres neutrophiles. Cette agrégation

neutrophilique se produit d'abord, comme avec les plaquettes, par un phénomène de roulement via les sélectines puis par une adhésion ferme via les intégrines. La L-sélectine joue un rôle important dans la première étape en liant les polysaccharides sur les neutrophiles opposés (118) ou le PSGL-1 (119). L'adhésion ferme se ferait entre les  $\beta_2$ -intégrines via une molécule de fibrinogène. Cependant, l'agrégation neutrophilique n'est pas un mécanisme de recrutement important dans les réactions inflammatoires.

### 2.3.3 Interactions plaquettes-neutrophiles

Plusieurs études démontrent l'importance des interactions plaquettes-leucocytes dans diverses conditions pathologiques (120, 121). On a également remarqué que les patients souffrant d'athérosclérose coronarienne ont des agrégats plaquette-monocyte circulants (122). L'importance de ces interactions a également été démontré lors de la thrombose (21, 22). Lors de réactions thrombotiques, la couche de plaquettes qui se dépose à la surface de la lésion favorise l'adhésion des neutrophiles (18, 26, 123). Les articles détaillant les multiples interactions moléculaires possibles et la coactivation via des médiateurs chimiques entre les plaquettes et les neutrophiles sont nombreux (124, 125, 126). Il semblerait cependant que, *in vivo*, les interactions d'importance physiopathologiques soient causées premièrement par les sélectines et le sLex puis par les  $\beta_2$ -intégrines (127, 128), comme il a été détaillé dans les passages traitant des adhésions respectives des plaquettes et des neutrophiles. Cependant, il a également été rapporté que la GPIIb/IIIa (36) et la thrombospondine (129) pourraient favoriser l'adhésion de leucocytes aux plaquettes. Finalement, une étude démontre aussi une interaction possible entre le LFA-1 des leucocytes et ICAM-2 à la surface plaquettaire (130). Ces interactions favorisent l'activation des plaquettes et des neutrophiles qui augmentent leurs activités sécrétoires et même phagocytaires (131). Ces effets ont pour conséquence d'augmenter les réactions vasoconstrictrices de l'artère (24, 25, 26). Il ne faut cependant pas négliger l'apport considérable des médiateurs chimiques comme les leucotriennes (132), le NO (117) et les voies de signalisations intracellulaires (133) qui favorisent la coactivation entre plaquettes et leucocytes ainsi que la vasoconstriction.

### 2.3.4 La cascade de coagulation

Une dernière composante importante de la thrombose est la cascade de coagulation. L'activation leucocytaire entraîne l'activation du Facteur Xa, point commun des branches intrinsèque et extrinsèque de la coagulation, et permet la génération de la thrombine. Hormis ces capacités puissantes d'activations cellulaires, la thrombine catalyse la dégradation du fibrinogène en fibrine. La fibrine, produit ultime de la coagulation, se dépose lors de la formation du thrombus créant une matrice qui le consolide. Elle favorise également l'agrégation plaquettaire (134).

La coagulation peut être limitée par l'HCII (Cofacteur de l'héparine-II), l'AT-III (Anti-thrombine-III) et les mécanismes de la fibrinolyse (dégradation et élimination de la fibrine). La fibrine est dégradée par la plasmine, substance provenant de la transformation du plasminogène. Cette réaction est stimulée par plusieurs facteurs comme le t-PA (activateur du plasminogène de type tissulaire) et l'urokinase. En temps normal, le t-PA est produit par les cellules endothéliales, mais une dysfonction de celles-ci lors de pathologies vasculaires entraîne l'arrêt de sa production. Couplée à la diminution de la production de NO et à l'activation du Facteur Xa, la baisse de t-PA favorise la coagulation et promeut la déposition de fibrine et de fibrinogène (134).

Nous constatons que lors de la thrombose, les mécanismes normaux de l'homéostasie qui sont un équilibre délicat entre coagulation, fibrinolyse, plaquettes, leucocytes et endothélium, sont fortement perturbés et favorisent l'accumulation excessive de ces composantes au site de la lésion. Il existe donc un phénomène d'amplification anormale de la réaction thrombotique qui peut mener à une occlusion aiguë, à un infarctus ou une embolie. Plusieurs traitements antithrombotiques ou thrombolytiques ont été mis au point et sont couramment utilisés en clinique chez des patients en infarctus myocardique, lors de l'angioplastie ou lors de thrombose veineuse (91). On retrouve notamment l'héparine, l'hirulog, le rt-PA (t-PA recombinant) (136) et l'héparine de bas poids moléculaire (137) comme l'énoxaparine.

## 2.4 Resténose

La resténose est un phénomène complexe qui englobe trois processus principaux qui mènent à la réobstruction partielle ou totale du vaisseau après l'angioplastie (79). Les deux premières phases sont celles du *recoil* et de la thrombose, que nous avons toutes deux décrites ci-dessus. La troisième phase est la formation néointimale.

### 2.4.1 Formation néointimale

La troisième phase (4-14 jours) est caractérisée par la prolifération de cellules musculaires lisses causées par l'étirement ou les déchirures de la média. Sous les effets du FGF, du PDGF, de l'EDGF et de la thrombine, les cellules musculaires lisses prolifèrent et migrent vers l'intima aux sites des lésions et s'accumulent pour former le néointima. Il y aura ensuite prolifération et production importante de matrice extracellulaire qui réduit la lumière de l'artère. Plusieurs études démontrent l'implication des sélectines, du moins indirectement, dans la formation néointimale. Particulièrement, des souris '*knock-out*' de la P-sélectine ont une formation néointimale nettement réduite par rapport aux souris témoins (138) et des lapins traités avec un AcMo (anticorps monoclonal) contre la P-sélectine améliore la néoendothélisation (139) après l'angioplastie. Un analogue du sLex peut également inhiber l'hyperplasie intimale en bloquant les sélectines (140). Il semble cependant que ces effets soient dûs à une diminution du recrutement de cellules inflammatoires au site de lésion, limitant ainsi leurs effets sur la formation du néointima. La régénération de l'endothélium au site de la lésion est cependant très importante car cet endothélium peut relâcher des substances vasodilatatrices comme le NO. Ce rôle n'est pas négligeable dans le processus de guérison (141). La déposition de fibrinogène et du facteur von Willebrand est également associée à un épaissement néointimal (142). Les trois phases sont importantes dans le phénomène de resténose et peuvent se prolonger jusqu'à trois mois post-angioplastie. Les processus impliqués dans le remodelage vasculaire sont complexes (143) et ne sont pas encore totalement élucidés. Quelques traitements appliqués lors de l'angioplastie parviennent à limiter la resténose. D'importance, l'héparine parvient à inhiber la prolifération des cellules de la média dans un modèle d'angioplastie répétée (144). Elle parvient également à inhiber l'adhésion plaquettaire lorsque infusée localement avec un

double ballon (145). Finalement, l'hyperplasie intimale peut être inhibée en bloquant les sélectines (140).

D'autres traitements ont été tentés afin de réduire les différentes phases de la resténose. Entre autres, le positionnement de prothèses endovasculaires (*stents*) pour prévenir le *recoil* est de plus en plus utilisé avec la création de matériaux biocompatibles et donnent de bons résultats si utilisés avec un traitement antithrombotique (146). La thrombose post-angioplastie est limitée en clinique par l'addition d'un antagoniste du GPIIb/IIIa, l'intégrine principalement responsable de l'agrégation plaquettaire (147, 148). Finalement, un antagoniste du PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes), qui joue également un rôle important dans la prolifération et la migration des cellules musculaires de la média, a réussi à réduire l'incidence de la resténose chez le rat (149) et chez l'homme (150). D'autres avenues sont également possibles, comme l'inhibition de la croissance cellulaire par antisens (thérapie génique), mais elles sont encore au stade expérimental. Finalement, les patients ayant une fonction plaquettaire anormale ou ceux qui ont le diabète sont plus à risque de développer une resténose (151).



## CHAPITRE II: LES MOLÉCULES D'ADHÉSION ET LEURS LIGANDS

Les sélectines, les intégrines et les immunoglobulines sont trois grandes classes de molécules d'adhésion impliquées dans le phénomène physiopathologique de la thrombose. Plusieurs résumés traitant de leurs rôles et leur importance relative sont disponibles (10, 49, 152).

### 1. Les sélectines

Depuis leur identification en 1989, de nombreuses recherches ont été effectuées afin d'élucider la biologie des sélectines et diverses revues ont été publiées (153, 154, 155). Les trois sélectines sont des protéines de type I qui se ressemblent structurellement et présentent un degré d'homologie très élevé entre elles, ainsi que d'une espèce à l'autre. Elles sont typiquement caractérisées par cinq domaines distincts qui se suivent mais dont la longueur diffère d'une molécule à l'autre. Le premier domaine, d'où elles tiennent leur nom, est le domaine lectine caractérisé par une dépendance au calcium (type C). Puis se succèdent un domaine EGF (facteur de croissance de l'épiderme ou *epidermal growth factor-like*), un domaine SCR (*short consensus repeats*) composé de deux à neuf séquences courtes répétées, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique. L'homologie des différents domaines varie de 35 à 75% entre les sélectines. Seuls les domaines transmembranaire et cytoplasmique n'ont aucune homologie. Cependant, pour une même sélectine, tous les domaines sont très bien conservés entre les espèces (154). La succession de ces différents domaines, qui existent dans d'autres molécules, confère probablement diverses fonctions et propriétés à la molécule et permet également une grande sélectivité au niveau des ligands. Des AcMos (anticorps monoclonaux) qui bloquent la fonction adhésive des sélectines se lient au domaine lectine près du site de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  (153, 156). Des études de mutations ponctuelles ont également révélé l'importance de ces résidus pour la liaison de ligands de type polysaccharide comme le sLex (157, 158, 159). Il semblerait que les SCR, et le domaine EGF en particulier, soient essentiels pour la présentation du domaine lectine dans sa bonne conformation. En effet, si on interchange les domaines EGF entre sélectines, il n'y a pas de changement de spécificité, ce qui se produit lorsqu'on

interchange les domaines lectines (160). Les SCR pourraient également contribuer en éloignant le domaine lectine de la cellule pour améliorer les interactions cellulaires, sans nécessairement contribuer à la fonction adhésive de la molécule. La dernière hypothèse veut que ces séquences répétées servent à oligomériser des sélectines non-liées afin d'augmenter leur affinité.

C'est en 1989 que les trois sélectines furent simultanément clonées et, depuis, d'intenses recherches sur leur structure, fonction et régulation ont permis d'en clarifier les rôles principaux. Notamment, il a été établi que les trois sélectines peuvent causer le roulement des neutrophiles à la surface de l'endothélium et ainsi permettre l'arrêt, l'activation et l'extravasation des leucocytes vers les sites inflammatoires. Ce rôle a été établi suite à l'observation que des polysaccharides simples ou complexes pouvaient inhiber l'attachement des lymphocytes aux cellules HEV (*High Endothelial Venule*) de ganglions lymphatiques et ainsi empêcher la recirculation des lymphocytes (161, 162, 163).

La plupart des ligands naturels pour les sélectines sont donc en partie des polysaccharides qui peuvent être fucosylés, sialylés ou les deux. Un tetrasaccharide simple, le Sialyl Lewis<sup>x</sup> (sLex), a été identifié comme récepteur possible des sélectines par des études avec Ac (164). Il semblerait cependant que cette structure contribue ou fasse partie des récepteurs naturels des sélectines, mais il n'est pas sûr qu'elle soit le domaine spécifique de liaison, puisque des études de liaison en présence d'Ac anti-hydrocarbures ont donné des résultats variables. Cependant, une série de gènes qui codent pour des fucosyltransférases est nécessaire pour la liaison des sélectines avec leurs ligands et, lorsque exprimés, induisent la présentation membranaire de variantes de la molécule Lex. Ainsi, l'expression du gène FucT-IV induit l'expression de Lex mais pas de sLex, FucT-VII produit du sLex mais pas de Lex, et FucT-III du Lex, du sLex, ainsi que ses stéréoisomères Lea et sLea (165, 166, 167). Ces fucosyltransférases paraissent donc fortement impliquées dans la régulation de l'expression de ligands fonctionnels leucocytaires pour les sélectines.

En effet, l'association entre une glycoprotéine et les polysaccharides pourrait conférer d'autres propriétés aux ligands des sélectines. Premièrement, des liens entre ces deux composantes peuvent améliorer la stabilité de la molécule. La protéine peut être

glycosylée à différents endroits et donc moduler les propriétés du ligand ou assurer que seulement certaines protéines puissent devenir des ligands. La protéine glycosylée pourrait faciliter la localisation des ligands dans des structures cellulaires spécifiques comme les microvillus et, finalement, les protéines sont idéales pour effectuer toute signalisation transmembranaire qui pourrait s'effectuer lors de la liaison du ligand avec la sélectine.

### 1.1 La L-sélectine

La L-sélectine (CD62L) est présente de façon constitutive à la surface de neutrophiles, de monocytes, de cellules T et B ainsi que d'une sous population de cellules NK (*Natural Killer*). Lors de l'activation cellulaire, la L-sélectine est relâchée (*shedding*) par clivage protéolytique à la surface extérieure de la membrane (168). Ainsi, on peut aisément détecter de la L-sélectine soluble dans le sérum de personnes normales (169). Le rôle physiologique précis de ce processus est inconnu mais pourrait être un mécanisme de régulation à la baisse de l'activation et de l'adhésion leucocytaire. En effet, le rôle principal de la L-sélectine est d'effectuer le roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium vasculaire en conditions d'inflammation. La L-sélectine est uniquement adaptée à effectuer le captage des leucocytes de par son affinité avec ses récepteurs endothéliaux. Elle permettrait également de suffisamment ralentir le roulement pour que les P et E sélectines endothéliales, de plus faible affinité, puissent établir leurs liaisons avec les récepteurs leucocytaires et ainsi entraîner l'arrêt des leucocytes (15, 170). La L-sélectine effectue également le rôle de recirculation des lymphocytes à travers les organes lymphoïdes secondaires, processus immunologique essentiel pour maintenir l'expression de tous les récepteurs antigéniques de surface. Ainsi, la L-sélectine est responsable du roulement spontané des leucocytes sur les surfaces endothéliales. Cependant, lors de stimulation de l'endothélium par des médiateurs inflammatoires comme des cytokines, l'expression rapide de la P-sélectine diminue l'importance relative de la L-sélectine lors des 20 premières minutes de la réaction. Suite à ce délai, la L-sélectine est de nouveau la principale médiatrice du roulement leucocytaire, dû à la baisse de l'expression de la P-sélectine (16). Dans les conditions d'inflammations, la L-sélectine et la P-sélectine ont des rôles similaires et qui

se superposent dans le temps afin d'assurer le recrutement des leucocytes vers les sites inflammatoires. Cependant, les deux molécules ont des vitesses de roulement différentes. La L-sélectine, avec une vitesse supérieure mais une affinité plus grande permet le captage des leucocytes et le roulement rapide qui permettra la liaison de la P-sélectine. La P-sélectine provoquera ensuite une liaison de plus faible affinité, mais dont le roulement plus lent permettra l'arrêt et l'adhésion ferme des leucocytes (17). La L-sélectine est également importante dans le phénomène d'ischémie-reperfusion et d'infarctus du myocarde puisqu'elle permet le recrutement de différents types de leucocytes vers les tissus endommagés. Des Ac dirigés contre la L-sélectine dans ces conditions permettent de réduire l'endommagement post-ischémique (171). Finalement, l'agrégation leucocytaire qui peut être divisée en deux phases, contact et adhésion, est provoquée par la L-sélectine et par les  $\beta 2$  intégrines (118). En effet, des Ac anti-L-sélectine et des polysaccharides peuvent inhiber l'agrégation neutrophilique (172).

Les domaines SCR et EGF de la L-sélectine semblent très importants pour la présentation du domaine lectine, puisque certains Ac dirigés contre ces domaines diminuent la capacité adhésive de la molécule (173). Cependant, la substitution de ces domaines avec ceux de la P-sélectine ne modifie pas les propriétés de la L-sélectine, ce qui montre que ces domaines contribuent à la présentation et à la conformation, mais non directement au site de liaison de la molécule (160). Une observation récente très intéressante indique que les molécules de L-sélectine sont localisées dans les microvillis à la surface des neutrophiles. Ceci implique que leur localisation peut être contrôlée par le réseau cytosquelettique de la cellule par des liaisons avec le domaine cytoplasmique ou transmembranaire de la L-sélectine (174, 175). De telles liaisons pourraient également faciliter la signalisation intracellulaire lors d'interactions avec ses ligands (176). Parmi d'autres molécules se trouvant sélectivement sur les microvillis on retrouve le ligand de la P-sélectine, le PSGL-1 (177), alors que les  $\beta 2$ -intégrines sont présentes sur la surface entière des leucocytes (174). Ces observations suggèrent que les microvillis favorisent les interactions cellulaires sollicitées par le roulement des leucocytes sur l'endothélium. En effet, des cellules transfectées dont la L-sélectine est redirigée ne sont pas aussi efficaces pour engendrer le roulement (176). De plus, les

molécules d'adhésion sur les microvillis se retrouvent groupées, ce qui pourrait augmenter leur efficacité.

L'expression du gène FucT-VII a été démontrée dans les HEV de souris et supporte donc l'hypothèse que ce gène soit impliqué dans la formation de ligands pour la L-sélectine (178). L'expression de ce gène dans les leucocytes pourrait en effet contribuer aux interactions leucocytes-leucocytes mais pourrait également contribuer à la formation des ligands pour les autres sélectines. Cette hypothèse fut confirmée par la suite par une étude *in vivo* sur des souris avec des mutations ponctuelles de ce gène. Ces souris n'ont pas de ligands fonctionnels ni pour la P ni la E-sélectine et les cellules HEV des organes lymphoïdes secondaires sont dépourvus de ligands fonctionnels pour la L-sélectine. Leur compte leucocytaire est élevé, le roulement spontané est complètement inhibé, ainsi que la migration leucocytaire en condition d'inflammation (179). Ces expériences démontrent bien l'importance de ce gène dans la construction de ligands fonctionnels pour les trois sélectines.

Trois ligands pour la L-sélectine ont été identifiés sur des cellules HEV par l'Ac MECA-79. Ces trois glycoprotéines présentent des résidus sialylés, fucosylés et sulfatés qui peuvent servir de ligands. La présence de ces résidus semble importante dans la reconnaissance par la L-sélectine et pour le phénomène de roulement (180). La première, sgp50 ou GlyCAM-1, est une molécule qui est sécrétée à la suite de sa production et ne peut donc pas être un ligand endothélial efficace. La deuxième, sgp90 ou CD34, est une protéine de type mucine présente universellement sur toute la surface de l'endothélium vasculaire chez les humains. Cependant, elle ne représente que 50% des liaisons avec la L-sélectine (181). Il semble donc que la dernière molécule, sgp200, qui n'a toujours pas été identifiée, pourrait être fortement impliquée comme ligand naturel ou même principal de la L-sélectine. Des études récentes suggèrent cependant que le PSGL-1 puisse être un ligand pour la L-sélectine lors d'interactions entre leucocytes (182, 183). Cependant, ces mêmes études proposent qu'un mécanisme distinct existe aussi puisqu'un Ac qui bloque la reconnaissance du PSGL-1 par la L-sélectine n'empêche que 53% du roulement leucocytaire sur de la L-sélectine purifiée (183).

La liaison calcium-dépendante de la L-sélectine avec son ligand leucocytaire entraîne plusieurs changements intracellulaires, notamment une augmentation de la

concentration calcique, du métabolisme respiratoire, de la production de radicaux libres ainsi que de l'expression de CD11b/CD18 (MAC-1). Ces effets ont pu être reproduits avec l'utilisation d'un Ac anti-L-sélectine sur des neutrophiles et confirment les hypothèses préalables de signalisations intracellulaires par la L-sélectine (20, 184, 185, 186). Plusieurs études ont démontré l'efficacité de la L-sélectine à produire une activation transitoire des leucocytes, une préparation caractérisée par une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et un changement de forme qui faciliterait l'activation complète des leucocytes par d'autres stimuli (184, 187). Ce mécanisme pourrait être important afin d'assurer une bonne activation lors du recrutement vers les sites inflammatoires. De plus, des sulfates induisent une production d'ARNm ainsi que de  $\text{TNF}\alpha$  (facteur de nécrose tumorale- $\alpha$ ) et d'IL-8 (interleukine-8) (184). Tous ces changements sont fortement impliqués dans l'activation leucocytaire au site d'inflammation et lors de réactions hémostatiques et favorisent les réactions physiopathologiques suivant l'adhésion leucocytaire.

## 1.2 La P-sélectine

La P-sélectine (PADGEM, GMP-140, CD62P) est exprimée de façon constitutive dans les granules  $\alpha$  des plaquettes ou dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales. Lors de stimulation par des agonistes, les compartiments intracellulaires fusionnent avec la membrane cellulaire et la P-sélectine est exprimée à la surface (12, 188). Les substances qui provoquent la translocation de la P-sélectine sont la thrombine ou l'adénosine diphosphate (ADP) chez les plaquettes et la thrombine, l'histamine, des activateurs de la protéine kinase C et des fragments du complément chez les cellules endothéliales (189). L'expression de la P-sélectine à la surface est rapide (minutes) mais transitoire car elle est également réinternalisée. Le cycle d'expression de la P-sélectine est contrôlé par le domaine cytoplasmique de la molécule et il semble que la phosphorylation de certains résidus soit impliquée dans sa translocation vers la surface (190, 191, 192, 193). Chez les cellules endothéliales, l'expression peut également être induite de façon transcriptionnelle par des facteurs tels le LPS (lipopolysaccharides bactériens), le  $\text{TNF}\alpha$  ou l'IL-1 et conduit à sa présence sur les membranes deux à quatre heures plus tard (194, 195). Ce patron d'expression permet l'agencement des activités de

la P et de la L-sélectine lors du roulement des leucocytes en situation d'inflammation, même si la P-sélectine prédomine lors de son induction dans les premiers instants de la réaction (<20 min). Cependant, la présence des deux sélectines permet un contact et un roulement beaucoup plus efficace que l'une des deux sélectines seule. Ainsi, la combinaison de la L et la P-sélectine n'est pas qu'une simple question de relais temporel, puisque la présence d'une molécule amplifie l'efficacité de la seconde au moment où le recrutement de leucocytes devient important. Ainsi, le *knock-out* de l'une ou l'autre des sélectines retarde l'entrée de leucocytes dans la cavité péritonéale enflammée de souris de deux à quatre heures (196, 197) et la combinaison de deux Ac inhibe complètement cette réaction (198). Ces observations concordent bien avec les délais d'expression de novo de la P et E-sélectine (2 à 4 heures) et démontrent l'importance de la P et L-sélectine dans les réactions aiguës d'inflammation. Néanmoins, l'induction de l'expression de novo de la P-sélectine par le LPS ou des cytokines lui confère également un rôle dans les réactions d'inflammation chronique. Les différences dans les affinités et les vitesses de roulement permettent une collaboration efficace entre les deux sélectines et assurent les étapes nécessaires pour le recrutement de leucocytes. Ces rôles inflammatoires de la P-sélectine sont résumés dans une publication de Lorant et al. (199).

Suite à une lésion vasculaire, les plaquettes adhèrent et s'activent par contact avec une paroi endommagée amenant l'expression de la P-sélectine. Ces molécules sont responsables des interactions entre plaquettes et leucocytes, dont les monocytes et neutrophiles. Ces interactions servent à augmenter l'adhésion des neutrophiles au site de lésion vasculaire, et favorisent ainsi une réaction inflammatoire et hémostatique. L'adhésion de neutrophiles aux surfaces artérielles endommagées (ou plutôt aux plaquettes activées) peut être bloquée par un Ac anti-P-sélectine (201, 202). L'importance de la P-sélectine dans les réactions thrombotiques suite à des lésions vasculaires importantes a également été démontrée (24, 26).

Le ligand de la P-sélectine sur les leucocytes est un homodimère de nature glycoprotéique qui a été baptisé PSGL-1 (202). Cette molécule de type mucine est le ligand principal de la P-sélectine et un anticorps dirigé contre lui peut inhiber le roulement de neutrophiles sur la P-sélectine sous conditions de flot (177). Il a également

été suggéré, dans un petit nombre d'études, qu'elle puisse être un ligand pour la L-sélectine (182, 183). Le PSGL-1 possède beaucoup de branches fucosylées et sialylées dont plusieurs se terminent avec le groupement sLex. Les gènes FucT-IV et FucT-VII pourraient avoir d'importants rôles lors de ces modifications post-traductionnelles pouvant modifier la spécificité du PSGL-1 pour différents ligands (203). De plus, la liaison du PSGL-1 avec la P-sélectine dépend de la présence d'une tyrosine sulfate près du terminus aminé de la glycoprotéine mature, elle doit être sialylée et fucosylée (204). Le PSGL-1 est présent sur la plupart des leucocytes même si certains ne peuvent lier la P-sélectine (cellules T). La liaison de PSGL-1 avec son ligand entraîne plusieurs changements cellulaires chez les monocytes et les neutrophiles. Entres autres, la production de radicaux libres, l'augmentation de la synthèse de PAF et de l'expression du facteur tissulaire ont été observés (205, 206, 207). La liaison est également associée à la sécrétion de MCP-1 et de TNF- $\alpha$  et à la translocation du facteur NF- $\kappa$ B (208, 209). Ainsi, la liaison du PSGL-1 leucocytaire à la P-sélectine plaquettaire ou endothéliale induit fortement l'activation des leucocytes. Cette étape est essentielle à l'adhésion ferme, la transmigration ou la production de médiateurs proinflammatoires lors de réactions inflammatoires et thrombotiques. L'importance physiologique de la liaison de la P-sélectine avec le PSGL-1 lors de ces réactions n'est plus à démontrer (210, 211).

### 1.3 La E-sélectine

Sous l'influence des stimuli inflammatoires tels que IL-1, TNF- $\alpha$  ou LPS, les cellules endothéliales expriment la E-sélectine (ELAM-1, CD62E) (212). L'expression de la E-sélectine est induite au niveau de la transcription et peut être inhibée par le TGF- $\beta$  (212, 213). Cette expression devient maximale de 3 à 6 heures après stimulation mais la E-sélectine est ensuite rapidement internalisée et dégradée dans les lysosomes (214, 215). Sa transcription est alors fortement abaissée (216), et l'ARNm de la E-sélectine ayant une demi-vie très courte (217), l'arrêt de l'expression de la E-sélectine sur les cellules endothéliales survient entre 6 et 9 heures après stimulation. Cependant, dans les cas d'inflammations locales, la E-sélectine peut être exprimée de façon chronique (155, 218).



La contribution de la E-sélectine au roulement des leucocytes lors de réactions inflammatoires n'est donc pas présente avant les deux premières heures de stimulation. Son rôle lors de stimulations chroniques a également été remis en cause puisque des études de souris knock-out de la E-sélectine ne montrent pas de déficiences sérieuses, à moins que la P-sélectine soit également bloquée (219). Néanmoins, la liaison de la E-sélectine avec son récepteur leucocytaire induit des changements cellulaires endothéliaux dont des changements de forme. Ceci confirme des études qui montrent que la E-sélectine peut établir des liens avec le cytosquelette de la cellule, dont l' $\alpha$ -actinine, la vinculine et la kinase d'adhésion focale (FAK)(220). Ces effets pourraient contribuer au recrutement et surtout à l'extravasation et la migration des leucocytes vers les sites enflammés et aussi à d'autres phénomènes physiopathologiques comme l'angiogénèse ou les métastases.

Les ligands de la E-sélectine sur les leucocytes ne semblent pas nécessiter de groupements sulfates pour établir la liaison, contrairement aux deux autres sélectines, mais l'expression du gène de la FucT-VII est un bon marqueur d'une liaison efficace. Il semble que la présence de sLex favorise la liaison avec la E-sélectine (167). Il a donc été postulé que le PSGL-1 et la L-sélectine puissent servir de ligand leucocytaire. Cependant, la liaison avec le PSGL-1 est de très basse affinité (221) et n'est sûrement pas efficace physiologiquement. Quant à l'expression de la L-sélectine sur les leucocytes, elle n'est ni nécessaire ni suffisante pour lier la E-sélectine (222). Leninovitz et al (223) ont cependant identifié une glycoprotéine de 150 KD, baptisée ESL-1, qui peut lier la E-sélectine lorsqu'elle est fucosylée. De plus, un antisérum anti-ESL-1 peut bloquer partiellement la liaison de leucocytes à une forme recombinante de la E-sélectine (224). Le ESL-1 pourrait donc être le ligand principal de la E-sélectine sur les leucocytes. Finalement, la liaison de la E-sélectine avec les neutrophiles peut induire l'activité des intégrines, dont MAC-1 (225).

## 2. Les intégrines

Plusieurs études complètes et détaillées sur les intégrines sont disponibles (226, 227, 228). Les intégrines sont des molécules d'adhésion glycoprotéiques composées de deux sous-unités distinctes  $\alpha$  et  $\beta$ . Jusqu'à présent, on a identifié près de 14 sous-unités  $\alpha$  ( $\alpha_{1-9, V, L, M, X}$  et  $\alpha_{IIB}$ ) et 8 sous-unités  $\beta$  ( $\beta_{1-8}$ ) pouvant créer par association 21 intégrines caractérisées (228). Les intégrines sont divisées en trois grandes classes qui regroupent celles ayant des sous-unités communes, et donc ayant des activités physiologiques semblables. Les  $\beta_1$ -intégrines, associées aux sous-unités  $\alpha_{1-9, V}$ , se retrouvent sur plusieurs types cellulaires et effectuent des interactions avec les composantes de la membrane basale comme le collagène, la laminine et la fibronectine (49). Parmi celles-ci, seule l' $\alpha_4\beta_1$  est exprimée sur les leucocytes, mais non les neutrophiles, alors que  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  et  $\alpha_6\beta_1$  sont présentes sur les plaquettes. Ces molécules font partie d'un groupe nommé VLA (antigènes exprimés tardivement ou *Very Late Antigens*) (229). Les interactions cellulaires fermes entre les leucocytes et les cellules endothéliales ou les plaquettes lors de réactions inflammatoires sont principalement effectuées par les  $\beta_2$ -intégrines, soient  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_M\beta_2$  et  $\alpha_X\beta_2$  (LFA-1, MAC-1 et p150,95). Ces molécules se retrouvent exclusivement sur les leucocytes (230). Les intégrines du groupe  $\alpha_V$  ( $\beta_{1,3,5,6}$ ) se retrouvent également sur plusieurs types de cellules et peuvent établir des liens avec le fibrinogène, la vitronectine, la fibronectine, la thrombospondine et le facteur von Willebrand. Cependant, elles ne sont pas présentes sur les leucocytes et seule l' $\alpha_V\beta_3$  l'est sur les plaquettes (231). L' $\alpha_V\beta_3$  sera donc traitée avec la GPIIb/IIIa ( $\alpha_{IIB}\beta_3$ ) dans le paragraphe réservé aux  $\beta_3$ -intégrines des plaquettes. Finalement, la GPIb plaquettaire sera traitée avec le facteur von Willebrand, bien qu'elle ne soit pas à proprement parler une intégrine, puisque cette interaction est importante lors de la phase d'adhésion plaquettaire.

Les intégrines sont des molécules reconnues pour leurs capacités à effectuer des liaisons de haute affinité et de grande spécificité et sont capables d'induire une signalisation transmembranaire (232, 233). En effet, la liaison des deux sous-unités au cytosquelette ou à des protéines cytoplasmiques leur confère l'unique habilité à effectuer des changements intracellulaires et morphologiques. Certaines intégrines comme la

GPIIb/IIIa peuvent également être activées et se modifier en une conformation de plus haute affinité suite à certains signaux intra- ou extra-cellulaires (234) . Les intégrines sont des molécules particulièrement efficaces pour médier les interactions cellulaires impliquées dans les réactions inflammatoires et la thrombose (49).

## 2.1 Les intégrines leucocytaires

### 2.1.1 Les $\beta_1$ -intégrines

Les VLAs sont composées d'une sous-unité  $\alpha$  et de la sous-unité  $\beta_1$ . Les sous-unités  $\alpha$  possèdent un important domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Il existe une certaine homologie (18-25%) entre les sous-unités  $\alpha$  des différentes VLAs. Les liaisons des VLAs avec leurs ligands sont souvent favorisées en présence de cations divalents comme le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$  étant donné la présence de ces sites de liaisons dans la sous-unité  $\alpha$ . Le rôle de la sous-unité  $\beta_1$  est principalement la transduction de signaux intracellulaires suite à la liaison des VLAs avec leurs ligands. En effet, un Ac dirigé contre l'épitope LYP22 de la sous-unité  $\beta_1$  inhibe la sécrétion par des plaquettes stimulées au collagène ainsi que l'adhésion au collagène de type III et l'agrégation (235).

