

Université de Montréal

**Régulation de la fonction plaquettaire par un aptamère  
dirigé contre le domaine A1 du facteur Von-Willebrand**

Par

Firas Dandachli

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc)

en microbiologie et immunologie

option cardiovasculaire

Firas Dandachli, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Régulation de la fonction plaquettaire par un aptamère dirigé  
contre le domaine A1 du facteur Von-Willebrand**

Présenté par :

Firas Dandachli

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Richard Marchand, président-rapporteur

Dr Walid Mourad, directeur de recherche

Dr Yahye Merhi, co-directeur

Dr Ly Quoc Hung, membre du jury

## Résumé

L'adhésion, l'activation et l'agrégation des plaquettes représentent les étapes initiales dans la formation du thrombus aux sites des lésions vasculaires. Malgré l'utilisation des médicaments antiplaquettaires comme l'Aspirine, le Plavix et les inhibiteurs de la glycoprotéine IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), l'incidence de thrombus dans la maladie coronarienne aiguë reste élevée. Le dommage aux artères coronaires induit l'exposition du collagène de la matrice sous-endothéliale et sa liaison au facteur Von-Willebrand (vWF). Ceci contribue au recrutement et à l'adhésion des plaquettes via la liaison du domaine A1 du vWF à la GPIIb des plaquettes.

Nous avons postulé que l'inhibition de la liaison vWF/GPIIb pourra représenter une stratégie efficace pour inhiber l'adhésion initiale des plaquettes et ainsi réduire la propagation du thrombus. L'objectif de notre étude était de déterminer le potentiel anti-thrombotique d'un inhibiteur du vWF.

L'aptamère dirigé contre le domaine A1 du vWF (ARC1779) a été développé et fourni par la compagnie Archemix. Son effet et celui du Reopro (abciximab, inhibiteur de la GPIIb/IIIa comme témoin positif) ont été testés en utilisant du sang provenant de 5 volontaires sains et de 27 patients coronariens traités avec l'Aspirine (inhibiteur du cyclo-oxygénase ou COX) et le Plavix (anti-récepteur de l'adénosine diphosphate ou ADP), en accord avec le comité d'éthique de l'ICM. Les plaquettes ont été marquées avec l'Indium-111 afin de pouvoir quantifier leur adhésion dans le sang complet sur des surfaces artérielles porcines dénudées. L'adhésion des plaquettes a été effectuée dans des chambres de perfusion sous des forces de cisaillement de 6974/sec pendant 15 minutes à 37 °C.

L'activation plaquettaire, suite à l'étude de l'adhésion, a été évaluée par l'expression de la P-sélectine et du vWF par la cytométrie en flux. L'effet de l'ARC1779 a été également déterminé sur l'agrégation plaquettaire, dans le sang complet par impédance, induite par l'acide arachidonique (AA), l'ADP, la Ristocétine et le peptide agoniste du récepteur de la thrombine-1 (TRAP-1). L'adhésion des plaquettes a été également observée par microscopie électronique à balayage.

Dans un premier temps, nous avons trouvé que l'adhésion des plaquettes des volontaires sains à l'artère endommagée était élevée ( $80 \times 10^6/\text{cm}^2$ ). Cette adhésion a été réduite significativement de plus que 90% par l'abciximab (100 nM) et d'une façon dose dépendante avec l'ARC1779 (25-250 nM). La perfusion du sang avec ou sans ARC1779 n'entraîne pas une activation plaquettaire, telle que déterminée par l'expression de la P-sélectine et du vWF à la surface des plaquettes. Suite à ces résultats, l'étude avec le sang des patients a été poursuivie avec des doses de 25, 83 et 250 nM d'ARC1779. L'agrégation plaquettaire du sang des patients a été complètement inhibée en réponse à l'AA et à l'ADP, ce qui confirme que ces patients étaient bien traités avec l'Aspirine et le Plavix. L'adhésion des plaquettes aux surfaces artérielles endommagées a été réduite, chez les volontaires sains et les patients, d'une manière dépendante de la dose d'ARC1779, lorsqu'il était incubé avant la perfusion. Cependant, l'ARC1779 et aussi l'abciximab étaient sans effets significatifs sur l'adhésion plaquettaire, lorsqu'ils étaient ajoutés 10 minutes après la perfusion. L'inhibition de l'adhésion avec 25 nM d'ARC1779 était comparable à celle obtenue avec l'abciximab. Cependant, l'agrégation plaquettaire en réponse au TRAP-1 n'était pas affectée par l'ARC1779, alors qu'elle était complètement inhibée par l'abciximab.

L'ARC1779 est un inhibiteur spécifique de la liaison du vWF au GPIIb des plaquettes. Il inhibe l'adhésion plaquettaire aux surfaces artérielles endommagées sans affecter l'agrégation plaquettaire et confère une protection anti-thrombotique similaire à l'abciximab. L'ARC1779 pourra être considéré comme un nouvel antiplaquettaire qui possède des propriétés anti-thrombotiques plus intéressantes que l'abciximab.

**Mots-clés :** Facteur von-Willebrand, Plaquettes, Thrombose, Antiplaquettaire, Agrégation

**Abstract**

Anti-platelet therapy in coronary artery disease (CAD) patients reduces recurrent athero-thrombosis, but at the cost of increased risk of bleeding. Because von Willebrand factor (vWF) functions predominantly in a high-shear environment, the vWF-specific aptamer, ARC1779 that blocks the binding of vWF A1-domain to platelet glycoprotein Ib, may deliver a site-specific anti-thrombotic effect while minimizing bleeding risk. We investigated the efficiency of ARC1779 on platelet activation, adhesion, and aggregation in CAD patients on double anti-platelet therapy.

Blood from 27 patients taking aspirin and clopidogrel and 5 normal volunteers was labeled with  $^{111}\text{In}$ -autologous platelets and perfused over denuded porcine arteries at high shear rate for 15 minutes. Blood was treated with either 25, 83 and 250 nM ARC1779; 100 nM abciximab or placebo, 5 min before (upstream therapy) or 10 min after (downstream therapy) beginning the perfusion. Under upstream, but not downstream therapy, platelet adhesion was significantly reduced by ARC1779 at 83 and 250 nM and by abciximab vs. placebo (4.8, 3.8 and 2.9 vs. 7.3 platelets  $\times 10^6/\text{cm}^2$ ,  $p < 0.05$ ). In contrast to abciximab, ARC1779 did not significantly affect platelet aggregation in response to thrombin receptor activating peptide-1, arachidonic acid and adenosine diphosphate. In addition, ARC1779 was without any effect on P-selectin expression and platelet-leukocyte binding.

In conclusion, ARC1779 has comparable anti-thrombotic efficacy to abciximab among CAD patients receiving aspirin and clopidogrel, but with lesser systemic effects on platelet activation and aggregation. These important proof-of-concept data form the

framework for randomized clinical investigations of this novel anti-platelet therapy among CAD patients.

**Key words:** von-Willebrand Factor, Platelets, Thrombosis, Anti-platelet, Aggregation

## Table des matières

Résumé.....	i-iii
Abstract.....	iv-v
Table des matières.....	vi-vii
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x-xi
Remerciements.....	xii-xiii
<b>Chapitre 1: Introduction .....</b>	<b>1-4</b>
<b>1. Le sang .....</b>	<b>4-5</b>
1.1. Composition du sang.....	5
1.1.1. Les granulocytes ou polymorphonucléaires.....	5-6
1.1.2. Les agranulocytes ou mononucléaires .....	6
1.1.3. Les plaquettes.....	6-7
1.1.4. Le plasma .....	8
1.2. Hémostase .....	8-9
1.2.1. Hémostase primaire.....	9-11
1.2.2. Hémostase secondaire .....	11-14
1.2.3. Hémostase pathologique .....	14-16
<b>2. Les plaquettes .....</b>	<b>16</b>
2.1. Structure des plaquettes.....	17-20

2.2. Les fonctions plaquettaires.....	20-21
2.2.1. L'adhésion plaquettaire.....	21-23
2.2.2. L'activation plaquettaire .....	24-25
2.2.3. L'agrégation plaquettaire .....	25-28
2.3. Les molécules d'adhésions plaquettaires .....	29-33
<b>3. Thrombose et maladies cardiovasculaires .....</b>	<b>33-36</b>
<b>4. Les antiplaquettaires.....</b>	<b>36</b>
4.1. Les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase .....	36-38
4.2. Les inhibiteurs de la réutilisation de l'adénosine.....	38-39
4.3. Les inhibiteurs des récepteurs de l'adénosine diphosphate.....	39-41
4.4. Les inhibiteurs de la glycoprotéine IIb/IIIa.....	41-42
4.5. Les antiplaquettaires en développement .....	42-47
<b>5. Hypothèse et objectifs .....</b>	<b>47-48</b>
<b>Chapitre 2: L'article scientifique.....</b>	<b>49-77</b>
Dabit Arzamendi, Firas Dandachli, Jean-François Théorêt, Gregory Ducrocq, Mark Chan, Walid Mourad, James C. Gilbert, Robert G. Schaub, Jean-François Tanguay, Yahye Merhi. An Anti-von Willebrand Factor Aptamer Reduces Platelet Adhesion among Patients Receiving Aspirin and Clopidogrel in an ex- vivo Shear-Induced Arterial Thrombosis	
<b>Discussion.....</b>	<b>78-81</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>82</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>83-91</b>

## Liste des figures

### Chapitre 1

- Figure 1 :** Images par microscopie électronique à balayage d'une plaquette au repos et activée.
- Figure 2 :** Récepteurs plaquettaires majeurs.
- Figure 3 :** Mécanismes de l'adhésion plaquettaire au collagène.
- Figure 4 :** Structure d'une glycoprotéine plaquettaire GPIIb/IIIa.
- Figure 5 :** Voies de signalisation à travers le GPVI et le complexe GPIb/IX/V.

### Article scientifique

- Figure 1:** Effects of ARC1779 and abciximab on platelet adhesion in healthy controls and in patients on aspirin and clopidogrel.
- Figure 2:** Representative scanning electron microscopy micrographs of the resulting platelet adhesion following exposure of whole blood to denuded (injured) porcine arterial segments in perfusion flow chambers at a shear rate of 6974/sec for 15 min at 37 °C.
- Figure 3:** Effects of ARC1779 and abciximab on platelet aggregation in healthy controls and in patients on aspirin and clopidogrel.
- Figure 4:** Effects of ARC1779 and abciximab on platelet activation.

## **Liste des tableaux**

### **Chapitre 1:**

**Tableau 1:** Récepteurs plaquettaires majeurs

### **Article scientifique**

**Tableau 1:** Baseline characteristics of the study population

## Liste des abréviations

<b>AA :</b>	Acide arachidonique
<b>AC :</b>	Adénylate cyclase
<b>ADP :</b>	Adénosine diphosphate
<b>AMPc :</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>AINS :</b>	Anti-inflammatoires non-stéroïdiennes
<b>ATP :</b>	Adénosine triphosphate
<b>AVC :</b>	Accident vasculaire cérébral
<b>CML :</b>	Cellules musculaires lisses
<b>COX :</b>	Cyclo-oxygénase
<b>EDRF :</b>	Facteur relaxant dérivé de l'endothélium
<b>EDHF :</b>	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
<b>GMPc :</b>	Guanosine monophosphate cyclique
<b>ICAM-1 :</b>	Molécules d'adhésion intracellulaire
<b>IL :</b>	Interleukine
<b>MCV :</b>	Maladies cardiovasculaires
<b>NO :</b>	Monoxyde d'azote
<b>PAR :</b>	Récepteur activé par une protéase
<b>PAF :</b>	Facteur d'activation plaquettaire
<b>PF4 :</b>	Facteur plaquettaire 4
<b>PGD<sub>2</sub> :</b>	Prostaglandine D <sub>2</sub>
<b>PGG<sub>2</sub> :</b>	Prostaglandine G <sub>2</sub>

<b>PGH<sub>2</sub> :</b>	Prostaglandine H <sub>2</sub>
<b>PGE<sub>2</sub> :</b>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub> :</b>	Prostacycline
<b>PGHS :</b>	Prostaglandine endopéroxyde synthétase
<b>PKC :</b>	Protéine kinase C
<b>PLC :</b>	Phospholipase C
<b>PLA :</b>	Phospholipase A
<b>PPACK :</b>	Phenylalanyl-Prolyl-Arginine-Chloromethyl Ketone
<b>PSGL-1 :</b>	Ligand-1 glycoprotéine de la P-sélectine
<b>TNF-<math>\alpha</math> :</b>	Facteur de nécrose tumorale $\alpha$
<b>TRAP :</b>	Peptide agoniste du récepteur de la thrombine
<b>TXA<sub>2</sub> :</b>	Thromboxane A <sub>2</sub>
<b>VCAM-1 :</b>	Molécules d'adhésion des cellules vasculaires-1
<b>vWF :</b>	Facteur von-Willebrand

## Remerciements

A mon père

A ma mère, mes frères

Dr. Richard Marchand, vous m'avez fait un grand honneur en acceptant la présidence de ce jury. Je vous prie d'accepter en retour l'assurance de mon plus profond respect.

Dr. Ly Quoc Hung, je vous remercie également d'avoir accepté de faire partie du jury pour examiner ce travail.

Je voudrais exprimer par la même occasion toute ma gratitude au Dr. Walid Mourad et au Dr. Yahye Merhi qui m'ont donné la possibilité de poursuivre mes études à la faculté des études supérieures au sein du laboratoire de la thrombose et de l'hémostase. Merci pour votre écoute, votre confiance et votre soutien dont vous m'avez fait preuve tout au long de ces années. Vous avez acquis ma reconnaissance et mon plus profond respect, pour toujours.

Dr. Yahye Merhi, j'ai eu la chance de pouvoir effectué ces travaux sous votre responsabilité. Je vous remercie pour la qualité de votre encadrement, toujours apprécié par les étudiants, et de votre attention à dépister les problèmes rencontrés. Votre patience, votre rigueur, votre disponibilité ainsi que votre bonne humeur sont autant de qualités qui ont permis de me guider dans cette discipline. Merci pour vos encouragements sans faille. Les mots ne suffiront pas à exprimer l'ampleur de ma gratitude et de ma reconnaissance.

L'achèvement de cet mémoire est l'occasion pour moi de remercier celles et ceux qui m'ont aidé au cours de ces années. J'exprime toute ma gratitude aux différents membres du laboratoire pour leur accueil et leur disponibilité.

Finalement, je tiens à dédier ce travail à mes parents et à mon frère Ahmad Dandachli qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans les moments difficiles. Merci pour l'éducation et les valeurs que vous avez su m'inculquer. Enfin, j'ai une pensée toute spéciale pour mon père, à qui je dis: j'essaie de mener ma vie malgré les difficultés rencontrées pour que, vous soyez toujours fier de moi.

## Chapitre 1

### Introduction

Les maladies cardiovasculaires (MCV) correspondent à un groupe de maladies touchant le cœur et les vaisseaux sanguins. On désigne un ensemble des maladies caractérisées soit par une obstruction progressive des artères, en particulier les artères coronaires qui irriguent les muscles cardiaques, les carotides qui alimentent le cerveau et les artères irriguant les membres périphériques et les organes. L'obstruction aiguë d'une artère coronaire produit une crise cardiaque (infarctus du myocarde), alors que l'éclatement d'une artère du cerveau provoque l'accident vasculaire cérébral (AVC).

Les maladies cardiovasculaires sont l'une des causes importantes de morbidité et de mortalité dans la population globale (1). Les maladies coronariennes sont causées par le rétrécissement des artères coronaires par une plaque athéromateuse ou l'athérosclérose. Ce rétrécissement réduit la quantité de sang qui arrive au cœur et augmente le risque de formation d'un thrombus bloquant l'artère, ce qui en résulte une ischémie et éventuellement un infarctus du myocarde.

L'athérosclérose est une maladie qui progresse très lentement. Après plusieurs décennies d'évolution silencieuse, vont apparaître des signes en rapport avec l'obstruction progressive des artères, et des complications thrombotiques aiguës qui font toute la gravité de la maladie (2, 3). La première étape de l'athérosclérose est l'accumulation des lipoprotéines (LDL-cholestérol) dans l'intima vasculaire. Les lipoprotéines présentes dans l'intima vont alors y subir des modifications oxydatives. Cette étape d'oxydation est

indispensable à la formation de la plaque (4). La présence de macrophages dans la paroi vasculaire est en effet liée à la présence de LDL-oxydées. Lors d'une deuxième phase, les monocytes circulants adhèrent à la surface de l'endothélium, le traversent et se transforment en macrophages puis en cellules spumeuses. Le recrutement des monocytes passe par une étape d'activation endothéliale qui conduit à l'expression de molécules d'adhésion à sa surface. Après l'adhésion et sous l'influence de divers facteurs de risque, les monocytes vont pénétrer dans l'espace sous endothélial et se différencier en macrophages. Certains de ces macrophages pourront alors se transformer en cellules spumeuses en captant les LDL-oxydées. Dès l'infiltration de la paroi artérielle, les macrophages vont y entretenir une réaction inflammatoire chronique qui jouera un rôle important dans la croissance de la plaque. Le risque essentiel de l'athérosclérose est la survenue d'un accident aigue, d'origine thrombotique. L'origine de l'accident aigue est pratiquement toujours un phénomène mécanique causé par la rupture ou l'érosion de plaque. La rupture met le sang en contact avec les éléments chromogènes du centre lipidique. La conséquence en est un phénomène de thrombose qui implique les plaquettes et le système de la coagulation (5).

L'adhésion plaquettaire est une fonction essentielle en réponse aux lésions vasculaires et généralement considérée comme une première étape pendant laquelle les plaquettes lient d'autres cellules ou les constituants de la matrice extracellulaire à travers leurs récepteurs membranaires (6). L'adhésion et l'agrégation plaquettaire sont considérées comme un processus distinct qui amène à la formation de la thrombose. Les plaquettes sont essentielles pour l'hémostase normale, particulièrement pour arrêter le saignement. Dans

les conditions pathologiques, les plaquettes constituent les contributeurs majeurs aux sites d'athérosclérose dans les vaisseaux sténosés. Les voies qui achèvent l'adhésion plaquettaire sont affectées par l'augmentation de force de cisaillement, dépendamment de la propriété biomécanique de chaque récepteur avec son ligand. La force de cisaillement élevée est capable de maintenir la liaison entre le domaine A1 du vWf et la glycoprotéine 1b $\alpha$  (GP1b $\alpha$ ), permettant l'adhésion des plaquettes à la surface endommagée et en aboutissant à l'activation et l'agrégation plaquettaire pour initier la formation de la thrombose artérielle (7). La réponse hémostatique à la lésion vasculaire est contingente de la nature de la lésion, dépendante des protéines de la matrice extracellulaire exposées au sang et sous les conditions hémostatiques. Les composants de la matrice extracellulaire réagissent avec les plaquettes à travers différents types de collagènes, le vWf, la fibronectine et d'autres protéines d'adhésion telles que la laminine, le fibuline, la thrombospondine, le fibrinogène, la fibrine, et la vitronectine (8) qui sont considérés comme des substrats thrombogéniques pour initier la formation de la thrombose (9).

Bien que les substrats thrombogéniques puissent amener ce processus à la formation de la thrombose, ils ont besoin uniquement de vWf pour initier l'adhésion plaquettaire et pour soutenir l'agrégation sous force de cisaillement élevée (7). Le vWf est une protéine sanguine impliquée dans l'hémostase et qui est produite constitutivement par l'endothélium (dans le corps de Weibel-Palade), les plaquettes (dans les granules  $\alpha$  des plaquettes) et les mégacaryocytes. Sa valeur principale est notée par la liaison entre le récepteur plaquettaire GP1b $\alpha$  du complexe GP1b/IX/V et le domaine A1 du vWf exposé dans le sang circulant, et en même temps l'association du vWf avec le filament de type VI du collagène (10). Le

vWf sous-endothéliale peut supporter l'adhésion plaquettaire. Par conséquent, l'interaction du vWf circulant avec la matrice sous endothéliale exposée suite à une lésion vasculaire est la clé de l'événement de la formation de la thrombose. Deux domaines du vWf A1 et A3 peuvent médier la liaison avec le collagène et leurs rôles dépendent du type de collagène impliqué (11). Le vWf est capable de se transformer de la forme soluble à une forme immobilisée. Les plaquettes n'interagissent pas avec le vWf soluble dans le sang, tant qu'elles adhèrent immédiatement à sa forme immobilisée.

L'implication de la liaison vWF/GPIIb dans la fonction plaquettaire et son inhibition par un nouvel antiplaquettaire constitue le sujet principal de notre étude. Afin de faciliter la compréhension de ce mémoire, j'ai jugé important d'expliquer dans l'introduction la composition et les fonctions du sang dans l'hémostase et la formation de thrombose en relation avec les maladies thrombotiques, et aussi d'expliquer les mécanismes d'action des médicaments antiplaquettaires.

## **1. Le sang**

Le sang est un tissu conjonctif liquide formé de populations cellulaires libres, dont le plasma est la substance fondamentale. Le sang joue plusieurs rôles très importants dans l'organisme par exemple, il assure une double fonction de transport, distribue l'oxygène et les nutriments nécessaires au fonctionnement et la survie de toutes cellules du corps et en même temps, récupère le dioxyde de carbone et les déchets (urée) qui résultent de l'activité de tout organe vivant. Le sang est constitué d'un liquide presque incolore très riche en eau (le plasma) dans lequel baignent des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes.

Le sang s'enrichit de nutriments et reçoit une grande partie de l'eau contenue dans les aliments et se débarrasse des déchets collectés (dioxyde de carbone, etc.) et s'enrichit en oxygène dans les poumons.

### **1.1. Composition de sang**

Le sang contient des éléments cellulaires et des substances fondamentales, mais il est dépourvu de fibres. Les éléments figurés sont : les globules rouges, hématies ou érythrocytes qui constituent 99% du volume sanguin. Elles ne possèdent ni noyau ni organites, donc ne sont pas des cellules proprement dites. Elles contiennent l'hémoglobine qui permet de fixer l'oxygène et aussi le dioxyde de carbone. Leur durée de vie est 120 jours et leur destruction est opérée par le foie, la rate ou la moelle osseuse.

