

Université de Montréal

**Évaluation pré-clinique et clinique de deux nouvelles stratégies dans
le traitement des maladies cardiovasculaires : Activité anti-
thrombotique de l'inhibition du récepteur P2Y1 et activité anti-
inflammatoire de l'inhibition du récepteur PAR-1**

par

Judith Babin

Département des Sciences Biomédicales

Faculté des Études Supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences biomédicales

option générale

Décembre, 2009

© Judith Babin, 2009

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Évaluation pré-clinique et clinique de deux nouvelles stratégies dans le traitement des
maladies cardiovasculaires : activité anti-thrombotique de l'inhibition du récepteur
P2Y1 et activité anti-inflammatoire de l'inhibition du récepteur PAR-1

Présenté par :

Judith Babin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean Gino Diodati

Président-rapporteur

Dr Pierre Thérioux

Directeur de recherche

Dr Arnaud Bonnefoy

Codirecteur

Dr Jean-François Tanguay

Membre du jury

Résumé

Alors que la plaquette a un rôle prépondérant dans le maintien de l'hémostase, son implication dans la formation de la thrombose est également incontestée. Il existe à présent des traitements antiplaquettaires mais ceux-ci présentent quelques failles. Le but de ma maîtrise a donc été de caractériser de nouvelles voies d'inhibition de l'activité plaquettaire.

Les deux études qui ont été réalisées concernent l'inhibition de récepteurs couplés aux protéines G, soit le récepteur à l'ADP P2Y₁ et le récepteur à la thrombine PAR-1.

Dans un premier temps, l'étude du récepteur P2Y₁ suggère que l'inhibition de celui-ci seul ou en combinaison avec l'inhibition du récepteur P2Y₁₂ présente un potentiel thérapeutique chez des patients coronariens stables.

Dans un deuxième temps, l'étude d'un nouvel antiplaquettaire qui est présentement en phase III de son développement clinique, soit le SCH 530348, a été effectuée. Étant un antagoniste du récepteur PAR-1, le SCH 530348 a des effets qui se répercutent à la fois chez la plaquette et les leucocytes qui possèdent eux aussi ce récepteur. Cette deuxième étude suggère que complémentairement à son effet chez la plaquette, cet inhibiteur diminue les marqueurs de l'inflammation systémique.

Mots clés : P2Y₁₂, P2Y₁, protease-activated receptor-1, PAR-1, SCH 530348, plaquette, thrombose, inflammation, leucocyte

Abstract

Platelets have a central role in haemostasis as well as in the pathology of atherothrombotic disease. Antiplatelet therapy is the standard treatment for patients with coronary heart disease. However, the current antiplatelet agents show some disadvantages. The aim of my studies was then to describe the effect of inhibition of platelet activation pathways that are not yet the target of clinically used therapies.

The two studies that were performed are regarding the inhibition of two G coupled-protein receptors, which are the ADP P2Y₁ receptor and the thrombin PAR-1 receptor.

First, the study of P2Y₁ receptor revealed that its inhibition alone or in combination with the inhibition of P2Y₁₂ receptor show a therapeutic potential in patients with stable coronary disease.

Second, the study of a novel antiplatelet agent, SCH 530348, which is in phase III of its clinical development, has been carried out. SCH 530348, which is a PAR-1 receptor antagonist, can therefore act on platelets as well as on leukocytes which also express this receptor. This second study showed that additionally to its effect on platelet activation inhibition, SCH 530348 also reduces the cell-surface markers of systemic inflammation.

Keywords : P2Y12, P2Y1, protease-activated receptor-1, PAR-1, SCH 530348, platelet, thrombosis, inflammation, leukocyte