#### 2.1.1.1 $\alpha_4\beta_1$

VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ) est la seule des  $\beta_1$ -intégrines à être exprimée de façon importante sur les cellules de lignées hématopoïétiques. Quoiqu'elle ne soit présente sur les neutrophiles, VLA-4 permet des interactions entre les autres leucocytes (lymphocytes B et T, éosinophiles, macrophage) et la matrice extracellulaire. Elle permet également quelques interactions cellulaires (236). En effet, il semblerait que le rôle principal de VLA-4 soit la migration de cellules T vers les sites inflammatoires. L'expression de la sous-unité  $\alpha_4$  à la surface de ces cellules lors de leur activation est fortement augmentée et promeut l'extravasation (237). Le rôle de cette molécule a également été décrit dans la recirculation des cellules T (238).

Les interactions qui entrent en jeu lors de ces processus sont des liaisons avec la molécule d'adhésion endothéliale VCAM-1 et avec une protéine sous-endothéliale, la fibronectine. D'autres interactions non-confirmées sont également possibles avec ICAM-

2 (239). VCAM-1 est une molécule de type immunoglobuline qui peut contenir soit 6 ou 7 domaines. La liaison de VLA-4 peut se faire avec les deux isoformes qui sont exprimés à la surface de l'endothélium vasculaire suite à son activation par IL-2, TNF $\alpha$  ou IL-4 (240). Les sites de liaison sur ces molécules sont les régions se trouvant le plus à l'extérieur de la molécule. Ainsi, la liaison de VLA-4 à l'isoforme à 6 Igs de VCAM-1 se fait sur le 1<sup>er</sup> domaine (241), alors que sa liaison à l'isoforme à 7 Igs se fait sur les 1<sup>er</sup> et 4<sup>ème</sup> domaines (242). Quant à la liaison de VLA-4 à la fibronectine, elle se fait à un site précis de 25 acides aminés désigné CS1 (243).

Les interactions de VLA-4 avec VCAM-1 ont été démontrées pour une variété de leucocytes et seraient surtout importantes dans les processus inflammatoires et de recirculation leucocytaire. Elles pourraient également être impliquées dans la formation de plaques athéromateuses (244). Les interactions de VLA-4 avec CS1 ou des peptides contenant cette séquence sont impliquées dans maint processus de différenciation cellulaire lors de l'hématopoïèse (245). Également, cette interaction pourrait être impliquée lors de la migration cellulaire puisque les cellules endothéliales peuvent exprimer les isoformes de la fibronectine qui contient la séquence CS1 (246). Le rôle de VLA-4 dans les réactions inflammatoires in vivo a été confirmé par des études impliquant des Ac (247, 248, 249).

### 2.1.2 Les $\beta_2$ -intégrines

Il existe trois  $\beta_2$ -intégrines qui sont toutes présentes sur les leucocytes et particulièrement sur les neutrophiles. LFA-1 ( $\alpha_L\beta_2$ , CD11a/CD18), MAC-1 ( $\alpha_M\beta_2$ , CD11b/CD18) et p150,95 ( $\alpha_X\beta_2$ , CD11c/CD18) sont des hétérodimères qui sont responsables de l'attachement ferme des leucocytes aux cellules endothéliales et aux plaquettes lors de réactions inflammatoires et hémostatiques.

#### 2.1.2.1 LFA-1

LFA-1 est présente sur tous les leucocytes de lignées lymphoïdes et myéloïdes. Les réactions adhésives de leucocytes effectuées par LFA-1 avec l'endothélium se font par l'entremise de deux molécules d'adhésion de type immunoglobuline, soient ICAM-1 et ICAM-2. Il semble que pour ces interactions, les sites privilégiés de liaison de LFA-1

soient les régions les plus éloignées de la cellule (en N-terminal). Cependant, il est probable que les autres régions participent au moins indirectement à la présentation correcte des sites de liaison. La liaison de LFA-1 à ICAM-1, qui contient cinq régions consensus de type Ig, se fait sur les deux premières régions N-terminales (250). Entre autres, cette liaison permet d'augmenter l'efficacité des liaisons des cellules T aux sites antigéniques et d'améliorer la destruction de pathogènes (251, 252). En effet, ICAM-1 est présente de façon constitutive à la surface de tout l'endothélium vasculaire et également sur la surface des lymphocytes T, des cellules NK et des monocytes (253, 254). De plus, l'expression de ICAM-1 peut être augmentée par des stimuli proinflammatoires. Étant donné la distribution de ces deux molécules entre les cellules sanguines et l'endothélium vasculaire, l'interaction entre LFA-1 et ICAM-1 est uniquement adaptée à engendrer les processus inflammatoires menant à l'athérosclérose (255). La liaison de LFA-1 à ICAM-2 se fait sur la première des deux régions de type Ig de la molécule. Comme ICAM-1, ICAM-2 est également exprimée de façon constitutive à la surface des cellules de lignées hématopoïétiques et de l'endothélium (253, 254) mais ne peut être induite ou augmentée par des stimuli inflammatoires. Une étude de Diavoco et al. (130) a également démontré la présence de ICAM-2 à la surface des plaquettes, suggérant un rôle dans les interactions plaquettes-leucocytes lors des réactions hémostatique et thrombotique.

La liaison de LFA-1 à ICAM-3 se fait également sur les deux premières régions des cinq disponibles (256). Cependant, ICAM-3 n'est pas exprimée sur la surface endothéliale mais à la surface de leucocytes non-activés. Lors d'interactions entre leucocytes, ICAM-3 semble être le ligand de choix pour LFA-1 et il est donc postulé que cette liaison est la principale impliquée dans les réponses immunitaires faites par les lymphocytes (256, 257). Les rôles physiologiques de LFA-1 ressemblent à ceux de VLA-4. En effet, LFA-1 est impliquée au niveau de l'adhésion de cellules T à l'endothélium, de la coactivation entre lymphocytes T (258) et dans la migration transendothéliale d'eosinophiles (259). Des études plus poussées ont été effectuées afin de déterminer l'implication des différentes voies adhésives possibles et montrent une spécificité dépendante de l'activation des cellules (activées: LFA-1/ICAM-1, ou inactivées: LFA-1/ICAM-2) (260). En général, la contribution de LFA-1 est supérieure à

celle de VLA-4 dans l'adhésion de lymphocytes T aux cellules endothéliales, à moins que l'activité ou la présence de LFA-1 soit diminuée comme dans les patients souffrant d'adhésion leucocytaire déficiente (261). Ces observations suggèrent que, dans le phénomène de recrutement des lymphocytes T par l'endothélium en conditions inflammatoires, il existe un mécanisme de régulation dépendant des niveaux réciproques d'activation des deux intégrines LFA-1 et VLA-4.

#### 2.1.2.2 MAC-1

MAC-1 est exprimée sur les cellules NK, les granulocytes, les monocytes et est l'intégrine la plus présente à la surface des neutrophiles. Cette intégrine est en effet impliquée principalement dans le recrutement et l'extravasation des neutrophiles vers les sites inflammatoires puisqu'elle est responsable de l'adhésion ferme des neutrophiles aux surfaces endothéliales après le roulement (262, 263). Cette interaction se produit principalement via l'immunoglobuline ICAM-1 (264). Cependant, MAC-1 peut également lier le fragment du complément C3bi, le fibrinogène ainsi que le facteur X. Ces liaisons activent la cascade de coagulation et favorisent la déposition de fibrine au site de lésion endothéliale, le recrutement, l'activation et l'extravasation des leucocytes vers des sites inflammatoires ainsi que le rejet de greffes (227, 228, 263, 265). La liaison de MAC-1 à ICAM-1 semble être distincte du site de liaison de LFA-1. En effet, MAC-1 se lie au troisième domaine Ig de ICAM-1 et est de moins haute affinité que la liaison LFA-1/ICAM-1. La liaison MAC-1/ICAM-1 peut cependant être modulée *in vivo* par la glycosylation du récepteur (266). MAC-1 peut également être activé par d'autres médiateurs. En effet, une régulation à la hausse de MAC-1 sans changement de densité de surface a été observée lors de l'activation cellulaire par l'ADP et l'ATP (267), le PAF, le roulement sur la E-sélectine d'un endothélium activé (268) et la LTB<sub>4</sub> (269). Un mécanisme commun à ces agonistes pourrait être l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. La liaison d'un cation divalent (Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>) à un domaine Ig du récepteur pourrait également induire le changement de conformation impliqué dans l'activation de MAC-1 (270).

MAC-1 peut également se lier au fibrinogène via le site protéolytique D de ce dernier. Ce fragment ne contient pas la séquence RGD qui est nécessaire à la liaison du

fibrinogène avec la GPIIb/IIIa. Cette interaction pourrait être importante lors de l'adhésion ferme des leucocytes aux plaquettes ou au fibrinogène inclus dans un thrombus et contribuer à sa formation (271).

### 2.1.2.3 p150,95

La troisième  $\beta_2$ -intégrine, p150,95 ou CD11c/CD18, est principalement exprimée sur les granulocytes, les monocytes et les macrophages (262, 263). C3bi est le ligand principal de cette molécule et donc permettrait la phagocytose de micro-organismes et l'activation de la cascade de coagulation (227, 228, 263). Les monocytes et les macrophages peuvent également interagir avec les cellules endothéliales activées par l'IL-1 $\beta$  ou le LPS via une liaison CD11c/CD18-dépendante (272). Le ligand endothélial n'est cependant pas encore identifié.

## 2.2 Les intégrines plaquettaires

Quelques résumés d'intérêt sur les intégrines plaquettaires sont récents, complets et permettent une vision générale des rôles essentiels de ces molécules dans les réactions thrombotiques (226, 273). Parmi celles-ci on retrouve les  $\beta_1$ -intégrines qui sont composées des "antigènes exprimés tardivement" (VLA, *Very Late Antigens*) et les  $\beta_3$ -intégrines dont la GPIIb/IIIa. Nous discuterons également dans ce chapitre d'un axe important dans l'adhésion primaire des plaquettes au sous-endothélium, l'axe GPIb-facteur von Willebrand.

### 2.2.1 Les $\beta_1$ -intégrines

#### 2.2.1.1 $\alpha_2\beta_1$

VLA-2 ( $\alpha_2\beta_1$ , GPIIa/IIa) est la principale molécule plaquettaire impliquée dans l'adhésion des plaquettes au collagène (274). Elle a donc un rôle important dans l'adhésion des plaquettes aux surfaces endommagées et également dans l'agrégation subséquente. En effet, l'adhésion des plaquettes à la surface sous-endothéliale qui contient beaucoup de collagène se fait principalement par VLA-2 et par l'axe GPIb-facteur von Willebrand, surtout en conditions de forces de cisaillement élevées (275, 276). L'interaction seule de VLA-2 avec le collagène de type I est suffisante pour

induire l'activation plaquettaire menant à l'agrégation et serait dépendante de la séquence RGD. Les mécanismes moléculaires de cette activation ont été décrits par Santoro et al. (277).

#### 2.2.1.2 $\alpha_5\beta_1$

VLA-5 ( $\alpha_5\beta_1$ , GPIc/IIa) est impliquée dans l'adhésion plaquettaire par sa liaison avec la fibronectine sous endothéliale. Peu d'études ont décrit les mécanismes de ces interactions ou la structure de cette molécule (278). Il est à noter que l'interaction entre VLA-5 et la fibronectine ne dépend pas de l'activation plaquettaire.

#### 2.2.1.3 $\alpha_6\beta_1$

VLA-6 ( $\alpha_6\beta_1$ , GPIc'/IIa) est responsable de l'adhésion des plaquettes à la laminine, composante de la membrane basale. Les plaquettes peuvent adhérer sans stimulation à la laminine via VLA-6 dans le cas d'endommagement léger de la surface endothéliale. Cette interaction se produirait indépendamment de la séquence RGD (279).

### 2.2.2 Les $\beta_3$ -intégrines

#### 2.2.2.1 $\alpha_v\beta_3$

La sous-unité  $\alpha_v$  peut se lier à plusieurs sous-unités  $\beta$  pour former au moins 4 intégrines caractérisées ( $\alpha_v\beta_{1,3,5,6}$ ). La sous-unité  $\alpha_v$  est essentielle puisqu'elle effectue des liaisons avec les séquences RGD de ses ligands. Cette sous-unité est d'ailleurs celle qui a la plus haute affinité pour cette séquence qui est présente dans plusieurs composantes de la matrice sous-endothéliale. La sous-unité  $\beta$  permet une certaine sélection de ces ligands, mais l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (VnR, récepteur de la vitronectine) n'est pas spécifique puisqu'elle peut lier la vitronectine, le fibrinogène, le facteur von Willebrand, la fibronectine, la laminine, le collagène, la tenascine, l'ostéopontine et la thrombospondine (226). L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est donc impliquée dans plusieurs interactions qui favorisent l'adhésion et l'activation plaquettaire aux surfaces sous-endothéliales.



### 2.2.2.2 $\alpha_{Ib}\beta_3$

L'intégrine plaquettaire GPIIb/IIIa ( $\alpha_{Ib}\beta_3$ ) est impliquée à deux niveaux d'adhésion aux surfaces vasculaires endommagées. La GPIIb/IIIa est d'abord en partie responsable de l'adhésion primaire et directe de la plaquette à la surface dénudée via le fibrinogène, le facteur von Willebrand ou encore avec des protéines adhésives du sous-endothélium (fibronectine, vitronectine, collagène) (280, 281, 282). Parmi les autres mécanismes d'adhésion primaire n'impliquant pas la GPIIb/IIIa, on retrouve les liaisons des  $\beta_1$ -intégrines avec les composantes de la matrice, comme vu précédemment, ainsi que l'axe GPIb-facteur von Willebrand (Cf. para 2.2.3). La GPIIb/IIIa est également la principale molécule impliquée dans l'agrégation plaquettaire *in vivo*, processus essentiel pour le recrutement subséquent de plaquettes au site de la lésion. Les liaisons entre plaquettes se font par l'entremise d'une molécule de GPIIb/IIIa sur chaque plaquette liée par une molécule de fibrinogène. Ici encore d'autres molécules peuvent venir favoriser les liaisons (facteur von Willebrand, thrombospondine). Ces interactions ont pour rôle de localiser les plaquettes aux sites d'endommagement et de les activer, phase nécessaire aux fonctions physiologiques de l'hémostase. Nous tenterons donc ici de dégager les propriétés biomoléculaires qui confèrent à la GPIIb/IIIa son implication importante dans les mécanismes d'adhésion, d'agrégation et de thrombose.

La plaquette étant anucléaire, aucune production de novo de GPIIb/IIIa n'est possible une fois que la plaquette est formée. La plaquette emmagasine les molécules qui ont été formées par son précurseur, le mégakaryocyte, dans les granules  $\alpha$ , mais une partie se retrouve également à la surface plaquettaire. Les deux sous-unités de l'intégrine GPIIb/IIIa sont produites séparément dans le mégakaryocyte à l'aide de différents ARNm (283, 284). L' $\alpha_{Ib}$  est fabriquée sous forme d'un précurseur, la pro- $\alpha_{Ib}$ , qui sera clivée dans le Golgi après sa liaison avec la sous-unité  $\beta_3$  dans le réticulum endoplasmique. La sous-unité  $\alpha_{Ib}$  mature contient neuf ponts disulfides et a une taille d'environ 145 kDa. Elle est formée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère (285), laquelle contient un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Le domaine extracellulaire contient un seul pont disulfide qui le lie à la chaîne lourde qui elle contient les huit autres ponts, quatre sites de liaison au calcium et un site de liaison pour la chaîne  $\gamma$  du fibrinogène (226). Beaucoup de modifications se produisent lors de

la glycosylation de la sous-unité dans le Golgi et modifient la structure de la molécule en y ajoutant des chaînes complexes d'hydrocarbures (285).

La taille de la sous-unité  $\beta_3$  est d'environ 90 kDa. Cette sous-unité est soumise à plusieurs modifications dans le réticulum endoplasmique où plusieurs chaînes d'hydrocarbures riches en mannose sont ajoutées (285). L'unique chaîne de la  $\beta_3$  contient un domaine transmembranaire, un domaine cytoplasmique, quatre séquences extracellulaires riches en cystines et 27 ponts disulfides (286, 287). Ces séquences de cystines font d'ailleurs partie intégrante du site de liaison de ligands et sont délimitées de part et d'autre par des ponts disulfides (288).

Lors de l'association des deux sous-unités dans le réticulum endoplasmique, les sites de liaison au calcium semblent jouer un rôle important en favorisant la liaison. D'autres cations divalents comme le magnésium peuvent empêcher la dissociation une fois la molécule complétée (289).

Bien que la GPIIb/IIIa soit la molécule principale impliquée dans l'agrégation, sa liaison comme telle avec ses ligands n'est pas suffisante pour induire le phénomène. En effet, une série de mécanismes suivant la liaison se produisent et favorisent l'activation plaquettaire et l'induction de l'agrégation. Entre autres, il est postulé que la liaison du récepteur de surface non-activé avec un ligand induise un changement de conformation qui résulterait en l'expression de néoantigènes (LIBS) qui pourraient avoir un rôle important dans l'agrégation (290, 291). Les domaines cytoplasmiques de  $\alpha_{IIb}$  et de  $\beta_3$  sont importants dans l'induction de signaux intracellulaires menant à l'activation des récepteurs ou de la plaquette entière. Les mécanismes impliqués dans ces voies ne sont pas encore élucidés mais il est possible que la phosphorylation/déphosphorylation de certains résidus sur le domaine cytoplasmique de  $\beta_3$  (292) ou l'association des domaines cytoplasmiques de la molécule à différentes composantes intracellulaires, ou même entre elles, soient impliqués dans ces cascades de signalisation (226). Certains effets de la liaison du récepteur avec ses ligands ont cependant pu être observés, notamment la phosphorylation de résidus tyrosines, le changement du pH intracellulaire et le changement du flux calcique (228, 293, 294, 295, 296).

La liaison de GPIIb/IIIa à certains ligands (fibrinogène, collagène de type I, fibronectine, facteur von Willebrand et vitronectine) peut se faire au site RGD (Arg-Gly-

Asp) présent sur ces ligands (280, 281, 282). Cette séquence est d'ailleurs présente deux fois sur le fibrinogène, et une troisième séquence non déterminée mais de nature différente peut également lier le fibrinogène et son récepteur. Ces séquences permettent en effet la liaison de deux plaquettes via une seule molécule de fibrinogène. La GPIIb/IIIa elle-même peut également être activée par la liaison avec ses récepteurs ou par des agonistes (ADP, thrombine, collagène). La réponse à ces stimuli passe par le métabolisme du phosphatidylinositol, de l'acide arachidonique ou du flux calcique (297). Ces mécanismes suggèrent que la liaison du récepteur non-activé à ses ligands induit l'activation d'autres molécules de GPIIb/IIIa et donc favorise l'agrégation (298). Ces mécanismes pourraient donc avoir de fortes implications au niveau de la formation de thrombus *in vivo*.

Tous ces mécanismes d'activation de la cellule et du récepteur en tant que tel sont essentiels au bon fonctionnement de l'hémostase et sont interdépendants. *In vivo* cependant, on a remarqué que les conditions favorisent certaines voies plutôt que d'autres. Ainsi, lorsque les conditions locales au site de lésion vasculaire impliquent des forces de cisaillement très élevées, comme dans le cas d'une sténose, la participation du GPIIb/IIIa par rapport à d'autres intégrines ( $\beta_1$ -intégrines) dans les mécanismes d'adhésion, d'agrégation et de formation du thrombus devient alors primordiale. Également dans ces conditions, c'est le facteur von Willebrand plus que le fibrinogène qui est impliqué comme ligand de choix pour l'agrégation (299). Ces observations suggèrent que les liaisons de GPIIb/IIIa à ses ligands puissent être distinctes et être modulées. En effet, Trapani-Lombardo et al. (300), suggèrent précisément que, contrairement à la croyance que la GPIIb/IIIa peut lier toutes les molécules qui contiennent le site RGD par un site unique sur la GPIIb/IIIa, il existe plusieurs sites de liaisons qui peuvent être distincts et ainsi favoriser un type de liaison par rapport à un autre. Il existe en fait deux sites de liaison pour le RGD qui sont compris dans chacune des sous-unités du récepteur et il semblerait que la liaison RGD- $\beta_3$  soit plus efficace que RGD- $\alpha_{IIb}$  à provoquer l'activation plaquettaire (301). Étant donné que la chaîne  $\gamma$  du fibrinogène interagit préférentiellement avec  $\alpha_{IIb}$ , on pourrait penser que le facteur von Willebrand interagit avec  $\beta_3$  et donc que les interactions sont spécifiques aux sous-

unités, ou du moins que les domaines de liaison sont principalement formés dans un cas par  $\alpha_{Ib}$  et dans l'autre par  $\beta_3$ .

Dans le cas de la GPIIb/IIIa, l'interaction avec ses ligands ou d'autres peptides contenant la séquence RGD sont dépendants de l'activation du récepteur (et donc de sa conformation), du degré d'activation de la plaquette (conditions extracellulaires, agonistes) et des signaux intracellulaires effectués (phosphorylation, flux calcique, pH, liens avec le cytosquellette). Cette dynamique complexe, également présente pour d'autres intégrines, régule précisément les étapes nécessaires au bon fonctionnement de l'hémostase.

### 2.2.3 L'axe GPIb-facteur von Willebrand

L'axe GPIb-facteur von Willebrand est responsable de l'adhésion de plaquettes non stimulées au facteur von Willebrand de la matrice sous-endothéliale de vaisseaux endommagés. Cette liaison est la plus importante sous conditions de flot avec forces de cisaillements élevées et engendre la première étape de l'hémostase et de la thrombose (275, 302). La GPIb peut cependant agir en concert avec la GPIIb/IIIa (voir ci-haut et 303) pour lier le facteur von Willebrand et favoriser l'adhésion ainsi que la signalisation intracellulaire menant à l'activation plaquettaire.

La GPIb est composée d'une grande sous-unité  $\alpha$  (143 KD) et d'une plus petite sous-unité  $\beta$  (24 KD). Elle se retrouve, à la surface plaquettaire, dimérisée avec une autre glycoprotéine, la GP-IX (20KD) (304, 305). Environ 50% de la masse de GPIb est composée d'hydrocarbones. Le complexe GPIb/IX est au nombre de 25000/plaquette.

Le facteur von Willebrand est une glycoprotéine sécrétée par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de manière bipolaire. La sécrétion du côté apical est responsable de la présence du facteur von Willebrand dans le plasma alors que la sécrétion basale mène à l'incorporation du facteur dans la matrice sous-endothéliale. Après déendothélialisation, le facteur von Willebrand lié à la matrice est exposé et provoque l'adhésion des plaquettes et le début de formation d'un thrombus hémostatique (306).

La structure moléculaire du complexe GPIb/IX a été décrite et résumée plusieurs fois (273, 307). D'importance, la GPIb $\alpha$  et la GPIb $\beta$  proviennent de deux gènes

différents. GPIb $\alpha$  contient 7 régions tandem extracellulaires riches en leucines et une longue chaîne (100 aa.) cytoplasmique. La portion extracellulaire de GPIb $\beta$  contient une séquence riche en leucines alors que la courte chaîne cytoplasmique contient deux sites de phosphorylation pour une protéine kinase AMPc-dépendante. La GPIX contient également une séquence extracellulaire riche en leucines et une très courte chaîne cytoplasmique (6 aa.). La présence des séquences de leucines sur les trois composantes du complexe la place dans une classe à part et ne peut, par conséquent, être considérée comme une intégrine traditionnelle. Ces séquences riches en leucines pourraient interagir les unes avec les autres pour moduler la fonction du complexe. Le complexe comprend également plusieurs ponts disulfides ainsi que plusieurs résidus cystéines qui sont importants dans la conformation du complexe en régions circulaires. Les séquences cytoplasmiques forment des liens avec l'ABP (protéine de liaison à l'actine ou *Actin Binding Protein*) qui lie les filaments d'actine du cytosol et sont impliqués dans la contraction des plaquettes (308).

Le complexe GPIb/IX peut donc lier le facteur von Willebrand, mais une liaison est également possible avec la thrombine. La liaison avec le facteur von Willebrand se fait sur le domaine le plus externe de GPIb $\alpha$  (302, 309), formé par des acides aminés chargés et organisés en régions circulaires par les ponts disulfides. Cette région serait d'emblée prête à réagir avec le facteur von Willebrand (310, 311). La liaison de la thrombine s'effectue également sur GPIb $\alpha$  avec une affinité modérée (312). Cette liaison favorise l'activation de plaquettes, particulièrement lors de la thrombose.

La liaison du facteur von Willebrand avec GPIb initie directement une signalisation intracellulaire menant à l'activation plaquettaire. Ce mécanisme passe d'abord par une phospholipase A<sub>2</sub> puis par la phospholipase C. Suivent ensuite une étape d'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, la génération d'acide phosphatidique, la phosphorylation de P47 ainsi qu'une augmentation de l'influx calcique (313). Cette séquence d'événements a été observée lors d'un contact entre plaquettes, et donc pourrait être un mécanisme important de l'agrégation. En conditions de flot, l'attachement direct de plaquettes au facteur von Willebrand induit l'activation plaquettaire, la sécrétion des granules ainsi que l'agrégation (314, 315). Ces mécanismes

sont fortement impliqués dans la phase initiale d'adhésion des plaquettes ainsi que dans l'agrégation subséquente lors de la formation d'un thrombus hémostatique.

### **3. Les immunoglobulines**

Les immunoglobulines forment la troisième classe de molécules d'adhésion dont les principaux membres (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 et VCAM-1) se retrouvent sur les leucocytes et les cellules endothéliales activées. Seule ICAM-2 a été trouvée à la surface des plaquettes. Les immunoglobulines sont des ligands pour des intégrines leucocytaires et ont donc été discutées dans le paragraphe correspondant (cf. paragraphe 2.1).

## CHAPITRE III: LES INHIBITEURS DES SÉLECTINES

### 1. Introduction

Les analogues du sLex sont utilisés afin de déterminer le rôle des sélectines dans l'évolution de différentes pathologies. En se liant aux sélectines à la place des récepteurs, ils empêchent leur interaction et la formation d'une liaison. Les analogues du sLex se caractérisent par une structure complexe formée de polysaccharides fucosylés et sialylés qui miment la structure du récepteur naturel.

Ces produits ont permis notamment de démontrer que les sélectines étaient impliquées dans le roulement et l'adhésion leucocytaire, surtout dans des conditions d'inflammations aiguës ou d'ischémie/reperfusion. Le traitement à l'analogue du sLex permet en général de limiter l'infiltration leucocytaire dans les sites enflammés ainsi que le phénomène d'endommagement post-ischémique du myocarde. Cependant, peu d'études ont été réalisées avec les analogues du sLex dans des modèles d'endommagement vasculaire (par angioplastie ou athérosclérose), où l'implication des sélectines dans les phénomènes d'hémostase, de thrombose et de resténose pourrait être importante.

Par soucis de concision et de pertinence, seuls les inhibiteurs des sélectines utilisées lors de nos recherches seront présentés dans cette section.

### 2. Le CY-1503

Le CY-1503 est un oligosaccharide et un analogue typique du sLex. Son utilisation en tant que bloqueur des sélectines est relativement récente et les premières études ont été effectuées afin de déterminer l'efficacité de ce traitement à inhiber les interactions des leucocytes avec les cellules endothéliales. Mulligan et al. ont démontré un effet protecteur du CY-1503 dans un modèle d'inflammation dépendant de la P-sélectine (316). Un an plus tard, ce fut au tour de Buerke et al. de démontrer la cardioprotection de cet oligosaccharide dans un modèle félin d'ischémie/reperfusion (317). Flynn et al. se sont donc basés sur ces observations pour tester le CY-1503 dans un modèle d'ischémie/reperfusion myocardique chez le chien (318). Dans ces

expériences, après une ischémie de 90 minutes, les chiens ayant reçu un bolus (35 mg/kg) 10 min avant la reperfusion puis une infusion (1.75 mg/kg/h) pour les 24 heures suivantes étaient nettement mieux protégés que le groupe témoin. Le groupe a observé une diminution de 56% de la taille de l'infarctus et une diminution de 55% de l'accumulation de cellules polymorphonucléaires. Cependant, une étude menée par Birnbaum et al. (319) chez les lapins n'a pas réussi à démontrer d'effets protecteurs du CY-1503 sur la taille de l'infarctus ni sur le phénomène de *no-reflow*. Aucune activité anticoagulante n'a été remarquée chez les animaux traités avec le CY-1503.

Le CY-1503, de part ses propriétés anti-sélectines, empêche donc le roulement des leucocytes sur l'endothélium activé par l'ischémie. Il s'ensuit une diminution de l'infiltration ainsi qu'une nette diminution de la zone infarctée dans certains modèles.

### 3. La fucoïdine

#### 3.1 Présentation

La fucoïdine est un polysaccharide fucosylé qui a été extrait d'algues marines par Springer et al en 1957 (320). A ce moment, les extraits d'algues étaient étudiés pour leurs propriétés anticoagulantes et la fucoïdine a tout de suite démontré ses capacités. Extrait de la plante *fucus vesiculolus*, la fucoïdine est une chaîne de fucoses liés par des ponts  $\alpha$ 1-3. Plusieurs branches de fucoses viennent s'ajouter à la structure principale par des liens  $\alpha$ 1-2 ou  $\alpha$ 1-4, et des groupements sulfates peuvent se substituer en position 4, lui conférant une structure complexe (321). La préparation de fucoïdine n'est pas sans inconvénients, notamment à cause de l'hétérogénéité des molécules quant à leur taille, variant entre 30 et 200 kDa avec une moyenne de 110 kDa. De plus, les chaînes de différentes tailles peuvent contenir des quantités variables de groupements sulfates étant donné que la fucoïdine est facilement sulfatée. Ainsi, les propriétés de la molécule peuvent changer, physiquement et physiologiquement puisque la sulfatation modifie certaines propriétés anticoagulantes (322, 323). La taille de la molécule influence également les propriétés anticoagulantes de la fucoïdine (324). Il est possible de limiter ces variations en séparant la fucoïdine en sections de tailles plus spécifiques mais cela consiste en une tâche ardue et il n'existe pas encore assez d'études comparatives entre



les différentes tailles de fucoïdine pour déterminer les tranches intéressantes à utiliser. Certaines études ont également démontré que l'addition de groupements phosphates ou amines (325) par des procédés chimiques modifient les propriétés de la molécule.

## 3.2 Propriétés

### 3.2.1 Bloqueur des sélectines

Le groupe Pantakar et al. (321) a sûrement effectué l'étude la plus complète sur la structure de la fucoïdine à ce jour. Leurs recherches révèlent que la structure de la fucoïdine est très similaire à celle d'un analogue du sialyl Lewis<sup>x</sup>. Cette structure expliquerait notamment les capacités de la fucoïdine à inhiber le roulement des leucocytes sur les cellules endothéliales. En effet, beaucoup de chercheurs se sont servis de la fucoïdine en tant que bloqueur des sélectines afin de déterminer le rôle de ces molécules dans différentes conditions d'inflammation.

Physiologiquement parlant, les effets observés sont assez divers. Plusieurs groupes ont remarqué une diminution du roulement et de l'adhésion des leucocytes, surtout dans des expériences de vidéomicroscopie intraveineuse (201, 326, 327, 328) et également une inhibition de l'extravasation des leucocytes vers les sites inflammatoires: ainsi, la fucoïdine a empêché la pléocytose dans un modèle de méningite expérimentale chez le lapin (326) et l'influx de neutrophiles dans les poumons de lapins (328). Également dû à son effet antisélectine, la fucoïdine réduit les lésions de reperfusion chez les rats (329) et les agneaux en ischémie myocardique (330).

In vitro, une multitude d'études ont démontré la capacité de la fucoïdine à lier les ligands de la P et de la L-sélectine (118, 316, 321). Cependant, aucune preuve directe de la liaison de la fucoïdine à ces récepteurs n'a été démontrée même si dans certains cas la fucoïdine a pu engendrer des changements cellulaires dûs à l'activation des cascades de signalisation (118, 316, 321, 331).

### 3.2.2 Anticoagulant

#### 3.2.2.1 Effets sur la coagulation

Les deux branches de la coagulation (extrinsèque et intrinsèque) se rejoignent par l'activation du facteur Xa. Le facteur Xa est responsable de l'activation de la thrombine

qui convertit le fibrinogène en fibrine. Tel que mentionné, le dépôt de fibrine forme une matrice qui consolide le caillot sanguin ou le thrombus. Ces étapes peuvent cependant être modulées, notamment par l'AT-III et l'HC-II. Ces deux molécules agissent de façon similaire en formant un complexe ternaire avec le facteur Xa et la thrombine, empêchant son action sur le fibrinogène. Une étude récente a d'ailleurs démontré que la fucoïdine peut inhiber la thrombose induite par le facteur Xa chez le lapin (332).