Les leucocytes ou globules blancs (0.2%) servent dans le système immunitaire à détruire les agents infectieux. Les différents types de leucocytes sont :

Les granulocytes ou polymorphonucléaires et les agranulocytes ou mononucléaires.

#### **1.1.1. Les granulocytes ou polymorphonucléaires**

**I)** Les neutrophiles sont des polymorphonucléaires qui possèdent des granules cytoplasmiques et un gros noyau à plusieurs lobes, représentant 50-70 % des leucocytes et 90% des granulocytes, possédant un diamètre de 10-12  $\mu\text{M}$  et leur durée de vie est de 10 jours, ils jouent un rôle très important dans la phagocytose et les réactions inflammatoires.

**II)** Les éosinophiles représentent 1-4% des leucocytes, possèdent un diamètre de 10-12  $\mu\text{M}$ , jouent un rôle de défense contre les parasites et phagocytent les complexes antigène-anticorps.

**III)** Les basophiles représentent 1% des leucocytes, et possèdent un diamètre de 8-10  $\mu\text{M}$ . Leur durée de vie est 1-2 ans. Dans les tissus, ils se transforment en mastocytes. Ils sont impliqués dans les réactions allergiques et contiennent de l'héparine et de l'histamine.

### **1.1.2. Les agranulocytes ou mononucléaires**

**I)** Les monocytes sont dépourvus de granulations spécifiques, et représentent 3-8 % des leucocytes. Leur diamètre est de 14-19  $\mu\text{M}$  et leur durée de vie est à peu près un jour en circulation et un mois dans le tissu. Les monocytes sont des cellules mobiles et sont capables de se différencier en phagocytes, macrophages dans le tissu conjonctif, microglies dans le système nerveux central et ostéoclastes dans les os. Ils jouent un rôle important dans la formation de l'athérosclérose.

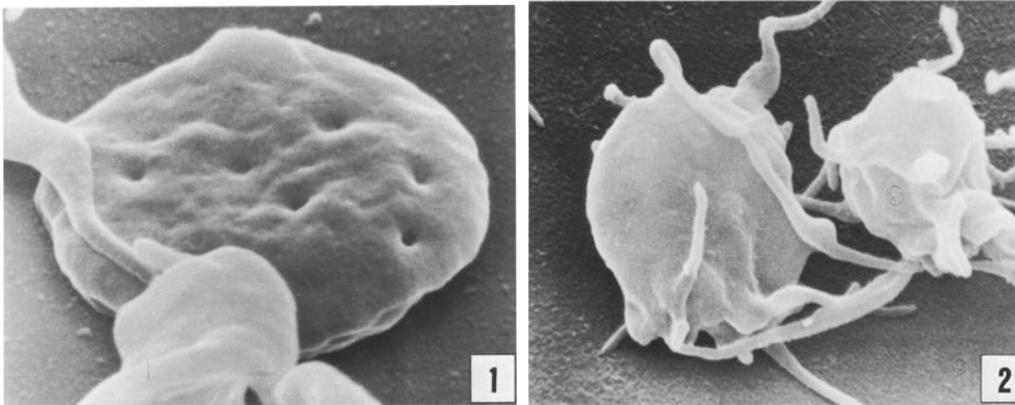
**II)** Les lymphocytes sont des leucocytes qui ont un rôle majeur dans le système immunitaire et la production d'anticorps, on distingue deux lignées lymphocytaires différentes : les lymphocytes B et T. Ils représentent 20-30 % des leucocytes. Leur diamètre est de 7-15  $\mu\text{M}$  et leur durée de vie est de quelques mois à des années.

### **1.1.3. Les plaquettes**

Les plaquettes sont des composantes du sang appelées également thrombocytes. Elles ne sont pas, à proprement parler, des cellules, mais des petits sacs de dimensions plus

importantes que les cellules habituelles, contenant des substances chimiques actives permettant le processus de la coagulation, et plus précisément de l'hémostase primaire (formation du caillot sanguin). Grâce à l'intervention d'une hormone (la thrombopoïétine), les mégacaryocytes sont fabriqués dans la moelle osseuse, puis se transforment en plaquettes. Plus précisément, la formation des plaquettes porte le nom de thrombocytopoïèse. Certaines cellules souches de la moelle osseuse se différencient en mégacaryoblastes, précurseurs des plaquettes. L'étape suivante est la transformation des mégacaryoblastes en prémégacaryocytes qui deviennent eux même des mégacaryocytes que l'on appelle également cellules géantes de la moelle osseuse. Ensuite par fragmentation du cytoplasme, ces mégacaryocytes se fragmentent en thrombocytes c'est-à-dire en plaquettes à proprement dit. Il s'agit de formation sans noyau ayant la forme de petites plaques plus ou moins sphériques (Figure 1). Le nombre des plaquettes est normalement compris entre 150 000 et 450 000 par  $\mu\text{L}$  de sang. Les plaquettes restent environ 8 à 10 jours dans la circulation, avant d'être détruites dans la rate (12). Les plaquettes jouent essentiellement un rôle dans l'hémostase. L'adhésion et l'agrégation des plaquettes au niveau de la plaie leur permettent de constituer un bouchon provisoire contribuant à colmater la brèche, après libération de leur contenu, cela aboutit à la formation du clou plaquettaire. Lors de la réaction inflammatoire, les plaquettes peuvent ingérer des particules entraînant la libération de leur contenu en présence des virus ou des bactéries, augmentant ainsi la quantité des globules blancs venant intervenir sur les lieux de l'inflammation, à travers la paroi vasculaire. Une section plus détaillée sur la structure et la fonction plaquettaire sera présentée dans la section 2 du chapitre 1.

**Figure 1 : Images par microscopie électronique à balayage d'une plaquette au repos (1) et activée (2).** Tiré de : P. Zilla, R. Fasol, A. Yildiz, M. Kadletz, Gunther Laufer, Gregor Wollenek, R. Seitelberger, M. Deutsch, Scanning electron microscopy of circulating platelets reveals new aspects of platelet alteration during cardiopulmonary bypass operations, *Tex. Heart Inst. J.*, 1987, 14: 13-21.



#### 1.1.4. Le plasma

Le plasma sanguin est la composante liquide du sang dans laquelle baignent les éléments figurés. Il est constitué d'eau, d'ions et de différentes molécules qui sont ainsi transportées à travers l'organisme. Les principales molécules du plasma sont le glucose, les lipides, les hormones (qui peuvent être des protéines, des acides aminés modifiés, des stéroïdes, ou des lipides modifiés dont les prostaglandines et les thromboxanes), des protéines du complément qui ont un rôle majeur dans l'initiation de la réponse immunitaire et inflammatoire, et des protéines de la coagulation sanguine (les facteurs de coagulation).

#### 1.2. Hémostase

L'hémostase désigne le processus qui permet d'interrompre le saignement pour éviter l'hémorragie. Grâce à une grande capacité d'adaptation régulatrice, le système de

l'hémostase contrôle la fluidité du sang dans les vaisseaux sanguins et l'arrêt du saignement lors d'une blessure vasculaire. Il s'agit de divers systèmes enzymatiques et cellulaires les plus complexes de l'organisme qui se mettent en place. Les principaux facteurs qui interviennent sont les facteurs plasmatiques de la coagulation, les plaquettes sanguines ainsi que les autres éléments figurés du sang et la paroi vasculaire. L'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse sont liées étroitement et de leur bonne coordination dépend le succès de l'opération d'arrêt de l'hémorragie ainsi le retour *ad integrum* de la circulation sanguine. La vasoconstriction est une réponse immédiate à la lésion, cela correspond à la contraction ou constriction du vaisseau sanguin. Ce spasme vasculaire diminue le diamètre du vaisseau et ralentit le saignement.

### **1.2.1. L'hémostase primaire**

L'hémostase primaire correspond à la première étape de l'hémostase, phénomène physiologique servant à stopper le saignement. Ce processus implique la paroi vasculaire, les plaquettes, les facteurs de coagulation et les protéines adhésives qui aboutissent à l'obturation de la brèche vasculaire grâce à la formation d'un thrombus blanc fibrino-plaquettaire. La paroi vasculaire est tapissée par une monocouche de cellules endothéliales qu'on appelle l'endothélium. Les cellules endothéliales sont largement impliquées dans la régulation de l'hémostase (13). Elles jouent un rôle de barrière de perméabilité sélective dans les vaisseaux sanguins. La surface des cellules endothéliales n'est pas thrombogène au repos. Plusieurs facteurs peuvent induire la thromborésistance comme la charge négative, l'exposition des phospholipides neutres des plaquettes, la synthèse et la sécrétion de

molécules inhibitrices des plaquettes (la prostacycline, le monoxyde d'azote, et l'ecto-ADPase) et les inhibiteurs de la coagulation (le thrombomoduline, la protéine S, l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, les activateurs de la fibrinolyse et les activateurs du plasminogène de type urokinase). Le vWf et le fibrinogène sont les principales protéines adhésives impliquées dans l'hémostase primaire. Le vWf, une glycoprotéine multimérique, est synthétisée par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes (14). Il est le médiateur principal de l'adhésion plaquettaire à la matrice sous-endothéliale. Le vWf participe indirectement dans la formation du caillot de fibrine puisqu'il est indispensable au transport et à la stabilisation plasmatique du facteur VIII de la coagulation. Dans l'hémostase primaire, on distingue deux temps, le temps vasculaire et le temps plaquettaire. Dans le temps vasculaire, les vaisseaux lésés se contractent (vasoconstriction) et cette contraction musculaire constitue un mécanisme de première urgence qui concourt à l'arrêt du saignement. La diminution de calibre du vaisseau peut atteindre 40% de sa taille initiale. Les plaquettes subissent rapidement des changements morphologiques et biochimiques dès qu'elles rentrent en contact avec la matrice sous endothéliale exposée lors d'une blessure vasculaire et renforcent cette vasoconstriction par la libération de sérotonine et la thromboxane (TXA<sub>2</sub>). L'activation plaquettaire procède en plusieurs étapes successives, liées les une aux autres par des boucles d'amplification. Dans le temps plaquettaire, l'endothélium ne joue plus son rôle physiologique anti-hémostase. L'adhésion plaquettaire est la première étape de contact des plaquettes avec les substances thrombogènes. Lors d'un endommagement de la paroi vasculaire, les structures sous endothéliales mises à nu les microfibrilles, la membrane basale, le collagène, la fibrine polymérisée à la suite d'une

activation de la coagulation. Les plaquettes adhèrent au sous-endothélium grâce à un récepteur membranaire la protéine GPIb par l'intermédiaire du vWf. Ce phénomène est très rapide et provoque l'activation des plaquettes. Les plaquettes activées changent de forme et libèrent des substances ayant une action agrégante comme l'ADP et le TXA<sub>2</sub>. Ces éléments vont provoquer une série de réactions qui mènent à l'agrégation par l'intermédiaire des molécules de fibrinogène en présence de calcium qui se fixent sur un récepteur de la membrane plaquettaire le GPIIb/IIIa.

### **1.2.2. L'hémostase secondaire**

L'hémostase secondaire ou la coagulation proprement dite correspondant à une succession de réactions qui opèrent en cascade et où interviennent des protéines qui sont normalement présentées dans le sang et plus précisément dans le plasma. Ces protéines présentent normalement en état inactif jusqu'à ce qu'intervienne l'activation qui est déclenchée quand certaines protéines, plus particulièrement le facteur XII appelé également facteur Hagemann, entrent en contact avec la paroi d'un vaisseau dont l'endothélium a été abimé ou est anormal. À cet instant, le contact déclenche la chaîne d'activation des protéines du plasma ce qui aboutit à la formation du caillot. Les facteurs intervenant dans cette cascade de la coagulation sont au nombre de 13. Ils entrent dans cette chaîne complexe des réactions qui a pour résultat de transformer une protéine soluble, le fibrinogène, en une protéine insoluble, la fibrine. La fibrine est en quelque sorte le squelette du caillot nouvellement constitué.

La théorie de la coagulation existait depuis l'antiquité. Le fibrinogène est un précurseur soluble dans le plasma et synthétisé par le foie, il se transforme en fibrine grâce à une enzyme, la thrombine. Le fibrinogène peut augmenter lors des syndromes inflammatoires. Le calcium est un élément essentiel pour la coagulation. Le calcium est nécessaire à l'activité de la plupart des étapes de la coagulation via l'activation des protéases et joue un rôle important avec la vitamine K au niveau hépatique et permet aux protéines de se lier aux membranes phospholipidiques. Les facteurs de la coagulation sont essentiellement des protéines plasmatiques. La prothrombine est le facteur II de coagulation et se transforme en thrombine.

Les facteurs de la coagulation sont présents dans la circulation sanguine, sauf le facteur tissulaire qui est un récepteur et qui s'exprime sur de nombreuses cellules humaines après leurs activations. Les facteurs V, XI, XII, sont également présents sur les plaquettes. La plupart des facteurs de coagulation circulent dans le sang sous forme inactive, et ils deviennent activés en cascade (ils sont dits zymogène), ce qui leur permet d'acquérir une activité sérine protéase. Cette cascade mène à la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Parmi ces facteurs, certains sont nécessaires, pour être actifs, d'être synthétisés en présence de vitamine K (facteurs vitamines K dépendants : II, VII, IX, et X). Des protéines de régulation existent et circulent dans le sang comme l'antithrombine, la protéine C, la protéine S, l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*).

Le système de coagulation est capable de s'auto-activer et de s'autoréguler, permettant la formation d'un caillot solide pour arrêter un saignement sur une brèche vasculaire limitée.

In vivo, la coagulation se déclenche après le contact entre le facteur tissulaire et le facteur VII, qui s'active en facteur VIIa. Le couple facteur VIIa-facteur tissulaire est capable d'activer le facteur X en facteur Xa, aussi que le facteur IX en facteur IXa qui par la suite active le facteur X. La génération du Xa nécessite la liaison du X à des phospholipides anioniques, fournis par la membrane plaquettaire et la présence du calcium. Les facteurs anti hémophiliques A et B (Facteur VIII et IX) sont indispensables à l'hémostase normale.

La voie intrinsèque de la coagulation fait intervenir les facteurs de la phase contact. C'est-à-dire les facteurs XII et XI. La phase contact se déclenche par contact entre le sang et une surface mouillable ou chargée négativement, qui par la suite déclenche l'activation du XII et XIIa en présence de prékallitréine et de kininogène. Le facteur XIIa est capable d'activer le facteur XI en facteur XIa et ce dernier active le facteur IX. In vivo, cette voie d'activation ne joue qu'un rôle mineur dans le déclenchement de la coagulation comme en témoigne l'absence totale de saignement dans les déficits complets en facteur XII, en prékallitréine ou en kininogène, par contre cette voie d'activation joue un rôle dans la fibrinolyse.

Les plaquettes jouent le rôle de défense par leurs adhésions aux sites de lésions. L'adhésion et l'activation plaquettaire sont influencées essentiellement par leurs interactions avec les protéines sous endothéliales, le vWf et le collagène. Les plaquettes

lient le vWf via le complexe GPIb/IX/V. L'importance de cette interaction est supportée par l'observation de certains individus qui sont en manque de GPIb/IX/V ou de vWf, qui ont des maladies de saignements. L'activation plaquettaire, qui est le résultat de leurs adhésions au collagène sous endothéliale, est essentiel pour l'hémostase. L'agrégation plaquettaire est le résultat de la liaison de la GPIIb/IIIa activée au fibrinogène ou le vWf. Les plaquettes activées régularisent la propagation des réactions du système de coagulation par 1) le relâchement des peptides bioactifs de leurs granules denses, ainsi que par leur participation directe dans les événements pro-coagulants, 2) l'expression des récepteurs spécifiques avec haute affinité pour les protéases de la coagulation, les zymogènes, et les cofacteurs, et 3) la stimulation initiale qui mène à la génération de la thrombine.

### **1.2.3. Hémostase pathologique**

Les désordres de l'hémostase se retrouvent dans des situations aussi différentes qu'une hémorragie ou une thrombose. En se basant sur les données des mécanismes de l'hémostase, on peut différencier les différentes pathologies de l'hémostase.

- A)** Les anomalies de l'hémostase primaire par atteinte vasculaire: les purpuras vasculaires et non thrombopéniques.
- B)** les anomalies de l'hémostase primaire par atteinte plaquettaire quantitative: les thrombopénies.
- C)** les anomalies de l'hémostase primaire par atteinte plaquettaire qualitative: les thrombopathies.

**D)** les anomalies de l'hémostase primaire par atteinte plasmatique: afibrinogénémie et maladie de Von Willebrand. La maladie de Von Willebrand est la maladie la plus fréquente de l'hémostase primaire et le trouble hémorragique le plus répandu chez l'être humain. On distingue trois grands types de la maladie Von Willebrand, soit le type 1, le type 2 et le type 3.

La maladie du Von-Willebrand de type 1 est la forme la plus courante, elle représente en effet 75% de tous les cas. La maladie de Von-Willebrand de type 2 est moins courante que la maladie de type 1, elle représente de 20 à 25 % de tous les cas. Dans la maladie de Von-Willebrand de type 2, la quantité de vWf dans la circulation sanguine est souvent normale. Le problème est que le vWf ne fonctionne pas. Il existe plusieurs sous-types de la maladie de Von-Willebrand de type 2. Le sous-type 2A est le sous-type le plus courant. Il représente de 15 à 20 % de tous les cas de maladie Von-Willebrand. Dans ce type de maladie, la quantité de vWf est souvent normale, par contre en raison d'une anomalie qui affecte la protéine elle-même, les plaquettes n'adhèrent pas bien les une aux autres. Le vWf ne remplit pas son rôle, qui est de maintenir les plaquettes en place pour colmater la brèche dans le vaisseau sanguin endommagé. Le sous-type 2B vient au second rang sur le plan de la fréquence, il représente environ 5% de tous les cas de maladie. Dans ce type de maladie, le vWf amène les plaquettes à s'agglutiner dans la circulation sanguine plutôt que de se fixer au siège de la lésion du vaisseau sanguin. L'organisme travaille ensuite à éliminer ces gros amas de plaquettes de la circulation. Il s'ensuit une pénurie de plaquettes. Le sous-type N du type 2 est beaucoup plus rare (la lettre N signifie Normandie, province de France où l'on a diagnostiqué le premier cas de ce sous type). Dans le type 2N,

le vWf fonctionne normalement avec les plaquettes, elles s'agglutinent donc comme elles le devraient autour de la lésion. En temps normal, le vWf transporte également le facteur VIII dans la circulation sanguine et le stabilise pour qu'il puisse participer à la formation de caillots solides. Il existe plusieurs autres types extrêmement rares de maladie de Von Willebrand de type 2, notamment le type M (signifie multimère, une partie de la structure de la molécule de vWf). Dans le type 2M, l'ancrage du vWf aux plaquettes est perturbé.

La maladie de vWf de type 3 est très rare. Elle affecte environ une personne sur 500 000. Par contre, elle est la forme la plus grave de maladie de Von Willebrand. Les gens qui en sont atteints ont très peu de vWf dans leur sang et parce que le vWf transporte le facteur VIII, ils ont également des taux très bas de facteur VIII. Par conséquent, les hémorragies peuvent être fréquentes et si elles ne sont pas traitées, elles peuvent avoir des conséquences graves.

## **2. Les plaquettes**

Les plaquettes, circulent dans le sang avec un nombre qui varie entre le 150 000 et 400 000/mm<sup>3</sup>. Elles contiennent des granules et produisent des substances vasoactives ou facteurs prothrombotiques, tel que le TXA<sub>2</sub>, la sérotonine et l'ATP. Elles s'agrègent rapidement suite à la stimulation par différents agonistes comme l'ADP, la thrombine, le collagène et l'adrénaline. Finalement, elles expriment de nombreuses molécules adhésives telles que le P-sélectine et la GPIIb/IIIa (15, 16).

## 2.1. Structure des plaquettes

Les plaquettes sont des petites cellules anucléées issues de la fragmentation des mégacaryocytes. L'interaction des plaquettes sanguines et des facteurs de la coagulation avec les composants de la paroi vasculaire jouent un rôle majeur en physiologie (maintien de l'intégrité vasculaire) et en pathologie (formation de thrombose).

**Système membranaire :** La membrane plaquettaire, composée d'une double couche de phospholipides, contient des glycoprotéines transmembranaires dont les parties cytoplasmiques interagissent avec le cytosquelette (17). L'adhésion des plaquettes au sous-endothélium implique des glycoprotéines comme la GPIb qui est le récepteur du vWf, la GPIa-IIa qui est un des récepteurs du collagène, ou la GPIc-IIa qui permet l'adhésion à la fibronectine. Le complexe GPIIb/IIIa permet l'agrégation des plaquettes entre elles quel que soit l'agent agrégant. Cette intégrine est le récepteur le plus abondant à la surface des plaquettes et se répartit sur la membrane de surface (70%), le système canaliculaire ouvert et la membrane des granules  $\alpha$  (30%). Durant le changement de forme de plaquettes consécutives à l'activation, les GPIIb/IIIa présents au niveau des invaginations de la membrane plasmique se retrouvent exposés à la surface plaquettaire. La membrane plasmique contient également des phospholipides, précurseurs de la voie des prostaglandines et leucotriènes, possédant une activité procoagulante liée à la phosphatidylsérine. Les plaquettes comportent un système membranaire intracellulaire: le système canaliculaire ouvert et le système tubulaire dense. Le système canaliculaire ouvert représente une source importante de membrane utilisable pour la formation des filopodes et

pour l'étalement des plaquettes. Le système tubulaire dense (STD), assimilé au réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires, représente le lieu de stockage de calcium. Ce système a un rôle très important puisqu'il intervient dans la régulation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique au cours de l'activation plaquettaire. En effet, dans la membrane du STD, on trouve les récepteurs de l'inositol trisphosphate et les  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases appelés SERCA (Sarcoendoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase) (18).