Table des matières

RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT.....	V
TABLE DES MATIERES.....	VII
Liste des tableaux.....	VIII
Liste des figures.....	IX
Liste des abréviations.....	XI
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 LA PLAQUETTE.....	1
1.2 BIOGENÈSE.....	1
1.3 MORPHOLOGIE.....	2
1.4 RÔLE DANS LA PHYSIOLOGIE.....	5
1.4.1 Adhésion.....	6
1.4.2 Activation/sécrétion.....	7
1.4.3 Agrégation.....	9
1.5 RÔLE DANS LA PATHOLOGIE CORONARIENNE.....	10
1.5.1 Interaction leucocytes-plaquettes.....	13
1.5.2 Implication des récepteurs couplés aux protéines G. Exemple des récepteurs purinergiques et des récepteurs à la thrombine.....	18
1.6 ANTIPLAQUETTAIRES.....	23
1.6.1 Aspirin.....	23
1.6.2 Les thiénoxyridines.....	24
1.6.3 Inhibiteurs de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (récepteur GPIIb/IIIa).....	26
1.6.4 Thérapies anti-plaquettaires en voie de développement.....	27
1.7 INTRODUCTION AU TRAVAIL DE RECHERCHE.....	31
2. RÉSULTATS.....	33
2.1 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 1.....	33
2.1.1 Abstract.....	35
2.1.2 Introduction.....	38
2.1.3 Methods.....	39
2.1.4 Results.....	43
2.1.5 Discussion.....	46
2.2 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 2.....	68
2.2.1 Résumé.....	71
2.2.2 Introduction.....	73
2.2.3 Matériel et méthodes.....	75
2.2.4 Résultats.....	89
2.2.5 Discussion.....	92
3. DISCUSSION.....	105
4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	110
5. BIBLIOGRAPHIE.....	XV

Liste des tableaux

TABLEAU I : RÉCEPTEURS PLAQUETTAIRES ET LIGANDS CORRESPONDANTS.....	4
TABLEAU II : PARAMÈTRES PLAQUETTAIRES DANS LA RÉPONSE AU MRS2179, CLOPIDOGREL ET COMBINAISON.....	53
TABLEAU III: INFORMATIONS ET HISTOIRE CLINIQUE DES PATIENTS INCLUS DANS L'ÉTUDE TRA 2P.....	67
TABLEAU IV : POURCENTAGE D'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE MAXIMAL EN PRÉSENCE D'ADP ET DE TRAP.....	68
TABLEAU V : EFFET DU TRAITEMENT (SCH 530348 OU PLACEBO) SUR LE POURCENTAGE DE CONJUGUÉS LEUCOCYTES-PLAQUETTES FORMÉS.....	69
TABLEAU VI : EFFET DU TRAITEMENT (SCH 530348 OU PLACEBO) SUR LE NIVEAU D'EXPRESSION DE MAC-1.....	70
TABLEAU VII : EFFET DU TRAITEMENT (SCH 530348 OU PLACEBO) SUR L'EXPRESSION DU FACTEUR TISSULAIRE.....	71

Liste des figures

FIGURE 1 : PRINCIPAUX RÉCEPTEURS PLAQUETTAIRES ET AGONISTES RESPECTIFS.....	3
FIGURE 2: TYPES D'INTERACTIONS POSSIBLES ENTRE LES LEUCOCYTES ET LES PLAQUETTES.....	13
FIGURE 3 : MÉCANISME D'ACTION DES RÉCEPTEURS PAR-1 ET PAR-4	16
FIGURE 4 : VOIES D'INHIBITION DES AGENTS ANTIPLAQUETTAIRES PRÉSENTEMENT UTILISÉS EN CLINIQUE.....	28
FIGURE 5 : EFFETS DU MRS2179 SUR L'ADHÉSION PLAQUETTAIRE ET LA FORMATION DE LA THROMBOSE.....	50
FIGURE 6 : INFORMATION SUR DIVERS PARAMÈTRES PLAQUETTAIRES.....	51
FIGURE 7 : INHIBITION DE L'AGRÉGATION, DE LA SÉCRÉTION, DE L'ACTIVATION ET DE LA FORMATION DE CONJUGUÉS.....	52
FIGURE 8 : EXEMPLES DE COURBES D'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE AVANT ET 30 JOURS APRÈS LE DÉBUT DU TRAITEMENT AU PLACEBO OU AU SCH 530348.....	80
FIGURE 9 : REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DU POURCENTAGE DE CONJUGUÉS LEUCOCYTE-PLAQUETTE FORMÉS.....	82
FIGURE 10 : ANALYSE EN CYTOMÉTRIE DE FLUX POUR LA DÉTERMINATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DE MAC-1 À LA SURFACE DE LEUCOCYTES SEULS OU CONJUGUÉS.....	83
FIGURE 11 : REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DE LA MOYENNE D'INTENSITÉ DE FLUORESCENCE DU SIGNAL MAC-1 À LA SURFACE DE LEUCOCYTES SEULS OU CONJUGUÉS.....	85
FIGURE 12 : ANALYSE EN CYTOMÉTRIE DE FLUX POUR LA DÉTERMINATION DU POURCENTAGE DE CELLULES EXPRIMANT LE FACTEUR TISSULAIRE À LEUR SURFACE.....	86

FIGURE 13 : REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DU POURCENTAGE DE LEUCOCYTES CONJUGUÉS EXPRIMANT LE FACTEUR TISSULAIRE À LEUR SURFACE MEMBRANAIRE.....	88
---	----