L'action de la fucoïdine consiste à augmenter l'efficacité des deux anticoagulants naturels que sont l'AT-III et l'HC-II. Elle favorise ainsi la séquestration de la thrombine et limite la conversion du fibrinogène en fibrine. Plusieurs études ont démontré son action sur les deux composantes (333, 334) mais une étude complète réfute l'implication de la fucoïdine dans l'action de l'AT-III (335). Pour l'HC-II, il semblerait que ses résidus lysines soient importants dans l'établissement de ponts ioniques avec la fucoïdine. Finalement, une étude a également observé un effet direct de la fucoïdine sur la conversion du fibrinogène en fibrine par la thrombine (336).

Enfin, il apparaîtrait que la fucoïdine ait des effets inhibiteurs sur le complément, favorisant ainsi son action anticoagulante mais défavorisant les actions protectrices du complément en tant que défense contre divers pathogènes (323, 337).

### 3.2.2.2 Effets sur la fibrinolyse

La fibrinolyse est l'étape qui permet la dégradation de la fibrine, molécule essentielle du caillot sanguin, maintenant une cohésion entre les différentes composantes de ce caillot. La fibrine est dégradée par la plasmine qui provient de la conversion du plasminogène. Cette étape est contrôlée par des enzymes activatrices (t-PA, urokinase, streptokinase). La plasmine elle-même peut être inhibée par l' $\alpha_2$ -antiplasmine.

La fucoïdine peut agir à différentes étapes de la fibrinolyse pour la favoriser. Ainsi, certains groupes ont observé un effet inhibiteur de la fucoïdine sur l'inhibition de la plasmine par l' $\alpha_2$ -antiplasmine (324, 333), un effet activateur sur la conversion du plasminogène en plasmine par le t-PA et l'urokinase (324, 333, 338) et un effet inhibiteur sur le PAI-1 (333) qui empêche la conversion du plasminogène en plasmine par le t-PA. Il semblerait que la fucoïdine puisse se lier au PAI-1 afin d'empêcher son action et il induirait un changement de conformation du plasminogène qui augmente son

affinité pour l'urokinase. D'autres ont également observé un effet de la fucoïdine sulfatée sur l'activation endothéliale par le LPS et le relargage de PAI-1 (339). En effet, les cellules endothéliales relâchent le PAI-1 pour favoriser la coagulation lorsqu'elles sont attaquées par le LPS. La fucoïdine sulfatée empêcherait la liaison du LPS avec les récepteurs endothéliaux par compétition. Le seul effet procoagulant observé par la fucoïdine est son action inhibitrice sur la conversion du plasminogène en plasmine par la streptokinase (338).

La fucoïdine s'avère être un anticoagulant efficace dû principalement à ses sites d'actions multiples, soient inhibiteurs de la coagulation et activateurs de la fibrinolyse. Son efficacité peut cependant varier proportionnellement avec son contenu en sulfate et selon sa taille.

### 3.2.3 Autres propriétés

D'autres études effectuées avec la fucoïdine ont permis de démontrer qu'elle possède certaines propriétés qui ne sont pas directement reliées à ses effets anticoagulants ou anti-sélectines. Ainsi, la fucoïdine a permis de réduire l'hyperplasie intimale suite à l'angioplastie chez le rat (340). Il est possible que ces résultats découlent des propriétés anti-sélectines de la fucoïdine étant donné qu'une diminution de la thrombose post-angioplastie risquerait d'inhiber la resténose subséquente et donc la formation du néointima. De plus, la fucoïdine peut interagir avec des protéines adhésives du sous-endothélium comme la laminine et la thrombospondine (341). Cependant, les expériences *in vitro* de ce groupe démontrent que la fucoïdine pourrait empêcher la prolifération des cellules musculaires lisses en liant le TGF- $\beta$ 1.

Une autre étude effectuée en 1994 par Soeda et al. démontre dans un modèle de thrombose veineuse induite par endotoxine chez des rats hyperlipidémiques que non seulement la fucoïdine est capable d'inhiber la thrombose mais également de diminuer les quantités circulantes de cholestérol et de triglycérides (325). Cette étude a été la première, à observer un effet antilipidémique de la fucoïdine.

Dans le domaine de la biologie reproductive, il a été observé que la fucoïdine peut inhiber la réaction acrosomiale qui survient au moment de la fécondation de l'œuf

humain par un spermatozoïde (342, 343). Cette observation a permis de suggérer que la réaction acrosomiale, qui libère les enzymes du spermatozoïde pour digérer la zona pellucida de l'œuf, implique l'interaction de molécules de type sélectine à la surface du spermatozoïde avec des récepteurs de nature polysaccharidique à la surface de l'œuf. Ces hypothèses n'ont cependant pas été confirmées.

Finalement, plusieurs études ont permis de démontrer que la fucoïdine peut empêcher la migration de cellules cancéreuses à travers un tissu. Ces études suggèrent également que des sélectines sont à la base de ce phénomène (344). Néanmoins, d'autres études démontrent, qu'au contraire, la fucoïdine accentue le déplacement de ces cellules à travers une matrice extracellulaire et la fibrine en stimulant l'activation du plaminogène (345).

L'excrétion de la fucoïdine a été rapidement décrite (346). Comme d'autres polysaccharides, sa perméabilité dépend de sa taille. Ainsi, une faible portion (10%) de bas poids moléculaire (<30kDa) est excrétée dans l'urine. Une partie des molécules plus grosses pourraient être dégradée par le foie mais cette hypothèse n'a pas été confirmée. Finalement, il semblerait que la plupart de la fucoïdine injectée se retrouve accumulée dans le rein.

## CHAPITRE IV: PREMIÈRE CONTRIBUTION

### 1. Résumé

L'adhésion de neutrophiles aux surfaces artérielles endommagées est accrue en présence de plaquettes par un mécanisme impliquant la P-sélectine. De telles interactions augmentent le risque de formation de thrombi ainsi que les réponses vasculaires associées. Dans le présent article, nous avons étudié les effets d'un bloqueur des sélectines, le CY-1503, un analogue du sialyl Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>), sur les interactions des plaquettes et des neutrophiles après endommagement artériel par angioplastie chez les porcs. La déposition de plaquettes-Cr<sup>51</sup> ainsi que l'adhésion de neutrophiles-In<sup>111</sup> furent mesurées sur des segments artériels avec un endothélium intact et sur des segments endommagés légèrement et sévèrement par cathéter-ballon chez 8 porcs témoins (saline) et 7 porcs traités (CY-1503, 15 mg/kg i.v.). Les paramètres hématologiques, l'agrégation plaquettaire induite par ADP dans le sang complet, le temps de coagulation activé (ACT) ainsi que la fréquence cardiaque et la pression artérielle ont été identiques entre les groupes et n'ont pas été modifiés par le CY-1503. Les niveaux d'adhésion plaquettaire et neutrophilique ont augmenté en fonction de l'endommagement artériel. Cependant, l'adhésion aux segments intacts et aux segments présentant des lésions légères n'a pas été significativement influencée par le traitement au CY-1503. Néanmoins, sur les segments présentant des lésions sévères, le traitement au CY-1503 a permis de réduire l'adhésion de neutrophiles de 51% ( $P < 0.01$ ), de  $446.7 \pm 72.6 \times 10^3$  neutrophiles/cm<sup>2</sup> dans le groupe témoin, à  $186.8 \pm 38.7 \times 10^3$  neutrophiles/cm<sup>2</sup> dans le groupe traité. L'adhésion plaquettaire n'a cependant pas été affectée par le CY-1503 ( $43.4 \pm 15.6 \times 10^6$  plaquettes/cm<sup>2</sup> versus  $50.1 \pm 12.2 \times 10^6$  plaquettes/cm<sup>2</sup> dans le groupe témoin). Dans les expériences in vitro de perfusion, avec des suspensions pures de plaquettes et de neutrophiles, nous avons observé que le CY-1503 interfère avec l'adhésion des neutrophiles aux surfaces artérielles endommagées seulement en présence de plaquettes. Donc, au contact de surfaces artérielles thrombogènes les plaquettes adhérentes et activées favorisent l'adhésion de neutrophiles aux sites de lésions sévères par un mécanisme impliquant le sLe<sup>x</sup> des neutrophiles. L'effet inhibiteur du CY-1503 sur l'interaction des neutrophiles avec les plaquettes adhérentes pourrait être d'importance chez les patients

nécessitant une PTCA, puisque dans de tels cas, les interactions entre plaquettes et neutrophiles pourraient augmenter les réponses aiguës et chroniques à l'endommagement artériel.

**Mots clés :** • plaquettes • neutrophiles • angioplastie • sélectine • CY-1503.

**Selectin Blockade Reduces Neutrophil Interaction with Platelets  
at the Site of Deep Arterial Injury by Angioplasty in Pigs**

Yahye Merhi, Patrick Provost, Patrick Chauvet, Jean-François Théorêt,  
M. Laurie Phillips, Jean-Gilles Latour

**Short title:** Selectin in Platelet, Neutrophil and Arterial wall Interactions

---

From the Laboratory of Experimental Pathology, Montreal Heart Institute, and the University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada (Y.M., P.P., P.C., J.F.T., J.G.L.); and Cytel Corporation (M.L.P.), San Diego, CA.

Reprint requests to Dr Y. Merhi, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Bélanger Street East, Montreal, Quebec H1T 1C8 Canada.

Tel.: (514) 376-3330, ext. 3035; fax: (514) 376-1355; e-mail:  
[merhi@icm.umontreal.ca](mailto:merhi@icm.umontreal.ca).

**Abstract** The adhesion of neutrophils to damaged arterial surfaces is increased in the presence of platelets by a mechanism implicating platelet P-selectin. Such interactions may enhance thrombus formation and the vascular response to injury. In this study, we investigated the effects of a selectin blocker (CY-1503), an analogue of sialyl Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>), on platelet and neutrophil interactions following arterial injury produced by angioplasty in pigs. <sup>51</sup>Cr-platelet deposition and <sup>111</sup>In-neutrophil adhesion were quantified on intact, mildly and deeply injured carotid arterial segments, produced by balloon dilation, in control (saline, n=8) and treated (CY-1503, 15 mg/kg i.v., n=7) pigs. The hematological parameters, the aggregation of whole blood in response to adenosine diphosphate (ADP), the activating clotting time (ACT) as well as the heart rate and mean arterial blood pressure were similar between groups and were not influenced significantly by CY-1503. The level of platelet and neutrophil adhesion increased significantly with the severity of arterial injury, but was not influenced by CY-1503 on intact and mildly injured arterial segments. However, at the site of deep arterial injury, CY-1503 treatment was associated with a 58% reduction ( $P<.01$ ) in neutrophil adhesion, from  $446.7\pm 72.6\times 10^3$  neutrophils/cm<sup>2</sup> in the control group to  $186.8\pm 38.7\times 10^3$  neutrophils/cm<sup>2</sup> in the CY-1503-treated group, whereas platelet deposition remained unchanged ( $43.4\pm 15.6\times 10^6$  platelets/cm<sup>2</sup> versus  $50.1\pm 12.2\times 10^6$  platelets/cm<sup>2</sup> in the control group). In in vitro adhesion experiments, using isolated platelet and neutrophil suspensions, we found that CY-1503 interfered with the adhesion of neutrophils to damaged arterial surfaces only in the presence of platelets. In contact with thrombogenic arterial surfaces, adherent and activated platelets supports neutrophil adhesion at the site of deep injury by an adhesive interaction involving neutrophil sLe<sup>x</sup>. The inhibitory effect of CY-1503 on neutrophil interaction with adherent platelets may be clinically relevant in patients undergoing PTCA where platelet and neutrophil interactions may enhance the acute and chronic arterial response to injury.

**Key Words** • platelets • neutrophils • angioplasty  
 • selectin • CY-1503



The interactions of platelets and leukocytes with the endothelium and the subendothelial matrix are essential to maintain vascular homeostasis. Dysregulation of these interactions after arterial injury has been implicated in thrombogenesis, atherosclerosis, vasospasm, restenosis and a variety of inflammatory processes.<sup>1-3</sup> The extent of platelet and neutrophil accumulation is influenced by the severity of arterial injury and regulated by the relative interplay of adhesion molecules, procoagulant proteins, the local shear conditions, and the nature of the arterial surface exposed. Under pathophysiological conditions, neutrophil-derived products such as platelet activating factor, proteolytic enzymes, reactive oxygen metabolites and leukotrienes can amplify vascular injury and platelet activation.<sup>4-6</sup> Conversely, platelet stimulation can enhance neutrophil activation and adhesion.<sup>7-9</sup> The complexity of these interactions between platelets and neutrophils is well recognized. However, the nature and mechanisms of these interactions after arterial injury are being explored.

In previous studies, we have shown a close interaction between platelets and neutrophils at the sites of carotid arterial injury produced by balloon dilation in pigs.<sup>10</sup> In this model, we have found that platelet depletion was associated with decreased neutrophil adhesion to damaged arterial surfaces,<sup>11</sup> confirming our previous findings showing increased neutrophil adhesion in the presence of platelets<sup>12</sup> in a concentration-dependent manner.<sup>11</sup> These studies provide strong evidence for platelets involvement in neutrophil adhesion to damaged arterial surfaces. The interaction between platelets and neutrophils have been shown to be dependent on P-selectin (CD62P, GMP-140 or PADGEM) expression on activated platelets.<sup>13</sup> The selectins are named according to the cell type on which they were originally identified: P-selectin (platelets), E-selectin (endothelium) and L-selectin (lymphocytes). P-selectin is present in the  $\alpha$ -granules of platelets and in the Weibel-Palade bodies of endothelial cells,<sup>14</sup> and is rapidly translocated to the cell surface after agonist stimulation. Interestingly, the selectin family of adhesion molecules is implicated in many homotypic and heterotypic reactions including the interactions of neutrophil with endothelial P- and E-selectin,<sup>14-17</sup> neutrophil-neutrophil L-selectin<sup>18</sup> and neutrophil with platelet P-selectin.<sup>13,19-23</sup> These pathways highlight the importance of selectins in neutrophil adhesion. Therefore,

blockade of selectins or their ligands could reduce neutrophil accumulation in many inflammatory reactions and thrombotic events.

The selectin family is characterized by adhesive interactions that involve fucosylated oligosaccharides on opposite cells, such as sialyl Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>).<sup>24-26</sup> Analogues of this carbohydrate-binding site, a sLe<sup>x</sup> oligosaccharide containing fucose and sialic acid moieties [NeuAC2,3Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAcβ1,3Galβ-O(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COOCH<sub>3</sub>] such as CY-1503, inhibit neutrophil adhesion to endothelial selectins *in vitro*<sup>25,26</sup> and in experimental models of myocardial ischemia and reperfusion *in vivo*.<sup>27-30</sup> Recently, it has been shown that a carbohydrate analogue of sLe<sup>x</sup> reduced cyclic flow variations (CFVS) in injured canine coronary arteries<sup>31</sup> and attenuated intimal hyperplasia after balloon arterial injury in rabbits.<sup>32</sup> However, none of those studies have examined platelet and neutrophil adhesion and interactions with the damaged denuded arteries; which they may be the first target of sLe<sup>x</sup> analogues during the acute response to arterial injury. Accordingly, this study was designed to study platelet and neutrophil interactions with different degrees of arterial injury, such as that occurring after balloon dilation, and the effects of a selectin blocker (CY-1503) on these interactions.

## **Methods**

### **Animal Preparation**

Fifteen 6-8 weeks old, normal cross-breed Yorkshire pigs of either sex weighing  $18.5 \pm 0.6$  kg were prepared in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care regulations, as previously described.<sup>10,11,33</sup> The animals were sedated by intramuscular injection of 20 mg/kg ketamine and 3 mg/kg azaperone, intubated, and mechanically ventilated with O<sub>2</sub>/air. Anesthesia was maintained with 0.5 to 1% halothane. The hematologic parameters of each animal were determined, and the electrocardiogram and arterial blood pressure were monitored.

### **Isolation and Labeling of Platelets and Neutrophils**

Fifty mL of autologous blood anticoagulated with acid-citrate dextrose was collected from the cranial vena cava and used to obtain a platelet-rich plasma by differential centrifugation as previously described.<sup>10,33</sup> After washing, each platelet suspension was incubated with 300  $\mu$ Ci <sup>51</sup>Cr (Amersham International, UK) for 40 minutes. The suspension was centrifuged to remove unbound <sup>51</sup>Cr, and the radiolabeled platelets were then resuspended in 5 mL of platelet poor plasma and reinjected into the animal.

Neutrophil isolation was performed using the pellet obtained after the first centrifugation of the blood used in platelet preparation according to a method previously reported.<sup>10,11</sup> This method involves sedimentation with 4% dextran, centrifugation on Ficoll-Paque gradient and hypotonic lysis of red blood cells. The isolated neutrophil suspension was incubated with 250  $\mu$ Ci of <sup>111</sup>In-tropolone (Merck Frosst Canada Inc.) for 30 minutes. The suspension was centrifuged to remove unbound <sup>111</sup>In, and the radiolabeled neutrophils were then resuspended in 5 mL of platelet poor plasma and reinjected into the animal. This procedure yielded a neutrophil preparation that is over 95% pure and viable, as assessed by the trypan blue exclusion test.

### **Experimental Groups and Carotid Arterial Injury**

Carotid injury was performed using a 7F-polyethylene balloon dilation catheter (size, 8 mm $\times$ 3 cm, Meditech Inc., Watertown, MA), as previously described.<sup>10,11,33</sup> A 9F-introducer sheath was inserted into the right femoral artery for introduction of the

balloon dilation catheter, and an 8F-introducer sheath was inserted into the femoral vein for blood sampling and drug infusion. Five minutes before the angioplasty procedure, animals received either CY-1503 (15 mg/kg, i.v. bolus, n=7) (Cytel Corporation, San Diego, CA) or saline (i.v., n=8). CY-1503 has a large volume of distribution and is rapidly excreted through the kidney with half life less than 20 min in cats and rats.<sup>34</sup> Given that our procedure lasts only 30 min this dose of 15 mg/kg bolus was chosen, based on computer allometric pharmacokinetic modeling provide by cytel, to maintain a plasma concentration of more than 20 µg/mL during the study and sufficient to block selectins. After a single bolus of heparin (100 IU/kg i.v.), the balloon dilation catheter was inserted into the right femoral artery and advanced under fluoroscopic control into the left and right common carotid arterial segments between the fifth and fourth cervical vertebrae. Five inflations were performed at 6 atmosphere pressure, each for 30 seconds with a 60-second interval between each inflation. In all pigs, angiograms of the common carotid arteries were obtained before and during angioplasty, and were used to determine the exposed diameter and the balloon-to-artery ratio for each artery.

The dilation procedure was successful in 14 arteries in the control and in 13 arteries in the treated groups. Two left carotid arteries in the control and one right carotid artery in the treated group were excluded from the study because balloon dilation induced a more deep injury extending to the adventice with rupture of these arteries and formation of an occlusive thrombus.

### **Quantification of Platelet and Neutrophil Deposition**

At the end of the experiments, approximately 30 min after angioplasty, the carotid arteries were perfusion-fixed in situ with a buffered solution of 2% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde as previously described.<sup>10,11,33</sup> The fixed carotid arteries were then removed and cleaned of all adventitial tissue. The dilated portion was divided into three segments, and the internal diameter and length of each segment were measured to determine the surface area (cm<sup>2</sup>). Non-dilated segments with intact endothelium were also selected and measured. After surface measurements, the radioactivity of each segment as well as that of reference blood samples was counted in a gamma counter (Minaxi 5000, Packard Instruments Co., Downers Grove, IL), equipped with a computer

and a multinuclide analysis program. Knowing blood platelet and neutrophil counts, and the radioactivity of  $^{51}\text{Cr}$  and  $^{111}\text{In}$  in blood and on the arterial segments, platelet ( $\times 10^6$ ) and neutrophil ( $\times 10^3$ ) deposition per  $\text{cm}^2$  was calculated, as previously reported.<sup>12,35</sup>

### **Histological Analysis**

After radioactivity counting, representative 2 to 3 mm sections from each arterial segment were processed and embedded in paraffin. Cross-sections (4  $\mu\text{m}$ ) were stained with Movat pentachrome stain, which produces intense staining of the internal and external elastic lamina. All specimens were evaluated microscopically for the presence of mild or deep arterial wall injury, which is characterized by the presence of tears through the internal elastic lamina with the exposure of the arterial media.

Morphometric analysis was performed on each section of the deeply injured segments in order to quantify the extent of injury.<sup>36</sup> The number of internal elastic laminal tears and the arc length of the internal elastic laminal fracture (fracture length), traced from one dissected laminal end to the other, were used as a measure of the extent of injury. The circumference demarcated by the internal elastic lamina was also measured, and the ratio of fracture length-to-internal elastic lamina was calculated to correct for vessel size.

### **Aggregation Study**

Aggregation was performed using a whole-blood aggregometer (Chronolog Corp., Harvestown, PA), and fresh blood samples obtained before and after the administration of CY-1503. Aggregation was induced by adding to 450  $\mu\text{L}$  of anticoagulated blood (5 U/mL heparin), 50  $\mu\text{L}$  of the platelet agonist ADP (10  $\mu\text{mol/L}$ ). All measurements were performed within the first minute after blood sampling. The amplitude of aggregation was measured in ohms 5 minutes after the addition of the agonist.

### **Isolated Platelet and Neutrophil Adhesion Assay**

To determine the influence of the selectin blocker on isolated neutrophils adhesivity to platelets, we have performed an in vitro adhesion assay. In these experiments, we have used Plexiglas superfusion flow chambers that mimic the tube-like and cylindrical shape of blood vessels.<sup>12,37,38</sup> Each chamber contains a window (2.0 mm ID) allowing direct exposure of damaged arterial segments to isolated neutrophil suspensions mixed or not with platelets. These damaged arterial segments were prepared from porcine aortas, which were dissected free of surrounding tissues, cut into rings and longitudinally opened. Damaged arterial segments were then prepared by lifting and peeling off the intima, together with a thin portion of the subjacent media, and cut to fit within the superfusion flow chambers, as previously described.<sup>11,12,37</sup> The flow within the chambers was adjusted at 10 mL/min with a peristaltic pump. The chambers were placed in parallel in a thermostatically controlled water bath at 37°C permitting simultaneous parallel pairwise superfusion over arterial tissues of control or treated neutrophil suspensions.

In these experiments, we exposed the arterial segments for 5 minutes, in the flow chambers, to <sup>111</sup>In-neutrophils ( $5 \times 10^6$ /mL) pretreated for 5 minutes with saline or 200 µg/mL of CY-1503 prior to adding or not platelets ( $250 \times 10^6$ /mL). The arterial tissues were then removed and the radioactivity counted in a gamma counter. The level of neutrophil adhesion, expressed as neutrophils  $\times 10^3$ /cm<sup>2</sup>, was then calculated.

### **Statistical Analysis**

Results are expressed as mean  $\pm$  SE. Intergroup analyses were performed using Student's unpaired t test and intragroup comparisons were assessed by Student's paired t test and when appropriate by one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered statistically significant at the 95% confidence level ( $P < .05$ ).

## **Results**

### **Group Characteristics**

The characteristics of the isolation and labeling procedures of platelets and neutrophils were similar in both groups as resumed in Table 1. Table 2 shows platelet and leukocyte counts in the circulation, platelet aggregation in response to 10  $\mu\text{mol/L}$  ADP, the ACT, heart rate and mean arterial blood pressure at baseline and following injection of saline or CY-1503 in the control and treated groups respectively. As compared to baseline, only platelet count decreased significantly in both the control and CY-1503 groups by 22% and 20% respectively. The reason for this decrease in platelet count is unknown but may be related to animal preparation and anesthesia. However, our results can not be influenced by this change because this decrease was similar in both groups and that platelet count, before the angioplasty procedure in the control ( $349.8 \pm 38.1 \times 10^6/\text{mL}$ ) and in the CY-1503 ( $477.1 \pm 66.7 \times 10^6/\text{mL}$ ) groups were statistically similar. All the remaining parameters were within the normal range at baseline and were not changed significantly after the injection of the selectin blocker CY-1503.

### **Angiographic and Histological Analyses**

Table 3 summarizes the characteristics of the dilated arteries in the control and CY-1503 treated groups. The diameter of these arteries and the balloon/artery ratio averaged 4 mm and 1.1 to 1.2 respectively and were statistically similar in both groups. In the deeply damaged segments the fracture length of the internal elastic lamina as determined by the histological and morphometric analyses, was also similar between the control and CY-1503 treated groups, indicating that the extent of injury was comparable in both groups.

### **Platelet and Neutrophil Adhesion In Vivo**

As illustrated in Fig 1, platelet deposition on the dilated segments with deep injury was significantly much higher than those quantified on mildly injured segments with endothelial denudation or on uninjured segments with intact endothelium in both groups. There was no statistical difference in platelet deposition on deeply injured segments

between the control ( $50.1 \pm 12.2 \times 10^6$  platelets/cm<sup>2</sup>) and the CY-1503 ( $43.4 \pm 15.6 \times 10^6$  platelets/cm<sup>2</sup>) treated groups.

In the control group, neutrophil adhesion (Fig 2) increased significantly with the severity of arterial injury, from  $26.1 \pm 7.9 \times 10^3$  neutrophils/cm<sup>2</sup> on intact endothelium to  $252.6 \pm 49.1 \times 10^3$  neutrophil/cm<sup>2</sup> on denuded segments with mild injury, and to  $446.7 \pm 72.6 \times 10^3$  neutrophils/cm<sup>2</sup> ( $P < .05$ ) on deeply injured segments. CY-1503 treatment was associated with a significant 58% ( $P < .01$ ) decrease in neutrophil adhesion ( $186.8 \pm 38.7 \times 10^3$  neutrophils/cm<sup>2</sup>) on deeply injured segments, whereas neutrophil adhesion to segments with intact endothelium or mildly injured was not influenced by CY-1503 treatment.

### **Neutrophil Adhesion In Vitro**

To assess whether CY-1503 interfered directly with the adhesive function of neutrophils or with platelet-neutrophil adhesive interactions, we have performed in vitro adhesion experiments in which isolated neutrophils or mixed neutrophil and platelet suspensions were pretreated with CY-1503 or saline and then exposed to damaged arterial surfaces under flowing conditions. The results are presented in Fig 3 and show that CY-1503 did not interfere with the adhesive function of isolated neutrophils, but significantly inhibited ( $P < .01$ ) the increased adhesion of neutrophils in the presence of platelets.

### **Discussion**

Following balloon angioplasty, rupture of the internal elastic lamina with exposure of the arterial media is characterized by extensive platelet and neutrophil adhesion, which collaborates to enhance the arterial response to injury. Administration of the analogue of sLe<sup>x</sup> or the selectin blocker CY-1503 led to a significant reduction in neutrophil adhesion to the highly thrombogenic arterial surfaces, without any significant effect on platelet deposition or on the adhesion of isolated neutrophils in the absence of platelets. These results indicate that at the site of deep arterial injury adherent and activated platelets contribute to neutrophil recruitment via sLe<sup>x</sup>.



The receptors implicated in the adhesion and aggregation of platelets, as well as the pathological significance of these interactions with the vessel wall, have been relatively well characterized.<sup>1,2,39-41</sup> Cell adhesion molecules involved in platelet adhesion and aggregation, such as glycoprotein (GP) Ia/IIa ( $\alpha_2 \beta_1$  integrin) and GPIIb/IIIa ( $\alpha_{IIb} \beta_3$  integrin), enhance thrombus formation in association with the coagulation pathway and leukocyte integrins. As well, platelets possess P-selectin involved in platelet-leukocyte-endothelial interactions, PECAM (CD31) involved in platelet-platelet binding, and GPIV (CD36) involved in platelet adhesion to collagen. The adhesion of platelets to damaged arterial surfaces is regulated by the interactions between these GPs, the von Willebrand factor (vWF), fibronectin, collagen, and other procoagulant proteins found in plasma and on the exposed arterial surface. As demonstrated previously,<sup>10</sup> the present study confirms that platelet deposition is influenced by the nature of the arterial surface exposed and increases with the severity of arterial injury. In fact, as compared to deep injury, mildly injured arterial surface is less thrombogenic and causes mild platelet deposition (under  $10 \times 10^6/\text{cm}^2$ ). This type of mild injury is characterized by endothelial denudation and intimal damage with intact elastic lamina. Indeed, the initial binding of platelets to this surface does not require activation and is predominantly mediated by the interaction of platelet GPIb/IX with the vWF<sup>41</sup> and the GPIIb/IIIa on nonactivated platelets with immobilized fibrinogen.<sup>42</sup> In contrast, deep arterial injury, which is characterized by rupture of the internal elastic lamina and exposure of the tunica media is more thrombogenic than the subendothelium. The exposure of the arterial media to flowing blood uncovers collagen, fibronectin, laminin and thrombospondin in an uneven boundary layer that leads to extensive platelet adhesion and aggregation through GPIIb/IIIa, and contributes significantly to thrombus growth. Under normal conditions, the intact endothelium sequesters the adhesive GP ligands from the platelet in the subendothelium, thus preventing platelet adhesion in the absence of vascular damage. Given that platelet adhesion and aggregation are mediated predominantly by the integrin family of adhesion molecules, it is not surprising that the selectin blocker (CY-1503) does not influence platelet deposition on any type of the arterial surfaces exposed after angioplasty nor platelet aggregation in whole blood. In contrast, Ueyama et al<sup>31</sup> have found that a high dose (40 mg/kg) but not a low dose (5 mg/kg) of an analogue of sLe<sup>x</sup>

reduced CFVS, which are mainly mediated by platelet adhesion and aggregation, in canine model of stenosed and endothelium-injured coronary arteries. Although our experimental porcine model of balloon carotid injury is different from that of stenosed and endothelium-injured coronary arteries model, our results indicate that CY-1503, at 15 mg/kg, selectively reduced neutrophil adhesion to deeply damaged arteries without any significant effect on platelets.

In previous studies aimed to determine the influence of platelets on neutrophil adhesion, we have shown a close interaction between platelets and neutrophils after arterial injury *in vitro*<sup>12</sup> and *in vivo*.<sup>10,11</sup> We have found that thrombocytopenia or platelet depletion was associated with decreased neutrophil adhesion to damaged arterial surfaces by angioplasty, indicating that platelets support neutrophil adhesion. This reaction involves cell-cell interactions that are at least mediated by platelet P-selectin. In another study involving an *in vivo* thrombosis model, platelets have been shown to adhere to vascular grafts, express P-selectin and, subsequently, to bind leukocytes through P-selectin.<sup>20</sup> This was also demonstrated in *in vitro* vessel wall injury models.<sup>21-</sup>

23

In the present study, we have used a more clinically relevant animal model to produce different degrees of arterial injury such as that occurring after atherosclerotic plaque rupture or following balloon angioplasty. We have observed that, similar to platelet deposition, neutrophil adhesion is also influenced by the extent or severity of arterial injury. Interestingly, the selectin blocker (CY-1503) significantly inhibited neutrophil adhesion only on the deeply injured arterial segments, without any significant effect on platelet deposition. This finding suggests that, in the presence of deep arterial injury, platelet adhesion and activation may lead to P-selectin expression which, in turn, can fix neutrophils via an interaction with sLe<sup>x</sup> and contribute to increase neutrophil adhesion as an acute reaction to the thrombogenic stimulus produced by angioplasty. Our finding that CY-1503 did not interfere directly with neutrophils, as the adhesion of isolated neutrophil suspensions to damaged denuded arterial segments *in vitro* was not influenced by CY-1503 but was inhibited in the presence of platelets, indicates that the selectin blocker acts on the adhesive interactions between neutrophils and platelets and that neutrophil-neutrophil homotypic adhesion via L-selectin and PSGL-1<sup>18</sup> is less

important in these interactions. Balloon angioplasty induces a complete denudation of the arteries at the site of dilation, thus excluding any possible effects of CY-1503 on neutrophil adhesion to endothelial P- or E-selectin. In addition, neutrophil adhesion to normal adjacent arterial segments with intact endothelium was similar between the control and CY-1503 groups. Neutrophil-endothelial cell adhesion is controlled by different steps involving L-selectin on resting neutrophil,  $\beta_2$ -integrin on activated neutrophils and ICAM-1, P- and E-selectin on activated endothelial cells.<sup>15-17</sup> Our study was performed without prior activation of neutrophils or the endothelium. Under these conditions, neutrophil interaction with endothelium was minimal and was not influenced by the selectin blocker. In the absence of endothelium, it has been shown that neutrophils can roll on immobilized platelets,<sup>19</sup> adhere via platelet P-selectin<sup>21</sup> or neutrophil  $\beta_2$ -integrin.<sup>43</sup> Many studies have reported that other mechanisms may be implicated in platelet binding to neutrophils, such as 1) fibrinogen bridging via platelet GPIIb/IIIa and neutrophil MAC-1,<sup>44,45</sup> 2) thrombospondin bridging via GPIa/IIa, GPIIb/IIIa or GPIV on platelets and a specific receptor on neutrophils,<sup>46,47</sup> 3) platelet ICAM-1 binding to neutrophil LFA-1<sup>48</sup> and 4) Immune complex interactions between platelet Fc RII (CD32) and neutrophil Fc RIIIb (CD16).<sup>49</sup> These different mechanisms for neutrophil interactions with platelet and recruitment to damaged arterial surfaces may explain the lack of complete inhibition, by CY-1503, of neutrophil adhesion in our study.