**Système des organelles :** Il comprend quelques mitochondries, des grains de glycogène et plusieurs types de granules dont les granules  $\alpha$  et les granules denses qui sont spécifiques aux plaquettes et qui sécrètent leur contenu lors de l'activation. Les granules denses sécrètent le calcium, la 5-hydroxytryptamine (sérotonine) et l'ADP ce qui renforce l'agrégation et les réactions de coagulation intervenant à la surface plaquettaire. Les granules  $\alpha$  sécrètent un grand nombre de protéines telles que le vWf, la  $\beta$ -thromboglobuline, la fibronectine et le PF4 (*Platelet Factor 4*), le fibrinogène, et d'autres protéines plasmatiques comme l'albumine, des IgG, des protéines adhésives (thrombospondine) et des facteurs de croissance (PDGF). De plus, la membrane de ces granules contient un certain nombre de récepteurs tels que l'intégrine GPIIb/IIIa, la P-sélectine et la glycoprotéine IV.

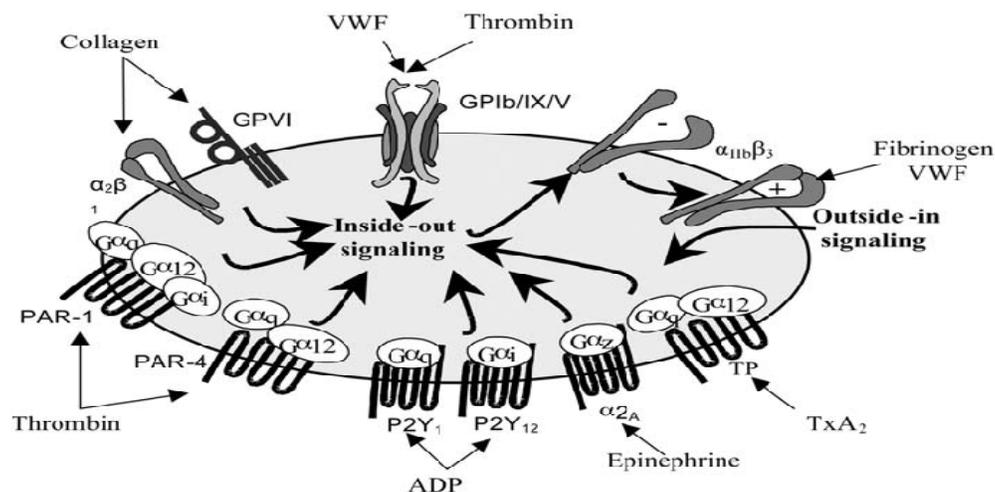
**Le cytosquelette :** Le cytosquelette plaquettaire est majoritairement constitué de filaments d'actine, de rares filaments intermédiaires et d'un anneau périphérique de microtubules qui assurent la forme discoïdale des plaquettes au repos. L'actine se présente sous deux

formes : à l'état de monomère (G-actine) ou sous forme de filaments (F-actine). On trouve également dans les plaquettes un nombre important de protéines telles que la taline, la profiline, la vinculine, l'ABP (*Actin Binding Protein*) ou la gelsoline qui peuvent se lier à l'actine. L'interaction de certaines de ces protéines avec les domaines intracellulaires des glycoprotéines enchâssées dans la membrane plasmique assure la stabilité membranaire et l'ancrage des filaments d'actine à la membrane (17). Le cytosquelette d'actine joue un rôle majeur dans les mécanismes de régulation plaquettaire. La stimulation des plaquettes par un agoniste induit une importante polymérisation d'actine et une réorganisation de ce cytosquelette. Ce processus est régulé par les protéines se liant à l'actine, par les phosphoinositides et par les protéines kinases régulées par les petites protéines G de la famille Rho.

La figure 1 et le tableau 1 présentent les récepteurs plaquettaires à la surface des plaquettes, ainsi que leurs ligands et leurs fonctions principales.

## Figure 2 : Récepteurs plaquettaires

Tiré de Rivra, J. Losano, M.L. *Haematologica*. 2009-94(5) :700-11



**Tableau 1 : Récepteurs plaquettaires, leurs ligands et leurs fonctions biologiques**

Tiré de Lisa K. Jennings, Am J Cardiol. 2009 ;103 (4A-10A)

Récepteurs	Ligands	Fonction biologique
GP Ia/IIa ( $\alpha_2\beta_1$ , VL2-A)	Collagen	Adhesion
GP Ib/IX/V	von Willebrand factor	Adhesion
GP Ic/IIa ( $\alpha_5\beta_1$ )	Fibronectin	Adhesion, stabilizing GPIa/IIa
GP IIb/IIIa ( $\alpha_{IIb} \beta_3$ )	Collagen, fibrinogen, Fibronectin, vitronectin, Von Willebrand factor	Aggregation, but with a secondary role in adhesion conditions of high shear stress
GP IV	Thrombospondin	Adhesion
GP VI	Collagen	Signal transduction, activation
Vitronectin ( $\alpha_v \beta_3$ )	Thrombospondin, Vitronectin	Adhesion
VLA-6 ( $\alpha_6 \beta_1$ )	Laminin	Adhesion

**2.2. Les fonctions plaquettaires**

Le rôle principal des plaquettes est de maintenir l'intégrité des vaisseaux sanguins à travers l'hémostase (19). Les mécanismes qui sont responsables de la formation d'un thrombus plaquettaire artériel sont les mêmes mécanismes qui sont impliqués dans

l'hémostase physiologique (20). Les plaquettes circulants peuvent différer en taille et en potentiel hémostatique (19, 21). L'activation des plaquettes leur permettent ensuite d'adhérer, de sécréter et d'agréger (22). Le risque de l'athérosclérose coronarienne est surtout lié au risque de déclenchement du processus thrombotique à la surface d'une plaque rompue. L'exposition de cette surface thrombogène induit l'adhésion des plaquettes circulantes. Ceci implique différents récepteurs membranaires plaquettaires permettant d'accomplir les fonctions des plaquettes qui sont: le complexe GPIb/IX/V, un récepteur principal pour le vWf, la GPIIb/IIIa qui lie le fibrinogène quand il est activé, et la P-sélectine qui permet aux plaquettes d'interagir avec plusieurs types cellulaires (23-25).

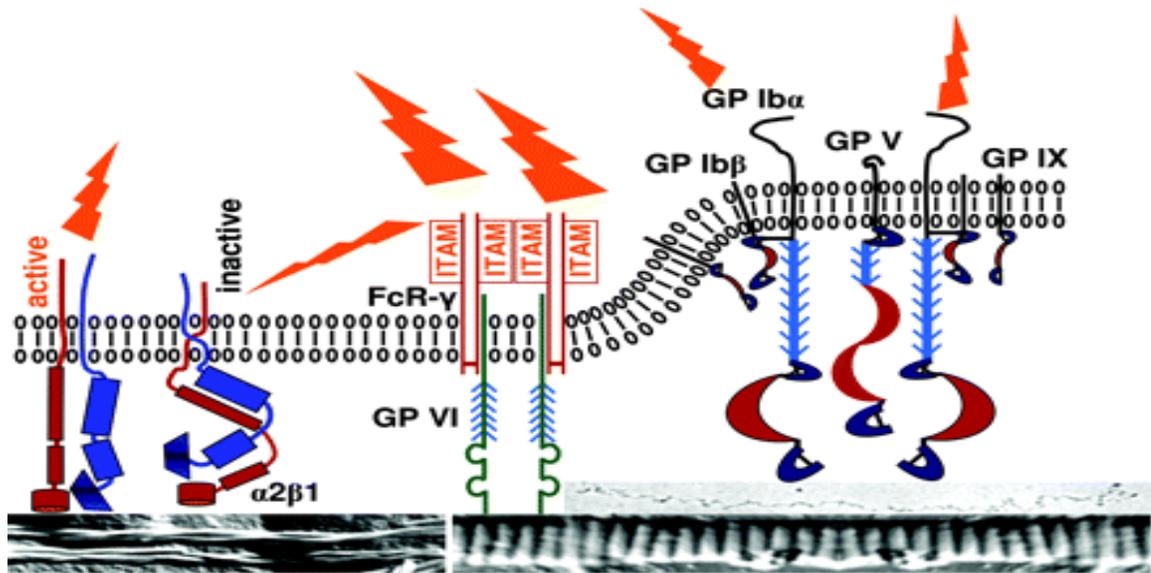
### **2.2.1. L'adhésion plaquettaire**

Les plaquettes adhèrent fortement et fermement aux structures conjonctives du sous-endothélium, et particulièrement aux fibrilles de collagène. Le collagène a plusieurs caractéristiques structurelles et diverses fonctions, c'est une famille de protéines qui consiste en 28 différents types de collagènes et synthétisé par plusieurs types cellulaires comme les macrophages, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les kératinocytes, les cellules épithéliales et les fibroblastes (26). Dans les vaisseaux sanguins, le collagène constitue 40% des protéines (27) et maintient l'intégrité et l'élasticité des vaisseaux. Tous les types de collagène en forme polymérique peuvent induire l'agrégation plaquettaire *in vitro*. Le collagène de type I, III et IV sont les plus réactifs aux plaquettes et peuvent induire l'adhésion ainsi que l'agrégation plaquettaire (28). Suite à un endommagement endothélial, le collagène de types I et III s'expose aux plaquettes et dans certains vaisseaux

le collagène se retrouve dans la matrice sous endothéliale (29), ce qui amène à l'adhésion des plaquettes, le roulement, l'attachement, l'activation, la propagation et la formation du thrombus (30). L'exposition du collagène sous endothéliale et du vWf aux sites des lésions vasculaires induit l'adhésion des plaquettes pour initier la formation du thrombus. L'attachement du collagène au vWf interagit avec les plaquettes à travers le complexe GPIb/IX/V et l'intégrine GPIIb/IIIa. Les plaquettes interagissent avec le collagène sous endothélial dépendamment des forces de cisaillement élevées et faibles (31). Les événements qui règlent les fonctions plaquettaires sont influencés par l'écoulement du sang. La vitesse du sang proche de la paroi vasculaire est plus faible que dans le centre du vaisseau sanguin et cette différence induit un effet de cisaillement entre les couches adjacentes du sang. Le cisaillement est la conséquence du mouvement parallèle relative entre le fluide luminal, tandis qu'il est très fort sur la surface luminale et diminue progressivement vers le centre du vaisseau. Le taux de cisaillement "shear rate" est la différence de la vitesse de l'écoulement relativement à la distance de la paroi vasculaire et s'exprime en centimètre/seconde ou ( $s^{-1}$ ). Sous la force de cisaillement élevée, les plaquettes interagissent avec le collagène attaché au vWf à travers le complexe GPIb/IX/V et subséquemment s'activent par la liaison au GPVI (32). Le vWf accélère l'adhésion des plaquettes sous l'écoulement aux surfaces du collagène (33). Cependant, sous la force de cisaillement faible, le collagène lie le GPIa/IIa suite à la liaison avec le GPVI. Le GPVI et le GPIb/IX/V peuvent lier le vWf avant l'activation des plaquettes, pendant que le GPIIb/IIIa et le GPIa/IIa ont besoin de l'activation plaquettaire pour pouvoir se lier au vWf et au collagène (34). Le GPIa/IIa est un récepteur plaquettaire important et induit l'adhésion

des plaquettes au collagène. La concentration du vWf dans le plasma et la quantité du récepteur GPIa/IIa à la surface des plaquettes établit une corrélation avec l'adhésion des plaquettes humaines et le collagène de type I et III. Le vWf contenu dans le plasma et son récepteur à la surface des plaquettes, le GPIb/IX/V, participent à l'adhésion des plaquettes au collagène sous des forces de cisaillement élevées ( $>1000 \text{ s}^{-1}$ ) (35, 36). L'adhésion plaquettaire est la première réaction morphologique observée dans la séquence des réactions plaquettaires ou la première ligne de défense du corps lors d'un endommagement du vaisseau sanguin. La thrombo-résistance est une propriété liée à la nature de l'endothélium et sa capacité à sécréter des substances inhibitrices de l'activité plaquettaire tels que le monoxyde d'azote (NO), le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF), la prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ), et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) (24) et l'ecto-ADPase (37). De même, les chaînes de sulfate d'héparane des protéoglycanes présentés à la surface des cellules, ont la capacité de lier l'antithrombine III, l'inhibiteur principal de la thrombine, ainsi augmente son activité anticoagulante. Alors que les plaquettes dépassent les mesures ou les mécanismes de régulation, la réaction plaquettaire pourra continuer et former enfin une oblitération partielle ou totale (thrombose) dans les vaisseaux sanguins ou dans les cavités cardiaques.

**Figure 3 : Un schéma qui représente les mécanismes de l'adhésion plaquettaire au collagène.** Tiré de Ruggeri, Z.M. et al, Adhesion mechanisms of platelet function. *Cir Res* 2007; 100:1673-1685



### 2.2.2. L'activation plaquettaire

L'activation plaquettaire est une propriété importante des plaquettes en réponse à une stimulation. Normalement, les plaquettes circulent dans le sang sous une forme discoïde. Suite à leur activation, les plaquettes deviennent plus globulaires et forment des filopodes. Après l'adhésion, les plaquettes sont activées par le collagène sous-endothélial et par la thrombine générée à leur surface. Les plaquettes interagissent avec le collagène par le GPIa/IIa et avec la thrombine par son récepteur fonctionnel. La thrombine active les plaquettes par l'intermédiaire de protéines G couplées au récepteur de la thrombine (protéine Gp, qui active la phospholipase C (PLC) et protéine Gi, qui inhibe l'activité de

l'adénylate cyclase (AC) et réduit le taux d'AMPc). L'augmentation du calcium cytosolique et l'activation de la protéine kinase C ont pour conséquence l'activation de la phospholipase A, qui transforme l'acide arachidonique (AA) des phospholipides membranaires en prostaglandines (PG) G<sub>2</sub>, puis en PGH<sub>2</sub> par la cyclo-oxygénase. Le PGH<sub>2</sub> est converti en TXA<sub>2</sub>. L'activation plaquettaire entraîne la contraction des microtubules et la libération du contenu des granulations endogènes. Les granules denses fusionnent d'abord avec la membrane et libèrent leur contenu, notamment l'ADP, qui est un activateur secondaire et un agent agrégeant, qui va recruter les plaquettes naïves au niveau de la lésion vasculaire. L'activation plaquettaire déclenche des réponses telles que l'adhésion ou la sécrétion ou l'agrégation plaquettaire, que ce soit par des forces de cisaillement élevées, ou par un endommagement ou dysfonction endothéliale ou par un agoniste.

### **2.2.3. L'agrégation plaquettaire**

Les syndromes coronariens aigus, l'angine stable et instable, et l'infarctus du myocarde impliquent l'occlusion partielle ou totale d'une artère coronaire, souvent athérosclérotique, par un thrombus, dont la composante primordiale est l'agrégat plaquettaire. L'agrégation des cellules est un processus physiologique permettant à deux cellules un contact étroit, afin de résister aux forces de cisaillement et interagir chimiquement. L'agrégation des plaquettes est une réaction physiologique très importante dans le maintien de l'hémostase vasculaire et dans la physiologie de multiples pathologies. Il est important de noter que la composition d'un thrombus sur une surface artérielle est

composée principalement des plaquettes (38). Le contact des plaquettes sur la surface thrombogénique mène à leur adhésion qui forme un amas de plus en plus cohésif. Les plaquettes s'accumulent au niveau du thrombus proportionnellement aux forces de cisaillement rencontrées. Différentes agonistes sont impliquées dans le développement et la formation du thrombus, que ce soit pour initier, propager ou stabiliser sa formation. 1) la concentration de l'ADP observée au niveau des thrombus exposées à des forces de cisaillement est inversement proportionnelle à l'intensité des forces de cisaillement rencontrées ( $4.5 \mu\text{M}$  à  $100 \text{ s}^{-1}$  et  $0.75 \mu\text{M}$  à  $1500 \text{ s}^{-1}$ ). La concentration minimale requise pour déclencher le changement de forme et l'agrégation plaquettaire irréversible est d'environ  $0.2$  et  $1.0 \mu\text{M}$ , dans le plasma riche en plaquette (PRP). Tandis que les concentrations en ADP au niveau du thrombus sont légèrement supérieures aux concentrations minimales requises pour déclencher l'activation plaquettaire, ce qui suggère que l'ADP joue un rôle primordial dans la formation des thrombus (39). 2) la concentration de  $\text{TXA}_2$ , au niveau du thrombus est aussi inversement proportionnelle aux forces de cisaillement ( $61.2 \text{ nM}$  à  $100 \text{ s}^{-1}$  et  $12.9 \text{ nM}$  à  $1500 \text{ s}^{-1}$ ) et augmente avec la taille du thrombus. La  $\text{TXA}_2$  pourrait exercer un rôle important dans la progression de la formation du thrombus en potentialisant l'activation induite par d'autres agonistes (39). 3) la formation de thrombine est proportionnelle à l'importance des forces de cisaillement et la concentration de thrombine varie entre  $140$  et  $279 \text{ U/mL}$  au niveau du thrombus, ce qui suggère que la thrombine est le plus important agoniste dans la formation du thrombus (40).

L'implication d'une activité lectine dans le processus de l'agrégation plaquettaire fut pour la première fois décrite en 1978 par Gartner et coll. Ils démontrèrent que différents

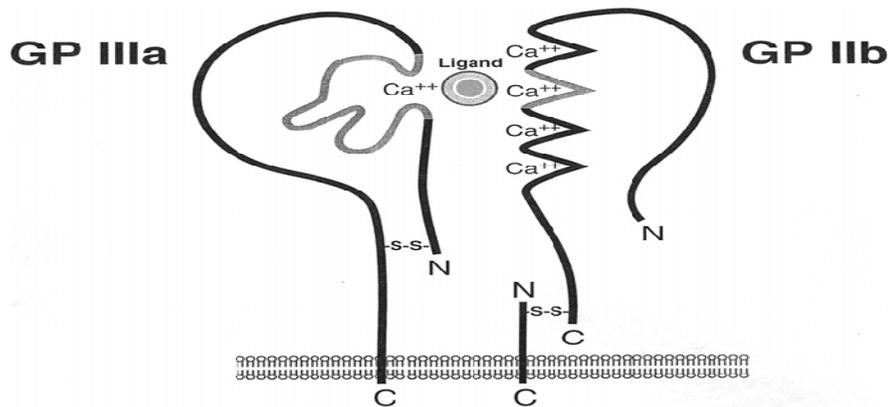
types de glycosides parvenaient à inhiber l'agrégation plaquettaire induite a la thrombine (41). Une protéine plaquettaire contient un domaine lectine à son extrémité NH<sub>2</sub>, lui permettant d'interagir avec ses ligands. La P-sélectine joue un rôle important et défini dans l'agrégation plaquettaire au niveau de la taille et la stabilité des agrégats plaquettaires et dans l'intensité de la réponse (42, 43). Les neutrophiles, en liant la P-sélectine par l'intermédiaire du PSGL-1, favorisent la sécrétion de TXA<sub>2</sub> et accentuent l'agrégation plaquettaire (44). La P-sélectine participerait aussi à l'agrégation plaquettaire induite par le vWf et le ristocetin (45) ou de fortes forces de cisaillement (46). L'agrégation plaquettaire induite dans les premières périodes (10-20 secondes) avec une force de cisaillement élevée a cours sans que les plaquettes soient vraiment activées, car les plaquettes expriment une petite quantité de P-sélectine et dénotent une faible activation de GPIIb/IIIa et ces agrégats ne sont pas stables et peuvent se désagréger (47). Avec des forces de cisaillement plus prolongées (>20 secondes), les plaquettes s'activent et agrègent d'une manière irréversible. Il semble que le TXA<sub>2</sub> joue un rôle primordial dans l'établissement des conditions optimales à l'obtention d'agrégation irréversible, possiblement en maintenant la GPIIb/IIIa dans sa conformation active (48). Le fait que les récepteurs de la thrombine, *Protease activated receptors* ou PARs, ont plusieurs signaux intracellulaires, résultant en une capacité de formation de TXA<sub>2</sub> propre à chaque PAR, suggère que les PARs aient chacun un rôle particulier au cours de l'agrégation plaquettaire. Les PAR1 sont plus importants au cours des étapes initiales de l'agrégation plaquettaire, tandis que les PAR4 jouent un rôle dans l'irréversibilité de l'agrégation à la thrombine, bien que la stimulation individuelle des PARs mène à une agrégation complète. L'agrégation plaquettaire semble associée à

l'affinité de GPIIb/IIIa (Figure 4) pour le fibrinogène (49). Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la stabilisation de l'agrégat plaquettaire, et dépendent de la signalisation suite à la liaison d'une molécule de fibrinogène à une GPIIb/IIIa. Les signaux intracellulaires de la GPIIb/IIIa sont influencés par son affinité (son état d'activation) et son avidité (formation d'amas de GPIIb/IIIa dans la membrane) (50, 51). La liaison du fibrinogène au GPIIb/IIIa mène à plusieurs événements :1) une réorganisation du cytosquelette, 2) une augmentation de calcium intracellulaire, 3) une élévation du pH intracellulaire, 4) une hydrolyse des lipides membranaires, 5) une activation du métabolisme des phospholipides, 6) une activation de divers tyrosines et sérines-thréonines kinases comme le PKC, et 7) la synthèse de Pi (PhosphoInositide).

Le fibrinogène lie une GPIIb/IIIa d'une plaquette activée, et lie aussi une autre GPIIb/IIIa et forment entre ces deux plaquettes un pont de fibrinogène. Ce pont formé entre deux plaquettes par l'intermédiaire du fibrinogène et de la GPIIb/IIIa constitue la dernière étape de l'agrégation plaquettaire dépendant des mécanismes intracellulaires par des différents agonistes (52, 53).