Liste des abréviations

AAS :	Acide Acétylsalicylique
AC :	Adénylate cyclase
ADP :	Adénosine 5'-diphosphate
Agg _{max} :	Agrégation maximale
Agg _{6min} :	Agrégation tardive
AMP :	Adénosine monophosphate
Arg :	Arginine
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ASA :	Aspirin
CD40L :	CD40 Ligand
CAD :	Maladie coronarienne
COX-1 :	Cyclooxygénase-1
DAG :	Diacylglycérol
ERK _{1/2} :	Extracellular signal regulated kinase 1 and 2
ESL-1 :	E-selectin ligand-1
GEF :	Guanine nucleotide exchanging factors
Gly :	Glycine
GP :	Glycoprotéine
HTA :	Hypertension artérielle
IAM :	Infarctus aigu du myocarde
ICAM :	Molécule d'adhésion intercellulaire
IL :	Interleukine
IMC :	Indice de masse corporelle
IMNQ :	Infarctus du myocarde sans onde Q
IP3 :	Inositol triphosphate
JAK :	Janus-activated kinase
JAM-3 :	Junctional adhesion molecule-C
JNK :	c-Jun N-terminal kinase
LFA-1 :	Lymphocyte function-associated antigen-1
LDL :	Lipoprotéines de basse densité

MAC-1 :	Macrophage-1 antigen
MAP:	Mitogen-activated protein
MCP-1 :	Monocytes Chemoattractant Protein-1
MFI :	Intensité de fluorescence moyenne
MRS2179:	N6-methyl-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate
NFAT :	Nuclear factor of activated T cell
NSTEMI :	Infarctus du myocarde sans élévation du segment ST
PAC-1:	Anticorps monoclonal qui lie le récepteur α IIb β 3 activé
PAF:	Platelet activating factor
PAR:	Protease activated receptor
PC5:	Phycoerythrin-CY5
PI 3-K:	Phosphoinositide 3-kinase
PKB :	Protéine kinase B
PKC :	Protein kinase C
PLC β :	Phospholipase C- β
Plt-mono:	Conjugué plaquette-monocyte
Plt-PMN:	Conjugué plaquette-granulocyte
PMNs:	Granulocytes
PPACK:	D-phenylalanyl-prolyl-argininechloromethylketone
PRP:	Plasma riche en plaquettes
PSGL-1 :	P-Selectin glycoprotein ligand-1
RCPG :	Récepteur couplé aux protéines G
ROS :	Dérivés réactifs de l'oxygène
ROCK :	Rho/Rho Kinases
RPE :	R-phycoerythrine
SDF-1:	Stromal cell-derived factor-1
Ser:	Sérine
SRE :	Serum response element
STAT1/3 :	Signal transducer and activator of transcription 1 and 3
STEMI :	Infarctus du myocarde avec élévation du segment ST
TBS :	Tris-buffered saline

TF :	Facteur tissulaire
TNF :	Facteur de nécrose tumorale
TRAP:	Thrombin Receptor Agonist Peptide
TRAP ⁻ :	Patients non répondant au TRAP
TRAP ⁺ :	Patients répondant au TRAP
Tx :	Traitement
TXA ₂ :	Thromboxane A ₂
VASP :	Vasodilatator-stimulated phosphoprotein
VLA-4 :	Very late activation antigen-4
VWF:	Facteur Von Willebrand

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Pierre Théroux, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Son expertise et la confiance qu'il a démontrée à mon égard m'ont permis de bien progresser tout au long de ma maîtrise.

Je remercie vivement le Dr Jean Gino Diodati pour avoir accepté d'occuper le rôle de président-rapporteur du jury de ce mémoire.

Je remercie chaleureusement le Dr Jean-François Tanguay pour me faire l'honneur de participer au jury de ce mémoire.

Je tiens à remercier le Dr Arnaud Bonnefoy qui m'a guidée tout au long de mon parcours. Son grand savoir, son optimisme infailible et sa grande disponibilité m'ont été d'une aide précieuse.

Je désire également remercier tous les membres du laboratoire sans qui mon expérience n'aurait pas été aussi enrichissante. Je tiens tout d'abord à témoigner ma reconnaissance à Mmes Marta Ghitescu et Jacinthe Rivard pour tout le soutien ainsi que les bons conseils qu'elles m'ont apportés. Je remercie Benoît Labarthe ainsi que Catherine Martel pour avoir partagé leurs connaissances avec moi et pour leur vitalité. Je remercie Jonathan Béland pour son dynamisme et son travail sérieux. Merci à Relique Massala pour sa bonne humeur contagieuse. Merci finalement à Sylvie Cointe pour sa complicité et sa gentillesse.