The importance of neutrophil-platelet adhesive interactions has been noted in the circulation of patients with unstable angina<sup>50</sup> and after coronary angioplasty.<sup>51</sup> Recently, it has been shown that blockade of the selectins with an analogue of sLe<sup>x</sup> reduced intimal hyperplasia after balloon injury in rabbits.<sup>32</sup> Our study highlights these interactions at the site of arterial injury produced by angioplasty through an adhesive interaction between platelets and neutrophil sLe<sup>x</sup>. The inhibitory effect of the selectin blocker may be clinically relevant since neutrophil-platelet interactions after angioplasty appears to play an important role in the initial step of the arterial response to injury and may accelerate the pathophysiologic chain reaction of restenosis.

**Acknowledgements**

This study was supported by grants from the Heart and Stroke Foundation and the Medical Research Council of Canada.

## References

1. Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J*. 1993;7:516-522.
2. Mehta JL, Nicolini FA, Donnelly WH, Nichols WW. Platelet-leukocyte-endothelial interactions in coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1992;69:8B-13B.
3. Bazzoni G, Dejana E, Del Maschio A. Platelet-neutrophil interactions possible relevance in the pathogenesis of thrombosis and inflammation. *Haematologica*. 1991;76:491-499.
4. De Gaetano G, Evangelista V, Rajtar G, Del Maschio A, Cerletti C. Activated polymorphonuclear leukocytes stimulate platelet function. *Thromb Res*. 1990;11:25-32.
5. Renesto P, Chignard M. Enhancement of cathepsin G-induced platelet activation by leukocyte elastase: consequence for the neutrophil-mediated platelet activation. *Blood*. 1993;82:139-144.
6. Pratico D, Iuliano L, Alessandri C, Camastra C, Violi F. Polymorphonuclear leukocyte-derived O<sub>2</sub>-reactive species activate primed platelets in human whole blood. *Am J Physiol*. 1993;264 (Heart Circ Physiol. 33):H1582-H1587.
7. Tzeng DY, Deuel TF, Huang JS, Senior RM, Boxer LA, Baehner RL. Platelet-derived growth factor promotes polymorphonuclear leukocyte activation. *Blood*. 1984;64:1123-1128.
8. Dinerman J, Mehta J, Lawson D, Mehta P. Enhancement of human neutrophil function by platelets: effects of indomethacin. *Thromb Res*. 1988;49:509-517.
9. Ruf A, Schlenk RF, Maras A, Morgenstern E, Patscheke H. Contact-induced neutrophil activation by platelets in human cell suspensions and whole blood. *Blood*. 1992;80:1238-1246.
10. Merhi Y, Guidoin R, Provost P, Leung TK, Lam JYT. Increase of neutrophil adhesion and vasoconstriction with platelet deposition after deep arterial injury by angioplasty. *Am Heart J*. 1995;129:445-451.

11. Merhi Y, Provost P, Guidoin R, Latour JG. Importance of platelets in neutrophil adhesion and vasoconstriction following arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1185-1191.
12. Merhi Y, Lam JYT, Lacoste LL, Latour JG., Guidoin R, Waters D. Effects of thrombocytopenia and shear rate on neutrophil and platelet deposition on endothelial and medial arterial surfaces. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:951-957.
13. Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood.* 1990;75:550-554.
14. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest.* 1989;84:92-99.
15. Lorant DE, Patel KD, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J Cell Biol.* 1991;115:223-234.
16. Lusinskas FW, Brock AF, Arnaout MA, Gimbrone MA. Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1-dependent and leukocyte (CD11/CD18)-dependent mechanisms contribute to polymorphonuclear leukocyte adhesion to cytokine-activated human vascular endothelium. *J Immunol.* 1989;142:2257-2263.
17. Abbassi O, Kishimoto TK, McIntire LV, Anderson DC, Smith CW. E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J Clin Invest.* 1993;92:2719-2730.
18. Walcheck B, Moore KL, McEver RP, Kishimoto TK. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. *J Clin Invest.* 1996;98:1081-1087.
19. Buttrum SM, Hatton R, Nash GB. Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood.* 1993;82:1165-1174.
20. Palabrica T, Lobb R, Fucie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu Y-M, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature.* 1992;359:848-851.

21. Yeo EL, Sheppard JI, Feuerstein IA. 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;83:2498-2507.
22. Kuijper PHM, Gallardo Torres HI, Lammers JWJ, Sixma JJ, Koenderman L, Zwaginga JJ. Platelet and fibrin deposition at the damaged vessel wall: cooperative substrates for neutrophil adhesion under flow conditions. *Blood*. 1997;89:166-175.
23. Kirchhofer D, Riederer MA, Baumgartner HR. Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood*. 1997;89:1270-1278.
24. Paulson JC. Selectin/carbohydrate-mediated adhesion of leukocytes. In: Harlan JM, Liu, DY. *Adhesion: Its Role in Inflammatory Disease*. New York, NY: Freeman. 1991:19-38.
25. Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FCA, Perez M, Singhal AK, Hakomori S, Paulson JC. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand sialyl-Le<sup>x</sup>. *Science*. 1990;250:1130-1132.
26. Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M, Hasegawa A, Asa D, Brandley BK. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis<sup>x</sup> oligosaccharide. *J Cell Biol*. 1992;117:895-902.
27. Lefer DJ, Flynn DM, Phillips ML, Ratcliffe M, Buda AJ. A novel sialyl Lewis<sup>x</sup> analog attenuates neutrophil accumulation and myocardial necrosis after ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1994;90:2390-2401.
28. Buerke M, Weyrich AS, Zheng Z, Gaeta FCA, Forrest MJ, Lefer AM. Sialyl Lewis<sup>x</sup>-containing oligosaccharide attenuates myocardial reperfusion injury in cats. *J Clin Invest*. 1994;93:1140-1148.
29. Silver MJ, Sutton JM, Hook S, Lee P, Malycky JL, Phillips ML, Ellis SG, Topol EJ, Nicolini FA. Adjunctive selectin blockade successfully reduces infarct size beyond thrombolysis in the electrolytic canine coronary artery model. *Circulation*. 1995;92:492-499.

30. Flynn DM, Buda AJ, Jeffords PR, Lefer DJ. A sialyl Lewis<sup>x</sup>-containing carbohydrate reduces infarct size: role of selectins in myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1996;271:H2086-H2096.
31. Ueyama T, Ikeda H, Haramaki N, Kuwano K, Imaizumi T. Effects of monoclonal antibody to P-selectin and analogue of Sialyl Lewis X on cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured canine coronary arteries. *Circulation.* 1997;95:1554-1559.
32. Barron MK, Lake RS, Buda AJ, Tenaglia AN. Intimal hyperplasia after balloon injury is attenuated by blocking selectins. *Circulation.* 1997;96:3587-3592.
33. Merhi Y, Lacoste LL, Lam JYT. Neutrophil implications in platelet deposition and vasoconstriction after deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Circulation.* 1994;90:997-1002.
34. Murohara T, Margiotta J, Phillips ML, Paulson JC, DeFrees S, Zalipsky S, Guo LSS, Lefer AM. Cardioprotection by liposome-conjugated sialyl Lewis<sup>x</sup> oligosaccharide in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1995;30:965-974.
35. Merhi Y, King M, Guidoin R. Acute thrombogenicity of intact and injured natural blood conduits versus synthetic conduits: neutrophil, platelet and fibrin (ogen) absorption under various shear-rate conditions. *J Biomed Mater Res.* 1997;34:477-485.
36. 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;17:1806-1812.
37. Provost P, Merhi Y. Endothelium-derived nitric oxide decreases polymorphonuclear leukocyte interaction with the deeply injured arterial wall under intermediate and high shear conditions. *Thromb Haemost.* 1997;78:939-946.
38. Badimon L, Turitto V, Rosemark JA, Badimon JJ, Fuster V. Characterization of a tubular flow chamber for studying platelet interaction with biologic and prosthetic



- materials: deposition of Indium<sup>111</sup>-labeled platelets on collagen, subendothelium, and expanded polytetrafluoroethylene. *J Lab Clin Med.* 1987;110:706-718.
39. Hawiger J. Formation and regulation of platelet and fibrin hemostatic plug. *Hum Pathol.* 1987;18:111-122.
  40. Hynes RO. The complexity of platelet adhesion to extracellular matrices. *Thromb Haemost.* 1991;66:40-43.
  41. Ruggeri ZM. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb Haemost.* 1993;70:119-123.
  42. Savage B, Ruggeri ZM. Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by GPIIb-IIIa on nonactivated platelets. *J Biol Chem.* 1991;266:11227-11233.
  43. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the  $\beta_2$ -integrin CD11b/CD18. *Blood.* 1996;88:146-157.
  44. 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, *Thromb Haemost.* 1993;70:514-521.
  45. Redlich H, Vickers J, Lösche W, Heptinstall S, Kehrel B, Spangenberg P. Formation of platelet-leukocyte conjugate in whole blood. *Platelets.* 1997;8:419-425.
  46. Silverstein RL, Asch AS, Nachman RL. Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *J Clin Invest.* 1989;84:546-552.
  47. Suchard SJ, Boxer LA, Dixit VM. Activation of human neutrophils increases thrombospondin receptor expression. *J Immunol.* 1991;147:651-659.
  48. Diacovo TG, deFougerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest.* 1994;94:1243-1251.
  49. Bizzaro N, Goldschmeding R, von dem Borne AEGK. Platelet satellitism is Fc $\gamma$  RIII (CD16) receptor-mediated. *Am J Clin Pathol.* 1995;103:740-744.

50. Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schömig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation*. 1996;94:1239-1246.
51. Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:345-353.

### Figure Legends

- Figure 1** Bar chart showing platelet deposition on intact, mildly and deeply injured arterial segments in control and CY-1503 treated groups in vivo. \* $P < .05$  versus intact and mild.
- Figure 2** Bar graph showing neutrophil adhesion on intact, mildly and deeply injured arterial segments in control and CY-1503 treated groups in vivo. \* $P < .05$  vs intact and mild; † $P < .01$  versus control.
- Figure 3** Bar graph showing the effect of CY-1503 on the adhesion of isolated neutrophils to damaged arterial in superfusion flow chambers in the absence (n=5) and presence (n=14) of platelets in vitro. \* $P < .01$  versus neutrophils alone; † $P < .01$  versus control in paired experiments.

**TABLE 1. Characteristics of the Isolation and Labeling Procedures of Platelets and Neutrophils in the Control and CY-1503 Treated Groups**

	<b>Control</b>	<b>CY-1503</b>
No. of animals	8	7
<sup>51</sup> Cr-platelets injected, ×10 <sup>9</sup>	6.4±0.5	8.9±1.1
<sup>111</sup> In-neutrophils injected, ×10 <sup>6</sup>	266.4±37.3	212.0±52.2
<sup>51</sup> Cr injected, μCi	150.6±5.2	168.6±8.4
<sup>111</sup> In injected, μCi	201.0±16.6	196.8±8.0
Platelets/cpm- <sup>51</sup> Cr, ×10 <sup>3</sup>	148.5±42.3	132.4±28.0
Neutrophils/cpm- <sup>111</sup> In	693.5±95.8	652.2±226.6

**TABLE 2. Hematologic and Hemodynamic Parameters in the Control and CY-1503 Treated Groups**

	Control		Treated	
	Baseline	Placebo	Baseline	CY-1503
Platelets, $\times 10^6/\text{mL}$	449.0 $\pm$ 27.2	349.8 $\pm$ 38.1*	600.1 $\pm$ 75.8	477.1 $\pm$ 66.7*
Leukocytes, $\times 10^6/\text{mL}$	23.2 $\pm$ 2.1	21.5 $\pm$ 2.1	19.8 $\pm$ 2.6	18.1 $\pm$ 3.0
Platelet aggregation, ohms	14.9 $\pm$ 3.8	15.3 $\pm$ 3.5	13.0 $\pm$ 2.9	9.6 $\pm$ 1.7
ACT, s	115.0 $\pm$ 6.2	118.5 $\pm$ 5.5	126.8 $\pm$ 5.6	125.8 $\pm$ 5.9
Heart rate, bpm	108.7 $\pm$ 5.1	116.5 $\pm$ 8.1	116.6 $\pm$ 9.8	114.9 $\pm$ 10.2
Mean arterial BP, mmHg	60.7 $\pm$ 3.1	62.4 $\pm$ 3.3	61.2 $\pm$ 3.3	60.0 $\pm$ 4.8

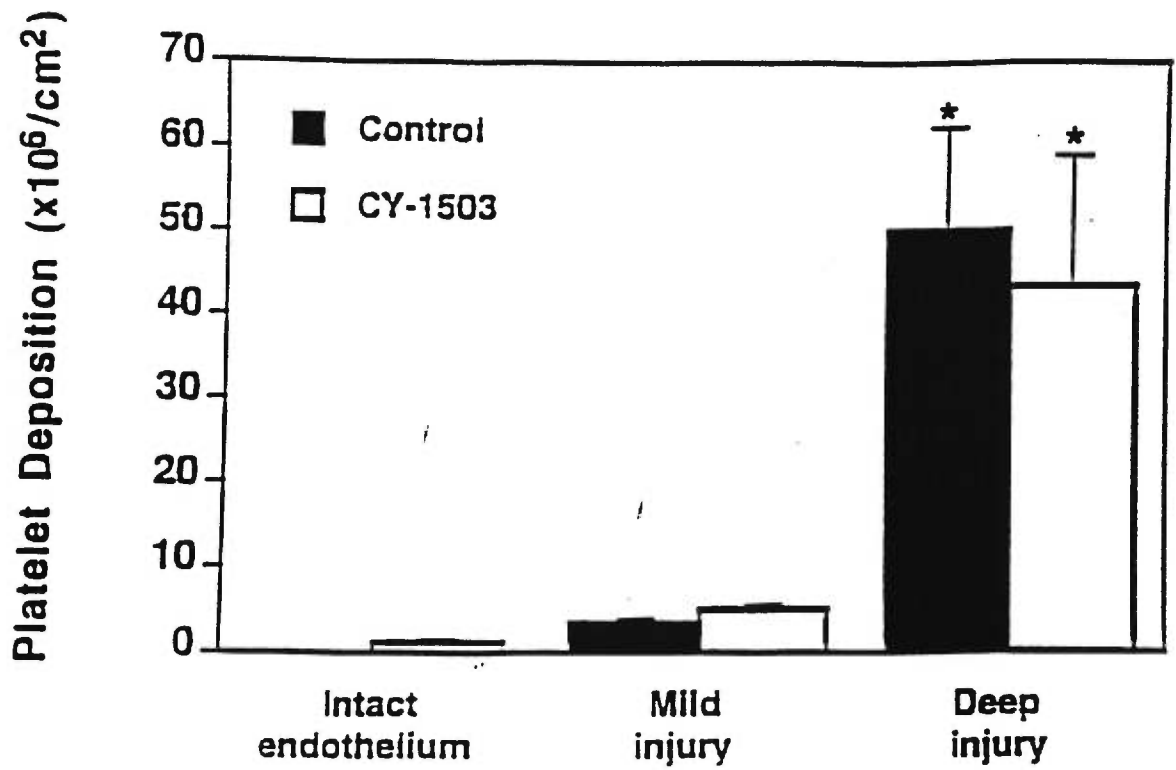
ACT indicates activating clotting time; BP, blood pressure; \* $P < .05$  vs baseline.

**TABLE 3. Characteristics of the Dilated Arteries in the Control and CY-1503 Treated Groups**

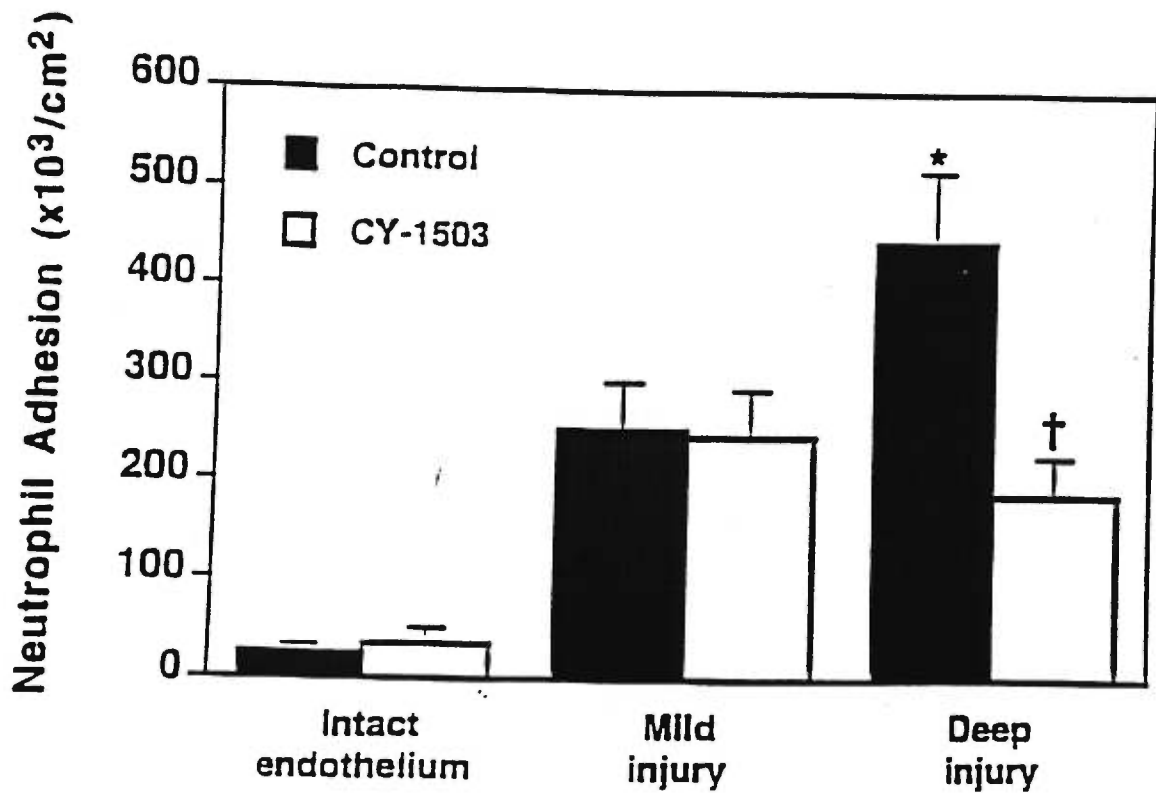
	<b>Control</b>	<b>CY-1503</b>
No. of animals	8	7
Weight, kg	19.2±0.9	17.8±0.6
No. of arteries successfully dilated (total)	14 (16)	13 (14)
Balloon/artery ratio	1.16±0.03	1.12±0.02
Diameter of the arteries, mm	4.07±0.09	3.81±0.05
No. of mildly injured segments (%)	19 (45.2)	23 (59.0)
No. of deeply injured segments (%)	23 (54.8)	16 (41.0)
Circumference of the internal elastic lamina, mm	8.0±0.2	7.8±0.2
Fracture length, mm	1.2±0.1	0.9±0.2
Fracture length/internal elastic lamina ratio	0.15±0.02	0.12±0.02

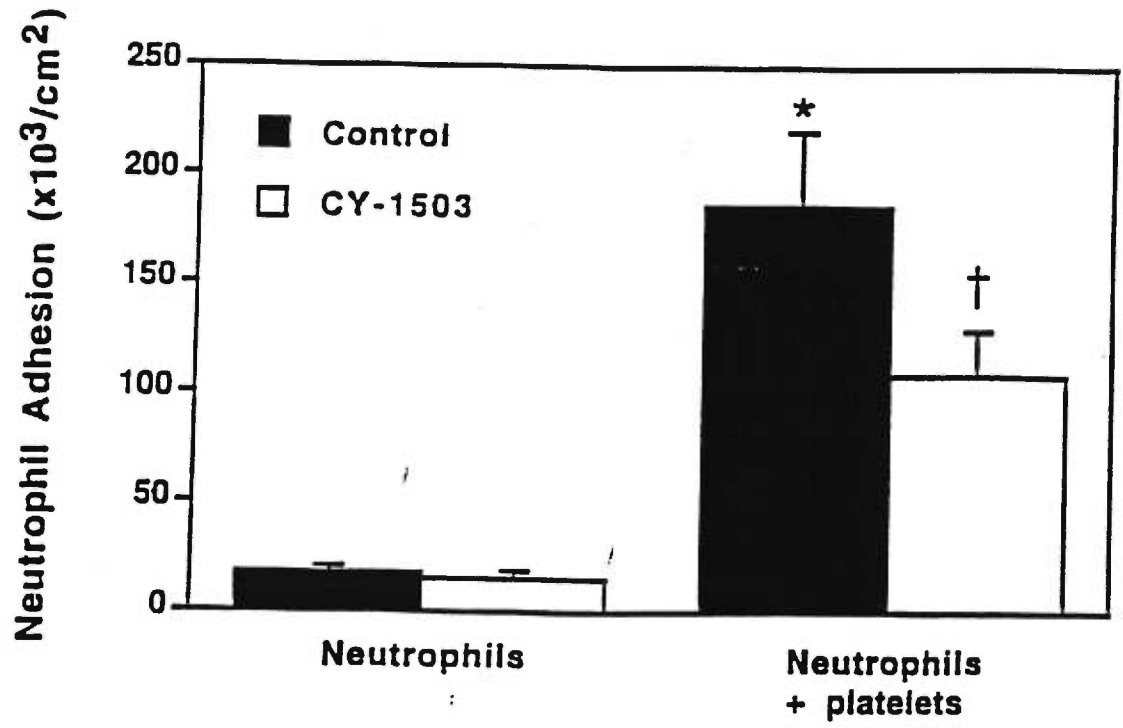
### Condensed Abstract

We investigated the effects of a selectin blocker, an analog of sialyl Lewis<sup>x</sup> (CY-1503) on the acute thrombotic response of porcine carotid arteries to angioplasty injury. CY-1503 treatment was without any significant effect on platelet and neutrophil interactions with intact and mildly injured arteries, and on the hematological and hemodynamic parameters of the animals. In contrast, CY-1503 significantly reduced by 58% neutrophil adhesion at the site of deep arterial injury, without any significant effect on platelet deposition. These results indicate that neutrophil adhesion to platelets on thrombogenic arterial surfaces is in part modulated by platelet P-selectin and neutrophil sLe<sup>x</sup>.









## CHAPITRE V: SECONDE CONTRIBUTION

### 1. Résumé

Les molécules d'adhésion de la famille des sélectines contribuent largement aux interactions des leucocytes et des plaquettes avec les parois vasculaires endommagées. Ces types d'interactions augmentent les réactions inflammatoires ainsi que la formation de thrombi lors de la réponse vasculaire suite à l'endommagement. La présente étude cible les effets d'un bloqueur des sélectines, la fucoïdine, sur les interactions des plaquettes et des neutrophiles suite à un endommagement artériel créé par angioplastie chez le porc. La déposition de plaquettes-Cr<sup>51</sup> ainsi que l'adhésion de neutrophiles-In<sup>111</sup> a été mesurée sur des segments artériels carotidiens intacts, présentant des lésions légères et présentant des lésions sévères. Les lésions ont été produites par gonflement d'un cathéter-ballon chez 7 porcs témoins (saline) et 11 porcs traités (I.V.; 1 mg/kg, n=6, 5 mg/kg, n=5). Dans le groupe témoin, la déposition plaquettaire ( $\times 10^6/\text{cm}^2$ ) a été dépendante de la sévérité de la lésion. En effet, elle s'est accrue significativement ( $P < 0.05$ ) de  $0.06 \pm 0.06$  sur l'endothélium intact à  $3.8 \pm 0.6$  et  $33.6 \pm 4.9$  sur des segments présentant des lésions légères et sévères respectivement. Le traitement à la fucoïdine à 1 mg/kg n'a eu aucun effet significatif sur ces valeurs. Cependant, le traitement à 5 mg/kg a réduit la déposition plaquettaire sur les lésions sévères de 73%. Le niveau d'adhésion neutrophilique ( $\times 10^3/\text{cm}^2$ ) a également été influencé par la sévérité de la lésion, augmentant dans le groupe témoin de  $8.8 \pm 2.5$  sur l'endothélium intact à  $226.6 \pm 45.5$  et à  $397.4 \pm 61.3$  sur les lésions légères et sévères respectivement ( $P < 0.05$ ). Une fois de plus, le traitement à 1 mg/kg n'a eu aucun effet, mais le traitement à 5 mg/kg a réduit l'adhésion des neutrophiles de 92% et de 84% sur les segments avec lésions légères et sévères, respectivement. Ces effets ont été associés à une inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, mais aucun effet n'a été observé sur le temps de coagulation activée (ACT). De plus, la fucoïdine a induit une réduction de 51% de la réponse vasoconstrictrice au site de lésion vasculaire. Lors d'études de perfusion avec des suspensions purifiées de plaquettes et de neutrophiles, nous avons observé que la fucoïdine inhibe l'adhésion de chaque type cellulaire aux surfaces endommagées. Cette inhibition est encore plus marquée lors de la perfusion de suspensions mixtes.

La fucoïdine inhibe donc les interactions entre plaquettes, neutrophiles et la paroi artérielle endommagée ainsi que la réaction vasoconstrictrice associée. Cette étude souligne l'importance des sélectines lors des réactions pathophysiologiques suivant l'endommagement vasculaire.

**Inhibition of Platelet-Neutrophil Interactions by Fucoidan  
Reduces Adhesion and Vasoconstriction after Arterial Injury  
by Angioplasty in Pigs<sup>1</sup>**

PATRICK CHAUVET, JEAN-GUY BIENVENU, JEAN-FRANÇOIS THÉORÊT,  
JEAN-GILLES LATOUR AND YAHYE MERHI

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

---

This work was supported by the Medical Research Council of Canada, The Heart and Stroke Foundation of Quebec, and the Fonds de la recherche en santé du Québec.

**Running title : Fucoidan and platelet-neutrophil interactions.**

---

**Send reprint requests to:** Dr.Yahye Merhi, PhD, Laboratory of Experimental Pathology, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St., Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8.

Phone : (514) 376-3330 # 3035, Fax : (514) 376-1355, E-Mail : [merhi@icm.umontreal.ca](mailto:merhi@icm.umontreal.ca)

---

---

**ABBREVIATIONS :** ACD, acide-citrate dextrose; ACT, activated clotting time; ADP, adenosine diphosphate; AT-III, antithrombin-III; EDTA, ethylene diamine tetracetic acid; HBSS, Hank's balanced salt solution; HCII, heparin cofactor-II; PAF, platelet activating factor; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PPP, platelet poor plasma; PRP, platelet rich plasma; PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand-1.

---

**ABSTRACT**

The selectin family of cell adhesion molecules contributes to the interactions of leukocytes and platelets at the site of vascular injury. Such interactions enhance inflammatory reactions and thrombus formation in the arterial response to injury. In this study, we investigated the effects of a selectin inhibitor (Fucoïdan) on platelet and neutrophil interactions following arterial injury produced by angioplasty in pigs.  $^{51}\text{Cr}$ -platelet deposition and  $^{111}\text{In}$ -neutrophil adhesion were quantified on intact, mildly and deeply injured carotid arterial segments, produced by balloon dilation in control (saline,  $n = 7$ ) and Fucoïdan-treated (I.V.; 1 mg/kg,  $n = 6$ ; 5 mg/kg,  $n = 5$ ) pigs. In the control group, platelet deposition ( $\times 10^6/\text{cm}^2$ ) was influenced by the severity of injury and increased significantly ( $P < .05$ ) from  $0.06 \pm 0.06$  on intact endothelium to  $3.8 \pm 0.6$  and  $33.6 \pm 4.9$  on mildly and deeply injured segments, respectively. Fucoïdan, 1 mg/kg, had no significant effect, but doses of 5 mg/kg reduced platelet deposition by 73% on deeply injured segments. The level of neutrophil adhesion ( $\times 10^3/\text{cm}^2$ ) was also influenced by the severity of injury and increased in the control group from  $8.8 \pm 2.5$  on intact endothelium to  $226.6 \pm 45.5$  and  $397.4 \pm 61.3$  on mildly and deeply injured arterial segments, respectively ( $P < .05$ ). Again, 1 mg/kg Fucoïdan had no effect but doses of 5 mg/kg reduced neutrophil adhesion by 92% and by 84% on mildly and deeply injured segments, respectively. The effects of Fucoïdan were associated with inhibition of platelet aggregation in response to adenosine diphosphate (ADP) but had no significant effect on activating clotting time (ACT), and with a 51% decrease in the vasoconstrictive response at the site of arterial injury. In isolated cells, we found that Fucoïdan interfered with both platelet and neutrophil adhesion to damaged arterial surfaces, but potency was

more pronounced in mixed cell preparations. Fucoïdan inhibits platelet and neutrophil interactions, reducing adhesion to damaged arterial surfaces as well as the associated vasoconstrictive response. These results highlight the importance of selectins in the physiopathological reactions after arterial injury.



The arterial response to injury involves many pathophysiological reactions that can lead to clinical complications such as thrombosis, vasospasm, and restenosis. Platelets and leucocytes, normally responsible for maintaining vascular homeostasis are implicated in the foremost reactions that lead to these pathological states (Bazzoni *et al.*, 1991; Nash, 1994, Bird *et al.*, 1997). After balloon angioplasty, the subendothelial matrix is exposed to flowing blood and circulating platelets are activated by contact with the thrombogenic surface. The ensuing response is influenced by a variety of local conditions like shear forces, the severity of the lesion, as well as platelet and neutrophil derived products. Cell adhesion molecules are responsible for physical interactions leading to activation and adhesion of platelets and neutrophils to the matrix (Jang *et al.*, 1994). In the dysregulated response, excess activation and adhesion of platelets and neutrophils may cause acute occlusive thrombosis, vasoconstriction and further vascular damage through the release of damaging products such as O<sub>2</sub>-radicals and proteolytic enzymes (Weiss, 1989). Previous studies have shown that P-selectin, present in the  $\alpha$ -granules and on the surface of activated platelets (McEver *et al.*, 1989), is important for increased interactions between platelets and neutrophils and recruitment of neutrophils to the site of arterial damage (Palabrica *et al.*, 1992, Kuijper *et al.*, 1997, Weber and Springer, 1997), a critical step in the evolution of such vascular complications (Merhi *et al.*, 1994, Merhi *et al.*, 1995, Merhi *et al.*, 1997b). This adhesive interaction is mainly mediated by platelet P-selectin and neutrophil surface Sialyl Lewis<sup>x</sup>. Indeed, we have shown that an analog of Sialyl Lewis<sup>x</sup> can successfully inhibit neutrophil recruitment by adherent and activated platelets at the site of deep arterial injury in a porcine model of carotid angioplasty (Merhi *et al.*, 1998).

Fucoidan, an  $\alpha$ 1-3-linked fucosylated polysaccharide extracted from the marine algae *Fucus vesiculolus* (Springer *et al.*, 1957), has been extensively used as a selectin blocker. In fact, Fucoidan's molecular structure seems to be a close analog of natural ligands recognized by the selectins, such as Sialyl Lewis<sup>x</sup> (Patankar *et al.*, 1993) and various studies have shown that Fucoidan can block L and P-selectins in vitro (Patankar *et al.*, 1993; Rochon *et al.*, 1994; Hajela *et al.*, 1996a) as well as *in vivo* (Lindbom *et al.*, 1992; Granert *et al.*, 1994; Shimaoka *et al.*, 1996), the bulk of the research focusing on Fucoidan's effectiveness vis-à-vis inhibiting leukocyte rolling on endothelial cells. Since leukocyte rolling is essential for adhesion and subsequent extravasation, Fucoidan is able to block many inflammatory responses (Granert *et al.*, 1994; Shimaoka *et al.*, 1996), to inhibit intimal hyperplasia in rats subject to blood-catheter injury (McCaffrey *et al.*, 1992) and to protect against ischemia and reperfusion (Kubes *et al.*, 1995; Miura *et al.*, 1996; Omata *et al.*, 1997). Furthermore, Fucoidan inhibited Factor Xa-induced thrombosis in rabbit (Mauray *et al.*, 1995) and has shown various degrees of anticoagulant and fibrinolytic activities (Church *et al.*, 1989; Soeda *et al.*, 1993; Doctor *et al.*, 1995, Minix and Doctor, 1997). However, Fucoidan has never been used as treatment in an acute model of arterial injury, where selectins may play a determinant role in the onset of vascular pathologies (Bazzoni *et al.*, 1991; Lorant *et al.*, 1993; Bird *et al.*, 1997).