#### Figure 4 : Structure d'une glycoprotéine plaquettaire GPIIb/IIIa

Tiré de Phillipis DR, Scarborough RM. Clinical Pharmacology of Eptifibatide. Am J Cardiol 1997;80 (suppl 4A);11B-20B



### 2.3. Les molécules d'adhésion plaquettares

Les études et l'analyse de la présence de différentes molécules d'adhésions sur la surface des plaquettes en état de repos, et en état activé, sont étudiées en base fondamentale sur la participation des plaquettes dans les troubles de l'hémostase vasculaire et les troubles thrombotiques. Plusieurs molécules peuvent induire un signal suite à l'engagement et /ou à la reconnaissance de son ligand. L'étape première qui mène à la formation du thrombus hémostatique est l'adhésion plaquettaire qui est en lien direct et étroit avec les différentes molécules d'adhésions. Le rôle des molécules d'adhésion plaquettares et des protéines de la matrice extracellulaire dans plusieurs processus pathologiques, comme l'angiogenèse, le thrombus, l'apoptose, la migration cellulaire et la prolifération sont très importants et bien documentés. Ce processus peut attribuer à plusieurs maladies aiguës et chroniques, telles que le métastase, l'angine de poitrine instable, l'infarctus de myocarde, l'accident

vasculaire cérébral, une large partie des maladies inflammatoires, et le remodelage vasculaire. Les molécules d'adhésion solubles sont des marqueurs potentiels diagnostiqués pour les leucocytes, les plaquettes et pour l'endommagement endothélial. Le développement des cibles thérapeutiques et diagnostiques est basé sur le rôle clé des molécules d'adhésion dans les interactions cellulaires. Plusieurs processus physiologiques, incluant l'activation cellulaire, la migration, la prolifération et la différenciation, ont besoin d'un contact entre les cellules et la matrice extracellulaire. Donc les récepteurs adhésifs sont divisés en deux grandes catégories : 1) les récepteurs qui sont responsables des premiers contacts entre les plaquettes et la matrice sous endothéliale et 2) les récepteurs de stabilisation qui sont impliqués quand les plaquettes deviennent activées (54). Les principales protéines d'adhésion qui se trouvent sur la matrice sous-endothéliale sont les différents types de collagènes, le vWf, et la fibronectine. Les récepteurs d'initiation sont: 1) le GPIb/IX/V, un récepteur qui lie le vWF, 2) l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  (GPIa/IIa), qui reconnaît le collagène, 3) le GPIV et le GPVI qui reconnaissent aussi le collagène, et 4) le  $\alpha_5\beta_3$ , un récepteur de la vitronectine. Ces récepteurs jouent un rôle important dans l'adhésion plaquettaire et déclenchent ensuite l'activation plaquettaire (24). Les récepteurs de stabilisation sont: 1) l'intégrine  $\alpha_2\beta_3$  (GPIIb/IIIa), qui existe en grande quantité et qui est le récepteur plaquettaire pour le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine, la thrombospondine et le vWf, et participe à l'adhésion et l'agrégation plaquettaire (23) et 2) la P-sélectine, qui s'exprime suite à l'activation plaquettaire et qui est impliquée dans la liaison des plaquettes aux neutrophiles et aux monocytes en liant son ligand, le PSGL-1.

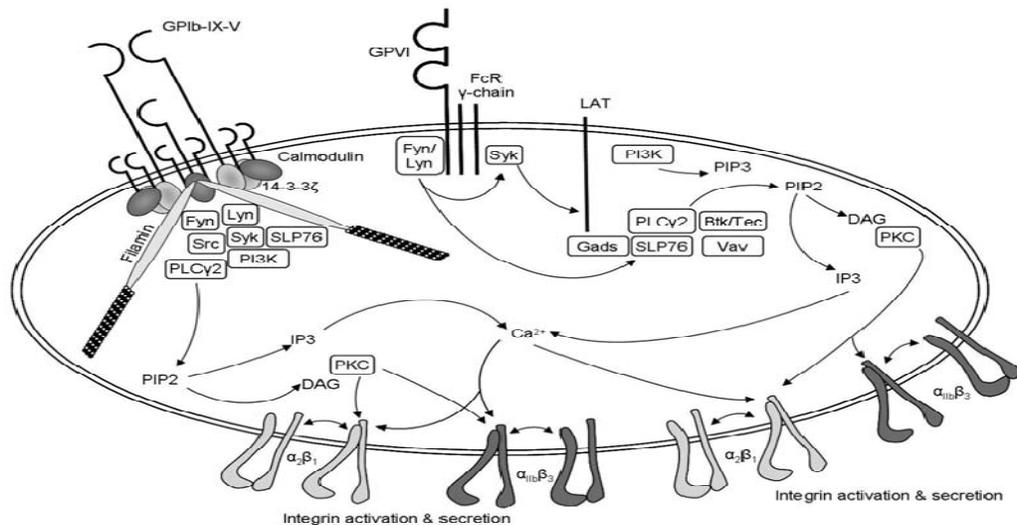
La **GPIa/IIa** ( $\alpha_2\beta_1$ ) interagit avec le collagène en présence d'ions magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et cette interaction peut être inhibée par des ions calcium ( $Ca^{2+}$ ). Cette protéine a une forme hétérodimérique et appartient à la famille des  $\beta_1$  intégrines ( $\alpha_2\beta_1$ ). La GPIa/IIa est considérée comme le principal récepteur plaquettaire de la plupart des types de collagène sous conditions statiques et de flot (55, 56). L'interaction de la GPIa/IIa et le collagène peut établir l'adhésion plaquettaire sous des forces de cisaillement faibles.

Le complexe **GPIb/IX/V** (Figure 5) est formé de quatre sous-unités transmembranaires: la GPIb $\alpha$ , la GPIb $\beta$ , la GPIX et la GPV, chacune de ces protéines représente un membre de la famille des protéines riches en leucine (57). Le GPIb a un poids moléculaire de 170 kDa, et formé de deux sous unités, la GPIb $\alpha$  de 135 kDa et la GPIb $\beta$  de 25 kDa. Elles sont reliées par un pont disulfure entre leurs deux domaines extracellulaires. Les sous-unités de GPIb/IX/V contiennent des séquences répétitives de 20-29 résidus riches en leucine. La sous-unité GPV consiste en 15 motifs riches en leucine et d'une région intra cytoplasmique de 16 AA. Le GPV interagît avec le complexe GPIb/IX grâce à l'interaction non covalente avec le GPIb $\alpha$ . Ainsi que l'interaction de la GPIb $\alpha$  avec le vWf déclenche des signaux intracellulaires qui amènent à l'activation plaquettaire, l'intégrine GPIIb/IIIa et enfin à l'agrégation plaquettaire. Sous des forces de cisaillement élevées, l'adhésion plaquettaire à la matrice sous-endothéliale dépend de la liaison du complexe GPIb/IX/V au vWf lié aux protéines de la matrice sous-endothéliale (58). Le complexe GPIb/IX/V a plusieurs fonctions au niveau de l'hémostase vasculaire, notamment le déclenchement des voies de signalisation qui amènent à l'activation de la GPIIb/IIIa, il reconnaît la thrombine et participe à l'activation plaquettaire, induit l'adhésion des plaquettes activées à

l'endothélium et l'adhésion des plaquettes non activés à l'endothélium activé, il entraîne un changement au niveau intracellulaire et à la morphologie des plaquettes. Il interagit aussi avec la  $\beta_2$ -intégrine des leucocytes, qui contribue au recrutement des leucocytes au sein des thrombus et aux sites des lésions vasculaires (59).

### Figure 5 : Voies de signalisation à travers GPVI et le complexe GPIb/IX/V

Tiré de Gibbins, J.M. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. J Cell Sci 2004 :117 :3415-25



Les sélectines sont des récepteurs adhésifs transmembranaires qui se trouvent sur les leucocytes, les cellules endothéliales et les plaquettes activées (60), et qui consistent en trois CAMs (*Cell Adhesion Molecules*) unifiés structurellement de L (Lectin), EGF-like (E) et le LEC-CAMs (*binding-like domains*). Fonctionnellement, les sélectines sont unifiées par leur capacité d'arbitrer les liaisons cellulaires à travers les interactions entre leurs domaines riches en lectines et "cell-surface carbohydrate ligands" (61). On distingue trois

sélectines, la L-sélectine qui est la plus petite des sélectines et se retrouve exprimée constitutivement à la surface des leucocytes, la E-sélectine qui se présente à la surface des cellules endothéliales activée par un mécanisme de synthèse de novo et la P-sélectine qui se retrouve dans les granules  $\alpha$  (62) et denses (63, 64) des plaquettes et dans le corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales (62).

Quand les plaquettes sont activées, la P-sélectine s'exprime rapidement à la membrane plasmique des plaquettes et des cellules endothéliales (65-70). La P-sélectine est constituée de 789 acides aminés, et se retrouve sous trois formes, la forme monomérique, la forme homodimérique et la forme hétérodimérique en association avec une protéine de 81 kDa encore mal caractérisée (71). Le niveau de la P-sélectine qui s'exprime à la surface des plaquettes à l'état de repos se situe entre 500 et 2400 exemplaires, et après une activation plaquettaire par la thrombine, on remarque qu'à peu près de 7500 à 12000 molécules de P-sélectine s'expriment à la surface des plaquettes (72-74). En se basant sur ces études, on peut voir l'augmentation de la P-sélectine de l'ordre 6 à 7 fois exprimées à la surface des plaquettes suite à l'activation cellulaire par la thrombine.

### **3. Thrombose et maladies cardiovasculaires**

Les maladies coronariennes englobent, entre autres, l'angine de poitrine, l'athérosclérose, et l'infarctus du myocarde, dont la pathologie implique l'occlusion partielle ou totale d'une artère coronaire, souvent athérosclérotique, par un thrombus et dont la composante primordiale est l'agrégat plaquettaire. Basé sur les symptômes, on distingue trois phases pour la progression des maladies coronariennes : la phase

préclinique, stable et instable. La phase préclinique est caractérisée par une manifestation bénigne de la maladie et ne démontrant pas assez de symptômes pour être caractérisé par des manifestations cliniques. La thérapie antiplaquettaire est utilisée dans ces cas, soit par la prise des médicaments tels que l'aspirine à des doses 75-100 mg par jour. Un suivi de la pression artérielle est alors considéré pour ces patients dans le but de prévenir les risques d'hémorragies au niveau cérébral. Les traitements considérés dans ces cas sont à la base préventive et implique le contrôle d'une bonne diète, et l'utilisation de médicaments tels que les statines dans les cas de patients ayant un taux de cholestérol élevé et qui sont donc à risque de développer une thrombose ou une rupture de plaque athéromateuse. Chez les patients ayant des maladies cardiovasculaires et à risque élevé de former une thrombose, on a recours à une thérapie de combinaison de médicaments tels que l'aspirine et le warfarine (75, 76).

La phase stable des maladies coronariennes est caractérisée par des symptômes prévisibles chez les patients qui développent les phases précoces de l'angine de poitrine. Généralement, cette phase de la maladie est démontrée par la présence d'une ou plusieurs lésions vasculaires réduisant ainsi la lumière de ceux-ci d'au moins 75%. Les patients souffrants de maladies coronariennes stables reçoivent de l'aspirine à des doses 75-325 mg par jour (77) ou le clopidogrel à 75 mg par jour. Les personnes ayant des maladies coronariennes bien établies prennent aussi des statines, tels que le Simvastatin, et le Paravastatin. De plus, ces patients reçoivent des bêtabloqueurs ayant pour but de réduire les symptômes d'angine de poitrine. D'autre part, le contrôle de la pression artérielle est atteinte par l'utilisation des inhibiteurs ACE (*Angiotensin-Converting Enzyme*) et des

bloqueurs du récepteur de l'angiotensine II (78). Les patients atteints d'angine de poitrine stable sont supposés prendre de l'aspirine et du clopidogrel dépendamment de la contre-indication (77).

Finalement, la troisième phase des maladies coronariennes est la phase instable, et fait l'objet de plusieurs recherches. Les symptômes impliqués dans cette phase sont subdivisés en 1) l'angine instable, 2) l'infarctus du myocarde, et 3) la mort cardiaque ischémique. L'angine instable est caractérisée par la manifestation des symptômes de l'angine au repos et un changement dynamique dans l'électrocardiogramme (79). Par contre, il faut noter que chez certains cas, la déstabilisation d'une plaque athéromateuse et la formation du thrombus peut rapidement manifester les symptômes de l'angine. En ce qui concerne l'infarctus de myocarde, ce dernier est diagnostiqué par l'élévation de la créatinine phosphokinase ainsi que l'apparition d'une nouvelle onde Q visible sur l'électrocardiogramme. Dans le cas de l'infarctus de myocarde caractérisé par l'élévation de l'onde ST, des dommages myocardiques se produisent en conséquence à une lésion ischémique aigue se trouvant à l'épicentre de l'infarctus. Cette région de lésion contient peu de cellules inflammatoires ainsi présentant une zone qui peut subir une nécrose ou apoptose. Dans le cas de l'infarctus qui n'est pas associé à une élévation de l'onde ST, la nécrose et l'apoptose des cardiomyocytes ne sont pas liées aux cellules inflammatoires.

Le traitement des syndromes coronariens aigus de type non liées à l'élévation de ST reçoivent l'aspirine à une dose de 325 mg par jour ainsi qu'un antagoniste de GPIIb/IIIa (80). Le clopidogrel, un inhibiteur des récepteurs de P2Y<sub>12</sub> des plaquettes, peut réduire l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP (81). La combinaison du clopidogrel et

l'aspirine, bloqueurs de la voie des cyclo-oxygénases et du récepteur de P2Y<sub>12</sub> respectivement, a également démontrée une réduction significative des symptômes sévères des maladies coronariennes aiguës.

L'activité plaquettaire est particulièrement impliquée dans les complications thrombotiques suite à l'intervention coronarienne percutanée, telle que dans les placements de stents. Or, l'aspirine et le clopidogrel sont couramment administrés chez les patients subissant de telles opérations. Également, les antagonistes de GPIIb/IIIa intraveineux sont généralement utilisés tels que l'abciximab, le Tirofiban et l'Eptifibatide (82). De plus, ces patients ont besoin d'héparine ou d'inhibiteurs de thrombine. Une autre complication suite à une telle intervention est la resténose. Généralement, une combinaison d'aspirine et de clopidogrel est recommandée pour prévenir les risques de thromboembolie suivant ces interventions.

#### **4. Les antiplaquettaires**

Les réactions plaquettaires représentent la phase initiale dans les troubles hémostatiques aux sites des lésions vasculaires. Elles participent aussi à la formation de thrombus, en aboutissant à l'infarctus du myocarde, les congestions cérébrales et les thromboses vasculaires périphériques. En conséquence, de puissants inhibiteurs de la fonction plaquettaire ont été développés dans les récentes années. On note plusieurs agents antiplaquettaires:

##### **4.1. Les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase**

**L'aspirine** ou **l'acide acétylsalicylique** est la substance active de nombreux médicaments aux propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. Elle est largement utilisée aussi comme antiplaquettaire. L'aspirine est l'ester salicylé de l'acide salicylique. Elle est rapidement hydrolysée in vivo en acétate et salicylate. Dans les années 1970, des chercheurs ont démontré que l'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) inhibent la synthèse des prostaglandines à partir de l'AA (83). La prostaglandine endopéroxyde synthétase (PGHS) ou cyclo-oxygénase (COX) est l'enzyme clé de cette cascade enzymatique qui aboutit à la formation des prostaglandines. Elle possède deux sites catalytiques : le premier qui a une activité cyclo-oxygénase et transforme l'arachidonate en prostaglandine  $G_2$  ( $PGG_2$ ) et le deuxième qui a une activité peroxydase et transforme le  $PGG_2$  en prostaglandine  $H_2$  ( $PGH_2$ ). Par la suite, la prostaglandine  $H_2$  se transforme en isomérase spécifiques en prostaglandine  $E_2$ ,  $D_2$ ,  $F_2a$ ,  $I_2$  (prostacycline) et en  $TXA_2$ . L'aspirine bloque les deux enzymes COX-1 et COX-2 en acétylant d'une manière irréversible une molécule spécifique de sérine (SER 530 pour le COX-1 et SER 516 pour la COX-2). Les AINS et l'acide salicylique inhibent le site actif de l'enzyme par des liaisons non-covalentes. L'aspirine est l'inhibiteur préférentiel du COX-1 et a une affinité 150 à 200 fois supérieure à celle pour la COX-2 (84). Bien connu, le COX-1 s'exprime constitutionnellement de façon ubiquitaire dans l'organisme et il assure la synthèse des prostaglandines pour maintenir l'hémostasie. Le COX-1 est aussi impliqué dans la synthèse de prostacycline au niveau de l'endothélium et de  $TXA_2$  au niveau des plaquettes, de  $PGD_2$  au niveau de l'estomac et de  $PGE_2$  au niveau du rein. Par contre, le COX-2 est inductible par des stimuli spécifiques (cytokines, facteurs de croissance) et assure la synthèse de

prostacycline qui a des fonctions de défense de l'organisme (85). L'acide acétylsalicylique agit sur le système immunitaire (86) en stimulant ou en inhibant la production des cytokines (87).

L'effet bénéfique de l'aspirine sur le système cardiovasculaire est relié à son action anti-thrombotique. Les plaquettes vont s'agréger quand elles seront exposées au collagène, l'ADP, l'AA et aux plusieurs médiateurs d'activation. Ces médiateurs pro-coagulants induisent l'augmentation de la production de TXA<sub>2</sub> dans les plaquettes et ensuite amplifient la réponse d'agrégation plaquettaire. L'inhibition de la production de TXA<sub>2</sub> et de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) par l'aspirine résulte en une diminution de la production de TXA<sub>2</sub> qui limite la formation de la thrombose, ainsi que la production de la PGI<sub>2</sub> par les cellules endothéliales. Par conséquent, l'aspirine inhibe le COX qui est nécessaire pour la fonction plaquettaire, et d'autre part les cellules endothéliales vasculaires retiennent leurs capacités de générer des nouveaux COX et récupèrent leurs fonctions après l'exposition à l'aspirine (88). L'aspirine peut aussi exercer son effet anti-thrombotique par l'inhibition de la synthèse de la PGI<sub>2</sub> dans les cellules endothéliales, qui par la suite devrait augmenter la production de NO (89). Aussi, une forte dose d'aspirine diminue la formation de thrombus en améliorant la fibrinolyse (90).

#### **4.2. Les inhibiteurs de la réutilisation de l'adénosine**

**Dipyridamole** : Un médicament qui inhibe la formation de thrombus en combinaison avec l'aspirine. Le ESPP-2 (*European Stroke Prevention Study 2*) a prouvé que chez les patients ayant des maladies cardiaques ischémiques, le Dipyridamole a un effet

similaire à l'aspirine et réduit les accidents cardiovasculaires et aussi, la combinaison du Dipyridamole avec l'aspirine ont un effet double que l'aspirine seul (91). Ils inhibent la synthèse de TXA2 et bloquent son effet sur l'agrégation plaquettaire. Ils inhibent la consommation cellulaire de l'adénosine dans les plaquettes et les cellules endothéliales et en augmentant la concentration extracellulaire en adénosine, inhibe aussi l'enzyme ADA (*Adenosine Deaminase*). Ils inhibent aussi l'enzyme phosphodiesterase en augmentant le niveau de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) et en bloquant la réponse des plaquettes à l'ADP.

L'augmentation du cAMP ou du cGMP (*Cyclic Gunaosine Monophosphate*) intracellulaire peut inhiber l'agrégation plaquettaire. Le Dipyridamole inhibe le cGMP phosphodiesterase dans différents tissus. L'inhibition de l'agrégation plaquettaire est en parallèle avec le niveau de cGMP intra-plaquettaire. Le Dipyridamole augmente le niveau du NO plaquettaire et la sensibilité des plaquettes à la combinaison de NO et de PGI<sub>2</sub> (92, 93). Il inhibe aussi le cAMP phosphodiesterase et induit ainsi une augmentation de cAMP intracellulaire (94). Ainsi, Le Dipyridamole stimule la production de PGI<sub>2</sub> par l'augmentation cellulaire de cAMP (95, 96).

#### **4.3. Les inhibiteurs des récepteurs de l'adénosine diphosphate (ADP)**

**Ticlopidine** : Les plaquettes contiennent deux récepteurs purinergiques, ce sont des récepteurs transmembranaires de types P2Y. Ils sont des récepteurs couplés aux protéines G à 7 domaines transmembranaires. Le récepteur plaquettaire P2Y1 est couplé à une protéine G (Gq). L'ADP active ce récepteur et évoque un changement de la forme des plaquettes et

provoque une agrégation plaquettaire. L'autre récepteur plaquettaire couplé à une protéine G (GI) et quand il est activé par l'ADP inhibe l'adénylate cyclase pour ensuite réduire l'activation plaquettaire. En se basant sur des études récentes, ces récepteurs peuvent être stimulés et activer les plaquettes (97). Le Ticlopidine bloque le GI-couplé à l'ADP.

**Clopidogrel** ou **Plavix**, est un antiplaquettaire qui appartient à la classe de thiényridines et qui a un effet lié au récepteur membranaire des plaquettes à l'ADP. Il inhibe l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP en bloquant d'une façon irréversible le récepteur P2Y<sub>12</sub>, qui est important pour l'agrégation plaquettaire et l'interaction plaquettaire avec la fibrine (98). Le Clopidogrel est indiqué pour la prévention d'accident thromboembolique artériel tel l'infarctus du myocarde et l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs. Il fait une partie du traitement de l'infarctus du myocarde en association avec l'aspirine, et aussi dans la prévention de sténose ou la thrombose des stents endovasculaires. Les plaquettes activées synthétisent le TXA<sub>2</sub> à partir de l'AA et par la suite la libération de l'ADP qui va activer d'autres plaquettes par l'intermédiaire de deux récepteurs purinergiques à 7 domaines transmembranaires : les récepteurs P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub>. Le récepteur P2Y<sub>1</sub> est couplé à une protéine G<sub>αq</sub> qui est responsable de l'initiation de l'agrégation plaquettaire à l'ADP par l'intermédiaire de la mobilisation des réserves de calcium inter-plaquettaire. Le récepteur P2Y<sub>12</sub> couplé à une protéine G<sub>2αi</sub>, complète et amplifie la réponse d'agrégation et stabilise l'agrégat. Le Clopidogrel inhibe l'agrégation plaquettaire causée par l'ADP et bloque d'une façon spécifique et irréversible le récepteur P2Y<sub>12</sub>. Le Clopidogrel n'est pas actif *in vitro*. Il est une pro-drogue qui doit être

métabolisée par plusieurs cytochromes et essentiellement par l'isoforme CYP 3A4 du cytochrome hépatique P450. Le dérivé carboxylé inactif SR26334 bloque le récepteur P2Y<sub>12</sub> d'une façon irréversible et inhibe indirectement l'activation de l'ADP-dépendante de la GPIIb/IIIa (98).