Je veux également remercier l'indispensable équipe des infirmières pour leur aide et leur bonne humeur : Mmes Suzanne Bujold, Anne-Marie Poitras et Nathalie Gendron.

Merci beaucoup à Marie-France Bouchard pour son aide et sa gentillesse tout au long de ces deux années.

Je désire remercier tous les volontaires et les patients qui ont accepté de participer à nos études, sans quoi rien n'aurait été possible.

Finalement, je désire profondément remercier les membres de ma famille pour le grand soutien inconditionnel qu'ils m'offrent depuis toujours, leur patience, leurs encouragements et pour m'avoir appris à persévérer afin d'atteindre mes objectifs.

1. Introduction

1.1 La plaquette

La plaquette ou thrombocyte est une cellule sanguine que l'on retrouve en concentration de 150 000 à 400 000 par microlitre de sang [1] et dont la durée de vie varie entre 8 et 10 jours [2]. La plaquette assure un rôle essentiel dans le processus d'hémostase par sa contribution à la formation du caillot. On lui attribue également un rôle dans la formation de la thrombose associée aux maladies cardiovasculaires, en particulier les maladies coronariennes.

1.2 Biogenèse

La plaquette est issue de la fragmentation du mégacaryocyte. Le mégacaryocyte, représente une faible quantité des cellules myéloïdes, soit environ 1%, et on le retrouve principalement dans la moelle osseuse bien qu'il soit également présent au niveau du poumon ainsi que dans le sang périphérique [3]. Cette cellule qui est le produit de l'évolution des cellules souches hématopoïétiques, est une cellule multinucléée et représente le type cellulaire ayant plus grande taille retrouvé dans la moelle osseuse. Sous l'influence de la thrombopoïétine [4] et de nombreuses cytokines dont l'IL-3, l'IL-6 ainsi que l'IL-11 [5], le mégacaryocyte subira un processus de maturation. Après endomitose de son noyau, le mégacaryocyte suivra une série de changements pour ensuite être libéré dans la circulation au niveau des sinusoides sous forme de proplaquette puis finalement former la plaquette [6]. Un

mégacaryocyte a la capacité de produire environ 10^4 plaquettes [7] et un humain sain produit environ 10^{11} plaquettes par jour [8].

1.3 Morphologie

Bien qu'en apparence simple, la plaquette a une structure complexe qui lui est propre. La plaquette est une cellule sanguine anucléée de très petite taille, soit entre 2 à 4 μm . Sa zone périphérique consiste en une membrane et des invaginations qui forment un système canaliculaire ouvert [9, 10]. À sa surface, la plaquette exprime de nombreux récepteurs transmembranaires qui lui confèrent ses diverses fonctions. Parmi ceux-ci se trouvent des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G, des intégrines, des récepteurs de la superfamille des immunoglobulines, des glycoprotéines et des récepteurs tyrosine kinase [11, 12]. Les principaux récepteurs et leur ligand respectif sont illustrés à la figure 1 et le tableau I présente une liste plus exhaustive.

Le cytoplasme de la plaquette renferme un cytosquelette, un système tubulaire dense qui agit à titre de site d'entreposage pour le calcium et les enzymes impliquées dans la synthèse de prostaglandines [13], quelques mitochondries, des granules de glycogène, des lysosomes ainsi que deux types de granules de sécrétion, soit les granules α et les granules denses [14]. Les granules α contiennent surtout des protéines ayant une fonction d'adhésion alors que les granules denses contiennent davantage des molécules nécessaires au recrutement et l'activation de plaquettes en circulation tel que montré dans le tableau I. Une fois la plaquette activée, une partie du contenu de ses granules sera libéré dans la circulation alors que certaines

molécules seront externalisées par fusion de la membrane de la granule à la membrane cellulaire.

De plus, bien que le cytoplasme de la plaquette ne renferme pas de noyau, il a été observé que la plaquette possédait tout de même toute la machinerie nécessaire à la traduction et la synthèse de protéines [15].

Il est également intéressant de noter que la plaquette offre une impressionnante plasticité : En effet, sa forme varie beaucoup tout au long de son processus d'activation. À son état de base, soit en l'absence d'activation, la plaquette est de forme discoïde. Par contre, une fois activée, elle subit un réarrangement de son cytosquelette, la menant ainsi à une forme de type sphérique. Lors d'un contact avec une surface thrombogène elle a la capacité de s'étaler et de recouvrir un périmètre plus important grâce à un réseau canaliculaire dense. Ce réseau qui pénètre à l'intérieur de la cellule est formé par des invaginations de la membrane plasmique et peut s'externaliser augmentant significativement la surface exposée [14].