Our hypothesis is that selectin-mediated interactions between platelets and neutrophils increase their activation and adhesion at the site of arterial injury and are implicated in thrombosis and the associated vascular responses after angioplasty. This

study has therefore focused on inhibiting selectin-mediated platelet-neutrophil interactions at the site of carotid arterial injury induced by balloon angioplasty in pigs.

## **Materials and Methods**

### **Animal Preparation**

Eighteen normal cross-bred Yorkshire pigs of either sex were prepared as previously described (Merhi *et al.*, 1994; Merhi *et al.*, 1995; Merhi *et al.*, 1997b; Provost *et al.*, 1998), in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care regulations. The animals were sedated by I.M. injection of 20 mg/kg ketamine (Rogarsetic, Rogar/STB Inc., Montreal, Quebec, Canada) and 3 mg/kg azaperone (Stresnil, Janssen Pharmaceuticals, Mississauga, Ontario, Canada) and 50 ml of blood were sampled from the right jugular vein and anticoagulated with 1:5 acid-citrate-dextrose (ACD) for platelet and neutrophil isolation and radiolabeling. Pigs were intubated, mechanically ventilated with O<sub>2</sub> and air, and maintained under anesthesia with 0.5-1% halothane (Fluothane, Ayerst, Montreal, Quebec, Canada). The right femoral artery and vein were cannulated. Heart rate, arterial blood pressure, and body temperature were continuously recorded and hematological parameters determined at baseline and after treatment.

### **Platelet and Neutrophil Isolation and Radiolabelling**

Platelet and neutrophil isolation and radiolabeling was performed as described previously (Provost and Merhi, 1996; Merhi *et al.*, 1997b; Provost *et al.*, 1998). In brief, ACD-anticoagulated blood was centrifuged 15 min at 500 g. Platelet rich plasma (PRP) was collected from which platelets were extracted at 1200 g. Platelet poor plasma (PPP) was saved. Platelets were resuspended in HBSS-Hepes EDTA (Hank's balanced salt

solution with 0.15 g/l ethyl diamine tetracetic acid (EDTA), pH: 6.5) and incubated for 40 min with 300  $\mu$ ci of  $^{51}\text{Cr}$  (Amersham International, UK) at room temperature. After a final centrifugation to remove unbound  $^{51}\text{Cr}$ , platelets were resuspended in 5 ml of PPP and reinjected into the pig.

After PRP removal, leukocytes were extracted from the pellet by 4% dextran sedimentation. Following washing in HBSS-Hepes citrated buffer (3.8 g/l sodium citrate, pH: 7.4), neutrophils were separated from other leukocytes by Ficoll-Paque gradient, 30 min at 400 g. Red blood cells were lysed and purified neutrophils were resuspended in HBSS-Hepes citrate. They were then incubated 15 min with 250  $\mu$ ci of  $^{111}\text{In}$  Oxine solution (Amersham International, UK), centrifuged, resuspended in 5 ml PPP, and reinjected.

### **Treatment and Carotid Angioplasty Procedure**

One hr after platelet and neutrophil reinjection, animals randomly received Fucoidan (1 mg/kg,  $n = 6$ ; 5 mg/kg,  $n = 5$ ; I.V., Sigma, US) or saline ( $n = 7$ , I.V.) as a 20 ml infusion at a constant rate of 1 ml/min. Ten minutes after injection, the pigs were heparinized (100 IU/kg, I.V. bolus). They were then allowed 5 min rest prior to the following angioplasty procedure. An 8F guiding catheter was introduced in the femoral artery, guided under fluoroscopic control to the left common carotid artery, and replaced by a 7F balloon dilation catheter (size, 8mm x 3cm, Meditech Inc., US). The balloon was positioned between the fourth and fifth cervical vertebrae and inflated five times to 6 atmospheres for 30 sec, with 60-sec intervals between inflations. This procedure was then repeated for the right common carotid artery. In order to measure the arteries'

vasoconstrictive responses and the balloon-to-artery ratio, angiograms of each of the common carotid arteries were taken before, during, and after dilation (Provost and Merhi, 1996; Merhi *et al.*, 1997b; Provost *et al.*, 1998).

After termination of the dilation procedure, the guiding catheter was repositioned in the brachiocephalic trunk, below the junction of the two common carotid arteries, and secured in position through a lateral incision between the second and third rib. The right and left jugular veins were cannulated and the blood collected. One liter of saline was infused through the catheter into the common carotid arteries. *In situ* fixation of the arteries and sacrifice then occurred via infusion of two liters of a 2% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde solution or Tissufix (Laboratoires Gilles Chaput, CA). The common carotid arteries were then excised, cleaned, and divided into nondilated and dilated segments. Next, each segment was measured for internal surface area and processed through a gamma-counter to determine  $^{111}\text{In}$ -neutrophil and  $^{51}\text{Cr}$ -platelet radioactivity. Total platelet and neutrophil adhesion levels were deduced by comparison with the radioactivity of reference blood samples of known platelet and neutrophil content, as detailed previously (Merhi *et al.*, 1993; Merhi *et al.*, 1997a).

### **Histological and Morphometric Analyses**

Movat-colored slides were prepared from representative sections of each segment in order to determine the severity of injury. The nondilated segments were also checked for absence of injury. Mild injury occurs when the internal elastic lamina is exposed to the arterial lumen in the absence of endothelium. Deep arterial injury occurs when the internal elastic lamina is torn and the subjacent media exposed. The type of injury as well as the internal circumference and length of the broken sections of the internal elastic

lamina were determined thanks to a Sony DXC-970 MD colour camera mounted on a Leitz Wetzlar microscope, linked to a Power Macintosh computer loaded with Scion Image 1.60 imaging software. The ratio of fracture length to internal circumference was calculated to correct for vessel size as described previously (Provost *et al.*, 1997).

### **Hematologic and Hemodynamic Monitoring**

Heart rate and blood pressure were monitored throughout all experiments. Blood samples were collected at various time points in EDTA vacutainers to allow determination of hematologic parameters by a T-890 cell counter (Coulter Corporation, FL, US), and slides for differential leukocyte analysis were made for each sample. The activated clotting time (ACT) was determined in 2 ml of fresh venous blood collected in FTCA 510 Hemochron tubes and coagulated in a Hemochron 801 (Technidyne, NJ, US). For platelet aggregation, 500  $\mu$ l of freshly drawn venous blood were heparinized (5 U/ml), diluted with 490  $\mu$ l saline and activated with 10  $\mu$ l ADP (10  $\mu$ M). Platelet aggregation was determined in a whole blood aggregometer (Chrono-Log 560-VS, PA, US) and measured in ohms after 5 min of activation.

### ***In vitro* Platelet and Neutrophil Adhesion Assays**

To further examine the importance of the selectin-mediated platelet-neutrophil interactions on platelet and neutrophil adhesion, *in vitro* assays were performed with isolated platelet and neutrophil suspensions. These suspensions were treated with the selectin inhibitor and perfused, in a controlled environment, over denuded arterial segments in plexiglass perfusion chambers as described previously (Merhi *et al.*, 1997b).

Briefly, excised pig aortas are cleaned of all surrounding tissue and preserved at 4°C in Krebb's Ringer buffer. A section is cut transversly into a ring which is then opened longitudinally. The media is exposed by peeling off the intima. The strip is then carefully cut into four segments that fit into the four plexiglass chambers. Two parallel sets of two chambers are connected with flexible tubing (R-1000 Tygon, Norton, US) and submerged in a circulating waterbath maintained at 37°C. Platelets and neutrophils are isolated and radiolabelled as described above but are finally resuspended in HBSS-Hepes buffer pH: 7.4 with calcium (0.14 g/l calcium chloride) and magnesium (0.1 g/l magnesium sulfate), instead of PPP. Platelet ( $250 \times 10^6/\text{ml}$ ) and/or neutrophil ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ ) suspensions are incubated (37°C, 5 min) with or without Fucoidan. They are then perfused for 5 min through the chambers which allows cells to come in contact with the media through a 1 cm x 0.2 cm window. The system is connected to a peristaltic pump (model 7520-35, Cole Parmer Instrument Co., US) which maintains flow conditions of 10 ml/min. Platelet deposition ( $\times 10^6/\text{cm}^2$ ) and neutrophil adhesion ( $\times 10^3/\text{cm}^2$ ) are quantified in the gamma counter by comparison with 50  $\mu\text{l}$  reference samples taken prior to perfusion.

### **Statistical Analysis**

Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Student's paired and unpaired *t* tests were performed for intragroup and intergroup comparisons, respectively. One way analysis of variance (ANOVA) was performed when appropriate. Differences were considered statistically significant at the 95% confidence level ( $P < .05$ ).

## Results

### Hematologic and Hemodynamic Parameters

As shown in table 1, both doses of Fucoidan decreased circulating leukocyte counts and doses of 5 mg/kg decreased platelet counts. We noticed, however, that this mild leukopenia and thrombocytopenia were transient, since leukocyte and platelet counts returned to normal before the end of the experiments.

Activated clotting time and the ADP-induced platelet aggregation were subject to Fucoidan activity. At 1 mg/kg, Fucoidan induced a mild decrease (18%) in ACT. These results were surprising since Fucoidan was not expected to have a procoagulant effect. However, at 5 mg/kg, Fucoidan had no apparent effect on ACT. Platelet aggregation (ohms) was significantly decreased by doses of 5 mg/kg (from  $14.9 \pm 2.8$  to  $10.9 \pm 2.5$ ), indicating an involvement of Fucoidan in the aggregation pathways. Fucoidan 1 mg/kg had no effect on aggregation. Red blood cell counts as well as heart rate and mean arterial blood pressure were within the normal range and not influenced by Fucoidan.

### Characteristics of the Arteries

As shown in table 2, the diameter of the arteries before angioplasty did not differ between groups and the balloon/artery ratio and dilation procedure were similar for all groups. As well, the level of arterial damage obtained by this procedure, as indicated by the relative percentages of mildly and deeply injured segments and by the fracture length/internal elastic lamina ratio, in the case of deeply injured segments, were similar between groups. Interestingly, treatment with Fucoidan 5 mg/kg induced a 51%



reduction in the vasoconstrictive response of injured arteries. Indeed, the vasoconstriction (% reduction of diameter) decreased from  $36.3 \pm 4.7$  in the control group to  $17.7 \pm 3.4$  in the Fucoidan 5 mg/kg group ( $P < .05$ ). However, the arterial vasoconstriction was statistically similar in the Fucoidan 1 mg/kg group as compared to control.

### ***In vivo* Platelet and Neutrophil Adhesion**

Figure 1 shows platelet deposition to intact, mildly injured and deeply injured carotid segments in control and treated pigs. In control animals, the level of platelet deposition ( $\times 10^6/\text{cm}^2$ ) was dependent on the severity of injury, increasing from  $0.06 \pm 0.06$  on intact endothelium, to  $3.84 \pm 0.59$  on mildly injured segments, to  $33.61 \pm 4.88$  on deeply injured segments. While 1 mg/kg of Fucoidan had no effect, Fucoidan 5 mg/kg reduced platelet deposition by 73% on deeply injured arterial segments, from  $33.61 \pm 4.88$  to  $8.75 \pm 2.51$  ( $P < .05$ ). Neutrophil adhesion ( $\times 10^3/\text{cm}^2$ ) was also dependent on the severity of injury, as shown in figure 2, increasing in control animals from  $8.75 \pm 2.45$  on intact endothelium, to  $226.56 \pm 45.46$  on mildly injured segments, to  $397.4 \pm 61.63$  on deeply injured segments. Fucoidan (5 mg/kg) reduced neutrophil adhesion to mildly injured segments by 92%, decreasing from  $226.56 \pm 45.46$  to  $18.91 \pm 4.43$ ; and to deeply injured segments by 84%, decreasing from  $397.4 \pm 61.63$  to  $65.04 \pm 10.81$ . Again, Fucoidan 1 mg/kg had no effect on neutrophil adhesion.

### ***In vitro* Adhesion Assays**

In order to determine the direct effects of Fucoïdan on platelet and neutrophil interactions with the arterial media, adhesion assays were performed with isolated cells. As shown in figure 3, platelet deposition ( $\times 10^6/\text{cm}^2$ ) was increased by the presence of neutrophils from  $2.49 \pm 0.42$  to  $8.34 \pm 1.26$ . When perfused alone, platelet deposition could be inhibited by Fucoïdan at both 20 and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Levels decreased by 50% to  $1.23 \pm 0.26$  and by 75% to  $0.62 \pm 0.11$ , respectively. When perfused with neutrophils, platelet deposition was reduced by 71% to  $2.4 \pm 0.36$  and by 89% to  $0.92 \pm 0.13$ , respectively. Neutrophil adhesion ( $\times 10^3/\text{cm}^2$ ) to arterial media was also increased in the presence of platelets from  $26.56 \pm 2.36$  to  $122.12 \pm 17.37$  (figure 4). Fucoïdan at both 20 and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  also inhibited neutrophil adhesion in the presence and absence of platelets. Indeed, when neutrophils were perfused alone, Fucoïdan reduced adhesion by 33% to  $17.61 \pm 3.31$  and by 43% to  $14.99 \pm 1.95$ , respectively. When they were perfused with platelets, Fucoïdan reduced adhesion by 61% to  $47.32 \pm 9.78$  and by 83% to  $19.65 \pm 2.82$ , respectively.

## Discussion

Platelet-leukocyte interactions at the site of arterial injury are critical to the evolution of vascular pathologies. Platelet deposition on the injured arterial wall first occurs in order to cover the injury and maintain vascular homeostasis. This reaction is known to implicate numerous adhesive proteins on the exposed arterial surface and cell adhesion molecules on platelets (Ruggeri, 1997). Neutrophils may then roll and adhere to these platelets to induce an inflammatory response (Palabrica *et al.*; 1992; Yeo *et al.*; 1994; Kuijper *et al.*; 1997, Weber and Springer, 1997). These reactions are closely tied into the coagulation pathways and are also influenced by cellular mediators, local shear conditions (Kostantopoulos and McIntire, 1997) and the nature of the lesion substrate. In dysregulation of the normal homeostatic response, recruitment of large numbers of platelets and neutrophils can build up a thrombus that may lead to an acute occlusive event, vasospasm, and restenosis (Bazzoni *et al.*, 1991; Jang *et al.*, 1994; Nash, 1994; Barron *et al.*, 1997).

Angioplasty is essential to reestablish vascular flow in a stenosed artery; however, deep vascular damage can occur from this procedure and may lead to acute thrombosis and chronic restenosis. Indeed, as demonstrated previously (Merhi *et al.*, 1995), and again in this study, vascular injury increases platelet and neutrophil adhesion. The extent of neutrophil adhesion is influenced as well by platelets, which support the adhesion of neutrophils to damaged arterial surfaces in a concentration dependent manner (Merhi *et al.*, 1997b). In addition, as we have shown in perfusion adhesion assays with isolated platelets and neutrophils, adhesion of both cell types is increased when they are perfused as mixed suspensions, showing the importance of interplay

between platelets and neutrophils at the site of injury. Together, these findings indicate that platelets can modulate neutrophil adhesion to damaged arteries. This reaction involves cell-cell interactions that are at least mediated by platelet P-selectin. In fact, P-selectin has been shown to mediate the interaction between platelets and neutrophils *in vitro* in a vessel wall injury model (Yeo *et al.*, 1994; Kuijper *et al.*, 1997; Kirchhofer *et al.*, 1997) as well as in an *in vivo* thrombosis model (Palabrica *et al.*, 1992) and following angioplasty (Merhi *et al.*, 1998). Thus, blockade of selectins in the present study, using Fucoidan, dramatically reduced *in vitro* and *in vivo* platelet and neutrophil adhesion at the site of arterial injury.

In the *in vitro* assays, although isolated platelets can adhere to arterial media when perfused alone, this adhesion is increased in the presence of neutrophils. Direct platelet deposition to the subendothelial matrix mainly involves Von Willebrand Factor with GPIb and GPIIb/IIIa (André *et al.*, 1997) and collagen with GPIa/IIa (Kainoh *et al.*, 1992; Saelman *et al.*, 1994). Activated adherent platelets may also be responsible for increased recruitment of other platelets through aggregation; this mainly involves platelet GPIIb/IIIa and fibrinogen (Ruggeri, 1997), and can be potentiated by thrombospondin (Agbanyo *et al.*, 1993; Kowalska and Tuszynski, 1993). It has been reported that Fucoidan may bind to laminin (Roberts *et al.*, 1986) and fibronectin (Burton-Wurster *et al.*, 1995), and also reduced platelet deposition by inhibiting aggregation through thrombospondin (Roberts *et al.*, 1986; Patankar *et al.*, 1993). In our study, the ability of platelets to aggregate in whole blood, as measured by the ADP-induced platelet aggregation, was decreased by doses of 5 mg/kg Fucoidan. This effect of Fucoidan could also be related to its ability to completely immobilize platelet

membranes (Hajela *et al.*, 1996a). Decreased aggregation could indeed result in decreased platelet deposition at the site of arterial injury. In addition, many anticoagulant and fibrinolytic properties of Fucoidan have been reported, involving potentiation of HCII inhibition of thrombin (Church *et al.*, 1989; Collicec *et al.*, 1991; Mauray *et al.*, 1995), activation of plasminogen by t-PA and urokinase (Doctor *et al.*, 1995), and  $\alpha_2$ -antiplasmin inhibition (Soeda *et al.*, 1992). However, since Fucoidan had no effect on ACT at the doses used in our study, its effects on platelet adhesion cannot be attributed to its anticoagulant properties.

Recruitment of neutrophils by adherent activated platelets mainly involves L-selectin, Sialyl Lewis<sup>x</sup>, and PSGL-1 via binding to platelet P-selectin (Lo *et al.*, 1997; Borges *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998). These interactions slow the rolling neutrophil and permit firm adhesion via its integrins CD11b/CD18 and CD11c/CD18 (Brown *et al.*, 1998), which bind to fibrinogen and platelet GPIIb/IIIa (Kuijper *et al.*, 1997; Weber and Springer, 1997). The effect of Fucoidan in our study on neutrophil adhesion may be related to its capacity to block selectins. It has been shown that Fucoidan can block L and P-selectins *in vitro* (Patankar *et al.*, 1993; Rochon *et al.*, 1994; Hajela *et al.*, 1996a) as well as *in vivo* (Lindbom *et al.*, 1992; Granert *et al.*, 1994; Shimaoka *et al.*, 1996). Recently, we showed by flow cytometry that Fucoidan inhibits the binding of activated platelets expressing P-selectin to neutrophils (unpublished observations). This is supported by the findings of Patankar *et al.* (1993) which reported that Fucoidan is a close structural analog of Sialyl Lewis<sup>x</sup>. It has also been reported that thrombospondin may contribute to platelet-leukocyte adhesion (Silverstein and Nachman, 1987) and that Fucoidan may bind to thrombospondin (Roberts *et al.*, 1986), but whether Fucoidan

significantly inhibits platelet binding to neutrophil through this mechanism is still unknown and may be secondary to its main effect on P-selectin. In fact, we have demonstrated *in vitro* that Fucoidan is most potent in inhibiting platelet and neutrophil adhesion to damaged surfaces when platelets and neutrophils are permitted to interact in mixed cell suspensions. When perfused alone, however, neutrophil adhesion was also partially inhibited by Fucoidan, probably by inhibition of neutrophil-neutrophil interactions via L-selectin (Rochon *et al.*, 1994; Walchek *et al.*, 1996). Furthermore, Hagela *et al.* (1996b) have reported that Fucoidan immobilizes neutrophil membranes, which may also result in decreased neutrophil adhesion. Nevertheless, in our study, the *in vitro* increase in neutrophil adhesion in the presence of platelets was completely inhibited by Fucoidan, indicating that the major effect of Fucoidan is related to inhibition of neutrophil-platelet interactions.

Engagement of these adhesion molecules causes platelet and neutrophil activation through intracellular signaling pathways (Crockett-Torabi *et al.*, 1995; Tsang *et al.*, 1997). Activated platelets and neutrophils release potent vasoactive substances such as thromboxane A<sub>2</sub>, serotonin, platelet activators such as PAF, chemotactic factors such as leukotrienes, and products such as elastase and O<sub>2</sub>-radicals that increase vascular constriction and injury (Weiss, 1989). Furthermore, increased platelet and neutrophil activation and interactions have been reported in patients following angioplasty (Neuman *et al.*, 1996, Serrano *et al.*, 1997). Inhibition of neutrophil adhesion and interaction with platelets by Fucoidan treatment therefore helps to reduce the release of these vasoactive substances and, thereby, the arterial vasoconstrictive response.

Platelet-neutrophil interactions at the site of vascular injury are clearly central in the pathophysiology of thrombosis and in the vasoconstrictive response. Our study has

shown that inhibition of this specific interaction by a selectin blocker, Fucoidan, can reduce platelet-neutrophil complex formation, platelet-neutrophil coactivation at the site of deep arterial injury, and both platelet and neutrophil adhesion to injured arterial surfaces. Platelet-neutrophil interactions through selectins may constitute targets in our attempts to limit post-angioplasty complications such as thrombosis and vasospasm, and to reduce chronic restenosis.

## References

- Agbanyo FR, Sixma JJ, de Groot PG, Languino LR and Plow EF (1993)  
Thrombospondin-platelet interactions. *J Clin Invest* **92**:288-296.
- André P, Hainaud P, Bal dit Sollier C, Garfinkel LI, Caen JP and Drouet LO (1997)  
Relative involvement of GPIb/IX-vWF axis and GPIIb/IIIa in thrombus growth at high shear rates in the guinea pig. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**:919-924.
- Barron MK, Lake RS, Buda AJ and Tenaglia AN (1997) Intimal hyperplasia after balloon injury is attenuated by blocking selectins. *Circulation* **96**:3587-3592.
- Bazzoni G, Dejana E and Del Maschio A (1991) Platelet-neutrophil interactions. Possible relevance in the pathogenesis of thrombosis and inflammation. *Haematologica* **76**:491-499.
- Bird MI, Foster MR, Priest R and Malhotra R (1997) Selectins: Physiological and pathophysiological roles. *Biochem Soc Trans* **25**:1199-1206.
- Borges E, Eytner R, Moll T, Steegmaier M, Campbell MA, Ley K, Mossmann H and Vestweber D (1997) The P-selectin glycoprotein ligand-1 is important for recruitment of neutrophils into inflamed mouse peritoneum. *Blood* **90**:1934-1942.
- Brown KK, Henson PM, Maclouf J, Moyle M, Ely JA and Worthen GS (1998)  
Neutrophil-platelet adhesion: Relative roles of platelet P-selectin and neutrophil  $\beta_2$  (CD18) integrins. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**:100-110.
- Burton-Wurster N, Zhang DW and Lust G (1995) Accumulation of fibronectin in articular cartilage explants cultured with TGF $\beta$ 1 and Fucoidan. *Arch Biochem Biophys* **316**:452-460.



- Church FC, Meade JB, Treanor RE and Whinna HC (1989) Antithrombin activity of Fucoidan. *J Biol Chem* **264**:3618-3623.
- Colliec S, Fischer AM, Tapon-Brethaudiere J, Boisson C, Durand P and Jozefonvicz J (1991) Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. *Thromb Res* **64**:143-154.
- Crockett-Torabi E, Sulenbarger B, Smith CW and Fantone JC (1995) Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules. *J Immunol* **154**:2291-2302.
- Doctor VM, Hill C and Jackson GJ (1995) Effect of fucoidan during activation of human plasminogen. *Thromb Res* **79**:237-247.
- Granert C, Raud J, Xie X, Lindquist L and Lindbom L (1994) Inhibition of leukocyte rolling with polysaccharide fucoidin prevents pleocytosis in experimental meningitis in the rabbit. *J Clin Invest* **93**:929-936.
- Hajela K, Kayestha R and Sumati (1996a) Carbohydrate induced modulation of cell membrane IV: Interaction with mucin and fucoidan totally immobilizes the human platelet membrane. *Indian J Biochem Biophys* **33**:308-310.
- Hajela K, Kayestha R and Sumati (1996b) Carbohydrate induced modulation of cell membrane V : ESR characterization of molecular mobility in lipid bilayer of human neutrophil plasma membrane. *Indian J Exp Biol* **34**:513-516.
- Jang Y, Lincoff AM, Plow EF and Topol EJ (1994) Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* **24**:1591-1601.
- Kainoh M, Ikeda Y, Nishio S and Nakadate T (1992) Glycoprotein Ia/IIa-mediated activation-dependent platelet adhesion to collagen. *Thromb Res* **65**:165-176.

- Kirchhofer D, Riederer MA and Baumgartner HR (1997) Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood* **89**:1270-1278.
- Konstantopoulos K and McIntire LV (1997) Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion. *J Clin Invest* **100**:S19-S23.
- Kowalska MA and Tuszynski GP (1993) Interaction of thrombospondin with platelet glycoproteins GPI<sub>a</sub>-II<sub>a</sub> and GPII<sub>b</sub>-III<sub>a</sub>. *Biochem J* **295**:725-730.
- Kubes P, Jutila M and Payne D (1995) Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* **95**:2510-2519.
- Kuijper PHM, Gallardo Torres HI, Lammers JWJ, Sixma JJ, Koenderman L and Zwaginga JJ. (1997) Platelet and fibrin deposition at the damaged vessel wall: Cooperative substrates for neutrophil adhesion under flow conditions. *Blood* **89**:166-175.
- Lindbom L, Xie X, Raud J and Hedqvist P (1992) Chemoattractant-induced firm adhesion of leukocytes to vascular endothelium *in vivo* is critically dependent on initial leukocyte rolling. *Acta Physiol Scand* **146**:415-421.
- Liu WJ, Ramachandran V, Kang J, Kishimoto TK, Cummings RD and McEver RP (1998) Identification of N-terminal residues on P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P-selectin. *J Biol Chem* **273**:7078-7087.
- Lo SK, Golenbock DT, Sass PM, Maskati A, Xu H and Silverstein RL (1997) Engagement of the Lewis X antigen (CD15) results in monocyte activation. *Blood* **89**:307-314.
- Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM and Zimmerman GA (1993) Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest* **92**:559-570.

- Mauray S, Sternberg C, Theveniaux J, Millet J, Siquin C, Tapon-Bretonnière J and Fischer AM (1995) Venous antithrombotic and anticoagulant activities of a fucoidan fraction. *Thromb Haemost* **74**:1280-1285.
- McCaffrey TA, Falcone DJ, Borth W, Brayton CF and Weksler BB (1992) Fucoidan is a non-anticoagulant inhibitor of intimal hyperplasia. *Biochem Biophys Res Com* **184**:773-781.
- McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L and Bainton DF (1989) GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* **84**:92-99.
- Merhi Y, Guidoin R, Provost P, Leung TK and Lam JYT (1995) Increase of neutrophil adhesion and vasoconstriction with platelet deposition after deep arterial injury by angioplasty. *Am Heart J* **129**:445-451.
- Merhi Y, King M and Guidoin R (1997a) Acute thrombogenicity of intact and injured natural blood conduits versus synthetic conduits: Neutrophil, platelet, and fibrin(ogen) adsorption under various shear-rate conditions. *J Biomed Mat Res* **34**:477-485.
- Merhi Y, Lacoste LL and Lam JYT (1994) Neutrophil implications in platelet deposition and vasoconstriction after deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Circulation* **90**:997-1002.
- Merhi Y, Lam JYT, Lacoste LL, Latour JG, Guidoin R and Waters D (1993). Effects of thrombocytopenia and shear rate on neutrophil and platelet deposition on endothelial and medial arterial surfaces. *Arterioscler Thromb* **13**:951-957.
- Merhi Y, Provost P, Chauvet P, Théorêt JF, Phillips ML and Latour JG (1998) Selectin blockade reduces neutrophil interactions with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (in press).

- Merhi Y, Provost P, Guidoin R and Latour JG (1997b) Importance of platelets in neutrophil adhesion and vasoconstriction after deep carotid arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**:1185-1191.
- Minix R and Doctor VM (1997) Interaction of fucoidan with proteases and inhibitors of coagulation and fibrinolysis. *Thromb Res* **87**:419-429.
- Miura T, Nelson DP, Schermerhorn ML, Shin'oka T, Zund G, Hickey PR, Neufeld EJ and Mayer JE. (1996) Blockade of selectin-mediated leukocyte adhesion improves postischemic function in lamb hearts. *Ann Thorac Surg* **62**:1295-1300.
- Nash GB (1994) Adhesion between neutrophils and platelets: A modulator of thrombotic and inflammatory events? *Thromb Res* **74**:S3-S11.
- Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Puchner G and Schömig A (1996). Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol* **27**:819-824.
- Omata M, Matsui N, Inomata N and Ohno T (1997). Protective effects of polysaccharide fucoidin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **30**:717-724.
- Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA and Furie B (1992). Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated *in vivo* by P-selectin on adherent platelets. *Nature* **359**:848-851.
- Patankar MS, Oehninger S, Barnett T, Williams RL and Clark GF (1993) A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J Biol Chem* **268**:21770-21776.

- Provost P and Merhi Y (1996) BW755C, a dual lipoyxygenase/cyclooxygenase inhibitor, reduces mural platelet and neutrophil deposition and vasoconstriction after angioplasty injury in pigs. *J Pharmacol Exp Ther* **277**:17-21.
- Provost P, Borgeat P and Merhi Y (1998) Platelets, neutrophils, and vasoconstriction after arterial injury by angioplasty in pigs: Effects of MK-886, a leukotriene biosynthesis inhibitor. *Brit J Pharm* **123**:251-258.
- Provost P, Tremblay J and Merhi Y (1997) 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* **17**:1806-1812.
- Roberts DD, Rao CN, Liotta LA, Gralnick HR and Ginsberg V (1986) Comparison of the specificities of laminin, thrombospondin, and von Willebrand factor for binding to sulfated glycolipids. *J Biol Chem* **261**:6872-6877.
- Rochon YP, Simon SI, Lynam EB and Sklar LA (1994) A role for lectin interactions during human neutrophil aggregation. *J Immunol* **152**:1385-1393.
- Ruggeri ZM (1997) Mechanisms initiating platelet thrombus formation (1997) *Thromb Haemost* **78**:611-616.
- Saelman EUM, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG, Heijnen HFG, Sage EH, Williams S, McKeown L, Gralnick HR and Sixma JJ (1994) Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa ( $\alpha_2\beta_1$ -Integrin). *Blood* **83**:1244-1250.
- Serrano CV Jr., Ramirez JAF, Venturinelli M, Arie S, D'Amico E, Zweier JL, Pileggi F and DA LUZ PL (1997) Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression. *J Am Coll Cardiol* **29**:1276-1283.

- Shimaoka M, Ikeda M, Iida T, Taenaka N, Yoshiya I and Honda T (1996) Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lung. *Am J Resp Crit Care Med* **153**:307-311.
- Silverstein RL and Nachman RL (1987) Thrombospondin binds to monocytes-macrophages and mediates platelet-monocyte adhesion. *J Clin Invest* **79**:867-874.
- Soeda S, Ohmagari Y, Shimeno H and Nagamatsu A (1993) Preparation of oversulfated fucoidan fragments and evaluation of their antithrombotic activities. *Thromb Res* **72**:247-256.
- Soeda S, Sakaguchi S, Shimeno H and Nagamatsu A (1992) Fibrinolytic and anticoagulant activities of highly sulfated fucoidan. *Biochem Pharmacol* **43**:1853-1858.
- Springer GF, Wurzel HA, McNeal GM Jr., Ansell NJ and Doughty MF (1957) Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidin. *Proc Soc Exp Biol Med* **94**:404-409.
- Tsang YTM, Neelamegham S, Hu Y, Berg EL, Burns AR, Smith CW and Simon SI (1997) Synergy between L-selectin signaling and chemotactic activation during neutrophil adhesion and transmigration. *J Immunol* **159**:4566-4577.
- Walcheck B, Moore KL, McEver RP and Kishimoto TK (1996) Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. *J Clin Invest* **98**:1081-1087.
- Weber C and Springer TA (1997) Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of MAC-1 with fibrinogen bound to  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest* **100**:2085-2093.
- Weiss SJ (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* **320**:365-376.