#### 4.4. Les inhibiteurs de la glycoprotéine IIb/IIIa

La glycoprotéine IIb/IIIa s'exprime à la surface des plaquettes, cette glycoprotéine est un récepteur pour le fibrinogène et le vWf. Elle devient activée par un agoniste comme la thrombine, le collagène, ou le TXA<sub>2</sub> pour former ensuite une liaison entre les plaquettes. L'inhibition de cette liaison bloque l'agrégation plaquettaire. Pour cette raison, des études récentes ont développé des agents spécifiques pour bloquer cette liaison. Les antagonistes de GPIIb/IIIa intraveineux les plus utilisés en clinique sont l'abciximab, le Tirofiban et l'Éptifibatide (82). Nous décrivons les caractéristiques de l'abciximab, car il était utilisé dans nos études expérimentales.

**Abciximab (Reopro) :** Un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le récepteur GPIIb/IIIa et inhibe l'agrégation plaquettaire. Il lie aussi le récepteur de la vitronectine ( $\alpha_v\beta_3$ ) exprimé à la surface des plaquettes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Le développement clinique de l'Abciximab a commencé avec la découverte de l'anticorps monoclonale murin 7E3Fc qui est un agoniste dirigé contre le GPIIb/IIIa (99), et cet agoniste a montré effectivement sa capacité à inhiber l'agrégation plaquettaire et à réduire la thrombose artérielle. L'Abciximab est une molécule large avec

un poids moléculaire de 46,615 daltons, a une haute affinité pour le GPIIb/IIIa, et pour cette raison la majorité des molécules d'Abciximab lient les plaquettes en circulant dans le sang. A cause de son long effet clinique, il peut augmenter le risque de saignement (100). L'Abciximab peut lier aussi le MAC-1 ( $\alpha_M\beta_2$  ou CD11b/18) exprimé sur les neutrophiles et monocytes activés.

#### **4.5. Les antiplaquettaires en développement**

**Antagonistes de PAR :** Les manifestations cliniques des maladies athéro-thrombotiques, telles que les syndromes coronaires aigus, les événements cérébraux vasculaires sont les causes majeures de mortalité et de morbidité dans le monde entier. Les plaquettes jouent un rôle essentiel dans les lésions vasculaires, et dans la formation du thrombus pathologique. L'activation des plaquettes est essentielle pour l'hémostase et pour le développement du thrombus pathologique et peut être influencée par plusieurs voies de signalisation. Les principaux agonistes impliqués sont le vWf, l'ADP, le TXA<sub>2</sub> et les voies de signalisation plaquettaires induites par la thrombine (101). Les agents antiplaquettaires oraux courants inhibent le TXA<sub>2</sub> et l'ADP et ils n'affectent pas les voies de signalisation induites par la thrombine via le PAR1 (*Protease-Activated Receptor-1*). Les antagonistes des récepteurs du PAR1 représentent une nouvelle classe d'antiplaquettaire pour le traitement et la prévention des maladies athéro-thrombotiques. La thrombine est considérée le plus puissant activateur des plaquettes (102). La réponse plaquettaire à la thrombine est déclenchée par la famille des GPCRs (*G-Protein-Coupled Receptors*), connu sous le nom PARs, ou les récepteurs à la thrombine. Chez l'humain, on distingue quatre différents types, le PAR1,

PAR2, PAR3 et le PAR4. Le PAR1, PAR3, et PAR4 s'activent par la thrombine, tandis que le PAR2 s'active par la trypsine. Le PAR1 est le principal récepteur à la thrombine au niveau des plaquettes humaines (102). L'inhibition de PAR1 avec le TRA (*Thrombin Receptor Antagonist*) représente une nouvelle approche clinique pour la prévention de la thrombose artérielle (103). L'inhibition de PAR1 n'induit pas le risque de saignement, à cause que le PAR1 n'est pas essentiel pour l'hémostase normale (104, 105).

Le FR171113 est un nouvel antagoniste non peptidique de PAR1, qui est composé de 3-(4-Chlorophenyl)-2-(2,4-Dichlorobenzoylimino)-5-(Methoxycarbonyl Methylene)-1,3-Thiazolidin-4-one, inhibe la formation du thrombus occlusif d'une manière dépendante de dose chez le porc sans prolonger le temps du saignement (106). L'inhibition de PAR1 par le FR171113 n'affecte pas l'activation des plaquettes par l'ADP, en suggérant que l'antagoniste de PAR1 n'affecte pas les voies d'activation plaquettaire nécessaires pour l'hémostase. De plus, l'inhibition de PAR1 n'affecte pas les paramètres hématologiques, tels que le compte plaquettaire (102). La thrombine nécessaire à la transformation du fibrinogène en fibrine est plus importante pour l'hémostase que la thrombine nécessaire à l'activation plaquettaire, suggérant que l'inhibition de PAR1 permet la formation initiale d'une monocouche de plaquettes qui est nécessaire pour l'arrêt de saignements et en même temps bloque la propagation du thrombus.

Le SCH 530348 est un autre agent antiplaquettaire, antagoniste de PAR (107). Le SCH 530348 est un inhibiteur rapide, puissant et inhibe d'une façon dépendante de dose le TRAP qui induit l'agrégation plaquettaire (108). Les essais précliniques ont montré que cet antagoniste de PAR1 bloque la réponse des plaquettes au TRAP (*Thrombin Receptor*

*Activating Peptid*) (107). De plus, le SCH 530348 est inactif dans les essais fonctionnels avec le PAR4 et n'affecte pas les facteurs de coagulation comme le temps de prothrombine. Les études faites sur les singes prouvent que l'administration de SCH 530348 1 mg/kg ou 10 mg/kg n'affecte pas le temps de saignement. Cet agent n'a pas un effet mesurable sur l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, l'AA et le collagène, en suggérant que cet agent n'affecte pas l'activation plaquettaire. Dans une étude préclinique, le SCH 530348 démontre qu'il n'induit pas le risque de saignement et qu'il ne change pas les paramètres hématologiques (109) et en combinaison avec l'aspirine et le clopidogrel, il démontre une diminution des événements cardiaques (109).

### **Les inhibiteurs de la liaison du vWf au GPIIb et l'ARC1779**

La liaison du vWf aux sites des lésions vasculaires et son interaction avec le GPIIb/IX/V contribuent à l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire via la liaison du fibrinogène au complexe GPIIb/IIIa (110). L'interaction de vWf immobilisé avec le GPIIb $\alpha$  s'améliore sous force de cisaillement élevé à travers le changement dans la conformation de domaine A1 du vWf. L'agrégation plaquettaire est bien améliorée sous force de cisaillement élevé chez les patients ayant des maladies coronaires aiguës (111). L'importance de ce processus dans la physiologie plaquettaire a suscité plusieurs chercheurs à développer des antagonistes de la liaison du vWf au GPIIb plaquettaire.

Parmi ces antagonistes, le GPG-290, une protéine recombinante qui est formée de deux acides aminés de la portion N-terminale du GPIIb $\alpha$  couplé au segment Fc d'un IgG1 humain muté. Une étude a démontré que le blocage de l'interaction GPIIb $\alpha$ -vWf par le

GPG-290 est une stratégie efficace pour prévenir la formation du thrombus occlusif dans un modèle canin sous force de cisaillement élevée et n'induit pas une augmentation dans le temps de saignement (112). Le GPG-290 pourrait constituer un nouvel antiplaquettaire pour le traitement et la prévention des maladies coronaires en combinaison, ou non, avec le Clopidogrel (112).

Le 82D6A3, un anticorps monoclonal dirigé contre les acides aminés du domaine A3 du vWf, l'Arg-963, le Pro-981, l'Asp-1009, l'Arg-1016, le Ser-1020, le Met-1022, et le His-1023 (113). le 82D6A3 lie le domaine A3 du vWf, et ainsi il est capable d'inhiber la liaison du vWf aux fibres du collagène de types I et III (114). L'inhibition de l'adhésion plaquettaire au collagène par le 82D6A3 est plus remarquable sous force de cisaillement élevée que sous force de cisaillement faible, ce qui confirme que l'interaction du vWf-GPIb $\alpha$  est plus dominante sous force de cisaillement élevé (113). L'administration de 82D6A3 à 300  $\mu$ g/kg n'induit pas un prolongement du temps de saignement, tandis que l'administration de l'anti GPIIb/IIIa à 300  $\mu$ g/kg augmente le temps de saignement dans une étude faite chez les singes (115). En se basant sur cette étude, le 82D6A3 a été humanisé pour tester son efficacité dans des études cliniques (116).

L'AJvW2/AJW200, un anticorps monoclonal, IgG<sub>4</sub> humanisé, dirigé contre le domaine A1 du vWf (117). Cet anticorps inhibe l'agrégation plaquettaire induite par le ristocetin et le botrocetin chez les humains et les porcs, et n'affecte pas l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, le collagène et le U46619. Aussi, il inhibe l'agrégation plaquettaire sous force de cisaillement élevée, sans affecter l'agrégation sous force de cisaillement faible, ce qui confirme que l'inhibition de l'agrégation sous force de

cisaillement élevée, est une conséquence de l'inhibition de l'interaction de vWf-GPIb $\alpha$ . L'AJvW2 démontre un effet anti-thrombotique puissant chez le porc sans affecter le temps de saignement (117).

L'ALX-0081, une nouvelle molécule dirigée contre le domaine A1 du vWf, a un poids moléculaire de 28,000 Da, réduit la formation du thrombus chez le babouin et inhibe l'agrégation plaquettaire en réponse au ristocetin (118).

L'ARC1779 est un aptamère thérapeutique dirigé contre le domaine A1 du vWf afin d'inhiber sa liaison au récepteur plaquettaire GPIb $\alpha$ . L'ARC1779 est synthétiquement fabriqué couplé au polyéthylène glycol ou (PEG) (poids moléculaire 20 kDa). Il lie le domaine A1 du vWf avec une haute affinité et prévient l'interaction avec le GPIb. L'ARC1779 a un poids moléculaire  $\sim$ 13 kDa (119), il se diffère entre sa structure et son activité (120). Comme il est bien établi que le vWf est un médiateur pour les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques et joue un rôle essentiel dans la thrombogénèse (121), les antagonistes de vWf peuvent agir spécifiquement dans les maladies coronariennes aiguës (119). L'ARC1779 inhibe l'agrégation plaquettaire induite par le botrocetin (122) et il est capable d'inhiber l'adhésion, l'activation plaquettaire provoquée par le vWf et la formation d'un thrombus occlusif. Cependant il n'affecte pas le temps de saignement en comparaison avec l'Abciximab, un inhibiteur de GPIIb/IIIa. L'ARC1779 réduit aussi l'adhésion des plaquettes sur le collagène exposé à la matrice sous endothéliale et réduit la formation du thrombus sur les surfaces des artères dénudées du porc (122). Ainsi, il s'avère que l'ARC1779 achève un effet anti-thrombotique puissant similaire à l'effet de l'Abciximab, sans augmenter les risques de saignement. Dans une étude clinique récente

chez des patients avec purpura thrombotique thrombocytopénique, l'ARC1779 inhibe effectivement l'activité du vWf dans le plasma des patients ayant cette maladie (123).

## **5. Hypothèse et objectifs**

Les médicaments antiplaquettaires occupent une place de choix dans le traitement des pathologies cardiovasculaires. La prise en charge du patient coronarien impose l'usage de telles substances aussi bien à la phase aiguë que chronique. La grande diversité de situations cliniques lors de maladies coronariennes et le nombre important de nouvelles substances antiplaquettaires mises à la disposition du médecin au cours de ces dernières années, rendent l'utilisation pertinente de ces médicaments parfois problématique.

Les antiplaquettaires, tels que l'Aspirine, le Clopidogrel ou l'Abciximab ont largement été validés dans le traitement de la maladie cardiovasculaire au sens large. Malgré l'efficacité démontrée de ces traitements, plusieurs patients présentent de nouveaux accidents vasculaires aigus (coronariens ou autres) et l'incidence de thrombus dans les maladies coronariennes reste élevée. De plus les risques de saignement en association avec ces médicaments sont élevés. La résistance à l'aspirine et au clopidogrel chez certains patients reste encore un problème non résolu et nécessite l'utilisation des traitements alternatifs chez ces patients.

Tel que mentionné dans les sections précédentes, le vWf représente une cible thérapeutique puisque il joue un rôle important dans l'adhésion plaquettaire via son interaction avec la GPIIb, spécifiquement à des forces de cisaillement élevées. Ceci aboutit par la suite à l'interaction de vWf et l'intégrine GPIIb/IIIa en permettant aux plaquettes de

s'arrêter d'une manière définitive et d'induire la formation du thrombus. Ainsi, l'hypothèse de notre travail était que l'inhibition de la liaison vWf/GPIb pourra représenter une approche efficace pour inhiber l'adhésion plaquettaire aux sites des lésions vasculaires. Pour valider cette hypothèse, notre objectif est de comparer l'efficacité d'un inhibiteur spécifique de cette liaison l'ARC1779 sur les fonctions plaquettaires en comparaison avec celle de l'Abciximab. Pour se faire, nous avons travaillé avec du sang provenant des patients coronariens sous thérapie double à l'Aspirine et au Clopidogrel. Plus spécifiquement, nos objectifs sont de déterminer le potentiel anti-thrombotique de l'inhibition de la liaison vWf/GPIb par l'ARC1779 et son effet sur l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire.

## Chapitre 2: Article Scientifique

### **An Anti-von Willebrand Factor Aptamer Reduces Platelet Adhesion among Patients Receiving Aspirin and Clopidogrel in an ex-vivo Shear-Induced Arterial Thrombosis**

Dabit Arzamendi, Firas Dandachli, Jean-François Théorêt, Gregory Ducrocq, Mark Chan, Walid Mourad, James C. Gilbert, Robert G. Schaub, Jean-François Tanguay, Yahye Merhi

*Department of Medicine, Montreal Heart Institute (D.A., F.D., J-F.T., G.D., M.C., J-F.T., Y.M.) and CHUM (W.M.), Université de Montréal, Montreal, Canada; and Archemix Corp. (J.C.G., R.G.S.), Cambridge, USA*

## Running Title Page

**Running title:** Anti-vWF and platelet function in coronary patients

**Corresponding author:** Yahye Merhi, PhD, Laboratory of Thrombosis and Haemostasis, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8; Tel: +514 376-3330 ext. 3035, Fax: +514 376-1355.

**Number of text pages:** 24

**Number of tables:** 1

**Number of figures:** 4

**Number of references:** 23

**Number of words in the abstract:** 249

**Number of words in the introduction:** 427

**Number of words in the discussion:** 1076

**ABBREVIATIONS:** CAD, coronary artery disease; vWF, von Willebrand factor; ACS, acute coronary syndromes; MI, myocardial infarction; CEA, carotid endarterectomy; PCI, percutaneous coronary intervention; TRAP-1, thrombin receptor activating peptide-1; ADP, adenosine diphosphate; ACD, anticoagulant citrate dextrose; PBS, phosphate buffered saline; BSA, bovine serum albumin.

**Section:** Cardiovascular

**ABSTRACT**

Anti-platelet therapy in coronary artery disease (CAD) patients reduces recurrent atherothrombosis, but at the cost of increased risk of bleeding. Because von Willebrand factor

(vWF) functions predominantly in a high-shear environment, the vWF-specific aptamer, ARC1779 that blocks the binding of vWF A1-domain to platelet glycoprotein Ib, may deliver a site-specific anti-thrombotic effect while minimizing bleeding risk. We investigated the efficiency of ARC1779 on platelet activation, adhesion, and aggregation in CAD patients on double anti-platelet therapy. Blood from 27 patients taking aspirin and clopidogrel and 5 normal volunteers was labelled with  $^{111}\text{In}$ -autologous platelets and perfused over denuded porcine arteries at high shear rate for 15 minutes. Blood was treated with either 25, 83 and 250 nM ARC1779; 100 nM abciximab or placebo, 5 min before (upstream therapy) or 10 min after (downstream therapy) beginning the perfusion. Under upstream, but not downstream therapy, platelet adhesion was significantly reduced by ARC1779 at 83 and 250 nM and by abciximab vs. placebo (4.8, 3.8 and 2.9 vs. 7.3 platelets  $\times 10^6/\text{cm}^2$ ,  $p < 0.05$ ). In contrast to abciximab, ARC1779 did not significantly affect platelet aggregation in response to thrombin receptor activating peptide-1, arachidonic acid and adenosine diphosphate. In addition, ARC1779 was without any effect on P-selectin expression and platelet-leukocyte binding. Thus, ARC1779 has comparable anti-thrombotic efficacy to abciximab among CAD patients receiving aspirin and clopidogrel, but with lesser systemic effects on platelet activation and aggregation. These important proof-of-concept data form the framework for randomized clinical investigations of this novel anti-platelet therapy among CAD patients.

## Introduction

Anti-thrombotic therapy has been shown to reduce the risk of death and myocardial infarction (MI) from 20 to 4-8% in acute coronary syndromes (ACS) (Anderson et al., 2007). However, it's commonly complicated by major bleeding, which is strongly associated with an increased risk of subsequent mortality (Rao et al., 2005). Therefore, contemporary drug development programs seek to identify molecular targets delivering reduced bleeding risk with preserved anti-thrombotic efficacy.

Upon vascular injury, von Willebrand factor (vWF) promptly interacts with the newly exposed sub-endothelial components, setting in motion the processes of platelet adhesion and aggregation (Reininger et al., 2006; Ruggeri et al., 2006). The A1 domain of vWF reversibly links platelets to the sub-endothelial matrix via an interaction with platelet GPIb $\alpha$ . Following initial platelet capture from flowing blood at the site of vascular injury, platelet GPVI stimulation and GPIIb/IIIa activation ensues, leading to irreversible platelet adhesion, spreading, aggregation and thrombus formation (Ruggeri et al., 2006). High shear stress is necessary and sufficient for vWF to adopt the proper conformation to support platelet adhesion and aggregation. Therefore, in the absence of high shear force vWF is not sufficiently activated and its contribution to thrombogenesis is greatly reduced (Strony et al., 1993; Mailhac et al., 1994).

ARC1779, an aptamer that binds to the A1 domain of activated vWF, inhibits binding of vWF to the GPIb receptor on platelets, inhibiting all of the vWF-mediated activation pathways and potentially blocking pathological thrombosis (Gilbert et al., 2007; Cosmi, 2009). We showed that ARC1779 inhibited botrocetin- and shear force-induced platelet

aggregation. It also reduced adhesion of platelets to collagen-coated matrices, formation of platelet thrombi on denuded porcine arteries, and formation of occlusive thrombi in cynomolgus monkeys (Diener et al., 2009). In a phase I study of 47 healthy subjects, ARC1779 demonstrated a favourable early safety profile with no bleeding complications and only minor adverse events (Gilbert et al., 2007). More recently, it has been shown that ARC1779 potently and specifically inhibits vWF activity and vWF dependent platelet function, even in the setting of acute myocardial infarction where vWF activity is increased (Spiel et al., 2009). Actually, ARC1779 is being evaluated in a phase II clinical study on cerebral micro embolism in patients undergoing carotid endarterectomy (CEA). However, the pharmacodynamic effect of ARC1779 in combination with other commonly used anti-platelet agents is unknown. We therefore sought to investigate the efficiency of ARC1779 on platelet activation, adhesion, and aggregation in the presence of two anti-platelet agents (aspirin and clopidogrel) utilized routinely in clinical practice in coronary artery disease (CAD) patients, as well as in unstable carotid disease.

## **Methods**

**Design of the study and protocol.** The ethics committee of the Montreal Heart Institute approved the study, and all subjects provided written informed consent. This is a single-center, randomized, open-label study in patients undergoing percutaneous coronary intervention (PCI) at the Montreal Heart Institute. Patients were eligible for the study if they were between 18 and 75 years of age, had documented stable CAD defined as prior MI (>90 days) and/or at least one lesion > 50% in a major epicardial artery on angiography,

and were receiving maintenance treatment with dual aspirin 81 mg and clopidogrel 75 mg daily at least 7 days prior to study entry. We excluded patients with a recent episode of ACS (<90 days), stroke within 3 months, malignancies, active bleeding or bleeding diathesis, oral anticoagulation with a coumarin derivate or prothrombin time >1.5 times control, platelet count < 100,000/mm<sup>3</sup>, serum creatinine > 180 mmol/L or liver disease resulting in bilirubin level >2 mg/dl. Healthy volunteers who were not consuming prescription or over-the-counter medications for at least 10 days before blood sampling were selected as the control group.

Blood from CAD patients treated with ASA (aspirin) + Clopidogrel (plavix) were compared to those obtained from normal volunteers. Patients were randomly assigned to upstream or downstream *ex vivo* therapy with ARC1779 or abciximab (Reopro). Treatments for upstream therapy were incubated 5 minutes before the onset of perfusion, whereas those for downstream therapy were administered 10 minutes after the beginning of the perfusion. In each subject, we compared escalating doses of ARC1779 (25, 83 and 250 nM), with abciximab (100 nM) and with placebo. Synthesis, structure and pharmacology of ARC1779 were reported previously (Gilbert et al., 2007; Diener et al., 2009).

**Platelet adhesion.** Platelet isolation and labelling, as well as the perfusion experiments were conducted as described previously (Bienvenu et al., 2001; Diener et al., 2009). Briefly, a 60-ml sample of venous blood from each subject was anti-coagulated with 60 ml of PPACK in saline (50 nM final concentration, Calbiochem, QC, Canada), and a 30-ml with anticoagulant citrate dextrose (ACD, Baxter, Mississauga, Canada). The ACD blood was used to isolate and radiolabel platelets with In<sup>111</sup> and resuspended in the remaining 60

ml of the PPACK blood. Fresh porcine aortas (Aggromex, St-Blaise, Canada) were isolated and denuded by lifting and peeling off the intima to expose the subjacent media. The segments were placed into Badimon perfusion chambers with a 1 mm internal diameter x 10 mm long. The chambers were placed in parallel in a thermostatically controlled water bath at 37°C, thus permitting simultaneous parallel, pair-wise perfusion over arterial tissues of treated or untreated blood at a high shear (6974/sec). Blood (10 ml) was re-circulated over the arterial segments for 15 minutes in the flow chambers. A known GPIIb/IIIa antagonist (100 nM of abciximab or ReoPro, Eli Lilly, Toronto, Canada) and a placebo (physiological saline) were used as controls and ARC1779 was tested at 25, 83 and 250 nM. The arterial segments were then fixed in formalin 1% and placed in polystyrene tubes for gamma counting to quantify platelet adhesion, as described previously (Theoret et al., 2001). After compilation of gamma counting, the arterial segments were prepared and observed by scanning electron microscopy.