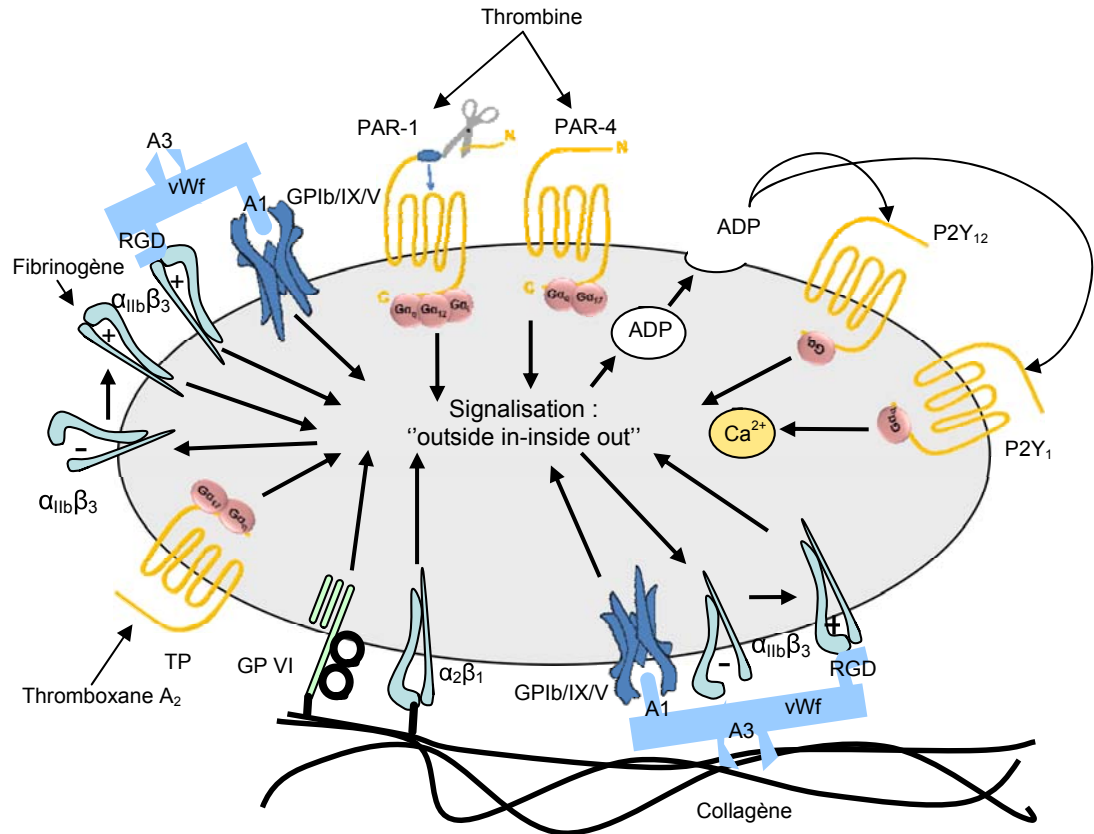


Figure 1 : Principaux récepteurs plaquettaire et agonistes respectifs
Adapté de Rivera et coll. [11] et Ruggeri [16]

Tableau I : Récepteurs plaquettaires et ligand correspondant.

ADP : Adénosine diphosphate ; PAR : Protease-activated receptor; PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion molecule-1; PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1 ; RCPG : Récepteur couplé aux protéines G; TLR : Toll-like receptor ; TSP-1 : Thrombospondine-1; VLA : Very late activation antigen ; vWF : Facteur von Willebrand

CLASSE DE RÉCEPTEURS	RÉCEPTEUR	LIGAND
RCPG	PAR-1, PAR-4 P2Y ₁ , P2Y ₁₂ , P2X ₁ TP α , TP β	THROMBINE ADP THROMBOXANE A2
INTÉGRINES	$\alpha_{11b}\beta_3$ $\alpha_2\beta_1$ $\alpha_5\beta_1$ $\alpha_6\beta_1$ $\alpha_8\beta_1$ $\alpha_v\beta_3$	FIBRINOGENÈ, VWF, COLLAGÈNES I-IV, FIBRONECTINE, LAMININE, EPILIGRINE FIBRONECTINE, VWF, FIBRINOGENÈ, COMPLEXES IMMUNS
SUPERFAMILLE DES RÉCEPTEURS TYROSINE KINASE	FC γ RIIa GP VI CD110 Tvro3, Axl, Mer EPH KINASES	COLLAGÈNE THROMBOPOÏÉTINE GAS-6 EPHRINE
RECEPTEURS RICHE EN	TLR2,TLR4, TLR9 GP Ib/IX/V	PATHOGÈNES VWF
AUTRES	CD63 CD36 PSGL-1	VLA-3, VLA-6 TSP-1 P-SÉLECTINE