Yeo EL, Sheppard JI and Feuerstein IA (1994) 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* **83**:2498-2507.

**FOOTNOTES**

<sup>1</sup> This work was supported by the Medical Research Council of Canada, The Heart and Stroke Foundation of Quebec, and the Fonds de la recherche en santé du Québec.



TABLE 1

Hematologic and hemodynamic parameters in the control and Fucoidan-treated groups

	Control		Fucoidan		Fucoidan	
	Baseline	Saline	Baseline	1mg/kg	Baseline	5mg/kg
Platelets (x10 <sup>6</sup> /ml)	327 ± 34	332 ± 37	364 ± 23	338 ± 23	366 ± 28	296 ± 26*
Leukocytes (x10 <sup>6</sup> /ml)	18.0 ± 6.6	17.7 ± 6.5	16.5 ± 1.7	10.2 ± 1.6*	16.7 ± 1.7	9.0 ± 1.5*
Red blood cells (x10 <sup>9</sup> /ml)	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.5 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.6 ± 0.2
Activated clotting time (sec)	113 ± 3	110 ± 6	111 ± 3	92 ± 3*	110 ± 5	119 ± 9
Platelet aggregation (ohms)	13.5 ± 2.5	13.5 ± 2.5	15.3 ± 1.8	14.6 ± 1.8	14.9 ± 2.8	10.9 ± 2.5*
Heart rate (bpm)	124 ± 18	128 ± 15	118 ± 17	121 ± 19	91 ± 6	109 ± 11
Mean arterial BP (mmHg)	58 ± 1.1	58 ± 2.1	62 ± 1.8	63 ± 3	65 ± 3.4	55 ± 4.7

\*P &lt; .05 vs. baseline

TABLE 2

Characteristics of the animals and the dilated arteries in the control and Fucoidan-treated groups

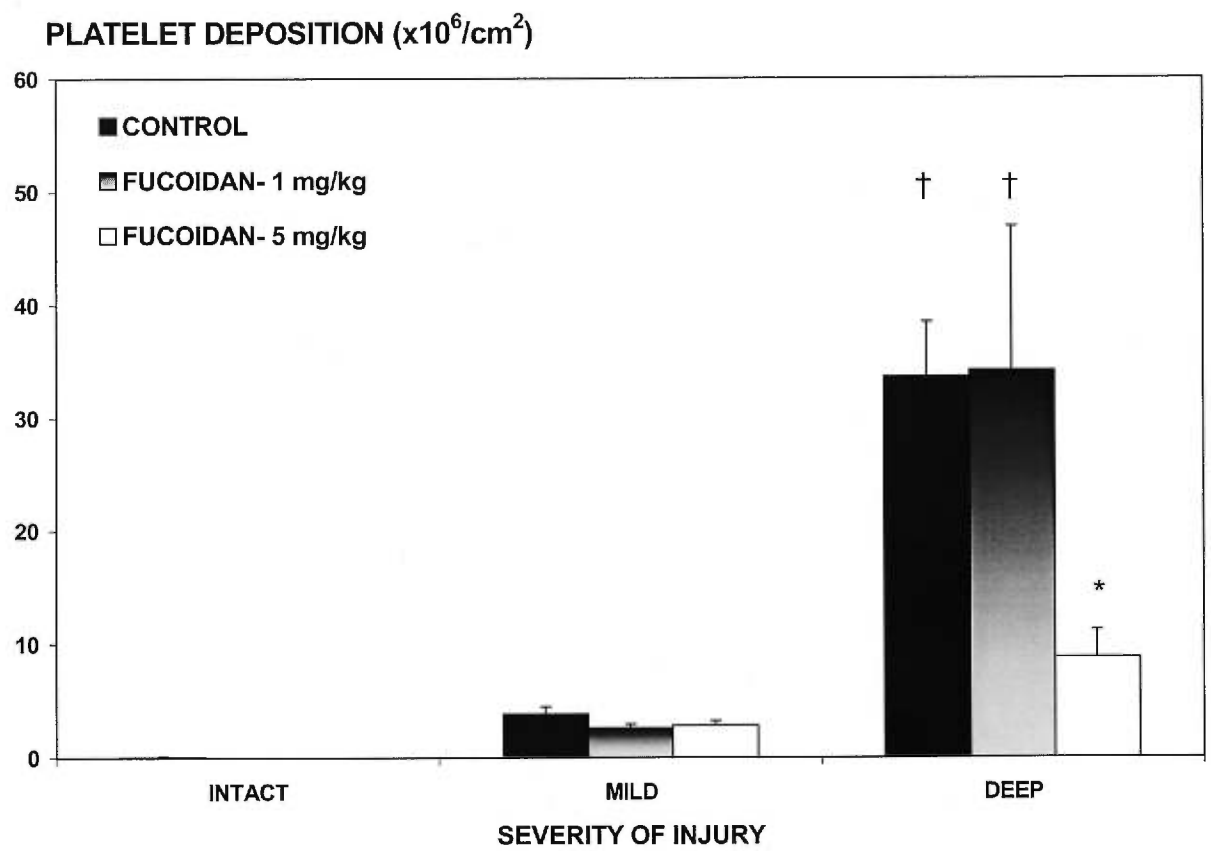
	Control	Fucoidan 1 mg/kg	Fucoidan 5 mg/kg
No. of animals	7	6	5
Weight (kg)	17.7 ± 1.1	18.9 ± 1.3	18.9 ± 1.8
No. Arteries successfully dilated	14	11	10
Diameter of arteries before dilation (mm)	4.06 ± 0.09	4.08 ± 0.09	4.08 ± 0.14
Vasoconstriction (% reduction of diameter)	36.3 ± 4.6	24.8 ± 4.3	17.7 ± 3.2*
Balloon/artery ratio	1.12 ± 0.02	1.19 ± 0.04	1.16 ± 0.03
No. of mildly injured segments (%)	20 (48%)	21 (64%)	16 (55%)
No. of deeply injured segments (%)	22 (52%)	12 (36%)	14 (45%)
Circumference of internal elastic lamina (mm)	7.17 ± 0.35	6.7 ± 0.26	6.63 ± 0.51
Fracture length (mm)	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.2	0.8 ± 0.1
Fracture length/internal elastic lamina ratio (%)	13.7 ± 1.3	19.5 ± 2.7	13.3 ± 2.8

\*P < .05 vs. control

## Legends for figures

- Figure 1.** Platelet deposition to intact, mildly injured, and deeply injured arterial segments in control and Fucoidan-treated groups. Platelet deposition increased with the severity of injury in the control group. Treatment with Fucoidan 5 mg/kg reduced platelet deposition to deeply injured segments by 73%.
- Figure 2.** Neutrophil adhesion to intact, mildly injured, and deeply injured arterial segments in control and Fucoidan-treated groups. Neutrophil adhesion increased with the severity of injury in the control group. Treatment with Fucoidan 5 mg/kg reduced neutrophil adhesion to mildly injured segments by 92% and to deeply injured segments by 84%.
- Figure 3.** Effect of Fucoidan on platelet deposition to arterial media in perfusion flow chambers, in the absence and presence of neutrophils. Both doses of Fucoidan reduced platelet deposition to arterial media.
- Figure 4.** Effect of Fucoidan on neutrophil adhesion to arterial media in perfusion flow chambers, in the absence and presence of platelets. Both doses of Fucoidan reduced neutrophil adhesion to arterial media.

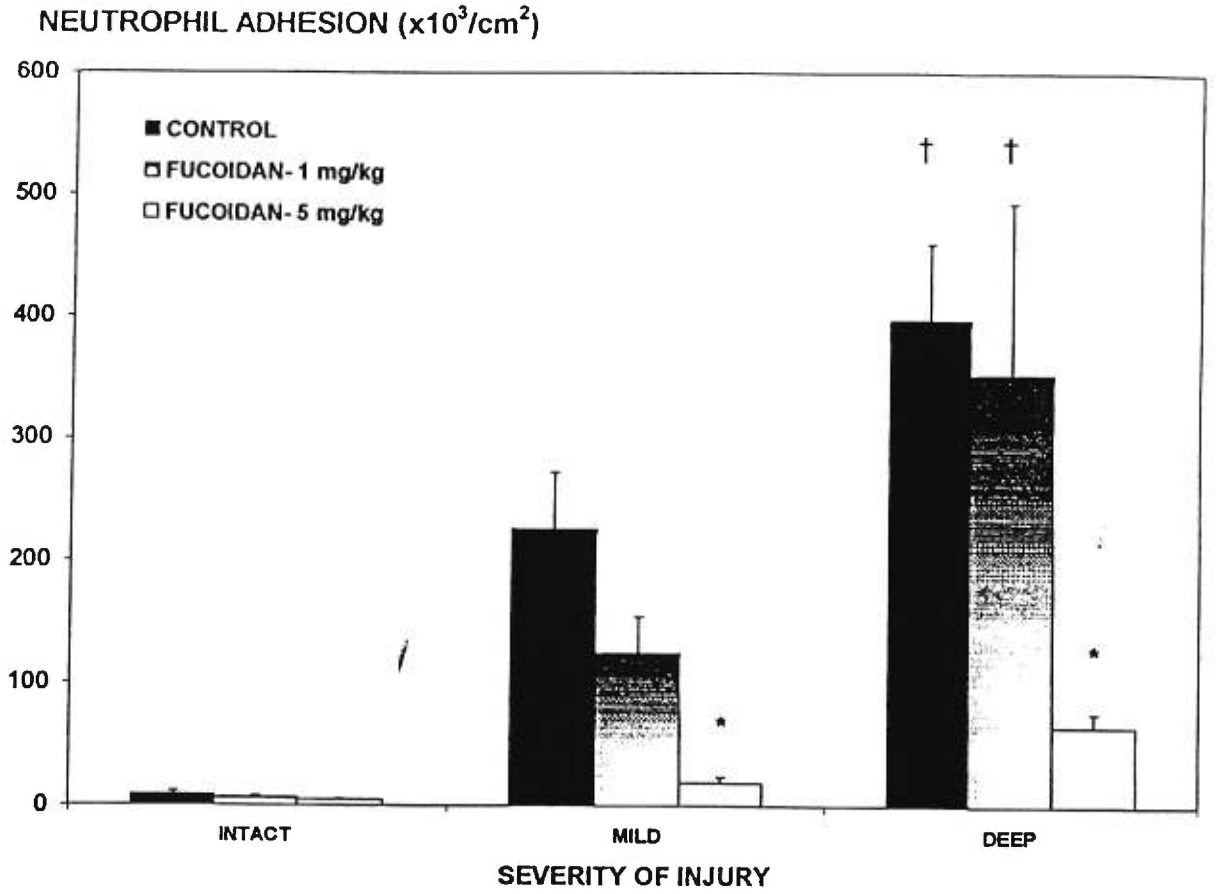
FIGURE 1



† $P < .05$  vs. Intact and Mild

\* $P < .05$  vs. control

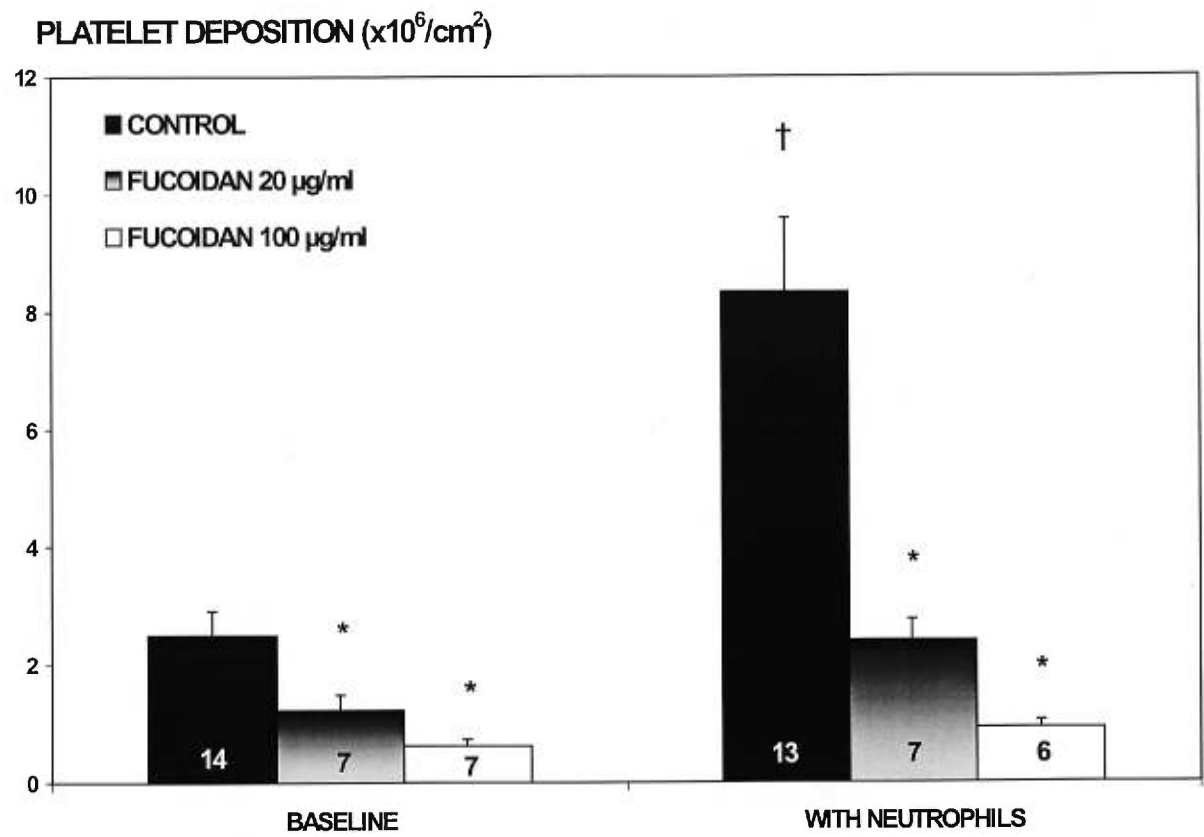
FIGURE 2



†P < .05 vs. Intact and Mild

\*P < .05 vs. control

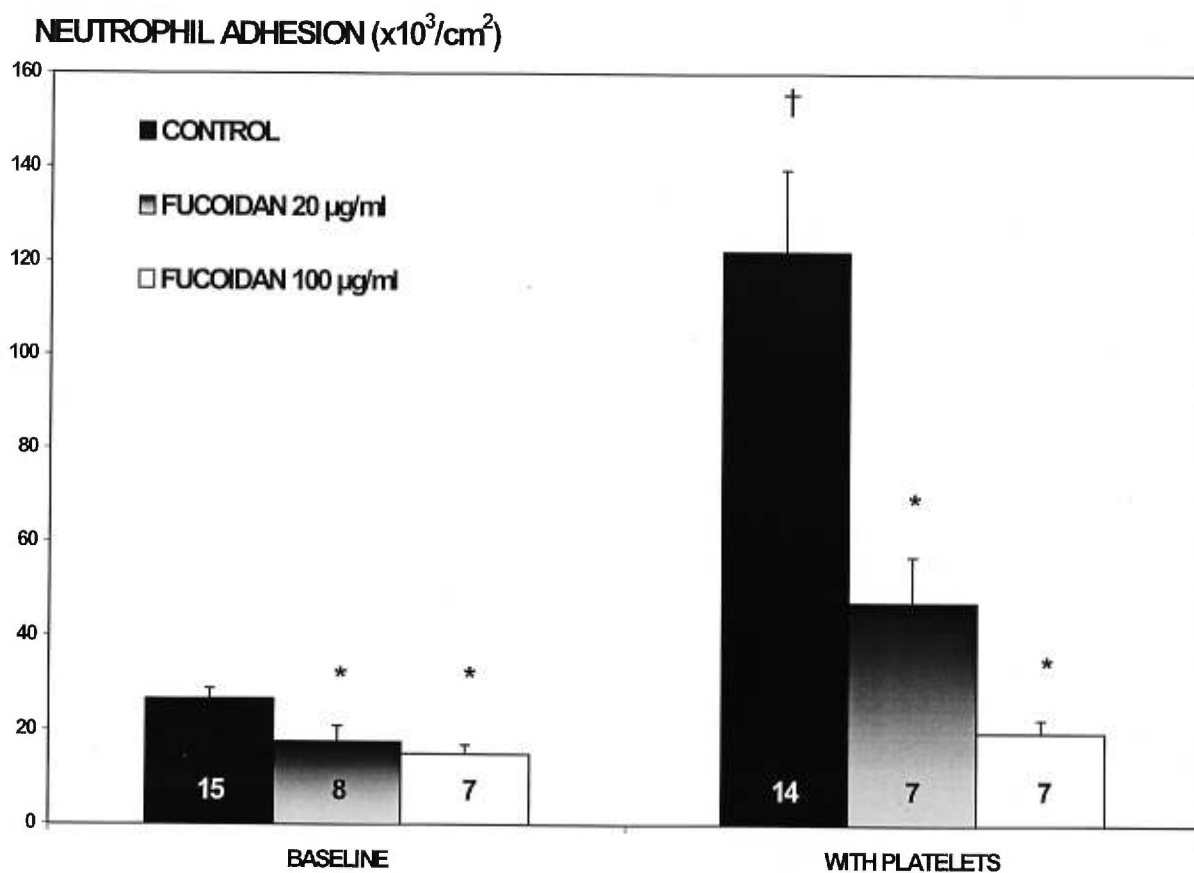
FIGURE 3



† $P < .05$  vs. Baseline

\* $P < .05$  vs. control

FIGURE 4



†P < .05 vs. Baseline

\*P < .05 vs. Control

## CHAPITRE VI: DISCUSSION

Les interactions entre plaquettes et leucocytes aux sites de lésions artérielles sont centrales dans le développement de pathologies vasculaires. La déposition de plaquettes à la surface d'une artère endommagée se fait en premier lieu pour couvrir la lésion et maintenir l'intégrité du vaisseau. Cette réaction implique plusieurs protéines adhésives sur la surface artérielle exposée ainsi que des molécules d'adhésion sur les plaquettes (36). Les neutrophiles peuvent ensuite rouler sur les plaquettes activées et participent à la réaction inflammatoire (14, 109, 111, 200). La cascade de coagulation, les médiateurs cellulaires, les forces de cisaillement locales ainsi que la nature de la lésion, sont également des facteurs impliqués de près dans les réactions homéostatiques. Cependant, lorsque ces facteurs sont débalancés, le recrutement d'un grand nombre de plaquettes et de neutrophiles peut conduire à la formation d'un thrombus, une occlusion aiguë d'une artère, la vasoconstriction ou la resténose (21, 22, 49, 79, 140).

L'angioplastie est nécessaire afin de rétablir la lumière d'une artère sténosée. Cependant, des lésions vasculaires sévères peuvent survenir suite à cette procédure et entraîner la thrombose aiguë et la resténose chronique. En effet, comme il a été démontré précédemment (24), et encore une fois dans ces études, la sévérité de la lésion augmente l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles. L'adhésion des neutrophiles est également influencée par les plaquettes qui supportent l'adhésion neutrophilique de façon concentration-dépendante (26). De plus, nous avons montré dans les études présentes, avec un système *in vitro* de perfusion, que l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles augmente lorsqu'ils peuvent interagir en perfusions de suspensions mixtes, démontrant bien l'importance des interactions entre ces deux types cellulaires au site de la lésion vasculaire. Ces résultats suggèrent que les plaquettes peuvent moduler l'adhésion des neutrophiles au site d'endommagement et vice-versa. Ces réactions impliquent des interactions cellulaires qui sont médiées en partie par les sélectines. Plusieurs groupes ont déjà démontré l'implication des sélectines dans les interactions entre plaquettes et neutrophiles dans un modèle *in vitro* d'endommagement vasculaire (109, 114, 347), dans un modèle *in vivo* de thrombose (200) et après angioplastie (24, 26). Dans les études présentes, l'inhibition des sélectines par les analogues du sialyl Lewis<sup>x</sup> a donc entraîné



une diminution de l'adhésion des neutrophiles aux sites de lésions artérielles profondes, *in vivo* et *in vitro*. La fucoidine a également permis d'inhiber l'adhésion des plaquettes.

*In vitro*, les plaquettes ont pu adhérer à la média artérielle lorsque perfusées en suspensions seules, mais cette adhésion fut augmentée en présence des neutrophiles. L'adhésion directe des plaquettes à la matrice sous-endothéliale implique principalement le facteur von Willebrand et les molécules plaquettaires GPIb et GPIIb/IIIa (303), ainsi que le collagène avec le GPIa/IIa (274, 276). Les plaquettes adhérees et activées peuvent recruter d'autres plaquettes par le phénomène d'agrégation. L'agrégation implique principalement l'intégrine plaquettaire GPIIb/IIIa et le fibrinogène (11) mais peut également être favorisé par la thrombospondine (348, 349). Cependant, la fucoidine peut réduire l'adhésion plaquettaire par son interaction avec la laminine (341) et la fibronectine (350) et peut également limiter l'agrégation par son interaction avec la thrombospondine (321, 341). En effet, dans notre étude, l'agrégation plaquettaire mesurée dans le sang complet et induite par l'ADP fut réduite par des doses de 5 mg/kg. De plus, Hajela et al. (331) ont observé que la fucoidine immobilise complètement les membranes des plaquettes, ce qui pourrait réduire leur capacité à agréger, en plus de son interaction avec la thrombospondine. L'inhibition de l'agrégation par la fucoidine a donc probablement une incidence sur l'adhésion plaquettaire au site d'une lésion artérielle. Cette observation peut également être renforcée par les propriétés anticoagulantes et fibrinolytiques de la fucoidine. Ces mécanismes impliquent la potentialisation de l'inhibition de la thrombine par l'HCII (332, 334, 335), l'activation du plasminogène par le t-PA et l'urokinase (338) et l'inhibition de l' $\alpha_2$ -antiplasmine (323). Cependant, dans notre étude, les effets de la fucoidine sur l'adhésion ne peuvent être attribués à ces capacités anticoagulantes puisque nous n'avons pas observé d'effets sur l'ACT aux doses testées. Dans la première contribution, le CY-1503 n'a pas eu d'effets sur l'adhésion des plaquettes. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'il est plus spécifique pour les sélectines, n'engendre pas d'interactions connues avec d'autres protéines adhésives comme la thrombospondine et n'intervient pas dans la coagulation.

Le recrutement des neutrophiles par les plaquettes adhérees et activées implique principalement la L-sélectine, le sialyl Lewis<sup>x</sup> et le PSGL-1 des neutrophiles par liaison avec la P-sélectine des plaquettes (19, 204, 210). Ces interactions permettent aux

neutrophiles de rouler et de ralentir afin de se fixer fermement via leurs intégrines. Les intégrines neutrophiliques CD11b/CD18 et CD11c/CD18 sont responsables de l'adhésion fixe (129) en liant le fibrinogène et l'intégrine plaquettaire GPIIb/IIIa (14, 111). L'inhibition de l'adhésion des neutrophiles dans nos études peut être expliquée par la capacité des analogues du sialyl Lewis<sup>x</sup> à bloquer la L et la P-sélectine. En effet, des études *in vitro* (118, 119, 321, 331) et *in vivo* (326, 327, 328) ont bien démontré ce potentiel. De plus, des résultats non publiés d'expériences en cytométrie en flux nous indiquent que la fucoidine peut inhiber la liaison de neutrophiles avec des plaquettes activées exprimant la P-sélectine. Ceci est soutenu par les observations de Patankar *et al.* (321) qui suggèrent que la fucoidine est un analogue structurel du sialyl Lewis<sup>x</sup>. Le CY-1503 ne lie pas d'autres protéines adhésives que les sélectines, par contre, la fucoidine peut lier des molécules comme la thrombospondine (341), qui pourraient être impliquées dans les liaisons plaquettes-leucocytes (129). Il n'a cependant pas été déterminé que la fucoidine inhibe significativement la liaison par ce mécanisme et il pourrait toutefois être secondaire au mécanisme de liaison par la P-sélectine. Ces observations sont en accord avec nos expériences *in vitro* qui montrent que la fucoidine a plus d'effets lorsque les plaquettes et les neutrophiles sont perfusés en suspensions mixtes. Lorsqu'ils sont perfusés seuls, la fucoidine a tout de même inhibé partiellement l'adhésion des neutrophiles, probablement par l'inhibition des interactions neutrophiles-neutrophiles médiées par la L-sélectine (118, 119, 351). De plus, Hajela *et al.* (352) ont montré que la fucoidine immobilise la membrane des neutrophiles, ce qui pourrait également réduire l'adhésion neutrophilique. Le CY-1503 quant à lui a également inhibé significativement l'adhésion des neutrophiles, *in vivo* sur des artères sévèrement endommagées, et *in vitro* en présence des plaquettes. Ces résultats démontrent clairement que l'action du CY-1503 passe par l'inhibition du recrutement des neutrophiles par les plaquettes. Il n'en est pas moins, cependant, que l'accroissement de l'adhésion des deux types cellulaires tel que mesuré lors de perfusions de suspensions mixtes fut complètement inhibée par la fucoidine, indiquant que l'effet principal de cet inhibiteur des sélectines est l'interruption des interactions plaquettes-neutrophiles, ainsi que la coactivation nécessaire à augmenter le recrutement des deux composantes impliquées. En effet, ces interactions sont responsables de l'activation des plaquettes et des neutrophiles, puisque la liaison de

molécules d'adhésions engendre des cascades de signalisations intracellulaires activatrices (20, 110, 206, 207). Les plaquettes et les neutrophiles activés relâchent plusieurs substances vasoactives comme la thromboxane- $A_2$ , la serotonine, des substances activatrices comme le PAF, des facteurs chemoattractants comme l'élastase, et des radicaux libres qui augmentent les réactions vasculaires suite à l'endommagement (353). Aussi, une augmentation de l'activation des plaquettes et des neutrophiles ainsi que de leurs interactions a été observée chez des patients suite à l'angioplastie (99, 100). Dans notre seconde contribution, l'inhibition de l'adhésion des neutrophiles et de leur interaction avec les plaquettes par la fucoidine a donc réduit le relâchement de substances vasoactives et ainsi la réponse vasoconstrictrice des artères.

Nous démontrons ici l'importance des interactions plaquettes-neutrophiles au site de lésions artérielles dans la physiopathologie de la thrombose et dans les réponses vasoconstrictrices associées. Nos études ont démontré que le CY-1503 et la fucoidine, des analogues du sialyl Lewis<sup>x</sup> inhibiteurs des sélectines, peuvent efficacement inhiber le recrutement de neutrophiles par les plaquettes, la coactivation plaquette-neutrophile au site de la lésion, l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles aux surfaces endommagées ainsi que la vasoconstriction artérielle. Les interactions plaquettes-neutrophiles médiées par les sélectines sont donc des cibles thérapeutiques potentielles qui pourraient s'avérer efficaces dans le traitement des pathologies vasculaires telles la thrombose, les vasospasmes et la resténose chronique.

**SOURCES DOCUMENTAIRES**

1. Brundtland G. H. Organisation Mondiale de la Santé. Rapport sur la santé dans le monde, 1999.
2. Funke H., Assmann G. Strategies for the assessment of genetic coronary artery disease risk *Curr Opin Lipidol* 10(3):285-291, 1999.
3. Nieto F. J., Diez-Roux A., Szklo M., Comstock G. W., Sharrett A. R. Short- and long-term prediction of clinical and subclinical atherosclerosis by traditional risk factors. *J Clin Epidemiol* 52(6):559-567, 1999.
4. Ridker P. M. Inflammation, atherosclerosis, and cardiovascular risk: an epidemiologic view. *Blood Coagul Fibrinolysis* 10 Suppl 1: S9-12, 1999.
5. Calverley D. C., Roth G. J. Antiplatelet therapy. Aspirin, ticlopidine/clopidogrel, and anti-integrin agents. *Hematol Oncol Clin North Am* 12(6):1231-1249, 1998.
6. Fox K. A. Have we reached the limit with thrombolytic therapy? *Cardiovasc Drugs Ther* 13(3):211-216, 1999.
7. Lee G., Ikeda R., Mason d. T., et al. Effective dilatation of human coronary artery obstruction due to atherosclerosis utilizing a balloon-tip catheter. *Circulation* 57/58 (suppl 2): II-80, 1978.
8. Casterella P. J., Teirstein P. S. Prevention of coronary restenosis. *Cardiol Rev* 7(4):219-231, 1999.
9. Schwartz S. M., Reidy M. A., O'Brien E. R. M. Assessment of Factors Important in Atherosclerotic Occlusion and Restenosis. *Thromb. Haemost.* 74: 541-551, 1995.
10. Zimmerman G. A., McIntyre T. M., Prescott S. M. Adhesion and Signaling in Vascular Cell-Cell Interactions. *J. Clin. Invest.* 100: S3-S5, 1997.
11. Ruggeri Z. M. Mechanisms Initiating Platelet Thrombus Formation. *Thromb. Haemost.* 78: 611-616, 1997.
12. Hsu-Lin S., 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. *J. Biol. Chem.* 259: 9121-9126, 1984.

13. Lozano M., Escolar G., White J. G., Tàssies D., Ordinas A., Díaz-Ricard M. Redistribution of membrane glycoproteins in platelets activated under flow conditions. *Blood Coagul. Fibrinol.* 7: 214-217, 1996.
14. Kuijper P. H. M., Gallardo Torres H. I., 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
15. Jung U., Bullard D. C., Tedder T. F., Ley K. Velocity differences between L- and P-selectin-dependent neutrophil rolling in venules of mouse cremaster muscle in vivo. *Am. J. Physiol.* 271: H2740-H2747, 1996.
16. Ley K., Bullard D., Arbones M. L., Bosse R., Vestweber D., Tedder T. F., Beaudet A. L. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J. Exp. Med.* 181: 669-675, 1995.
17. Davenpeck K. L., Steeber D. A., Tedder T. F., Bochner B. S. P- and L-Selectin Mediate Distinct but Overlapping Functions in Endotoxin-Induced Leukocyte-Endothelial Interactions in the Rat Mesenteric Microcirculation. *J. Immunol.* 159: 1977-1986, 1997.
18. Sheikh S., Nash G. B. Continuous Activation and Deactivation of Integrin CD11b/CD18 During De Novo Expression Enables Rolling Neutrophils to Immobilize on Platelets. *Blood* 87: 5040-5050, 1996.
19. Lo S. K., Golenbock D. T., Sass P. M., Maskati A., Xu H., Silverstein R. L. Engagement of the Lewis X Antigen (CD15) Results in Monocyte Activation. *Blood* 89: 307-314, 1997.
20. Crockett-Torabi E., Sulenbarger B., Smith C. W., Fantone J. C. Activation of Human Neutrophils Through L-Selectin and Mac-1 Molecules. *J. Immunol.* 154: 2291-2302, 1995.
21. Nash G. B. Adhesion Between Neutrophils and Platelets: A Modulator of Thrombotic and Inflammatory Events? *Thromb. Res.* 74: S3-S11, 1994.
22. Bazzoni G., Dejana E., Del Maschio A. Platelet-Neutrophil Interactions: Possible Relevance in the Pathogenesis of Thrombosis and Inflammation. *Haematol.* 76: 491-499, 1991.

23. Gillis S., Furie B. C., Furie B. Interactions of neutrophils and coagulation proteins. *Semin Hematol* 34(4): 336-342, 1997.
24. 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. *Am. Heart J.* 129: 445-451, 1995.
25. Merhi Y., Lacoste L. L., Lam J. Y. T. Neutrophil Implications in Platelet Deposition and Vasoconstriction After Deep Arterial Injury by Angioplasty in Pigs. *Circulation* 90: 997-1002, 1994.
26. 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. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1185-1191, 1997.
27. Quyyumi A. A. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am. J. Med.* 105: 32S-39S, 1998.
28. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809, 1993.
29. Provost P., Merhi Y. Endothelium-derived Nitric Oxide Decreases Polymorphonuclear Leukocyte Interaction with the Deeply Injured Arterial Wall under Intermediate and High Shear Conditions. *Thromb. Haemost.* 78: 939-946, 1997.
30. Provost P., Merhi Y. Endogenous Nitric Oxide Release Modulates Mural Platelet Thrombosis and Neutrophil-Endothelium Interactions under Low and High Shear Conditions. *Thromb. Res.* 85: 315-326, 1997.
31. Maruyama I. Biology of endothelium. *Lupus* 7 Suppl 2: S41-S43, 1998.
32. Rodeberg D. A., Chaet M. S., Bass R. C., Arkovitz M. S., Garcia V. F. Nitric oxide: an overview. *Am J Surg* 170(3): 292-303, 1995.
33. Meager A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 10(1): 27-39, 1999.
34. Imhof B. A., Dunon D. Basic mechanism of leukocyte migration. *Horm. Metab. Res.* 29: 614-621, 1997.
35. Ruschitzka F. T., Noll G., Luscher T. F. The endothelium in coronary artery disease. *Cardiology* 88 Suppl 3: 3-19, 1997.