**Platelet aggregation.** Blood from each treatment was collected and diluted 1:1 in physiological saline. Platelet aggregation was measured at 37°C in a whole blood lumi-aggregometer (Chrono-log Corporation, Havertown, PA) after the addition of adenosine diphosphate (ADP) 10 µM (Chrono-log), ristocetin 1 mg/ml (Helena Laboratories, Beaumont, TX), arachidonic acid 500 µM (Chrono-log), thrombin receptor activating peptide-1 (TRAP-1 5 µM, Peptides international, Louisville, KY), and collagen (2 µg/ml, Chrono-log). Aggregation was recorded for 10 min and expressed in ohms.

**Platelet activation.** The effects of ARC1779 on platelet activation was evaluated in healthy volunteers, where 50 µl of blood were fixed in 950 µl of PBS-paraformaldehyde

1% for 30 minutes before being centrifuged at 7000g for 15 seconds. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in 50  $\mu$ l of PBS containing BSA. Platelets were labelled with 5  $\mu$ l of a mouse anti-human P-selectin-phycoerythrin conjugated (Becton Dickinson, Clone AC1.2), or a mouse anti-human vWF-unconjugated (Santa Cruz Biotechnology, clone 4F9). Antibodies were allowed to react for 30 min at room temperature and the P-selectin labelled samples were submitted to red blood cell lysis in 1.5 ml of 10 times diluted BD FACS<sup>TM</sup> lysing solution (Becton Dickinson) for 60 min, followed by analysis on a Altra flow cytometer (Beckman Coulter). For vWF labelling, platelets were washed in 1 mL PBS-BSA 0.5% (w/vol) and centrifuged at 7000g for 15 seconds. The platelet pellet was resuspended in 50  $\mu$ l of 40 times diluted goat anti-mouse IgG-fluorescein isothiocyanate secondary antibody (Santa Cruz Biotechnologies), vortexed and incubated for 30 min, before the addition of the erythrocytes lysing solution. The binding of platelets to leukocytes was evaluated using the P-selectin associated fluorescence present in a previously identified CD11b-phycoerythrin (Becton Dickinson, clone D12) positive leukocyte population. An average of 15 000 events were analyzed for the platelet population and 5 000 events for the leukocyte population, as previously described (Theoret et al., 2001).

**Statistical analysis.** Data from the characteristics of the study population were expressed as mean and standard error of mean (SEM) for continuous variables and as total number of patients and percentages for categorical variables. Continuous data were analyzed using a non-parametric one-way ANOVA followed by Dunnett's test and expressed as mean (SEM), while categorical data were analyzed using the chi-square test.

All p-values were two-sided and considered statistically significant if  $< 0.05$ . Statistical analyses were performed with SPSS Version 16 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## Results

**Study population.** The characteristics of the patient population and the healthy controls are summarized in table 1. The mean age of the CAD patient group was  $57.2 \pm 1.5$  years (81.5% male) and the mean age of the healthy volunteer group was  $40 \pm 5.3$  years (20% male). The mean duration of combined aspirin and clopidogrel treatment prior to study entry was  $10 \pm 5$  months.

**Platelet adhesion.** Upstream therapy was used with the blood of 5 healthy volunteers and 17 CAD patients, while blood from the remaining 10 CAD patients was used to assess downstream therapy. As shown in Fig. 1, platelet adhesion was highest when the arterial samples were perfused with blood from healthy volunteers treated with placebo. Platelet adhesion in this group averaged  $81.9 \pm 23.6 \times 10^6$  platelets/cm<sup>2</sup>. Administration of abciximab before perfusion almost completely inhibited platelet adhesion to  $2.2 \times 10^6$  platelets/cm<sup>2</sup>. In the healthy controls, ARC1779 at 25 and 83 nM had no significant effect on platelet adhesion, whereas it significantly reduced platelet adhesion by 89% to  $8.8 \times 10^6$  platelets/cm<sup>2</sup> at 250 nM.

In patients pre-treated with clopidogrel and aspirin and randomized to upstream therapy, a significant reduction in adhesion was observed in perfusions with placebo compared to that observed in healthy volunteers,  $7.3 \pm 1.0 \times 10^6$  platelets/cm<sup>2</sup> vs.  $81.9 \pm 23.6 \times 10^6$  platelets/cm<sup>2</sup>. Treatment of patient blood with ARC1779 at 83 and 250 nM or

with abciximab further reduced platelet adhesion to 4.8, 3.8, and 2.9  $\times 10^6$  platelets/cm<sup>2</sup>, respectively (Fig. 1).

In patients treated with dual anti-platelet therapy in which the downstream therapy protocol was followed, no significant difference was observed in platelet adhesion among the different therapies compared to the perfusion without ARC1779 (Fig. 1).

The results of the adhesion assay were confirmed by scanning electron microscopy visualization of thrombus mass in each of the treatment groups. As shown in Fig. 2, arterial surfaces exposed to the blood of healthy volunteers with placebo, accumulated a heavy thrombotic matrix, which was markedly attenuated when blood from patients treated with aspirin and clopidogrel was used. Thrombus formation was further decreased by both abciximab and ARC1779, given as upstream therapy, with an equal degree of thrombus reduction with both treatments. However, among subjects randomized to downstream therapy, platelet adhesion was similar among placebo, abciximab and ARC1779.

**Platelet aggregation.** The impact of the different treatments on whole blood platelet aggregation in response to different platelet agonists was evaluated and presented in Fig. 3. As expected, the responses to ADP and arachidonic acid were completely prevented in patients on double anti-platelet therapy with aspirin and clopidogrel. Moreover, abciximab abolished platelet aggregation in response to TRAP-1, ADP and arachidonic acid in healthy volunteers and in patients in response to TRAP-1. The response to collagen activation was similar to TRAP-1. In human volunteers, collagen-induced aggregation averaged 18 ohms that was reduced to 2 ohms with abciximab, but unaffected by ARC1779 (18 ohms). In patients, collagen-induced aggregation was reduced to 3 ohms, abolished by abciximab, and

unaffected by ARC1779 (4 ohms). In contrast, ARC1779 had no significant effect on platelet aggregation in response to either TRAP-1, ADP, arachidonic acid or collagen. In response to ristocetin, abciximab and ARC1779 were equally effective in reducing platelet aggregation by 50% only in healthy volunteers. In patients receiving clopidogrel and aspirin, a reduction of ristocetin induced aggregation was observed in the control group and in the group treated with ARC1779, but not with abciximab.

**Platelet activation.** Platelet activation was assessed by the measurement of P-selectin (CD62P) translocation and vWF expression on the platelet surfaces, as well as by the determination of platelet-leukocyte aggregates, in the presence of ARC1779 or abciximab. This was done on blood samples from healthy volunteers after the perfusion experiments. As shown in Fig. 4, neither abciximab nor ARC1779 has a significant effect on P-selectin or vWF expression. Although the binding of platelets to leukocytes increased after blood perfusion (control) in comparison with non perfused blood (baseline), this increase was not significantly affected by ARC1779 or abciximab.

### Discussion

We investigated, in an *ex-vivo* model, the effects on platelet function of escalating concentrations of a vWF antagonist aptamer (ARC1779) in healthy volunteers and in CAD patients receiving aspirin and clopidogrel, and compared it to placebo and abciximab administration. When incubated with the blood before perfusion (upstream therapy), we observed similar levels of reduction in platelet adhesion with the highest dose of ARC1779 (250 nM) and abciximab (100 nM), compared to the placebo group. These results were consistent in healthy volunteers, as reported previously (Gilbert et al., 2007; Diener et al.,

2009), and in patients under dual anti-platelet therapy with aspirin and clopidogrel. In contrast, none of the treatments showed any benefit in the downstream therapy settings. In contrast to abciximab, ARC1779 did not significantly affect platelet aggregation in response to TRAP-1, arachidonic acid and ADP. In addition, ARC1779 was without any effect on P-selectin expression and platelet-leukocyte binding.

Despite their documented clinical benefits, contemporary anti-platelet agents are limited by inter-individual treatment response variability (Maree and Fitzgerald, 2007; Angiolillo et al., 2009; Kuliczkowski et al., 2009), delayed onset of action (Cattaneo, 2006; Steinhubl and Roe, 2007; L'Allier et al., 2008), irreversibility and increased bleeding complications. Thus, current research on anti-platelet therapy is mainly focused on the development of new agents capable of reducing bleeding complications while preserving their anti-thrombotic efficacy. The compatibility of novel anti-platelet therapies with aspirin and clopidogrel must be determined prior to their clinical investigation among patients with ACS and those undergoing PCI or CEA, as these two molecules are considered upstream therapy in such populations (Antman et al., 2008; Van de Werf et al., 2008).

In the present study, we analyzed the effect of ARC1779 alone and in combination with aspirin and clopidogrel. ARC1779 reduced significantly platelet adhesion, even in patients pre-treated with aspirin and clopidogrel. However, no differences were observed on aggregation in healthy volunteers between control group and ARC1779, except when the platelet agglutinating agent ristocetin was used. Compared to healthy volunteers, patients receiving clopidogrel and aspirin demonstrated a reduction in aggregation response to the different tested agonists. However, the addition of ARC1779 did not further attenuate

platelet aggregation. Thus, the effect of ARC1779 is additive to aspirin and clopidogrel in preventing platelet adhesion but not in inhibiting platelet aggregation. We hypothesize that this observation may be explained by the different molecular targets of the three anti-platelet agents used in this study: the anti vWF aptamer binds to the A1 domain of vWF that interacts with the platelet GPIb receptor at high shear rate, while aspirin irreversibly inhibits the cyclooxygenase pathway leading to a reduction in thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) formation from arachidonic acid, and clopidogrel prevents ADP from interacting with the P2Y<sub>12</sub> receptor. When the endothelial layer is disrupted, platelets adhere to newly exposed vWF and collagen via GPIb and GPVI, respectively. Thereafter, they become activated, change shape and secrete secondary mediators such as ADP and (TxA<sub>2</sub>), which in turn induce further platelet activation propagation and thrombus formation (Monroe and Hoffman, 2006). ARC1779 inhibits the initial adhesive contact between the platelet GPIb receptor and extra cellular matrix-bound vWF at high shear, while aspirin and clopidogrel interferes with platelet aggregation, limiting the autocrine/ paracrine activation loop triggered by secreted TxA<sub>2</sub> and ADP during platelet activation (Monroe and Hoffman, 2006). This property may be particularly useful in patients with high platelet reactivity despite treatment with clopidogrel or aspirin, given that ARC1779 offers an alternative pathway of platelet inhibition.

ARC1779 has a rapid onset of action, achieving maximum concentration levels in 7-30 minutes (Gilbert et al., 2007). Hence, in situations where rapid anti-platelet action is needed, as in primary PCI or CEA, ARC1779 might be considered as a promising therapy for future investigation. In this study, we simulated established administration protocols

utilized in clinical practice with abciximab administered before PCI in the emergency room (upstream therapy) or peri-procedurally in the cardiac catheterization laboratory (downstream therapy). Since contradictory results have been observed in recent studies on the administration of abciximab prior to PCI (Ellis et al., 2008; Ortolani et al., 2009), we decided to study the behaviour of ARC1779 in this setting. We observed that, in patients already pre-treated with aspirin and clopidogrel, there was no significant decrease in platelet adhesion with ARC1779 or with abciximab administered as downstream therapy. In contrast, administration of the drug as upstream therapy had an additive effect on the dual anti-platelet therapy, reducing significantly platelet adhesion compared to placebo. This observation should be considered in future protocols of clinical studies with ARC1779.

VWF is active only in the presence of high intravascular shear forces found in stenosed arteries or at the atherosclerotic plaque. Thereby, a vWF antagonist may theoretically avoid hemorrhagic complications normally seen with conventional anti-platelet agents. In our ex-vivo perfusion chamber model, we studied the behaviour of the ARC1779-vWF-platelet interaction in a high laminar shear environment ( $6974 \text{ s}^{-1}$ ) emulating flow conditions in a moderately-stenotic epicardial coronary artery. To assess possible systemic effects of ARC1779, FACS was performed and no differences were observed in platelet vWF and P-selectin expression, and in platelet-leukocyte aggregate formation compared to placebo group. This observation supports the concept of a localized effect of ARC1779, without systemic anti-thrombotic effects. Failure of systemic anti-platelet therapy to remain localized to the primary site of action, the coronary or carotid vasculature, may contribute

to bleeding events, and a site-specific drug may help minimize bleeding. However, this potential benefit has to be confirmed in larger clinical studies powered for clinical bleeding endpoints.

Our study has several limitations. First, this was an *ex vivo* study which may not fully replicate the *in vivo* pharmacologic effects of ARC1779. Second, the relatively small sample size may affect the precision of our pharmacodynamic estimates. Third, CAD patients were on multiple co-medications and the impacts of any potential interactions with ARC1779 are unknown. Fourth, clinical endpoints were not studied, and the effects of ARC1779 on thrombotic and bleeding endpoints will require investigation in larger clinical studies.

In this preclinical study in CAD patients, we showed that an anti-vWF aptamer, ARC1779, has comparable anti-thrombotic efficacy to abciximab among patients receiving aspirin and clopidogrel, but with lesser systemic effects on platelet activation and aggregation. Because vWF functions predominantly in a high-shear environment, ARC1779 may deliver a site-specific anti-thrombotic effect while minimizing bleeding risk. These important proof-of-concept data form the framework for randomized clinical investigations of this novel anti-platelet therapy among coronary patients in the setting of PCI in ACS, or cerebral microembolism post CEA.

### **Acknowledgements**

We are grateful to M. Lyne Mongeon and Dr Maryam Tabrizian for their assistance in scanning electron microscopy.

## References

- Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE, Jr., Chavey WE, 2nd, Fesmire FM, Hochman JS, Levin TN, Lincoff AM, Peterson ED, Theroux P, Wenger NK, Wright RS, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Halperin JL, Hunt SA, Krumholz HM, Kushner FG, Lytle BW, Nishimura R, Ornato JP, Page RL and Riegel B (2007) ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-Elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *J Am Coll Cardiol* **50**:e1-e157.
- Angiolillo DJ, Bhatt DL, Gurbel PA and Jennings LK (2009) Advances in antiplatelet therapy: agents in clinical development. *Am J Cardiol* **103**:40A-51A.
- Antman EM, Hand M, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Halasyamani LK, Hochman JS, Krumholz HM, Lamas GA, Mullany CJ, Pearle DL, Sloan MA, Smith SC, Jr., Anbe DT, Kushner FG, Ornato JP, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Halperin JL, Hunt SA, Lytle BW, Nishimura R, Page RL, Riegel B, Tarkington LG and Yancy CW (2008) 2007 focused update of the ACC/AHA 2004 guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a

report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* **51**:210-247.

Bienvenu JG, Tanguay JF, Theoret JF, Kumar A, Schaub RG and Merhi Y (2001) Recombinant soluble p-selectin glycoprotein ligand-1-Ig reduces restenosis through inhibition of platelet-neutrophil adhesion after double angioplasty in swine. *Circulation* **103**:1128-1134.

Cattaneo M (2006) ADP receptors: inhibitory strategies for antiplatelet therapy. *Drug News Perspect* **19**:253-259.

Cosmi B (2009) ARC-1779, a PEGylated aptamer antagonist of von Willebrand factor for potential use as an anticoagulant or antithrombotic agent. *Curr Opin Mol Ther* **11**:322-328.

Diener JL, Daniel Lagasse HA, Duerschmied D, Merhi Y, Tanguay JF, Hutabarat R, Gilbert J, Wagner DD and Schaub R (2009) Inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet activation and thrombosis by the anti-von Willebrand factor A1-domain aptamer ARC1779. *J Thromb Haemost* **7**:1155-1162.

Ellis SG, Tendera M, de Belder MA, van Boven AJ, Widimsky P, Janssens L, Andersen HR, Betriu A, Savonitto S, Adamus J, Peruga JZ, Kosmider M, Katz O, Neunteufl T, Jorgova J, Dorobantu M, Grinfeld L, Armstrong P, Brodie BR, Herrmann HC, Montalescot G, Neumann FJ, Effron MB, Barnathan ES and Topol EJ (2008) Facilitated PCI in patients with ST-elevation myocardial infarction. *N Engl J Med* **358**:2205-2217.

- Gilbert JC, DeFeo-Fraulini T, Hutabarat RM, Horvath CJ, Merlino PG, Marsh HN, Healy JM, Boufakhreddine S, Holohan TV and Schaub RG (2007) First-in-human evaluation of anti von Willebrand factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers. *Circulation* **116**:2678-2686.
- Kuliczkowski W, Witkowski A, Polonski L, Watala C, Filipiak K, Budaj A, Golanski J, Sitkiewicz D, Pregowski J, Gorski J, Zembala M, Opolski G, Huber K, Arnesen H, Kristensen SD and De Caterina R (2009) Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* **30**:426-435.
- L'Allier PL, Ducrocq G, Pranno N, Noble S, Ibrahim R, Gregoire JC, Azzari F, Nozza A, Berry C, Doucet S, Labarthe B, Theroux P and Tardif JC (2008) Clopidogrel 600-mg double loading dose achieves stronger platelet inhibition than conventional regimens: results from the PREPAIR randomized study. *J Am Coll Cardiol* **51**:1066-1072.
- Mailhac A, Badimon JJ, Fallon JT, Fernandez-Ortiz A, Meyer B, Chesebro JH, Fuster V and Badimon L (1994) Effect of an eccentric severe stenosis on fibrin(ogen) deposition on severely damaged vessel wall in arterial thrombosis. Relative contribution of fibrin(ogen) and platelets. *Circulation* **90**:988-996.
- Maree AO and Fitzgerald DJ (2007) Variable platelet response to aspirin and clopidogrel in atherothrombotic disease. *Circulation* **115**:2196-2207.

- Monroe DM and Hoffman M (2006) What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**:41-48.
- Ortolani P, Marzocchi A, Marrozzini C, Palmerini T, Saia F, Taglieri N, Baldazzi F, Dall'Ara G, Nardini P, Gianstefani S, Guastaroba P, Grilli R and Branzi A (2009) Long-term effectiveness of early administration of glycoprotein IIb/IIIa agents to real-world patients undergoing primary percutaneous interventions: results of a registry study in an ST-elevation myocardial infarction network. *Eur Heart J* **30**:33-43.
- Rao SV, O'Grady K, Pieper KS, Granger CB, Newby LK, Van de Werf F, Mahaffey KW, Califf RM and Harrington RA (2005) Impact of bleeding severity on clinical outcomes among patients with acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* **96**:1200-1206.
- Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, Specht HM, Schramm W and Ruggeri ZM (2006) Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood* **107**:3537-3545.
- Ruggeri ZM, Orje JN, Habermann R, Federici AB and Reininger AJ (2006) Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood* **108**:1903-1910.
- Spiel AO, Mayr FB, Ladani N, Wagner PG, Schaub RG, Gilbert JC and Gilma B (2009) The aptamer ARC1779 is a potent and specific inhibitor of von Willebrand Factor mediated ex vivo platelet function in acute myocardial infarction. *Platelets* **20**:334-340.
- Steinhubl S and Roe MT (2007) Optimizing platelet P2Y<sub>12</sub> inhibition for patients undergoing PCI. *Cardiovasc Drug Rev* **25**:188-203.

- Strony J, Beaudoin A, Brands D and Adelman B (1993) Analysis of shear stress and hemodynamic factors in a model of coronary artery stenosis and thrombosis. *Am J Physiol* **265**:H1787-1796.
- Theoret JF, Bienvenu JG, Kumar A and Merhi Y (2001) P-selectin antagonism with recombinant p-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig) inhibits circulating activated platelet binding to neutrophils induced by damaged arterial surfaces. *J Pharmacol Exp Ther* **298**:658-664.
- Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, Filippatos G, Fox K, Huber K, Kastrati A, Rosengren A, Steg PG, Tubaro M, Verheugt F, Weidinger F, Weis M, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Aguirre FV, Al-Attar N, Alegria E, Andreotti F, Benzer W, Breithardt O, Danchin N, Di Mario C, Dudek D, Gulba D, Halvorsen S, Kaufmann P, Kornowski R, Lip GY and Rutten F (2008) Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* **29**:2909-2945.

### Footnotes

Drs Arzamendi and Dandachli contributed equally to this work.

#### **Financial support:**

This study was in part supported by Archemix corp.

#### **Citation of meeting abstracts:**

This study was previously presented at the following conferences: Arzamendi D, Dandachli F, Ducroq G, Theoret J-F, Mourad W, Schaub R, Tanguay JF, Merhi Y. Antithrombotic effects of an anti-von Willebrand factor A1 domain aptamer in patients under aspirin and clopidogrel. *XXIII congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH)*; July 11-16 2009, Boston, MA, USA; Arzamendi D, Dandachli F, Ducroq G, Theoret J-F, Mourad W, Schaub R, Tanguay JF, Merhi Y. Antithrombotic effects of an anti-von Willebrand factor A1 domain aptamer in patients under aspirin and clopidogrel. *Canadian Cardiovascular Congress (CCS)*, October 24-28 2009, Edmonton, Alberta, Canada.

#### **Reprint request:**

Yahye Merhi, PhD, Laboratory of Thrombosis and Haemostasis, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8; Tel: +514 376-3330 ext. 3035, Fax: +514 376-1355.