1.4 Rôle dans la physiologie

En condition normale, les plaquettes circulent librement dans le sang, sans interagir avec la paroi vasculaire. Par contre, suite à l'altération de l'endothélium tel que produit par une blessure, le rôle de la plaquette est associé à l'hémostase et sert de prime abord à éviter la perte sanguine. La formation d'un caillot est un phénomène dynamique qui implique des étapes déterminantes telles que l'adhésion, l'activation, la sécrétion et l'agrégation plaquettaire. Ce processus agit de concert avec le système de la coagulation afin de permettre la formation d'un caillot stable.

1.4.1 Adhésion

Suite à une lésion de l'endothélium, alors que la matrice sous-endothéliale est mise à nue, la plaquette adhère rapidement aux constituants thrombogènes de la paroi vasculaire endommagée. Les récepteurs impliqués dans l'adhésion plaquettaire dépendent grandement des conditions rhéologiques, soit du taux de cisaillement présent dans la circulation au niveau du vaisseau lésé. Le taux de cisaillement présent dans une veine est généralement plus faible (inférieur à 500 s^{-1}) que pour la microvasculature ($1\ 500 - 3\ 000 \text{ s}^{-1}$). En présence d'un faible taux de cisaillement, l'adhésion plaquettaire est d'abord initiée par le collagène fibrillaire, la fibronectine et la laminine alors que dans le cas opposé, le processus fera intervenir le VWF en premier lieu [17, 18].

Le VWF est synthétisé chez les cellules endothéliales et on en retrouve également dans les granules α des plaquettes [19]. Le VWF synthétisé par la cellule endothéliale est ensuite dirigé à la fois dans deux directions : Une portion sera libérée sous forme soluble vers le plasma tandis qu'une autre portion sera conduite vers la matrice sous-endothéliale [20] où il formera un complexe avec les filaments de collagène de type I, III et VI via ses domaines A1 et A3 [21]. La forme soluble du VWF peut également s'immobiliser sur du collagène de la matrice sous-endothéliale qui aurait été exhibé suite à une lésion de l'endothélium. En condition de cisaillement élevé, lors d'une lésion, l'interaction du domaine A1 du VWF avec la portion GP Ib α du complexe GP Ib/IX/V plaquettaire sert à diminuer la vitesse de la plaquette, ce qui permet à d'autres récepteurs, tels que les récepteurs GP VI et $\alpha_2\beta_1$, de se lier à leur ligand respectif, amenant une liaison plus stable [22]. En se liant au collagène, le GP VI engendrerait une signalisation intracellulaire menant à un changement de

conformation de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, et, conséquemment, l'activation de cette dernière [23]. La liaison de $\alpha_2\beta_1$ au collagène serait responsable d'une liaison stable et ferme de la plaquette à la matrice sous endothéliale. Les plaquettes ainsi adhérees forment une monocouche au niveau de l'endothélium et s'engagent dans le recrutement de plaquettes en circulation afin de créer l'agrégat.

1.4.2 Activation/sécrétion

L'activation de la plaquette aurait lieu dès son adhésion au VWF : Une mobilisation du calcium intracellulaire suite à l'interaction du GP Ib/IX/V avec le VWF serait responsable de l'activation du récepteur $\alpha_{11b}\beta_3$ [24]. Le récepteur GP VI lié à son ligand ainsi que le récepteur $\alpha_2\beta_1$ seraient également impliqués dans la transduction de signal d'activation plaquettaire. Alors que GP VI initierait le signal, l'adhésion ferme du $\alpha_2\beta_1$ au collagène renforcerait ce signal de façon à multiplier le niveau d'activation de la plaquette [23]. Une fois activée, tel que mentionné précédemment, la plaquette subira un réarrangement de son cytosquelette, se traduisant par un rapide changement de morphologie.