36. Andrews R. K., López J. A., Berndt M. C. Molecular Mechanisms of Platelet Adhesion and Activation. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29: 91-105, 1997.
37. Davis M. J., Hill M. A. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev* 79(2): 387-423, 1999.
38. Lehoux S., Tedgui A. Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall. *Hypertension* 32: 338-345, 1998.
39. Seidel C. L. Cellular Heterogeneity of the Vascular Tunica Media – Implications for Vessel Wall Repair. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1868-1871, 1997.
40. Williams J. K., Heistad D. D. The vasa vasorum of the arteries. *J Mal Vasc* 21 Suppl C: 266-269, 1996.
41. Ross R., Glomset J. A. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 180(93):1332-1339, 1973.
42. Hansson G. K., Bondjers G. Endothelial proliferation and atherogenesis in rabbits with moderate hypercholesterolemia. *Artery* 7: 316-329, 1987.
43. Fagiotto A, Ross R. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 4: 341-356, 1984.
44. Sieffert G. F., Keown K., Moore S. W. Pathologic effect of tobacco smoke inhalation on arterial intima. *Surg Forum* 32: 333-335, 1981.
45. Østerud B. A Global View on the Role of Monocytes and Platelets in Atherogenesis. *Thromb Res.* 85: 1-22, 1997.
46. Shats E. A., Nair C. H., Dhall D. P. Interaction of endothelial cells and fibroblasts with modified fibrin networks: role in atherogenesis. *Atherosclerosis* 129: 9-15, 1997.
47. Torzewski J., Bowyer D. E., Waltenberger J., Fitzsimmons C. Processes in atherogenesis: complement activation. *Atherosclerosis* 132: 131-138, 1997.
48. Taubman M. B., Fallon J. T., Schechter A. D., Giesen P., Mendlowitz M., Fyfe B. S., Marmur J. D., Nemerson Y. Tissue Factor in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* 78: 200-204, 1997.
49. Jang Y., Lincoff A. M., Plow E. F., Topol E. J. Cell Adhesion Molecules in Coronary Artery Disease. *JACC* 24: 1591-1601, 1994.

50. Geng Y-J. Regulation of programmed cell death or apoptosis in atherosclerosis. *Heart Vessels* 12: 76-80, 1997.
51. Rudic R. D., Shesely E. G., Maeda N., Smithies O., Segal S. S., Sessa W. C. Direct Evidence for the Importance of Endothelium-derived Nitric Oxide in Vascular Remodeling. *J. Clin. Invest.* 101: 731-736, 1998.
52. Wever R. M. F., Lüscher T. F., Cosentino F., Rabelink T. J. Atherosclerosis and the Two Faces of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation* 97: 108-112, 1998.
53. Petrie B. L., Adam E., Melnick J.L. Association of herpesvirus/cytomegalovirus infections with human atherosclerosis. *Prog Med Biol* 35: 21-42, 1988.
54. Velican C., Velican D. The precursors of coronary atherosclerotic plaques in subjects up to 40 years old. *Atherosclerosis* 37: 33-46, 1980.
55. Lecerf J. M., Luc G., Fruchart J. C. Vitamin E, antioxidants and atherosclerosis. *Rev Med Interne* 15(10): 641-649, 1994.
56. Creager M. A., Selwyn A. When 'Normal' Cholesterol Levels Injure the Endothelium. *Circulation* 96: 3255-3257, 1997.
57. Vora D. K., Fang Z-T., Liva S. M., Tyner T. R., Parhami F., Watson A. D., Drake T. A., Territo M. C., Berliner J. A. Induction of P-Selectin by Oxidized Lipoproteins - Separate Effects on Synthesis and Surface Expression. *Circ. Res.* 80: 810-818, 1997.
58. Fagiotto A., Ross R., Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation.. *Arteriosclerosis* 4: 323-340, 1984.
59. Quinn M. T., Parthasaraty S., Fong L. G., Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2995-2998, 1987.
60. Stary H. C., Chandler A. B., Dinsmore R. E., Fuster V., Glagov S., Insull W. Jr., Rosenfeld M. E., Schwartz C. J., Wagner W. D., Wissler R. W. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council



- on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92(5):1355-1374, 1995.
61. Nageh M. F., Sandberg E. T., Marotti K. R., Lin A. H., Melchior E. P., Bullard D. C., Beaudet A. L. Deficiency of Inflammatory Cell Adhesion Molecules Protects Against Atherosclerosis in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1517-1520, 1997.
  62. Raines E. W., Ross R. Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy? *Bioessays* 18(4): 271-82, 1996.
  63. Tomazic B. B., Brown W. E., Queral L. A., Sadovnik M. Physiochemical Characterization of cardiovascular calcified deposits. I. Isolation, purification, and instrumental analysis. *Atherosclerosis* 69: 5-19, 1988.
  64. Falk E. Plaque rupture with severe pre-existing stenosis and precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi. *Br. Heart J.* 50: 127-134, 1983.
  65. Ridolfi R., Hutchins G. M. The relationship between coronary artery lesions and myocardial infarcts: ulcerations of atherosclerotic plaques precipitating coronary thrombosis. *Am Heart J.* 93: 468-486, 1977.
  66. Hellstrom H. R. Evidence in favor of the vasospastic cause of coronary artery thrombosis. *Am Heart J.* 97: 449-452, 1979.
  67. Davies M. J., Woolf N., Robertson W. B. Pathology of acute myocardial infarction with particular reference to occlusive coronary thrombi. *Br. Heart J.* 38: 659-669, 1976.
  68. Buja L. M., Willerson J. T. The role of coronary artery lesions in ischemic heart disease: insights from recent clinicopathologic coronary arteriographic, and experimental studies. *Hum Pathol* 18: 451-460, 1987.
  69. Zamir M., Silver M. D. Vasculature in the walls of human coronary arteries. *Arch Pathol Lab Med* 109: 659-662, 1985.
  70. Isner J. M., Donaldson R. F., Fortin A. G., Tischler A., Clarke R. H. Attenuation of the media of coronary arteries in advanced atherosclerosis. *Am J. Cardiol.* 58: 937-939, 1986.

71. Cotran R. S. Blood vessels. Dans: Cotran R. S., Kumar V., Robbins S. L., eds. Robbins pathologic basis of disease. 4ième ed. Philadelphia: WB Saunders. 553-595, 1989.
72. Felton C. V., Crook D., Davies M. J., Oliver M. F. Relation of Plaque Lipid Composition and Morphology to the Stability of Human Aortic Plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1337-1345, 1997.
73. Lee R. T., Libby P. The Unstable Atheroma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1859-1867, 1997.
74. Slack S. M., Turitto V. T. Fluid Dynamic and Hemorheologic Considerations. *Cardiovasc. Pathol.* 2: 11S-21S, 1993.
75. Kienast J., Padró T., Steins M., Li C-X., Schmid K. W., Hammel D., Scheld H. H., van de Loo J. C. W. Relation of Urokinase-Type Plasminogen Activator Expression to Presence and Severity of Atherosclerotic Lesions in Human Coronary Arteries. *Thromb. Haemost.* 79: 579-586, 1998.
76. Frijns C. J. M., Kappelle L. J., van Gijn J., Nieuwenhuis H. K., Sixma J. J., Fijnheer R. Soluble Adhesion Molecules Reflect Endothelial Cell Activation in Ischemic Stroke and in Carotid Atherosclerosis. *Stroke* 28: 2214-2218, 1997.
77. 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. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 : 2044-2053, 1997.
78. Ferrari R. Metabolic Disturbances During Myocardial Ischemia and Reperfusion. *Am. J. Cardiol.* 76: 17B-24B, 1995.
79. Fuster V., Falk E., Fallon J. T., Badimon L., Chesebro J. H., Badimon J. J. The Three Processes Leading to Post PTCA Restenosis: Dependence on the Lesion Substrate. *Thromb. Haemost.* 74: 552-559, 1995.
80. Dotter C. T., Judkins M. P. Transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction. *Circulation* 30: 654, 1964.
81. Dotter C. T., Judkins M. P. Percutaneous transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction. *Radiology* 84: 631, 1965.

82. Dotter C. T. Transluminal angioplasty: pathologic basis. Dans: Zeitler E., Gruntzig A., Schoop W. eds. Percutaneous vascular recanalization. Berlin: Springer-Verlag 3, 1978.
83. Van Andel G. J., Percutaneous transluminal angioplasty: the Dotter procedure. *Excerpta Medica*. Amsterdam, 1976.
84. Castañeda-Zúñiga W. R., Formanek A., Tadavarthy M., et al. The mechanism of balloon angioplasty. *Radiology* 135: 565-571, 1980.
85. Castañeda-Zúñiga W. R., Amplatz K., Laerum F., et al. Mechanics of angioplasty: an experimental approach. *Radiographics* 1:1, 1981.
86. Laerum F., Vloday Z., Castañeda-Zúñiga W. R., Edwards J. E., Amplatz K. The mechanism of angioplasty: dilatation of iliac cadaver arteries with intravascular pressure control. *RöFo* 136-573, 1982.
87. Castañeda-Zúñiga W. R., Tadavarthy S. M., Laerum F., Amplatz K. "Pseudo" intramural injection following percutaneous transluminal angioplasty. *Cardiovasc Intervent Radiol* 7(2): 104-108, 1984.
88. Zollikofer C. L., Castañeda-Zúñiga W. R., Amplatz K. Results of animal experiments with balloon dilatation. Dans: Dotter C. T., Gruntzig A., Schoop W., Zeitler E., eds. Percutaneous transluminal angioplasty. Berlin: Springer-Verlag. 60, 1983.
89. Zollikofer C. L., Salomonowitz E., Sibley R., et al. Transluminal angioplasty evaluated by electron microscopy. *Radiology* 153(2): 369-374, 1984.
90. Zollikofer C. L., Chain J., Salomonowitz E., et al. Percutaneous transluminal angioplasty of the aorta. Light and electron microscopic observations in normal and atherosclerotic rabbits. *Radiology* 151(2): 355-363, 1984.
91. Block P. C., Baughman K. L., Pasternak R. C., Fallon J.T. Transluminal angioplasty: correlation of morphologic and angiographic findings in an experimental model. *Circulation* 61(4): 778-785, 1980.
92. Faxon D. P., Weber V. J., Haudenschild C., Gottsman S. B., McGovern W. Z., Ryan T. J. Acute effects of transluminal angioplasty in three experimental models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 2(2): 125-133, 1982.

93. Saffitz J. E., Totty W. G., McClennan B. L., Gilula L. A. Percutaneous transluminal angioplasty: radiological-pathologic correlation. *Radiology* 141(3): 651-654, 1981.
94. 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.* 13: 951-957, 1993.
95. Inoue T., Sakai Y., Fujito T., Hoshi K., Hayashi T., Takayanagi K., Morooka S. Clinical Significance of Neutrophil Adhesion Molecules Expression after Coronary Angioplasty on the Development of Restenosis. *Thromb. Haemost.* 79: 54-58, 1998.
96. Cahill M. R., Macey M. G., Dawson J. R., Newland A. C. Platelet surface activation antigen expression at baseline and during elective angioplasty in patients with mild to moderate coronary artery disease. *Blood Coagul. Fibrinol.* 7: 165-168, 1996.
97. Cerek B., Yamashita M., Dimayuga P., Zhu J., Fishbein M. C., Kaul S., Shah P. K., Nilsson J., Regnstrom J. Nuclear factor- $\kappa$ B activity and arterial response to balloon injury. *Atherosclerosis* 131: 59-66, 1997.
98. Panek R. L., Dahrting T. K., Olszewski B. J., Keiser J. A. PDGF Receptor Protein Tyrosine Kinase Expression in the Ballon-Injured Rat Carotid Artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1283-1288, 1997.
99. Serrano C. V., Ramires J. A. F., Venturinelli 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 - Evidence of Inflammatory Responses in Coronary Angioplasty. *JACC* 29: 1276-1283, 1997.
100. Neumann F.-J., Ott I., Gawaz M., Puchner G., Schömig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *JACC* 27: 819-824, 1996.
101. Frojmovic M. M., Kasirer-Freide A., Goldsmith H. L., Brown E. A. Surface-Secreted von Willebrand Factor Mediates Aggregation of ADP-Activated Platelets

- at Moderate Shear Stress: Facilitated by GPIb but controlled by GPIIb/IIIa. *Thromb. Haemost.* 77: 568-576, 1977.
102. Chung J., Gao A-G., Frazier W. A. Thrombospondin Acts via Integrin-associated Protein to Activate the Platelet Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . *J. Biol. Chem.* 272: 14740-14746, 1997.
  103. Tcheng J. E., Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Integrin Blockade: Recent Clinical Trials in Interventional Cardiology. *Thromb. Haemost.* 78: 205-209, 1997.
  104. Badimon J. J., Meyer B., Feigen L. P., Baron D. A., Chesebro J. H., Fuster V., Badimon L. Thrombosis triggered by severe arterial lesions is inhibited by oral administration of a glycoprotein IIb/IIIa antagonist. *Eur. J. Clin. Invest.* 27: 568-574, 1997.
  105. Hantgan R. R., Jerome W. G., Handt S. Platelets and Endothelial Cells Act in Concert to Delay Thrombolysis-Evidence from an in vitro model of the Human Occlusive Thrombus. *Thromb. Haemost.* 79: 602-608, 1998.
  106. Kirchhofer D., Tschopp T. B., Steiner B., Baumgartner H. R. Role of Collagen-Adherent Platelets in Mediating Fibrin Formation in Flowing Whole Blood. *Blood* 86: 3815-3822, 1995.
  107. Hagberg I. A., Roald H. E., Lyberg T. Platelet Activation in Flowing Blood Passing Growing Arterial Thrombi. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1331-1336, 1997.
  108. Holme P. A., Ørvm U., Hamers M. J. A. G., Solum N. O., Brosstad F. R., Barstad R. M., Sakariassen K. S. Shear-Induced Platelet Activation and Platelet Microparticle Formation at Blood Flow Conditions as in Arteries With a Severe Stenosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 646-653, 1997.
  109. Yeo E. L., Sheppard J.A., 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* 83: 2498-2507, 1994.
  110. Tsang Y. T. M., Neelamegham S., Hu Y., Gerg E. L., Burns A. R., Smith C. W., Simon S. I. Synergy Between L-Selectin Signaling and Chemotactic Activation

- During Neutrophil Adhesion and Transmigration. *J. Immunol.* 159: 4566-4577, 1997.
111. Weber C., Springer T. A. Neutrophil Accumulation on Activated, Surface-adherent Platelets in Flow is Mediated by Interaction of Mac-1 with Fibrinogen Bound to  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and Stimulated by Platelet-activating Factor. *J. Clin. Invest.* 100: 2085-2093, 1997.
  112. 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. *J. Leukoc. Biol.* 61: 489-499, 1997.
  113. Dore 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 neutrophils. *Blood* 87: 2029-2037, 1996.
  114. Wroblewski M., Hamann A. CD45-mediated signals can trigger shedding of lymphocyte L-selectin. *Int. Immunol.* 9: 555-562, 1997.
  115. Si-Tahar M., Pidard D., Balloy V., Moniatte M., Kieffer N., Van Dorsselaer A., Chignard M. Human Neutrophil Elastase Proteolytically Activates the Platelet Integrin  $\alpha$ <sub>IIb</sub> $\beta$ <sub>3</sub> through Cleavage of the Carboxy Terminus of the  $\alpha$ <sub>IIb</sub> Subunit Heavy Chain. *J. Biol. Chem.* 272: 11636-11647, 1997.
  116. Sato H., Zhao Z-Q., Vinten-Johansen J. L-Arginine inhibits neutrophil adherence and coronary artery dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 31: 63-72, 1996.
  117. 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.* 17: 1806-1812, 1997.
  118. Rochon Y. P., Simon S. I., Lynam E. B., Sklar L. A. A Role for Lectin Interactions During Human Neutrophil Aggregation. *J. Immunol.* 152: 1385-1393, 1994.
  119. Walcheck B., Moore K. L., McEver R. P., Kishimoto T. K. Neutrophil-Neutrophil Interactions under Hydrodynamic Shear Stress Involve L-Selectin and PSGL-1. *J. Clin. Invest.* 98: 1081-1087, 1996.

120. 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* 28: 345-353, 1996.
121. Siminiak T., Flores N. A., Sheridan D. J. Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury. *Eur. Heart. J.* 16: 160-170, 1995.
122. 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* 31: 352-358, 1998.
123. Ruf A., Schlenk R. F., Maras A., Morgenstern E., Patscheke H. Contact-Induced Neutrophil Activation by Platelets in Human Cell Suspensions and Whole Blood. *Blood* 80: 1238-1246, 1992.
124. Spangenberg P. Adhesion of Activated Platelets to Polymorphonuclear Leukocytes. *Thromb. Res.* 74: S35-S44, 1994.
125. 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. *Blood* 67: 629-636, 1986.
126. Furie B., Furie B. C. Leukocyte Crosstalk at the Vascular Wall. *Thromb. Haemost.* 78: 603-309, 1997.
127. Ueyama T., Ikeda H., Haramaki N., Kuwano K., Imaizumi T. Effects of Monoclonal Antibody to P-Selectin and Analogue of Sialyl Lewis X on Cyclic Flow Variations in Stenosed and Endothelium-Injured Canine Coronary Arteries. *Circulation* 95: 1554-1559, 1997.
128. Brown K. K., Henson P. M., Maclouf J., Moyle M., Ely J. A., Worthen G. S. Neutrophil-Platelet Adhesion: Relative Roles of Platelet P-Selectin and Neutrophil  $\beta_2$  (CD18) Integrins. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18: 100-110, 1998.
129. Silverstein R. L., Nachman R. L. Thrombospondin Binds to Monocytes-Macrophages and Mediates Platelet-Monocyte Adhesion. *J. Clin. Invest.* 79: 867-874, 1987.

130. Diavoco T. G., deFougerolles A. R., Bainton D. F., Springer T. A. A Functional Integrin Ligand on the Surface of Platelets: Intercellular Adhesion Molecule-2. *J. Clin. Invest.* 94: 1243-1251, 1994.
131. Lösche W., Dressel M., Krause S., Redlich H., Spangenberg P., Heptinstall S. Contact-induced modulation of neutrophil elastase secretion and phagocytic activity by platelets. *Blood Coag. Fibrinol.* 7: 210-213, 1996.
132. 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.* 123: 251-258, 1998.
133. Provost P., Merhi Y. BW755C, a Dual Lipoxygenase/Cyclooxygenase Inhibitor, Reduces Mural Platelet and Neutrophil Deposition and Vasoconstriction After Angioplasty Injury in Pigs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 17-211, 1996.
134. Elstad M. R., McIntyre T. M., Prescott S. M., Zimmerman G. A. The interaction of leukocytes with platelets in blood coagulation. *Curr Opin Hematol* 2(1): 47-54, 1995.
135. Prandoni P., Lensing A. W. A., Prins M. R. The Natural History of Deep-Vein Thrombosis. *Semin. Thromb. Haemost.* 23: 185-188, 1997.
136. Leadley R. J., Kasiewski C. J., Bostwick J. S., Bentley R., McVey M. J., White F. J., Perrone M. H., Dunwiddle C. T. Comparison of Enoxaparin, Hirulog, and Heparin as Adjunctive Antithrombotic Therapy during Thrombolysis with rtPA in the Stenosed Canine Coronary Artery. *Thromb. Haemost.* 78: 1278-1285, 1997.
137. Pini M. Prevention of Recurrences after Deep Venous Thrombosis: Role of Low-Molecular-Weight Heparins. *Semin. Thromb. Haemost.* 23: 51-54, 1997.
138. Kumar A., Hoover J. L., Simmons C. A., Lindner V., Shebuski R. J. Remodeling and Néointimal Formation in the Carotid Artery of Normal and P-Selectin-Deficient Mice. *Circulation* 96: 4333-4342, 1997.
139. Akers D. L., Lefer D. J., Chen I. L., Wilkens R. G., Rice J., Aurora H., Osgood T. A., Bedi B., Tenaglia A. N., Buda A. J., Kadowitz P. J., McNamara D. B. Effects of short term treatment with a monoclonal antibody to P-selectin on balloon catheter-induced: Intimal hyperplasia, re-endothelialization, and attenuation of endothelial-dependant relaxation. *Mol. Cell. Biochem.* 176: 13-20, 1997.



140. Barron M. K., Lake R. S., Buda A. J., Tenaglia A. N. Intimal Hyperplasia After Balloon Injury Is Attenuated by Blocking Selectins. *Circulation* 96: 3587-3592, 1997.
141. Harrison D. G. Endothelial Modulation of Vascular Tone: Relevance to Coronary Angioplasty and Restenosis. *JACC* 17: 71B-76B, 1991.
142. Bosmans J. M., Kockx M. M., Vrints C. J., Bult H., De Meyer G. R. Y., Herman A. G. Fibrin(ogen) and von Willebrand Factor Deposition Are Associated With Intimal Thickening After Balloon Angioplasty of the Rabbit Carotid Artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 634-645, 1997.
143. Preissner K. T., May A. E., Wohn K. D., Germer M., Kanse S. M. Molecular Crosstalk Between Adhesion Receptors and Proteolytic Cascades in Vascular Remodeling. *Thromb. Haemost.* 78: 88-95, 1997.
144. Capron L., Jarnet J., Heudes D., Joseph-Monrose D., Bruneval P. Repeated Balloon Injury of Rat Aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1649-1656, 1997.
145. Viel K., Cui J., Thomas C. N., Nunes G. C., King III S. B., Cipolla G. D., Scott N. A. Inhibition of Platelet Deposition with Local Delivery of Heparin using a Double Balloon Catheter. *Thromb. Res.* 88: 147-157, 1997.
146. Bettmann M. A., Katzen B. T., Whisnant J., Brant-Zawadzki M., Broderick J. P., Furlan A. J., Hershey L. A., Howard V., Kuntz R., Loftus C. M., Pearce W., Roberts A., Roubin G. Carotid stenting and angioplasty: a statement for healthcare professionals from the Councils on Cardiovascular Radiology, Stroke, Cardio-Thoracic and Vascular Surgery, Epidemiology, and Prevention, and Clinical Cardiology, American Heart Association. *Circulation* 97: 121-123, 1998.
147. Topol E. J., Califf R. M., Weisman H. F., Ellis S. G., Tcheng J. E., Worley S., Ivanhoe R., George B. S., Fintel D., Weston M., et al. Randomised trial of coronary intervention with antibody against platelet IIb/IIIa integrin for reduction of clinical restenosis: results at six months. The EPIC Investigators. *Lancet* 343: 881-886, 1994.
148. Topol E. J. Prevention of cardiovascular ischemic complications with new platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Am. Heart J.* 130: 666-672, 1995.

149. Ferns G. A., Raines E. W., Sprugel K. H., Motani A. S., Reidy M. A., Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* 253: 1129-1132, 1991.
150. Maresta A., Balducelli M., Cantini L., Casari A., Chioin R., Fabbri M., Fontanelli A., Monici Preti P. A., Repetto S., De Servi S., et al. Trapidil (triazolopyrimidine), a platelet-derived growth factor antagonist, reduces restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation* 90: 2710-2715, 1994.
151. Bach R., Jung F., Kohsiek I., Özbek C., Spitzer S., Scheller B., Dyckmans J., Schieffer H. Factors Affecting the Restenosis Rate After Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty. *Thromb. Res.* 74: S55-S67, 1994.
152. Carlos T. M., Harlan J. M. Leukocyte-Endothelial Adhesion Molecules. *Blood* 84: 2068-2101, 1994.
153. Bevilacqua M. P., Nelson R. M. Selectins. *J. Clin. Invest.* 91: 379-387, 1993.
154. Kansas G. S. Selectins and Their Ligands: Current Concepts and Controversies. *Blood* 88: 3259-3287, 1996.
155. Crockett-Torabi E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *J. Leukoc. Biol.* 63: 1-14, 1998.
156. Bowen B. R., Fennie C., Lasky L. A. The Mel-14 antibody binds to the lectin domain of the murine peripheral lymph node homing receptor. *J. Cell Biol.* 110: 147-153, 1990.
157. Erbe D. V., Wolitzky B. A., Presta L. G., Norton C. R., Ramos R. J., Burns D. K., Rumberger J. M., Rao B. N., Foxall C., Brandley B. K., Lasky L. A. Identification of an E-selectin region critical for carbohydrate recognition and cell adhesion. *J. Cell Biol.* 119: 215-227, 1992.
158. Erbe D. V., Watson S. R., Presta L. G., Wolitzky B. A., Foxall C., Brandley B. K., Lasky L. A. P- and E-selectin use common sites for carbohydrate ligand recognition and cell adhesion. *J. Cell Biol.* 120: 1227-1235, 1993.
159. Waltz G., Aruffo A., Kolanus W., Bevilacqua M., Seed B. Recognition by ELAM-1 of the Sialyl-Le<sup>x</sup> determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 250: 1132-1135, 1990.

160. Kansas G. S., Saunders K. B., Ley K., Zakrzewicz A., Gibson R. M., Furie B. C., Furie B., Tedder T. F. A role for the epidermal growth factor-like domain of P-selectin in ligand recognition and cell adhesion. *J. Cell Biol.* 124: 609-618, 1994.
161. Stoolman L. M., Rosen S. D. Possible role of cell-surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation. *J. Cell Biol.* 96: 722-729, 1983.
162. Stoolman L. M., Yednock T. A., Rosen S. D. Homing receptors on human and rodent lymphocytes – evidence for a conserved carbohydrate-binding specificity. *Blood* 70: 1842-1850, 1987.
163. 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. *J. Cell Biol.* 104: 725-731, 1987.
164. Polley M. J., Phillips M. L., Wayner E., Nudelman E., Singhal A. K., Hakomori S-I., Paulson J. C. CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis X. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 6224-6228, 1991.
165. Goelz S., Kumar R., Potvin B., Sundaram S., Brickerlmaier M., Stanley P. Differential expression of an E-selectin ligand (SLe<sup>x</sup>) by two Chinese hamster ovary cell lines transfected with the same alpha (1,3)-fucosyltransferase gene (ELFT). *J. Biol. Chem.* 269: 1033-1040, 1994.
166. Kumar R., Potvin B., Muller W. A., Stanley P. Cloning of a human alpha (1,3)-fucosyltransferase gene that encodes ELFT but does not confer ELAM-1 recognition on Chinese hamster ovary cell transfectants. *J. Biol. Chem.* 266: 21777-21783, 1991.
167. Natsuka S., Gersten K. M., Zenita K., Kannagi R., Lowe J. B. Molecular cloning of a cDNA encoding a novel human leukocyte alpha 1,3-fucosyltransferase capable of synthesizing the sialyl Lewis X determinant. *J. Biol. Chem.* 269: 16789-16794, 1994.
168. Jung T. M., Daily M. O. Rapid modulation of homing receptors (gp90<sup>Mel-14</sup>) induced by activators of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *J. Immunol.* 144 : 3130-3136, 1990.

169. Schleiffenbaum B. E., Spertini O., Tedder T. F. Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J. Cell Biol.* 119: 229-238, 1992.
170. Kundel E. J., Jung U., Ley K. Slow leukocyte rolling in TNF- $\alpha$ -treated mouse cremaster muscle venules is mediated by E-selectin. *FASEB J.* 10: A1280, 1996.
171. Mihelcic D., Schleiffenbaum B., Tedder T. F., Sharar S. R., Harlan J. M., Winn R. K. Inhibition of leukocyte L-selectin function with a monoclonal antibody attenuates reperfusion injury to the rabbit ear. *Blood* 84: 2322-2328, 1994.
172. Simon S. I., Rochon Y. P., Lynam E. B., Smith C. W., Anderson D. C., Sklar L. A.  $\beta$ 2 integrin and L-selectin are obligatory receptors in neutrophil aggregation. *Blood* 82: 1097-1106, 1993.
173. Spertini O., Kansas G. S., Reimann K. A., Mackay C. R., Tedder T. F. Functional and evolutionary conservation of distinct epitopes on the leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1) that regulate leukocyte migration. *J. Immunol.* 147: 942-949, 1991.
174. Erlandsen S. L., Hasslen S. R., Nelson R. D. Detection and spatial distribution of the  $\beta$ 2 integrin (Mac-1) and L-selectin (LECAM-1) adherence receptors on human neutrophils by high resolution field emission SEM. *J. Histochem. Cytochem.* 41: 327-333, 1993.
175. Hasslen S. R., von Andrian U. H., Butcher E. C., Nelson R. D., Erlandsen S. L. Spatial distribution of L-selectin (CD62L) on human lymphocytes and transfected murine L1-2 cells. *Histochem. J.* 27: 547-554, 1995.
176. von Andrian U. H., Hasslen S. R., Nelson R. D., Erlandsen S. L., Butcher E. C. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* 82 : 989-999, 1995.
177. Moore K. L., Patel K. D., Breuhl R. E., Fugang L., Johnson D. L., 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.* 128: 661-671, 1995.
178. Smith P. L., Gersten K. M., Petryniak B., Kelly R. J., Rogers C., Natsuka N., Alford III J. A., Scheidegger E. P., Natsuka S., Lowe J. B. Expression of the  $\alpha$ 1,3-

- fucosyltransferase Fuc-TVII in lymphoid aggregate high endothelial venules correlates with expression of L-selectin ligands. *J. Biol. Chem.* 271: 8250-8259, 1996.
179. Maly P., Thall A., Petryniak B., Rogers C. E., Smith P. L., Marks R. M., Kelly R. J., Gersten K. M., Cheng G., Saunders T. L., Camper S. A., Camphausen R. T., Sullivan F. X., Isogai Y., Hindsgaul O., von Andrian U. H., Lowe J. B. The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* 86: 643-653, 1996.
  180. Fuhlbrigge R. C., Alon R., Puri K. D., Lowe J. B., Springer T. A. Sialylated, Fucosylated Ligands for L-Selectin Expressed on Leukocytes Mediate Tethering and Rolling Adhesions in Physiologic Flow Conditions. *J. Cell. Biol.* 135: 837-848, 1996.
  181. 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. *J. Cell Biol.* 131: 261-270, 1995.
  182. 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 sulfate motif of human PSGL-1 and blocks recognition of both P- and L-selectin. *Blood* 91: 154-164, 1998.
  183. 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. *Blood* 91: 1067-1075, 1998.
  184. Laudanna C., Constantin G., Baron P., Scarpini E., Scarlato G., Cabrini G., Dehecchi C., Rossi F., Cassatella M. A., Berton G. Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. *J. Biol. Chem.* 269: 4021-4026, 1994.
  185. Waddell T. K., Fialkow L., Chan C. K., Kishimoto T. K., Downey G. P. Potentiation of the oxidative burst of human neutrophils. A signaling role for L-selectin. *J. Biol. Chem.* 269: 18485-18491, 1994.

186. Po J. L., Mazer B., Jensen G. S. The L-selectin antibody FMC46 mediates rapid, transient increase in intracellular calcium in human peripheral blood mononuclear cells and Daudi lymphoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217: 1145-1150, 1995.
187. Harris H., Miyasaka M. Reversible stimulation of lymphocyte motility by cultured high endothelial cells: mediation by L-selectin. *Immunology* 84: 47-54, 1995.
188. 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 is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest.* 84: 92-99, 1989.
189. Foreman K. E., Vaporciyan A. A., Bonish B. K., Jones M. L., Johnson K. J., Glovsky M. M., Eddy S. M., Ward P. A. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 94: 1147-1155, 1994.
190. Disdier M., Morrissey 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. *Mol. Biol. Cell* 3: 309-321, 1992.
191. 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. *J. Cell. Biol.* 116: 617-625, 1992.
192. Crovello C. S., Furie B. C., Furie B. Rapid phosphorylation and selective dephosphorylation of P-selectin accompanies platelet activation. *J. Biol. Chem.* 268: 14590-14593, 1993.
193. Fujimoto T., McEver R. P. The cytoplasmic domain of P-selectin is phosphorylated on serine and threonine residues. *Blood* 82: 1758-1766, 1993.
194. Sanders W. E., Wilson R. W., Ballantyne C. M., Beaudet A. L. Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood* 80: 795-800, 1992.
195. Gotsch U., Jager U., Dominis M., Vestweber D. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhes. Commun.* 2: 7-14, 1994.