## Legends for Figures

**Fig. 1.** Effects of ARC1779 and abciximab on platelet adhesion in healthy control and in patients on aspirin and clopidogrel.  $^{111}\text{In}$ -labelled human platelets in whole blood were circulated over denuded (injured) porcine arterial segments in perfusion flow chambers at a shear rate of 6974/sec for 15 min at 37 °C. In 17 patients and in 5 normal volunteers, the drugs (Abciximab and ARC1779) were incubated with the blood for 5 min before each perfusion run, and defined as upstream therapy. In 10 patients, the drugs were added as a downstream therapy for 5 min, 10 min after the onset of blood perfusion. (Mean  $\pm$  SEM, \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, and \*\*\* $p$  < 0.001 vs. placebo)

**Fig. 2.** Representative scanning electron microscopy micrographs of the resulting platelet adhesion following exposure of whole blood to denuded (injured) porcine arterial segments in perfusion flow chambers at a shear rate of 6974/sec for 15 min at 37 °C. Both the effect of Abciximab (100 nM) and ARC1779 (250 nM) are depicted in healthy volunteers and patients under upstream and downstream therapies. Magnifications 500X, Insert 2500X.

**Fig. 3.** Effects of ARC1779 and abciximab on platelet aggregation in healthy control and in patients on aspirin and clopidogrel. Whole blood platelet aggregation in healthy volunteers and in patients in response to different agonists (TRAP-1 5  $\mu\text{M}$ , Ristocetin 1 mg/ml, ADP 10  $\mu\text{M}$  and arachidonic acid 500  $\mu\text{M}$ ). Aggregation was monitored over 15 min in the presence of abciximab (100 nM) or ARC1779 (250 nM). (Mean  $\pm$  SEM, \* $p$  < 0.05, and \*\*\* $p$  < 0.001 vs. data in healthy volunteers, +  $p$  < 0.05 vs. placebo in the healthy volunteers)

**Fig. 4.** Effects of ARC1779 and abciximab on platelet activation. Whole blood platelet activation as assessed by P-selectin translocation (CD62P), vWF expression and platelet/leukocyte aggregate (PLA) formation following exposure of whole blood to denuded (injured) porcine arterial segments in perfusion flow chambers at a shear rate of 6974/sec for 15 min at 37 °C. Platelet activation was studied in healthy volunteers in the presence of abciximab (100 nM) or ARC1779 (250 nM). (Mean  $\pm$  SEM, \* $p$  < 0.05 vs. baseline)

Figure 1

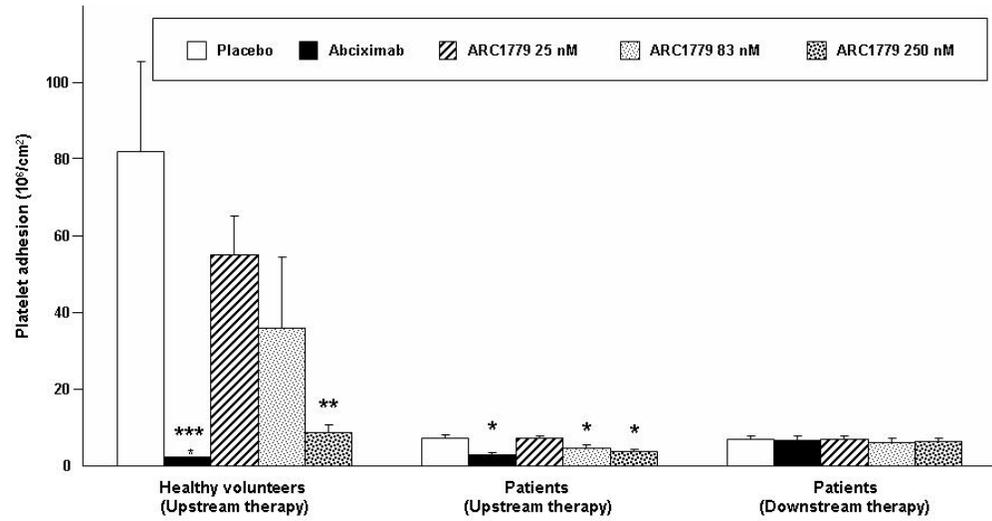


Figure 2

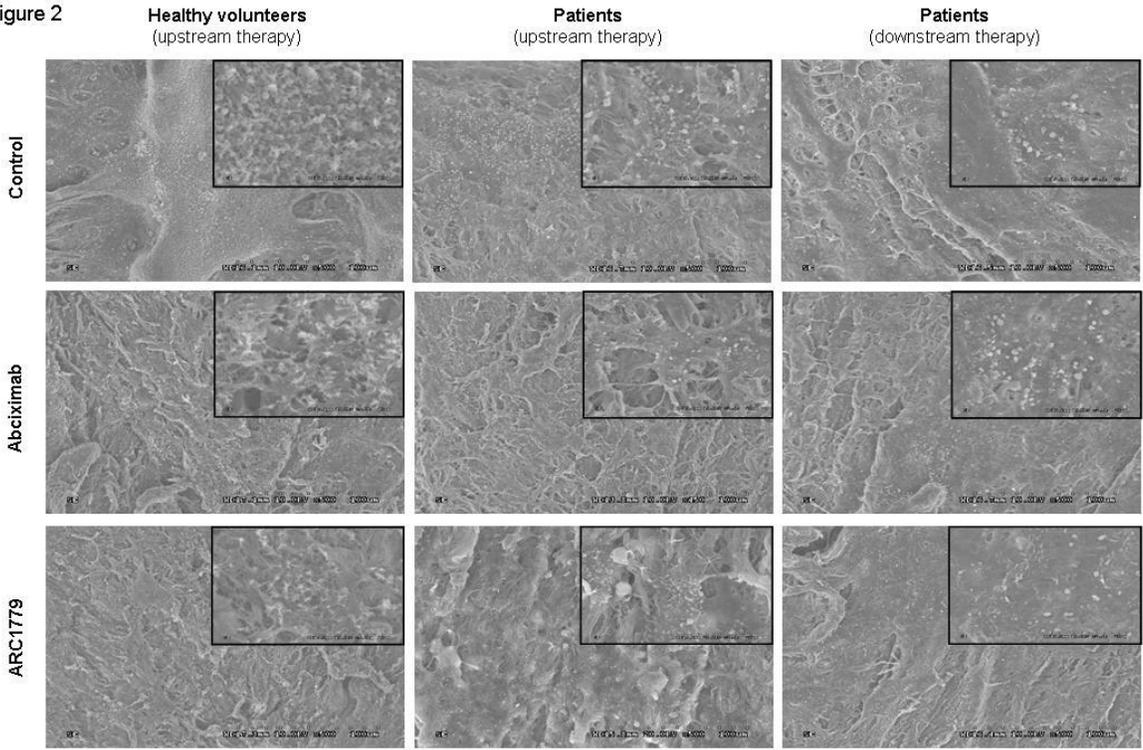


Figure 3

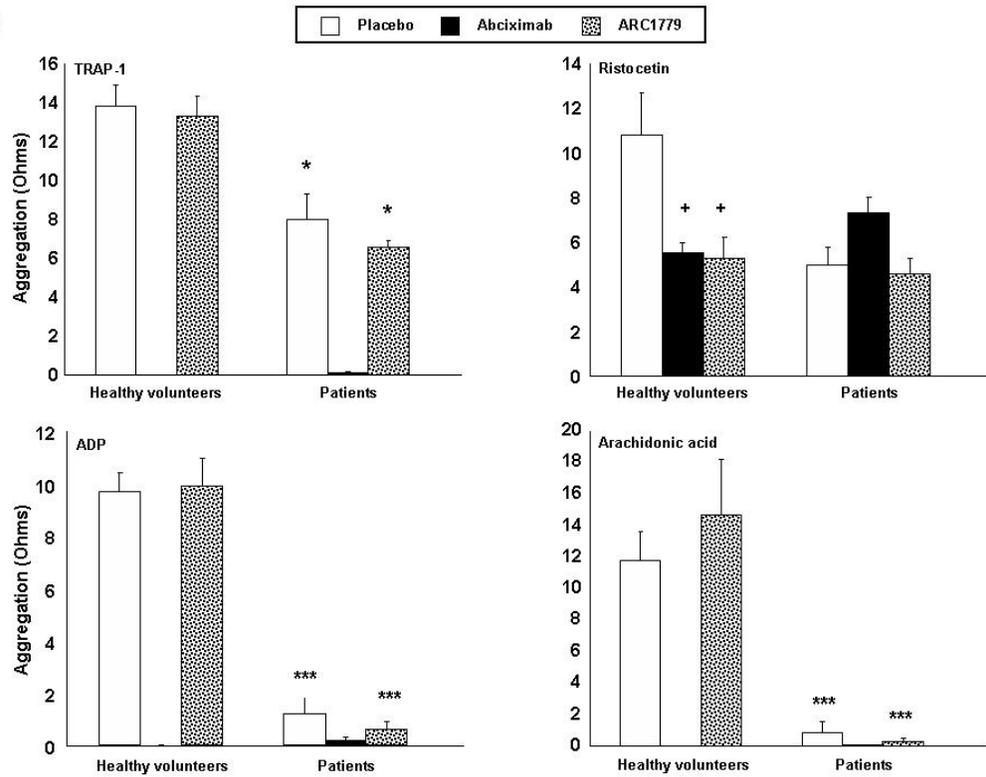
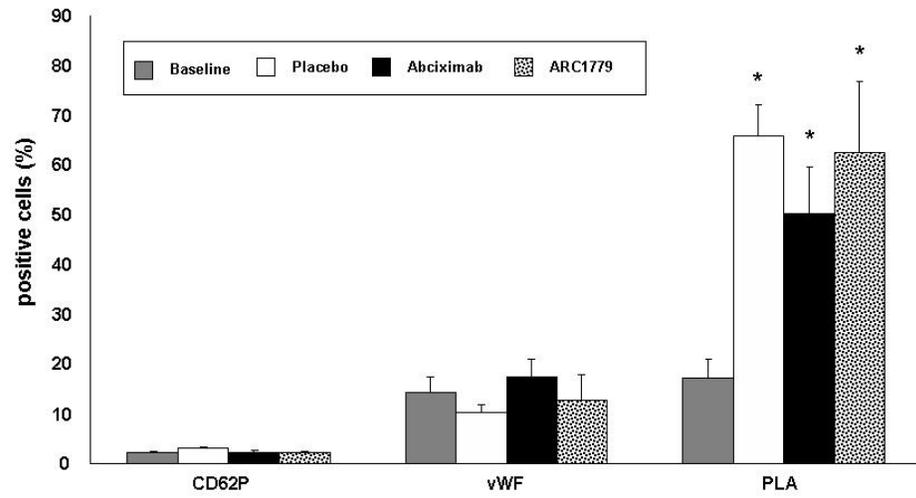


Figure 4



**TABLE 1.** Baseline characteristics of the study population

	Patients (n=27)	included Healthy (n=5) volunteers
	Mean $\pm$ SEM or n (%)	Mean $\pm$ SEM or n (%)
Age (years)	57.2 $\pm$ 1.5	40 $\pm$ 5.3
Male gender	22 (81.5)	1 (20)
Hypertension	9 (33.3)	0 (0)
Hypercholesterolemia	16 (59.3)	0 (0)
Diabetes mellitus	4 (14.8)	0 (0)
Smoke habit	10 (37)	0 (0)
Family history	4 (14.8)	0 (0)
Old myocardial infarction	6 (22.7)	0 (0)
Vasculopathy	1 (3.7)	0 (0)
Cerebrovascular accident	0 (0)	0 (0)
Body mass index	27.4 $\pm$ 0.9	23.6 $\pm$ 1.0
Acute coronary syndrome		
• STEMI	17 (63)	0 (0)
• NSTEMI	1 (3.7)	0 (0)
	9 (33.3)	0 (0)

- Unstable angina

Creatinine	92.3 ± 1.4	69.8 ± 2.0
Haemoglobin	147.5 ± 2.4	154.7 ± 5.2
Platelet	267.4 ± 11.0	245.6 ± 11.5
Months on clopidogrel	10 ± 5	0
Previous Bleeding	3 (11.1)	0

---

*SEM: Standard Error of Mean. STEMI: ST segment elevation myocardial infarction. NSTEMI: Non ST segment elevation myocardial infarction.*

## **Discussion**

Nous avons étudié les effets de l'aptamère ARC1779 sur les fonctions plaquettaires, chez des volontaires sains et chez des patients coronariens recevant de l'aspirine et de clopidogrel. Lorsque le sang a été traité avant la perfusion (traitement en amont), nous avons observé un niveau semblable de réduction de l'adhésion plaquettaire à la dose la plus élevée d'ARC1779 (250 nM) et d'abciximab (100 nM), comparativement au groupe placebo. Ces résultats étaient conformes chez des volontaires sains, comme indiqué précédemment (119, 122), et chez les patients sous traitement antiplaquettaire avec l'aspirine et le clopidogrel. En revanche, aucun de ces traitements n'a montré un avantage dans les paramètres de traitement en aval. Contrairement à l'abciximab, l'ARC1779 n'a pas affecté significativement l'agrégation plaquettaire en réponse au TRAP-1, l'AA et l'ADP. En outre, l'ARC1779 n'induit pas l'expression de la P-sélectine et l'interaction des plaquettes avec les leucocytes.

Malgré les avantages cliniques documentés des agents antiplaquettaires, leur utilisation reste limitée par plusieurs facteurs comme la variabilité de la réponse entre individus (124-126), leur début d'action retardé (127-129), l'irréversibilité de l'action antiplaquettaire, et l'augmentation des complications hémorragiques. Ainsi, les recherches actuelles sur la thérapie antiplaquettaire sont essentiellement concentrées sur le développement de nouveaux agents capables de réduire les complications hémorragiques, tout en préservant leur efficacité anti-thrombotique. La compatibilité de tout nouveau traitement antiplaquettaire avec l'aspirine et le clopidogrel doit être déterminée avant son investigation clinique chez les patients ayant des syndromes coronariens aigus (SCA) et ceux subissant

une intervention coronarienne percutanée (PCI), parce que l'aspirine et le clopidogrel sont toujours prescrits chez ces patients (130, 131).

Dans cette étude, nous avons analysé l'effet de l'ARC1779 seul et en combinaison avec l'aspirine et le clopidogrel. L'ARC1779 réduit significativement l'adhésion des plaquettes, même chez les patients prétraités par l'aspirine et le clopidogrel. Toutefois, aucune différence n'a été observée sur l'agrégation plaquettaire chez les volontaires sains entre le traitement témoin et l'ARC1779, sauf lorsque le Ristocetin est utilisé comme agent d'agrégation. En comparaison avec des volontaires sains, les patients recevant le clopidogrel et l'aspirine ont démontré une réduction de l'agrégation en réponse aux différents agonistes plaquettaires. Toutefois, l'ajout de l'ARC1779 n'a pas affecté l'agrégation plaquettaire. Ainsi, l'effet de l'ARC1779 est ajouté à l'aspirine et au clopidogrel dans la prévention de l'adhésion plaquettaire, mais pas dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire. Nous croyons que cette observation peut être expliquée par les trois différents agents antiplaquettaires utilisés dans cette étude, l'ARC1779 se lie au domaine A1 du vWf qui interagit avec le récepteur plaquettaire GPIb sous force de cisaillement élevée, tandis que l'aspirine inhibe de manière irréversible le cyclo-oxygénase conduisant à une réduction de la TXA<sub>2</sub>, et le clopidogrel empêche l'ADP d'interagir avec le récepteur P2Y<sub>12</sub>. Lorsque la couche endothéliale est perturbée, les plaquettes lient le vWf nouvellement exposé et le collagène via le GPIb et le GPVI, respectivement. Par la suite, elles s'activent, changent de forme et secrètent des médiateurs tels que l'ADP et le TXA<sub>2</sub>, ce qui induit l'activation plaquettaire et la formation de thrombus (132). L'ARC1779 inhibe l'adhésion initiale entre le récepteur plaquettaire GPIb et le vWf sous

force de cisaillement élevée, tandis que l'aspirine et le clopidogrel interfère avec l'agrégation plaquettaire, ce qui limite les voies d'activation autocrines déclenchées par le TXA2 et l'ADP lors de l'activation plaquettaire. Cette propriété peut être particulièrement utile chez les patients avec une réactivité plaquettaire élevée malgré un traitement par le clopidogrel ou l'aspirine, étant donné que l'ARC1779 offre une voie alternative de l'inhibition plaquettaire.

L'ARC1779 a un début d'action rapide et atteint un niveau de concentration plasmatique maximale dans les 7-30 minutes suivant son injection (119). Ainsi, dans les situations où la rapidité d'action antiplaquettaire est nécessaire, comme dans les PCI primaires, l'ARC1779 pourrait être considéré comme un traitement prometteur. Ainsi, nous avons simulé les protocoles d'administration établis utilisés en pratique clinique avec l'abciximab administré avant le PCI dans la salle d'urgence (traitement en amont) ou en péri-procédure dans le laboratoire de cathétérisme cardiaque (traitement en aval). Nous avons décidé d'étudier l'efficacité de l'ARC1779 dans ce cadre parce que des résultats contradictoires ont été observés dans des études récentes sur l'administration de l'abciximab avant le PCI (133, 134). Nous avons observé que, chez les patients déjà prétraités avec de l'aspirine et le clopidogrel, il n'y avait aucune diminution significative de l'adhésion des plaquettes avec l'ARC1779 ou avec l'abciximab administré comme traitement en aval. En revanche, l'administration du médicament comme traitement en amont a un effet additif sur la bithérapie antiplaquettaire, ce qui réduit considérablement l'adhésion des plaquettes par rapport au placebo. Cette observation devrait être prise en considération dans les protocoles d'études cliniques avec l'ARC1779.

Le vWf est active uniquement en présence de force de cisaillement élevée intra-vasculaire trouvé dans les artères sténosées ou a la plaque d'athérome. Ainsi, un antagoniste du vWf peut théoriquement éviter les complications hémorragiques habituellement observées avec les agents antiplaquettaires classiques. Dans notre modèle de chambre de perfusion, nous avons étudié le comportement de l'interaction ARC1779-vWf plaquettaire dans un environnement de cisaillement élevée ( $6974 \text{ s}^{-1}$ ), émulant les conditions d'écoulement dans une artère coronaire sténosée. Pour évaluer les effets éventuels systémiques de l'ARC1779, on a évalué l'expression de la P-sélectine et l'expression du vWf par cytométrie en flux et on n'a pas observé des changements significatifs dans leur expression ou dans la formation d'agrégats plaquettes-leucocytes, par rapport au groupe placebo. Cette observation appuie le concept d'un effet localisé de l'ARC1779, sans effets systémiques anti-thrombotiques.

Notre étude a plusieurs limites. Tout d'abord, il s'agit d'une étude *ex vivo*, qui ne peut pas répliquer totalement les effets pharmacologiques *in vivo* de l'ARC1779. Deuxièmement, la taille de l'échantillon relativement petit peut affecter la précision de nos estimations pharmacologiques. Troisièmement, les patients ayant de complications cardio-vasculaire ont été sur plusieurs co-médicaments et les effets de toute interaction potentielle avec l'ARC1779 sont inconnus. Quatrièmement, les critères d'évaluation cliniques n'ont pas été étudiés, et les effets de l'ARC1779 sur les paramètres thrombotiques et hémorragiques devront être étudiés dans des études cliniques plus larges.

## **Conclusion**

Dans cette étude préclinique, chez des patients ayant de complications cardio-vasculaire, nous avons montré que l'aptamère ARC1779, dirigé contre le vWf, a une efficacité anti-thrombotique comparable à l'abciximab chez les patients recevant l'aspirine et le clopidogrel, mais avec moins d'effets systémiques sur l'activation et l'agrégation plaquettaire. Parce que le vWf fonctionne principalement dans un environnement à haut cisaillement, l'ARC1779 peut produire un effet spécifique au site anti-thrombotique, tout en minimisant le risque de saignement. Ces données importantes (*proof-of-concept*) forment le cadre de recherches cliniques randomisées de cette nouvelle thérapie antiplaquettaire chez les patients coronariens dans le cadre du ICP en SCA.

## Bibliographie

1. WHO | Cardiovascular diseases. World Health Organization; 2009 [updated September 2009]; Available from: <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.
2. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Dec 1;54(23):2129-38.
3. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., et al. 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 Sep;15(9):1512-31.
4. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994 May;89(5):2462-78.
5. Zaman AG, Helft G, Worthley SG, Badimon JJ. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2000 Apr;149(2):251-66.
6. Kiefer TL, Becker RC. Inhibitors of platelet adhesion. *Circulation*. 2009 Dec 15;120(24):2488-95.
7. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*. 1996 Jan 26;84(2):289-97.
8. Asch E, Podack E. Vitronectin binds to activated human platelets and plays a role in platelet aggregation. *J Clin Invest*. 1990 May;85(5):1372-8.
9. Furie B. Pathogenesis of thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:255-8.
10. Rand JH, Patel ND, Schwartz E, Zhou SL, Potter BJ. 150-kD von Willebrand factor binding protein extracted from human vascular subendothelium is type VI collagen. *J Clin Invest*. 1991 Jul;88(1):253-9.
11. Bonnefoy A, Romijn RA, Vandervoort PA, I VANR, Vermeylen J, Hoylaerts MF. von Willebrand factor A1 domain can adequately substitute for A3 domain in recruitment of flowing platelets to collagen. *J Thromb Haemost*. 2006 Oct;4(10):2151-61.
12. Tortora GJ, Grabowski SR. *Principes d'anatomie et de physiologie*. Nouv. éd. ed. Anjou, Québec: Centre éducatif et culturel; 1994.
13. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3527-61.
14. Ruggeri ZM. von Willebrand factor. *J Clin Invest*. 1997 Feb 15;99(4):559-64.
15. Bath PM, Butterworth RJ. Platelet size: measurement, physiology and vascular disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1996 Mar;7(2):157-61.
16. Thompson CB, Jakubowski JA, Quinn PG, Deykin D, Valeri CR. Platelet size as a determinant of platelet function. *J Lab Clin Med*. 1983 Feb;101(2):205-13.
17. Fox JE. Linkage of a membrane skeleton to integral membrane glycoproteins in human platelets. Identification of one of the glycoproteins as glycoprotein Ib. *J Clin Invest*. 1985 Oct;76(4):1673-83.