La mobilisation de calcium engendrée par la signalisation intracellulaire favoriserait également la sécrétion du contenu des granules intracytoplasmiques [25] de la plaquette, libérant ainsi plusieurs molécules dont l'ADP et favoriserait la synthèse d'éléments tel que le thromboxane A_2 par la plaquette. La libération de ces molécules a pour but d'amplifier l'activation de plaquettes déjà initiée par d'autres agonistes. L'ADP, via son récepteur $P2Y_1$, activera de façon paracrine les cellules afin d'accroître l'activation des plaquettes environnantes. Quant à lui, le récepteur $P2Y_{12}$ servira à renforcer le signal préalablement initié par $P2Y_1$ [26].

Suite à son activation, la plaquette développera également une activité procoagulante en modifiant sa membrane lipidique et en sécrétant dans son environnement plusieurs facteurs de coagulation [27]. En effet, parmi les molécules contenues dans les granules α qui seront libérées lors de l'activation plaquettaire, on retrouve entre autres de nombreuses molécules procoagulantes dont plusieurs facteurs de la cascade de coagulation [25] nécessaires à la formation de la thrombine. La thrombine ainsi formée a le rôle du plus puissant agoniste plaquettaire et donc amplifie grandement la réponse plaquettaire via les récepteurs PAR-1 et PAR-4 [28]. La formation de la thrombine par la cascade de coagulation aboutira également à la formation de fibrine [29] qui, en se fixant au thrombus, formera un caillot stable. De plus, d'autres molécules telles que la phosphatidylsérine située sur la partie interne de la membrane cellulaire sera extériorisée du côté extracellulaire de la membrane suite à l'activation de la plaquette [30]. La phosphatidylsérine sert à la liaison des ions calcium nécessaires à la fixation des facteurs de la coagulation aux plaquettes. La présence de TF à la surface des plaquettes activées est quant à elle très controversée [31]. Certains affirment que du TF pourrait se retrouver à la surface de ces cellules mais qu'il proviendrait de microparticules dérivées de cellules ayant la capacité d'exprimer le TF [32]. Toutefois, une équipe a démontré une augmentation de l'expression de TF dans des échantillons de plaquettes lavées, suite à une activation par différents agonistes, suggérant que le TF provienne bel et bien de la plaquette [33]. Le TF est le point de départ de la voie extrinsèque de la cascade de coagulation. Son interaction avec le facteur VIIa de la coagulation présent en circulation conduit à la formation du facteur Xa, qui lui, convertira la prothrombine en thrombine. Non seulement la thrombine catalyse la transformation du fibrinogène en fibrine mais, tel que

mentionné ci-haut, elle est un puissant agoniste plaquettaire [34]. De plus, la thrombine a un rôle dans l'activation du complément. Lors d'une activité excessive, le complément, qui à l'origine possède un rôle dans l'immunité, peut engendrer des dommages cellulaires et ainsi favoriser le développement de nombreuses pathologies dont les maladies coronariennes [35]. Huber-Lang et coll. ont montré que la thrombine avait la capacité d'activer le système du complément en clivant le segment C5 pour former le fragment peptidique C5a [36].

1.4.3 Agrégation

Les premières plaquettes activées adhéreront à la surface thrombogène et recruteront des plaquettes circulantes par l'intermédiaire de la sécrétion d'agonistes (ADP, sérotonine), de protéines de liaison (thrombospondine, fibrinogène) puis la synthèse et sécrétion de thromboxane A₂. L'activation de ces plaquettes circulantes implique entre autre l'activation de la phospholipase C, l'augmentation du calcium intracellulaire, l'activation de la protéine kinase C et le remodelage du cytosquelette [11]. Cette cascade d'événement amènera un changement de conformation de $\alpha_{IIb}\beta_3$, augmentant son affinité pour ses deux ligands, soit le fibrinogène et le VWF [37]. Le fibrinogène est présent sous forme soluble dans le plasma et est également sécrété des granules α après activation de la plaquette. C'est donc par l'intermédiaire de l'interaction du $\alpha_{IIb}\beta_3$ avec le fibrinogène et le VWF que les plaquettes pourront se lier les unes aux autres, de façon à former un agrégat. La fibrine, produit final de la cascade de coagulation se rajoutera à l'agrégat de plaquettes formé et aura donc un rôle essentiel pour la consolidation définitive du caillot.

1.5 Rôle dans la pathologie coronarienne

La maladie coronarienne est souvent une conséquence de l'athérosclérose et est une cause majeure de mortalité dans les pays industrialisés. En 2007, environ 1,2 millions d'Américains ont subi un infarctus du myocarde et environ 452 000 d'entre eux en sont décédés [38]. En 2005, le Canada recensait plus de 55 000 décès attribuables à l'avènement d'infarctus du myocarde ou d'une autre maladie cardiaque ischémique [39].