196. Arbones M. L., Ord D. C., Ley K., Ratech H., Maynard-Curry C., Otten G., Capon D. J., Tedder T. F. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* 1: 247-260, 1994.
197. Mayadas T. N., Johnson R. C., Rayburn H., Hynes R. O., Wagner D. D. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 74: 541-554, 1993.
198. Bosse R., Vestweber D. Only simultaneous blocking of the L- and P-selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum. *Eur. J. Immunol.* 24: 3019-3024, 1994.
199. Lorant D. E., Topham M. K., Whatley R. E., McEver R. P., McIntyre T. M., Prescott S. M., Zimmerman G. A. Inflammatory roles of P-selectin. *J. Clin. Invest.* 92: 559-570, 1993.
200. 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* 359: 848-851, 1992.
201. Kubes P., Jutila M., Payne D. Therapeutic Potential of Inhibiting Leukocyte Rolling in Ischemia/Reperfusion. *J. Clin. Invest.* 95: 2510-2519, 1995.
202. 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.* 118: 445-456, 1992.
203. Snapp K. R., Wagers A. J., Craig R., Stoolman L. M., Kansas G. S. P-selectin glycoprotein ligand-1 is essential for adhesion to P-selectin but not E-selectin in stably transfected hematopoietic cell lines. *Blood* 89: 896-901, 1997.
204. Liu W., 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. *J. Biol. Chem.* 273: 7078-7087, 1998.
205. Celi A., Pellegrini G., Lorenzet R., De Blasi A., Ready N., Furie B. C., Furie B. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 8767-8771, 1994.

206. Tsuji T., Nagata K., Koike J., Todoroki N., Irimura T. Induction of superoxide anion production from monocytes and neutrophils by activated platelets through the P-selectin-sialyl Lewis X interaction. *J. Leukoc. Biol.* 56: 583-587, 1994.
207. Elstad M. R., La Pine T. R., Cowley F. S., McEver R. P., McIntyre T. M., Prescott S. M., Zimmerman G. A. P-selectin regulates platelet-activating factor synthesis and phagocytosis by monocytes. *J. Immunol.* 155: 2109-2122, 1995.
208. Weyrich A. S., McIntyre T. M., McEver R. P., Prescott S. M., Zimmerman G. A. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion. Signal integration and NF- $\kappa$ B translocation. *J. Clin. Invest.* 95: 2297-2303, 1995.
209. Weyrich A. S., Elstad M. R., McEver R. P., McIntyre T. M., Moore K. L., Morrissey J. H., Prescott S. M., Zimmerman G. A. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J. Clin. Invest.* 97: 1525-1534, 1996.
210. Borges E., Eytner R., Moll T., Steegmaier M., Campbell M. A., Ley K., Mossmann H., Vestweber D. The P-selectin glycoprotein ligand-1 is important for recruitment of neutrophils into inflamed mouse peritoneum. *Blood* 90: 1934-1942, 1997.
211. McEver R. P., Cummings R. D. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.* 100: S97-S103, 1997.
212. Bevilacqua M. P., Stengelin S., Gimbrone M. A. Jr., Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243: 1160-1165, 1989.
213. Gamble J. R., Khew-Goodall Y., Vadas M. A. Transforming growth factor- $\beta$  inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J. Immunol.* 150: 4494-4503, 1993.
214. von Asmuth E. J., Smeets E. F., Ginsel L. A., Onderwater J. J., Leeuwenberg J. F., Buurman W. A. Evidence for endocytosis of E-selectin in human endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* 22: 2519-2526, 1992.
215. Subramaniam M., Koedam J. A., Wagner D. D. Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* 4: 791-801, 1993.



216. Ghersa P., Hooft van Huijsduijnen R., Whelan J., DeLamarter J. F. Labile proteins play a dual role in the control of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) gene regulation. *J. Biol. Chem.* 267: 19226-19232, 1992.
217. Smeets E. F., de Vries T., Leeuwenberg J. F., van den Eijnden D. H., Buurman W. A., Neeffjes J. J. Phosphorylation of surface E-selectin and the effect of soluble ligand (sialyl Lewisx) on the half-life of E-selectin. *Eur. J. Immunol.* 23: 147-151, 1993.
218. Munro J. M., Pober J. S., Cotran R. S. Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*. *Am. J. Pathol.* 135: 121-133, 1989.
219. Labow M. A., Norton C. R., Rumberger J. M., Lombard-Gillooly K. M., Shuster D. J., Hubbard J., Bertko R., Knaack P. A., Terry R. W., Harbison M. L., Kontgen F., Stewart C. L., McIntyre K. W., Will P. C., Burns D. K., Wolitzky B. A. Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins. *Immunity* 1: 709-720, 1994.
220. Yoshida M., Westlin W. F., Wang N., Ingber D. E., Rosenzweig A., Resnick N., Gimbrone M. A. Jr. Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J. Cell. Biol.* 133: 445-455, 1996.
221. 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. *J. Biol. Chem.* 269: 23318-23327, 1994.
222. 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. *Cell* 66: 921-933, 1991.
223. Levinovitz A., Muhlhoff J., Isenmann S., Vestweber D. Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells. *J. Cell. Biol.* 121: 449-459, 1993.
224. 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. *Nature* 373: 615-620, 1995.

225. 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,  $\alpha_M\beta_2$ ) on human neutrophils. *J. Exp. Med.* 173: 1493-1500, 1991.
226. Cheresh D. A., Mecham R. P. Integrins: Molecular and Biological Responses to the Extracellular Matrix. *Academic Press Inc.*, San Diego, 1994.
227. Hogg N. The leukocyte integrins. *Immunol. Today* 10: 111-114, 1989.
228. Hynes R. O. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25, 1992.
229. Maxfield S. R., Moulder K., Koning F., et al. Murine T-cells express a cell-surface receptor for multiple extracellular matrix proteins – Identification and characterization with monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 169: 2173-2190, 1989.
230. Sanchez-Madrid F., Nagy J. A., Robbins E., Simon P., Springer T. A. A human leukocyte differentiation antigen family with distinct  $\alpha$  subunits and common  $\beta$  subunit. *J. Exp. Med.* 158: 1785-1803, 1983.
231. Albelda S. M., Buck C. A. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 4: 2868-2880, 1990.
232. Dike L. E., and Farmer S. R. Cell adhesion induces expression of growth-associated genes in suspension-arrested fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6792-6796, 1988.
233. Dhawna J., Farmer S. R. Regulation of  $\alpha 1(I)$  collagen gene expression in response to cell adhesion in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 265: 9015-9021, 1990.
234. Phillips D. R., Charo I. F., Scarborough R. M. GPIIb-IIIa: The responsive integrin. *Cell* 65: 359-362, 1991.
235. Parmentier S., Catimel B., McGregor L., Leung L. L., McGregor J. L. Role of glycoprotein IIa (beta 1 subunit of very late activation antigens) in platelet functions. *Blood* 78: 2021-2026, 1991.
236. Hemler M. E., Elices M. J., Parker C., Takada Y. Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol.* 114: 45-65, 1990.

237. Mackay C. R., Marston W. L., Dudler L., Spertini O., Tedder T. F., Hein W. R. Tissue-specific migration pathways by phenotypically distinct subpopulations of memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 22: 887-895, 1992.
238. Picker L. J., Terstappen L. W., Rott L. S., Streeter P. R., Stein H., Butcher E. C. Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man. *J. Immunol.* 145: 3247-3255, 1990.
239. Seth R., Salcedo R., Patarroyo M., Makgoba M. W. ICAM-2 peptides mediate lymphocyte adhesion by binding to CD11a/CD18 and CD49d/CD29 integrins. *FEBS* 282: 193-196, 1991.
240. Briscoe D. M., Cotran R. S., Pober J. S. Effects of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vivo. Correlation with CD3+ T cell infiltration. *J. Immunol.* 149: 2954-2960, 1992.
241. Vonderheide R. H., Springer T. A. Lymphocyte adhesion through very late antigen 4: evidence for a novel binding site in the alternatively spliced domain of vascular cell adhesion molecule 1 and an additional  $\alpha 4$  integrin counter-receptor on stimulated endothelium. *J. Exp. Med.* 175: 1433-1442, 1992.
242. Osborn L., Vassallo C., Benjamin C. D. Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *J. Exp. Med.* 176: 99-107, 1992.
243. Komoriya A., Green L. J., Mervic M., Yamada S. S., Yamada K. M., Humphries M. J. The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J. Biol. Chem.* 266: 15075-15079, 1991.
244. Cybulsky M. I., Gimbrone M. A. Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251: 788-791, 1991.
245. Wadsworth S., Halvorson M. J., Chang A. C., Coligan J. E. Multiple changes in VLA protein glycosylation, expression, and function occur during mouse T cell ontogeny. *J. Immunol.* 150: 847-857, 1993.
246. Elices M. J., Tsai V., Strahl D., Goel A. S., Tollefson V., Arrhenius T., Wayner E. A., Gaeta F. C., Fikes J. D., Firestein G. S. Expression and functional significance

- of alternatively spliced CS1 fibronectin in rheumatoid arthritis microvasculature. *J. Clin. Invest.* 93: 405-416, 1994.
247. Mulligan M. S., Smith C. W., Anderson D. C., Todd R. F. III, Miyasaka M., Tamatani T., Issekutz T. B., Ward P. A. Role of leukocyte adhesion molecules in complement-induced lung injury. *J. Immunol.* 150: 2401-2406, 1993.
248. Mulligan M. S., Wilson G. P., Todd R. F., Smith C. W., Anderson D. C., Varani J., Issekutz T. B., Miyasaka M., Tamatani T., Rusche J. R., Vaporciyan A. A., Ward P. A. Role of beta 1, beta 2 integrins and ICAM-1 in lung injury after deposition of IgG and IgA immune complexes. *J. Immunol.* 150: 2407-2417, 1993.
249. Baron J. L., Madri J. A., Ruddle N. H., Hashim G., Janeway C. A. Jr. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J. Exp. Med.* 177: 57-68, 1993.
250. Olson NH, Kolatkar PR, Oliveira MA, Cheng RH, Greve JM, McClelland A, Baker TS, Rossmann MG Structure of a human rhinovirus complexed with its receptor molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 507-511, 1993.
251. Goedegebuure P. S., Braakman E., Segal D. M., Vreugdenhil R. J., Bolhuis R. L. Lymphocyte leukocyte function-associated antigen 1 interacting with target cell intercellular adhesion molecule 1 co-activates cytolysis triggered via CD16 or the receptor involved in major histocompatibility antigen-unrestricted lysis. *Int. Immunol.* 2: 1213-1220, 1990.
252. Dohlsten M., Hedlund G., Lando P. A., Trowsdale J., Altmann D., Patarroyo M., Fischer H., Kalland T. Role of the adhesion molecule ICAM-1 (CD54) in staphylococcal enterotoxin-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 21: 131-135, 1991.
253. de Fougerolles A. R., Stacker S. A., Schwarting R., Springer T. A. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J. Exp. Med.* 174: 253-267, 1991.
254. Nortamo P., Salcedo R., Timonen T., Patarroyo M., Gahmberg C. G. A monoclonal antibody to the human leukocyte adhesion molecule intercellular adhesion molecule-2. Cellular distribution and molecular characterization of the antigen. *J. Immunol.* 146: 2530-2535, 1991.

255. Nie Q., Fan J., Haraoka S., Shimokama T., Watanabe T. Inhibition of mononuclear cell recruitment in aortic intima by treatment with anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 monoclonal antibodies in hypercholesterolemic rats: implications of the ICAM-1 and LFA-1 pathway in atherogenesis. *Lab. Invest.* 77: 469-482, 1997.
256. Fawcett J., Holness C. L., Needham L. A., Turley H., Gatter K. C., Mason D. Y., Simmons D. L. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* 360: 481-484, 1992.
257. de Fougerolles A. R., Klickstein L. B., Springer T. A. Cloning and expression of intercellular cell adhesion molecule 3 reveals strong homology to other immunoglobulin family counter-receptors for lymphocyte function-associated antigen 1. *J. Exp. Med.* 177: 1187-1192, 1993.
258. Burkly L. C., Jakubowski A., Newman B. M., Rosa M. D., Chi-Rosso G., Lobb R. R. Signaling by vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) through VLA-4 promotes CD3-dependent T cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* 21: 2871-2875, 1991.
259. Kuijpers T. W., Mul E. P., Blom M., Kovach N. L., Gaeta F. C., Tollefson V., Elices M. J., Harlan J. M. Freezing adhesion molecules in a state of high-avidity binding blocks eosinophil migration. *J. Exp. Med.* 178: 279-284, 1993.
260. Shimizu Y., Newman W., Gopal T. V., Horgan K. J., Graber N., Beall L. D., van Seventer G. A., Shaw S. Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J. Cell. Biol.* 113: 1203-1212, 1991.
261. van Kooyk Y., van de Wiel-van Kemenade E., Weder P., Huijbens R. J., Figdor C. G. Lymphocyte function-associated antigen 1 dominates very late antigen 4 in binding of activated T cells to endothelium. *J. Exp. Med.* 177: 185-190, 1993.
262. Arnaout M. A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75: 1037-1050, 1990.
263. Springer T. A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-434, 1990.

264. Diamond M. S., Staunton D. E., de Fougères A. R., Stacker S. A., Garcia-Aguilar J., Hibbs M. L., Springer T. A. ICAM-1 (CD54): A counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell Biol.* 111: 3129-3139, 1990.
265. Vercellotti G. M., Platt J. L., Bach F. H., Dalmaso A. P. Neutrophil adhesion to xenogeneic endothelium via iC3b. *J. Immunol.* 146: 730-734, 1991.
266. Diamond M. S., Staunton D. E., Marlin S. D., Springer T. A. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 65: 961-971, 1991.
267. Altieri D. C., Wiltse W. L., Edgington T. S. Signal transduction initiated by extracellular nucleotides regulates the high affinity ligand recognition of the adhesive receptor CD11b/CD18. *J. Immunol.* 145: 662-670, 1990.
268. Kuijpers T. W., Hakkert B. C., Hoogerwerf M., Leeuwenberg J. F., Roos D. Role of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and platelet-activating factor in neutrophil adherence to IL-1-prestimulated endothelial cells. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-mediated CD18 activation. *J. Immunol.* 147: 1369-1376, 1991.
269. Graham I. L., Lefkowitz J. B., Anderson D. C., Brown E. J. Immune complex-stimulated neutrophil LTB<sub>4</sub> production is dependent on beta 2 integrins. *J. Cell. Biol.* 120: 1509-1517, 1993.
270. Altieri D. C. Occupancy of CD11b/CD18 (Mac-1) divalent ion binding site(s) induces leukocyte adhesion. *J. Immunol.* 147: 1891-1898, 1991.
271. Altieri D. C., Plescia J., Plow E. F. The structural motif glycine 190-valine 202 of the fibrinogen  $\gamma$  chain interacts with CD11b/CD18 ( $\alpha$ M $\beta$ 2, Mac-1) and promotes leukocyte adhesion. *J. Biol. Chem.* 268: 1847-1853, 1993.
272. Stacker S. A., Springer T. A. Leukocyte integrin P150,95 (CD11c/CD18) functions as an adhesion molecule binding to a counter-receptor on stimulated endothelium. *J. Immunol.* 146: 648-655, 1991.
273. Nurden A. T., Nurden P. A review of the role of platelet membrane glycoproteins in the platelet-vessel wall interaction. *Baillière's Clin. Haematol.* 6: 653-690, 1993.

274. Saelman E. U., Nieuwenhuis H. K., Hese K. M., de Groot P. G., Heijnen H. F., Sage E. H., Williams S., McKeown L., Gralnick H. R., Sixma J. J. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa ( $\alpha_2\beta_1$ -integrin). *Blood* 83: 1244-1250, 1994.
275. 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  $\beta_1$  integrin  $\alpha_2\beta_1$ . *Thromb. Res.* 81: 113-119, 1996.
276. Kainoh M., Ikeda Y., Nishio S., Nakadate T. Glycoprotein Ia/IIa-mediated activation-dependent platelet adhesion to collagen. *Thromb. Res.* 65: 165-176, 1992.
277. Santoro S. A., Walsh J. J., Staatz W. D., Baranski K. J. Distinct determinants on collagen support  $\alpha_2\beta_1$  integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation. *Cell Regul.* 2: 905-913, 1991.
278. Piotrowicz R. S., Orzechowski R. P., Nugent D. J., Yamada K. Y., Kunicki T. J. Glycoprotein Ic-IIa functions as an activation-independent fibronectin receptor on human platelets. *J. Cell Biol.* 106: 1359-1364, 1988.
279. Sonnenberg A., Gehlsen K. R., Aumailley M., Timpl R. Isolation of  $\alpha_6\beta_1$  integrins from platelets and adherent cells by affinity chromatography on mouse laminin fragment E8 and human laminin pepsin fragment. *Exp. Cell Res.* 197: 234-244, 1991.
280. Plow E. F., Ginsberg M. H. Cellular adhesion: GPIIb-IIIa as a prototypic adhesion receptor. *Progress in Hemostasis and Thrombosis*, Collier B. S. ed., Saunders Pennsylvania, 117-156, 1989.
281. Pytela R. P., Pierschbacher M. D., Ginsberg M. H., Plow E. F., and Ruoslahti E. Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: Member of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion receptors. *Science* 231: 1559-1562, 1986.
282. Ruoslahti E., Pierschbacher M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238: 491-497, 1987.
283. Bray P. F., Rosa J. P., Lingappa V. R., Kan Y. W., McEver R. P., Shuman M. A. Biogenesis of the platelet receptor for fibrinogen: Evidence for separate precursors for glycoproteins IIb and IIIa. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 83: 1480-1484, 1986.

284. Silver S. N., McDonough M. M., Vilare G., Bennett J. S. The *in vitro* synthesis of polypeptides for the platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa. *Blood* 69: 1031-1037, 1987.
285. Duperray A., Berthier R., Chagnon E., Rycjewaert J.-J., Ginsberg M., Plow W., Marguerie G. Biosynthesis and processing of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes. *J. Cell Biol.* 104: 1665-1673, 1987.
286. Fitzgerald L. A., Steiner B., Rall S. C. Jr., Lo S.-S., Phillips D. R. Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone: Identity with platelet glycoprotein IIIa and similarity to "integrin". *J. Biol. Chem.* 262: 3936-3939, 1987.
287. Calvete J. J., Henschen A., Gonzalez-Rodriguez J. Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa: A disulphide pattern for the beta-subunits of the integrin family. *Biochem. J.* 274: 63-71, 1991.
288. Beer J., Collier B. S. Evidence that platelet glycoprotein IIIa has a large disulfide-bonded loop that is susceptible to proteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.* 264: 17564-17573, 1989.
289. Kunicki T. J., Pidard D., Rosa J. P., Nurden A. T. The formation of Ca<sup>2+</sup>-dependent complexes of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa in solution as determined by crossed immunoelectrophoresis. *Blood* 58: 268-278, 1981.
290. Frelinger A. L. III, Lam S. C.-T., Plow E. F., Smith M. A., Loftus J. C., Ginsberg M. H. Occupancy of an adhesive glycoprotein receptor modulates expression of an antigenic site involved in cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 263: 12397-12402, 1988.
291. Frelinger A. L. III, Cohen I., Plow E. F., Smith M. A., Roberts J., Lam S. C.-T., Ginsberg M. H. Selective inhibition of integrin function by antibodies specific for ligand-occupied receptor conformers. *J. Biol. Chem.* 265: 6346-6352, 1990.
292. Van Willigen G., Akkerman J.-W. N. Regulation of glycoprotein IIB/IIIA exposure on platelets stimulated with  $\alpha$ -thrombin. *Blood* 79: 82-90, 1992.
293. Schwartz M. A., Cragoe E. J. Jr., Lechene C. P. pH regulation in spread cells and round cells. *J. Biol. Chem.* 265: 1327-1332, 1990.



294. Schwartz M. A., Ingber D. E., Lawrence M., Springer T. A., Lechene C. Multiple integrins share the ability to induce elevation of intracellular pH. *Exp. Cell Res.* 195: 533-535, 1991.
295. Schwartz M. A. Spreading of human endothelial cells on fibronectin or vitronectin triggers elevation of intracellular free calcium. *J. Cell Biol.* 120: 1003-1010, 1993.
296. Lipfert L., Haimovich B., Schaller M. D., Cobb B. S., Parsons J. T., Brugge J. S. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J. Cell Biol.* 119: 905-912, 1992.
297. Kieffer N., Fitzgerald L. A., Wolf D., Cheresch D. A., Phillips D. R. Adhesive properties of the  $\beta_3$  integrins: Comparison of GP IIb-IIIa and the vitronectin receptor individually expressed in human melanoma cells. *J. Cell Biol.* 113: 451-461, 1991.
298. Savage B., Shattil S. J., Ruggeri Z. M. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 267: 11300-11306, 1992.
299. Weiss H. J., Hawiger J., Ruggeri Z. M., Turitto V. T., Thiagarajan P., Hoffmann T. Fibrinogen-independent platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium mediated by glycoprotein IIb-IIIa complex at high shear rate. *J. Clin. Invest.* 83: 288-297, 1989.
300. Trapani-Lombardo V., Hodson E., Roberts J. R., Kunicki T. J., Zimmerman T. S., Ruggeri Z. M. Independent modulation of von Willebrand factor and fibrinogen binding to the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex as demonstrated by monoclonal antibody. *J. Clin. Invest.* 76: 1950-1958, 1985.
301. D'Souza S. E., Ginsberg M. H., Burke T. A., Lam S. C., Plow E. F. Localization of an Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor. *Science* 242: 91-93, 1988.
302. Roth G. J. Developing relationships: arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich glycoproteins. *Blood* 77: 5-19, 1991.
303. André P., Hainaud P., Bal dit Sollier C., Garfinkel L. I., Caen J. P., Drouet L. O. Relative involvement of GPIb/IX-vWF axis and GPIIb/IIIa in thrombus growth at

- high shear rates in the guinea pig. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 919-924, 1997.
304. Berndt M. C., Gregory C., Kabral A., Zola H., Fournier D., Castaldi P. A. Purification and preliminary characterization of the glycoprotein Ib complex in the human platelet membrane. *Eur. J. Biochem.* 151: 637-649, 1985.
305. Du X., Beutler L., Ruan C., Castaldi P. A., Berndt M. C. Glycoprotein Ib and glycoprotein IX are fully complexed in the intact platelet membrane. *Blood* 69: 1524-1527, 1987.
306. 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. *Thromb. Haemost.* 78: 445-450, 1997.
307. Ware J. Molecular analyses of the platelet glycoprotein Ib-IX-V receptor. *Thromb. Haemost.* 79: 466-478, 1998.
308. Andrews R. K., Fox J. E. Interaction of purified actin-binding protein with the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *J. Biol. Chem.* 266: 7144-7147, 1991.
309. Vicente V., Houghten R. A., Ruggeri Z. M. Identification of a site in the alpha chain of platelet glycoprotein Ib that participates in von Willebrand factor binding. *J. Biol. Chem.* 265: 274-280, 1990.
310. Murata M., Ware J., Ruggeri Z. M. Site-directed mutagenesis of a soluble recombinant fragment of platelet glycoprotein Ib alpha demonstrating negatively charged residues involved in von Willebrand factor binding. *J. Biol. Chem.* 266: 15474-15480, 1991.
311. Cruz M. A., Petersen E., Turci S. M., Handin R. I. Functional analysis of a recombinant glycoprotein Ib alpha polypeptide which inhibits von Willebrand factor binding to the platelet glycoprotein Ib-IX complex and to collagen. *J. Biol. Chem.* 267: 1303-1309, 1992.
312. Yamamoto N., Greco N. J., Barnard M. R., Tanoue K., Yamazaki H., Jamieson G. A., Michelson A. D. Glycoprotein Ib (GPIb)-dependent and GPIb-independent pathways of thrombin-induced platelet activation. *Blood* 77: 1740-1748, 1991.

313. 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. *J. Clin. Invest.* 88: 1568-1573, 1991.
314. Moake J. L., Turner N. A., Stathopoulos N. A., Nolasco L., Hellums J. D. Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood* 71: 1366-1374, 1988.
315. 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. *Blood* 80: 113-120, 1992.
316. Mulligan M. S., Paulson J. C., De Frees S., Zheng Z. L., Lowe J. B., Ward P. A. Protective effects of oligosaccharides in P-selectin-dependent lung injury. *Nature* 364: 149-151, 1993.
317. Buerke M., Weyrich A. S., Zheng Z., Gaeta F. C. A., Forrest M. J., Lefer A. M. Sialyl Lewis<sup>x</sup>-containing oligosaccharide attenuates myocardial reperfusion injury in cats. *J. Clin. Invest.* 93: 1140-1148, 1994.
318. Flynn D. M., Buda A. J., Jeffords P. R., Lefer D. J. A sialyl Lewis<sup>x</sup>-containing carbohydrate reduces infarct size: role of selectins in myocardial reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 271: H2086-H2096, 1996.
319. Birnbaum Y., Patterson M., Kloner R. A. The effects of CY1503, a sialyl Lewis<sup>x</sup> analog blocker of the selectin adhesion molecules, on infarct size and "no reflow" in the rabbit model of acute myocardial infarction/reperfusion. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29: 2013-2025, 1997.
320. Springer G. F., Wurzel H. A., McNeal G. M. Jr., Ansell N. J., Doughty M. F. Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidin *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94: 404-409, 1957.
321. Patankar M. S., Oehninger S., Barnett T., Williams R. L., Clark G. F. A revised structure for Fucoidan may explain some of its biological activities. *J. Biol. Chem.* 268: 21770-21776, 1993.
322. Soeda S., Sakaguchi S., Shimeno H., Nagamatsu A. Fibrinolytic and anticoagulant activities of highly sulfated fucoidan. *Biochem. Pharmacol.* 43: 1853-1858, 1992.

323. Blondin C., Chaubet F., Nardella A., Sinquin C., Jozefonvicz J. Relationships between chemical characteristics and anticomplementary activity of fucans. *Biomaterials* 17: 597-603, 1996.
324. Soeda S., Ohmagari Y., Shimeno H., Nagamatsu A. Preparation of oversulfated fucoidan fragments and evaluation of their antithrombotic activities. *Thromb. Res.* 72: 247-256, 1993.
325. Soeda S., Ohmagari Y., Shimeno H., Nagamatsu A. Preparation of aminated fucoidan and its evaluation as an antithrombotic and antilipemic agent. *Biol. Pharm. Bull.* 17: 784-788, 1994.
326. 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. *J. Clin. Invest.* 93: 929-936, 1994.
327. Lindbom L., Xie X., Raud J., Hedqvist P. Chemoattractant-induced firm adhesion of leukocytes to vascular endothelium in vivo is critically dependent on initial leukocyte rolling. *Acta Physiol. Scand.* 146: 415-421, 1992.
328. 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 lung. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 153: 307-311, 1996.
329. Omata M., Matsui N., Inomata N., Ohno T. Protective effects of polysaccharide Fucoidin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 30: 717-724, 1997.
330. Miura T., Nelson D. P., Schermerhorn M. L., Shin'oka T., Zund G., Hickey P. R., Neufeld E. J., Mayer J. E. Blockade of selectin-mediated leukocyte adhesion improves postischemic function in lamb hearts. *Ann. Thorac. Surg.* 62: 1295-1300, 1996.
331. Hajela K., Kayestha R., Sumati. Carbohydrate induced modulation of cell membrane IV: Interaction with mucin and Fucoidan totally immobilizes the human platelet membrane. *Indian J. Biochem. Biophys.* 33: 308-310, 1996.

332. Mauray S., Sternberg C., Theveniaux J., Millet J., Siquin C., Tapon-Bretonnière J., Fischer A.-M. Venous antithrombotic and anticoagulant activities of a Fucoïdan fraction. *Thromb. Haemost.* 74: 1280-1285, 1995.
333. Minix R., Doctor V. M. Interaction of Fucoïdan with proteases and inhibitors of coagulation and fibrinolysis. *Thromb. Res.* 87: 419-429, 1997.
334. Collic S., Fisher A. M., Tapon-Bretonnière J., Boisson C., Durand P., Jozefonvicz J. Anticoagulant properties of a fucoïdan fraction. *Thromb. Res.* 64: 143-154, 1991.
335. Church F. C., Meade J. B., Treanor R. E., Whinna H. C. Antithrombin activity of Fucoïdan. *J. Biol. Chem.* 264: 3618-3623, 1989.
336. Grauffel V., Kloareg B., Mabeau S., Durand P., Jozefonvicz J. New natural polysaccharides with potent antithrombic activity: fucans from brown algae. *Biomaterials* 10: 363-368, 1989.
337. Charreau B., Blondin C., Boisson-Vidal C., Soullou J.-P., Anegon I. Efficiency of fucans in protecting porcine endothelial cells against complement activation and lysis by human serum. *Transpl. Proc.* 29: 889-890, 1997.
338. Doctor V. M., Hill C., Jackson G. L. Effect of Fucoïdan during activation of human plasminogen. *Thromb. Res.* 79: 237-247, 1995.
339. Soeda S., Fujii N., Shimeno H., Nagamatsu A. Oversulfated fucoïdan and heparin suppress endotoxin induction of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured human endothelial cells: their possible mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1269: 85-90, 1995.
340. McCaffrey T. A., Falcone D. J., Borth W., Brayton C. F., Weksler B. B. Fucoïdan is a non-anticoagulant inhibitor of intimal hyperplasia. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 184: 773-781, 1992.
341. Roberts D. D., Rao N., Liotta L. A., Gralnick H. R., Ginsberg V. Comparison of the specificities of laminin, thrombospondin, and von Willebrand factor for binding to sulfated glycolipids. *J. Biol. Chem.* 261: 6872-6877, 1986.
342. Mahony M. C., Oehninger S., Clark G. F., Acosta A. A., Hodgen G. D. Fucoïdin inhibits the zona pellucida-induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Contraception* 44: 657-665, 1991.

343. Oehninger S., Clark G. F., Acosta A. A., Hodgen G. D. Nature of the inhibitory effect of complex saccharide moieties on the tight binding of human spermatozoa to the human zona pellucida. *Fertil. Steril.* 55: 165-169, 1991.
344. Itoh H., Noda H., Amano H., Ito H. Immunological analysis of inhibition of lung metastases by fucoidan (GIV-A) prepared from brown seaweed *Sargassum Thunbergii*. *Anticancer Res.* 15: 1937-1948, 1995.
345. Brunner G., Reibold K., Meissauer A., Schirrmacher V., Erkell L. J. Sulfated glycosaminoglycans enhance tumor cell invasion in vitro by stimulating plasminogen activation. *Exp. Cell Res.* 239: 301-310, 1998.
346. Guimarães M. A. M., Mourão P. A. S. Urinary excretion of sulfated polysaccharides administered to Wistar rats suggests a renal permselectivity to these polymers based on molecular size. *Biochim. Biophys. Acta* 1335: 161-172, 1997.
347. Kirchhofer D., Riederer M. A., Baumgartner H. R. Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood.* 89: 1270-1278, 1997.
348. Agbanyo F. R., Sixma J. J., de Groot P. G., Languino L. R., Plow E. F. Thrombospondin-platelet interactions. *J. Clin. Invest.* 92: 288-296, 1993.
349. Kowalska M. A., Tuszyński G. P. Interaction of thrombospondin with platelet glycoproteins GPIa-IIa and GPIIb-IIIa. *Biochem. J.* 295: 725-730, 1993.
350. Burton-Wurster N., Zhang D., Lust G. Accumulation of fibronectin in articular cartilage explants cultured with TGF $\beta$ 1 and Fucoidan. *Arch. Biochem. Biophys.* 316: 452-460, 1995.
351. Walcheck B., Moore K. L., McEver R. P., Kishimoto T. K. Neutrophil-Neutrophil Interactions under Hydrodynamic Shear Stress Involve L-Selectin and PSGL-1. *J. Clin. Invest.* 98: 1081-1087, 1996.
352. Hajela K., Kayestha R., Sumati. Carbohydrate induced modulation of cell membrane V : ESR characterization of molecular mobility in lipid bilayer of human neutrophil plasma membrane. *Indian J. Exp. Biol.* 34: 513-516, 1996.
353. Weiss S. J. Tissue Destruction by Neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320 : 365-376, 1989.

## Remerciements

Je désire remercier Dr. Yahye Merhi, mon directeur de maîtrise, de m'avoir donné l'occasion d'effectuer mes études dans son laboratoire, de m'avoir suggéré un sujet d'importance actuelle ainsi que de m'avoir enseigné les méthodes nécessaires à la réalisation du projet, tout en me laissant l'indépendance essentielle à ce genre d'apprentissage.