18. Martin V, Bredoux R, Corvazier E, Papp B, Enouf J. Platelet Ca(2+)ATPases : a plural, species-specific, and multiple hypertension-regulated expression system. *Hypertension*. 2000 Jan;35(1 Pt 1):91-102.
19. Frojmovic MM, Milton JG. Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. *Physiol Rev*. 1982 Jan;62(1):185-261.
20. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115-26.
21. van der Loo B, Martin JF. Megakaryocytes and platelets in vascular disease. *Baillieres Clin Haematol*. 1997 Feb;10(1):109-23.
22. Moog S, Mangin P, Lenain N, Strassel C, Ravanat C, Schuhler S, et al. Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. *Blood*. 2001 Aug 15;98(4):1038-46.
23. Giesberts AN, van Willigen G, Lapetina EG, Akkerman JW. Regulation of platelet glycoprotein IIb/IIIa (integrin alpha IIB beta 3) function via the thrombin receptor. *Biochem J*. 1995 Jul 15;309 ( Pt 2):613-20.
24. Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997 Jan;29(1):91-105.
25. Schneider DJ, Taatjes DJ, Sobel BE. Paradoxical inhibition of fibrinogen binding and potentiation of alpha-granule release by specific types of inhibitors of glycoprotein IIb-IIIa. *Cardiovasc Res*. 2000 Jan 14;45(2):437-46.
26. Plenz GA, Deng MC, Robenek H, Volker W. Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2003 Jan;166(1):1-11.
27. Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ, de Groot PG. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2004 Apr;2(4):561-73.
28. Saelman EU, Horton LF, Barnes MJ, Gralnick HR, Hese KM, Nieuwenhuis HK, et al. Platelet adhesion to cyanogen-bromide fragments of collagen alpha 1(I) under flow conditions. *Blood*. 1993 Nov 15;82(10):3029-33.
29. Murata K, Motayama T, Kotake C. Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis*. 1986 Jun;60(3):251-62.
30. Steinhubl SR, Moliterno DJ. The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2005;5(6):399-408.
31. Yip J, Shen Y, Berndt MC, Andrews RK. Primary platelet adhesion receptors. *IUBMB Life*. 2005 Feb;57(2):103-8.
32. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*. 1998 Sep 4;94(5):657-66.
33. Tomokiyo K, Kamikubo Y, Hanada T, Araki T, Nakatomi Y, Ogata Y, et al. Von Willebrand factor accelerates platelet adhesion and thrombus formation on a collagen surface in platelet-reduced blood under flow conditions. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):1078-84.
34. Chow TW, Hellums JD, Moake JL, Kroll MH. Shear stress-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib initiates calcium influx associated with aggregation. *Blood*. 1992 Jul 1;80(1):113-20.

35. Alevriadou BR, Moake JL, Turner NA, Ruggeri ZM, Folie BJ, Phillips MD, et al. Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von Willebrand factor binding to platelets. *Blood*. 1993 Mar 1;81(5):1263-76.
36. Moroi M, Jung SM, Nomura S, Sekiguchi S, Ordinas A, Diaz-Ricart M. Analysis of the involvement of the von Willebrand factor-glycoprotein Ib interaction in platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions. *Blood*. 1997 Dec 1;90(11):4413-24.
37. Pearson JD. Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 1999 Sep;12(3):329-41.
38. Hashimoto I, Nakanishi H, Shono Y, Yamano M, Toda M. The features of thrombus in a microvessel injury model and the antithrombotic efficacy of heparin, urokinase, and prostaglandin E1. *Plast Reconstr Surg*. 2003 Jun;111(7):2307-14.
39. Folie BJ, McIntire LV. Mathematical analysis of mural thrombogenesis. Concentration profiles of platelet-activating agents and effects of viscous shear flow. *Biophys J*. 1989 Dec;56(6):1121-41.
40. Mann KG. Thrombin formation. *Chest*. 2003 Sep;124(3 Suppl):4S-10S.
41. Gartner TK, Williams DC, Minion FC, Phillips DR. Thrombin-induced platelet aggregation is mediated by a platelet plasma membrane-bound lectin. *Science*. 1978 Jun 16;200(4347):1281-3.
42. Merten M, Chow T, Hellums JD, Thiagarajan P. A new role for P-selectin in shear-induced platelet aggregation. *Circulation*. 2000 Oct 24;102(17):2045-50.
43. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation*. 2000 Oct 17;102(16):1931-6.
44. Faraday N, Scharpf RB, Dodd-o JM, Martinez EA, Rosenfeld BA, Dorman T. Leukocytes can enhance platelet-mediated aggregation and thromboxane release via interaction of P-selectin glycoprotein ligand 1 with P-selectin. *Anesthesiology*. 2001 Jan;94(1):145-51.
45. Boukerche H, Ruchaud-Sparagano MH, Rouen C, Brochier J, Kaplan C, McGregor JL. A monoclonal antibody directed against a granule membrane glycoprotein (GMP-140/PADGEM, P-selectin, CD62P) inhibits ristocetin-induced platelet aggregation. *Br J Haematol*. 1996 Feb;92(2):442-51.
46. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin in arterial thrombosis. *Z Kardiol*. 2004 Nov;93(11):855-63.
47. Zhang JN, Bergeron AL, Yu Q, Sun C, McBride L, Bray PF, et al. Duration of exposure to high fluid shear stress is critical in shear-induced platelet activation-aggregation. *Thromb Haemost*. 2003 Oct;90(4):672-8.
48. Macconi D, Vigano G, Bisogno G, Galbusera M, Orisio S, Remuzzi G, et al. Defective platelet aggregation in response to platelet-activating factor in uremia associated with low platelet thromboxane A2 generation. *Am J Kidney Dis*. 1992 Apr;19(4):318-25.
49. Peter K, Ahrens I, Schwarz M, Bode C, Ylanne J. Distinct roles of ligand affinity and cytoskeletal anchorage in alphaIIb beta3 (GP IIb/IIIa)-mediated cell aggregation and adhesion. *Platelets*. 2004 Nov;15(7):427-38.

50. Hato T, Pampori N, Shattil SJ. Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin alphaIIb beta3. *J Cell Biol.* 1998 Jun 29;141(7):1685-95.
51. Pelletier AJ, Kunicki T, Ruggeri ZM, Quaranta V. The activation state of the integrin alpha IIb beta 3 affects outside-in signals leading to cell spreading and focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem.* 1995 Jul 28;270(30):18133-40.
52. Shattil SJ. Function and regulation of the beta 3 integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemost.* 1995 Jul;74(1):149-55.
53. De Marco L, Mazzucato M, Masotti A, Fenton JW, 2nd, Ruggeri ZM. Function of glycoprotein Ib alpha in platelet activation induced by alpha-thrombin. *J Biol Chem.* 1991 Dec 15;266(35):23776-83.
54. Du X, Ginsberg MH. Integrin alpha IIb beta 3 and platelet function. *Thromb Haemost.* 1997 Jul;78(1):96-100.
55. Staatz WD, Rajpara SM, Wayner EA, Carter WG, Santoro SA. The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg<sup>++</sup>-dependent adhesion of platelets to collagen. *J Cell Biol.* 1989 May;108(5):1917-24.
56. He L, Pappan LK, Grenache DG, Li Z, Tollefsen DM, Santoro SA, et al. The contributions of the alpha 2 beta 1 integrin to vascular thrombosis in vivo. *Blood.* 2003 Nov 15;102(10):3652-7.
57. Yap CL, Hughan SC, Cranmer SL, Nesbitt WS, Rooney MM, Giuliano S, et al. Synergistic adhesive interactions and signaling mechanisms operating between platelet glycoprotein Ib/IX and integrin alpha IIb beta 3. Studies in human platelets and transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 2000 Dec 29;275(52):41377-88.
58. Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, Gardiner EE, Andrews RK. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost.* 2001 Jul;86(1):178-88.
59. Clemetson KJ. Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb Haemost.* 1995 Jul;74(1):111-6.
60. Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost.* 1999 Jan;81(1):1-7.
61. Brandley BK, Swiedler SJ, Robbins PW. Carbohydrate ligands of the LEC cell adhesion molecules. *Cell.* 1990 Nov 30;63(5):861-3.
62. Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, Gallatin M, Gimbrone M, Harlan J, et al. Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell.* 1991 Oct 18;67(2):233.
63. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, McNicol A, Cham B, Nishibori M, et al. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood.* 1992 Jul 1;80(1):143-52.
64. Norcott JP, Solari R, Cutler DF. Targeting of P-selectin to two regulated secretory organelles in PC12 cells. *J Cell Biol.* 1996 Sep;134(5):1229-40.
65. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol.* 1985 Sep;101(3):880-6.

66. Hsu-Lin S, Berman CL, Furie BC, 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*. 1984 Jul 25;259(14):9121-6.
67. 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 Jul;84(1):92-9.
68. Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood*. 1989 Apr;73(5):1109-12.
69. Koedam JA, Cramer EM, Briend E, Furie B, Furie BC, Wagner DD. P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulated secretory pathway in AtT-20 cells. *J Cell Biol*. 1992 Feb;116(3):617-25.
70. Disdier M, Morrissey JH, Fugate RD, Bainton DF, McEver RP. Cytoplasmic domain of P-selectin (CD62) contains the signal for sorting into the regulated secretory pathway. *Mol Biol Cell*. 1992 Mar;3(3):309-21.
71. Barkalow FJ, Barkalow KL, Mayadas TN. Dimerization of P-selectin in platelets and endothelial cells. *Blood*. 2000 Nov 1;96(9):3070-7.
72. Johnston GI, Pickett EB, McEver RP, George JN. Heterogeneity of platelet secretion in response to thrombin demonstrated by fluorescence flow cytometry. *Blood*. 1987 May;69(5):1401-3.
73. Parmentier S, McGregor L, Catimel B, Leung LL, McGregor JL. Inhibition of platelet functions by a monoclonal antibody (LYP20) directed against a granule membrane glycoprotein (GMP-140/PADGEM). *Blood*. 1991 Apr 15;77(8):1734-9.
74. Dupont A, Fontana P, Bachelot-Loza C, Reny JL, Bieche I, Desvard F, et al. An intronic polymorphism in the PAR-1 gene is associated with platelet receptor density and the response to SFLLRN. *Blood*. 2003 Mar 1;101(5):1833-40.
75. Patrono C, Collier B, Dalen JE, FitzGerald GA, Fuster V, Gent M, et al. Platelet-active drugs : the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest*. 2001 Jan;119(1 Suppl):39S-63S.
76. Hirsh J, Dalen J, Anderson DR, Poller L, Bussey H, Ansell J, et al. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest*. 2001 Jan;119(1 Suppl):8S-21S.
77. Gibbons RJ, Chatterjee K, Daley J, Douglas JS, Fihn SD, Gardin JM, et al. ACC/AHA/ACP-ASIM guidelines for the management of patients with chronic stable angina: executive summary and recommendations. A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Patients with Chronic Stable Angina). *Circulation*. 1999 Jun 1;99(21):2829-48.
78. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 2000 Jan 20;342(3):145-53.
79. Hamm CW, Braunwald E. A classification of unstable angina revisited. *Circulation*. 2000 Jul 4;102(1):118-22.

80. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: executive summary and recommendations. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (committee on the management of patients with unstable angina). *Circulation*. 2000 Sep 5;102(10):1193-209.
81. Quinn MJ, Fitzgerald DJ. Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation*. 1999 Oct 12;100(15):1667-72.
82. Smith SC, Jr., Dove JT, Jacobs AK, Kennedy JW, Kereiakes D, Kern MJ, et al. ACC/AHA guidelines for percutaneous coronary intervention (revision of the 1993 PTCA guidelines)-executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (Committee to revise the 1993 guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty) endorsed by the Society for Cardiac Angiography and Interventions. *Circulation*. 2001 Jun 19;103(24):3019-41.
83. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*. 1971 Jun 23;231(25):232-5.
84. Schror K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin Thromb Hemost*. 1997;23(4):349-56.
85. Kalgutkar AS, Crews BC, Rowlinson SW, Garner C, Seibert K, Marnett LJ. Aspirin-like molecules that covalently inactivate cyclooxygenase-2. *Science*. 1998 May 22;280(5367):1268-70.
86. Japel M, Lotzerich H, Rogalla K. Role of Acetylsalicylic Acid in Cytokine Stimulation of Macrophages in Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). *Mediators Inflamm*. 1994;3(6):419-24.
87. Hartel C, von Puttkamer J, Gallner F, Strunk T, Schultz C. Dose-dependent immunomodulatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in human whole blood: potential role of cyclooxygenase-2 inhibition. *Scand J Immunol*. 2004 Oct;60(4):412-20.
88. Jaffe EA, Weksler BB. Recovery of endothelial cell prostacyclin production after inhibition by low doses of aspirin. *J Clin Invest*. 1979 Mar;63(3):532-5.
89. Bolz SS, Pohl U. Indomethacin enhances endothelial NO release--evidence for a role of PGI<sub>2</sub> in the autocrine control of calcium-dependent autacoid production. *Cardiovasc Res*. 1997 Dec;36(3):437-44.
90. Bjornsson TD, Schneider DE, Berger H, Jr. Aspirin acetylates fibrinogen and enhances fibrinolysis. Fibrinolytic effect is independent of changes in plasminogen activator levels. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989 Jul;250(1):154-61.
91. Nishi T, Tabusa F, Tanaka T, Shimizu T, Kanbe T, Kimura Y, et al. Studies on 2-oxoquinoline derivatives as blood platelet aggregation inhibitors. II. 6-[3-(1-cyclohexyl-5-tetrazolyl)propoxy]-1,2-dihydro-2-oxoquinoline and related compounds. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1983 Apr;31(4):1151-7.
92. Potel G, Maulaz B, Pabceuf C, Toyze MD, Baron D. [Potentiation of acenocoumarol after application of an semi-synthetic heparinoid]. *Therapie*. 1989 Jan-Feb;44(1):67-8.
93. Bult H, Fret HR, Jordaens FH, Herman AG. Dipyridamole potentiates platelet inhibition by nitric oxide. *Thromb Haemost*. 1991 Sep 2;66(3):343-9.

94. Kadatz R, Diederens W. [The influence of coronary-active drugs on the circulation and oxygen tension of the myocardium in experimental coronary insufficiency]. *Arztl Forsch.* 1967 Feb 10;21(2):51-60.
95. Blass KE, Block HU, Forster W, Ponicke K. Dipyridamole: a potent stimulator of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) biosynthesis. *Br J Pharmacol.* 1980 Jan;68(1):71-3.
96. Mehta J, Mehta P. Dipyridamole and aspirin in relation to platelet aggregation and vessel wall prostaglandin generation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1982 Jul-Aug;4(4):688-93.
97. Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 7;95(14):8070-4.
98. Savi P, Zacharyus JL, Delesque-Touchard N, Labouret C, Herve C, Uzabiaga MF, et al. The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y<sub>12</sub> receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jul 18;103(29):11069-74.
99. Collier BS, Peerschke EI, Scudder LE, Sullivan CA. A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa. *J Clin Invest.* 1983 Jul;72(1):325-38.
100. Gammie JS, Zenati M, Kormos RL, Hattler BG, Wei LM, Pellegrini RV, et al. Abciximab and excessive bleeding in patients undergoing emergency cardiac operations. *Ann Thorac Surg.* 1998 Feb;65(2):465-9.
101. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2007 Dec 13;357(24):2482-94.
102. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2005 Aug;3(8):1800-14.
103. Leger AJ, Covic L, Kuliopulos A. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation.* 2006 Sep 5;114(10):1070-7.
104. Derian CK, Damiano BP, Addo MF, Darrow AL, D'Andrea MR, Nedelman M, et al. Blockade of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 with a small-molecule antagonist prevents thrombus formation and vascular occlusion in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Feb;304(2):855-61.
105. Vandendries ER, Hamilton JR, Coughlin SR, Furie B, Furie BC. Par4 is required for platelet thrombus propagation but not fibrin generation in a mouse model of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 2;104(1):288-92.
106. Kato Y, Kita Y, Hirasawa-Taniyama Y, Nishio M, Mihara K, Ito K, et al. Inhibition of arterial thrombosis by a protease-activated receptor 1 antagonist, FR171113, in the guinea pig. *Eur J Pharmacol.* 2003 Jul 25;473(2-3):163-9.
107. Chackalamannil S, Wang Y, Greenlee WJ, Hu Z, Xia Y, Ahn HS, et al. Discovery of a novel, orally active himbacine-based thrombin receptor antagonist (SCH 530348) with potent antiplatelet activity. *J Med Chem.* 2008 Jun 12;51(11):3061-4.
108. Becker RC, Moliterno DJ, Jennings LK, Pieper KS, Pei J, Niederman A, et al. Safety and tolerability of SCH 530348 in patients undergoing non-urgent percutaneous coronary intervention: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II study. *Lancet.* 2009 Mar 14;373(9667):919-28.

109. Oestreich J. SCH-530348, a thrombin receptor (PAR-1) antagonist for the prevention and treatment of atherothrombosis. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009 Sep;10(9):988-96.
110. Roth GJ. Developing relationships: arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich glycoproteins. *Blood*. 1991 Jan 1;77(1):5-19.
111. Frossard M, Fuchs I, Leitner JM, Hsieh K, Vlcek M, Losert H, et al. Platelet function predicts myocardial damage in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004 Sep 14;110(11):1392-7.
112. Hennan JK, Swillo RE, Morgan GA, Leik CE, Brooks JM, Shaw GD, et al. Pharmacologic inhibition of platelet vWF-GPIb alpha interaction prevents coronary artery thrombosis. *Thromb Haemost*. 2006 Mar;95(3):469-75.
113. Vanhoorelbeke K, Depraetere H, Romijn RA, Huizinga EG, De Maeyer M, Deckmyn H. A consensus tetrapeptide selected by phage display adopts the conformation of a dominant discontinuous epitope of a monoclonal anti-VWF antibody that inhibits the von Willebrand factor-collagen interaction. *J Biol Chem*. 2003 Sep 26;278(39):37815-21.
114. Vanhoorelbeke K, Ulrichs H, Schoolmeester A, Deckmyn H. Inhibition of platelet adhesion to collagen as a new target for antithrombotic drugs. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2003 Jun;3(2):125-40.
115. Wu D, Meiring M, Kotze HF, Deckmyn H, Cauwenberghs N. Inhibition of platelet glycoprotein Ib, glycoprotein IIb/IIIa, or both by monoclonal antibodies prevents arterial thrombosis in baboons. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Feb 1;22(2):323-8.
116. Staelens S, Desmet J, Ngo TH, Vauterin S, Pareyn I, Barbeaux P, et al. Humanization by variable domain resurfacing and grafting on a human IgG4, using a new approach for determination of non-human like surface accessible framework residues based on homology modelling of variable domains. *Mol Immunol*. 2006 Mar;43(8):1243-57.
117. Kageyama S, Yamamoto H, Nagano M, Arisaka H, Kayahara T, Yoshimoto R. Anti-thrombotic effects and bleeding risk of AJvW-2, a monoclonal antibody against human von Willebrand factor. *Br J Pharmacol*. 1997 Sep;122(1):165-71.
118. De Meyer SF, De Maeyer B, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. Von Willebrand factor: drug and drug target. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2009 Mar;9(1):9-20.
119. Gilbert JC, DeFeo-Fraulini T, Hutabarat RM, Horvath CJ, Merlino PG, Marsh HN, et al. First-in-human evaluation of anti von Willebrand factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers. *Circulation*. 2007 Dec 4;116(23):2678-86.
120. Oney S, Nimjee SM, Layzer J, Que-Gewirth N, Ginsburg D, Becker RC, et al. Antidote-controlled platelet inhibition targeting von Willebrand factor with aptamers. *Oligonucleotides*. 2007 Fall;17(3):265-74.
121. Paulinska P, Spiel A, Jilma B. Role of von Willebrand factor in vascular disease. *Hamostaseologie*. 2009 Jan;29(1):32-8.
122. Diener JL, Daniel Lagasse HA, Duerschmied D, Merhi Y, Tanguay JF, Hutabarat R, et al. Inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet activation and thrombosis by the anti-von Willebrand factor A1-domain aptamer ARC1779. *J Thromb Haemost*. 2009 Jul;7(7):1155-62.

123. Knobl P, Jilma B, Gilbert JC, Hutabarat RM, Wagner PG, Jilma-Stohlawetz P. Anti-von Willebrand factor aptamer ARC1779 for refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion*. 2009 Oct;49(10):2181-5.
124. Maree AO, Fitzgerald DJ. Variable platelet response to aspirin and clopidogrel in atherothrombotic disease. *Circulation*. 2007 Apr 24;115(16):2196-207.
125. Angiolillo DJ, Bhatt DL, Gurbel PA, Jennings LK. Advances in antiplatelet therapy: agents in clinical development. *Am J Cardiol*. 2009 Feb 2;103(3 Suppl):40A-51A.
126. Kuliczkowski W, Witkowski A, Polonski L, Watala C, Filipiak K, Budaj A, et al. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2009 Feb;30(4):426-35.
127. Cattaneo M. ADP receptors: inhibitory strategies for antiplatelet therapy. *Drug News Perspect*. 2006 Jun;19(5):253-9.
128. Steinhubl S, Roe MT. Optimizing platelet P2Y12 inhibition for patients undergoing PCI. *Cardiovasc Drug Rev*. 2007 Summer;25(2):188-203.
129. L'Allier PL, Ducrocq G, Pranno N, Noble S, Ibrahim R, Gregoire JC, et al. Clopidogrel 600-mg double loading dose achieves stronger platelet inhibition than conventional regimens: results from the PREPAIR randomized study. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Mar 18;51(11):1066-72.
130. Antman EM, Hand M, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Halasyamani LK, et al. 2007 focused update of the ACC/AHA 2004 guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Jan 15;51(2):210-47.
131. Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2008 Dec;29(23):2909-45.
132. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Jan;26(1):41-8.
133. Ellis SG, Tendera M, de Belder MA, van Boven AJ, Widimsky P, Janssens L, et al. Facilitated PCI in patients with ST-elevation myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008 May 22;358(21):2205-17.
134. Ortolani P, Marzocchi A, Marrozzini C, Palmerini T, Saia F, Taglieri N, et al. Long-term effectiveness of early administration of glycoprotein IIb/IIIa agents to real-world patients undergoing primary percutaneous interventions: results of a registry study in an ST-elevation myocardial infarction network. *Eur Heart J*. 2009 Jan;30(1):33-43.