La plaquette a, entre autres, un rôle clé dans la formation de la thrombose, conséquence commune de l'athérosclérose. L'athérosclérose est une maladie caractérisée par la formation de lésions dans la paroi vasculaire soit des plaques d'athérome située au niveau de l'intima et provoquant un rétrécissement progressif de la lumière du vaisseau sanguin. La croissance de la plaque d'athérome formée peut soit mener à l'occlusion partielle du vaisseau ou à l'occlusion complète suite à la formation du thrombus [40].

Il existe de nombreux facteurs de risques favorisant le développement de l'athérosclérose. Il existe une composante génétique qui englobe l'hypercholestérolémie familiale, l'hypertension artérielle, le diabète et l'obésité [41, 42]. Des facteurs de risques environnementaux et des habitudes de vies inadéquates telles qu'une alimentation riche en gras, le tabagisme et le manque d'exercice favorisent également grandement les risques de développement de la pathologie [41].

Le développement et la progression de l'athérosclérose est un processus complexe qui s'étend sur une période de plusieurs années. Les premières lésions apparaissent tôt dans le développement de l'être humain sous formes de stries lipidiques et sont bénignes. Toutefois, ces dernières agissent comme précurseur des lésions plus

avancées [40]. Les premières lésions se forment préférentiellement dans des régions d'embranchement artériel où le flux n'est pas laminaire. Ceci augmente la perméabilité de l'endothélium de façon à favoriser l'incorporation de LDL vers l'intima [43]. Les LDL ainsi infiltrés subiront de nombreuses modifications dont l'oxydation par des ROS stimulant l'endothélium à produire, entre autres, des facteurs chimiotactiques et des molécules d'adhésion telles que ICAM-1, P-sélectin, E-sélectin, PCAM-1 et VCAM-1 [41]. Ce processus aura pour effet d'attirer les monocytes et les lymphocytes au niveau de la matrice sous-endothéliale. Les monocytes ainsi infiltrés se différencieront en macrophages. Ces macrophages engloutiront par la suite les LDL oxydés et deviendront des cellules spumeuses [44]. Les cellules musculaires lisses de la média migreront vers l'intima modifiant alors leur phénotype de cellules musculaires à cellules sécrétoires, modifiant la matrice extracellulaire et entraînant la formation d'une capsule fibreuse recouvrant la lésion [41]. Les plaques d'athérome riches en lipides extracellulaires et recouvertes d'une capsule minces et moins fibreuse sont beaucoup plus instables que celles riches en collagène contenant une faible quantité de lipides et une capsule ferme [45].

Les cellules spumeuses affichent une activité proinflammatoire accrue dont la sécrétion de MCP-1, $\text{TNF}\alpha$, IL-1 et IL-2 [46]. Les macrophages entreraient également en apoptose, libérant des métalloprotéinases menant à la destruction de la matrice extracellulaire et donc affaiblissant la capsule fibreuse qui peut alors se rompre sous l'action de la pression exercée par la circulation sanguine [46].

Bien que, dans certains cas, la croissance de la plaque athérosclérotique puisse engendrer une perturbation du flot sanguin et produire une ischémie myocardique progressive, la formation de la plaque est souvent un processus asymptomatique.

C'est la rupture ou l'érosion de la chape fibreuse de la plaque qui conduit à l'avènement de la thrombose [47].

Une plaque athérosclérotique ainsi rompue met entre autre à nu le collagène situé dans la matrice extracellulaire, provoquant conséquemment l'adhésion et l'activation plaquettaire. De plus, le TF produit par les macrophages et l'endothélium se retrouve désormais lui aussi en contact direct avec le sang, déclenchant alors la cascade de coagulation [48]. Ce processus mène donc à la formation d'un thrombus riche en plaquettes qui occlura partiellement ou complètement l'artère dans laquelle il se trouve. Le thrombus formé peut également quitter le site de lésion et former une embolie en allant se loger dans un vaisseau de plus petit diamètre.

Les manifestations cliniques associées aux événements thrombotiques dépendent du type de thrombose formée et de sa localisation. La formation d'un thrombus partiellement occlusif n'engendrera pas les mêmes conséquences qu'un thrombus qui obstrue totalement le vaisseau.

L'angine stable est la conséquence de la progression de la croissance d'une plaque athérosclérotique qui obstrue plus de 50% du diamètre de la lumière vaisseau. L'angine est causée par une ischémie du myocarde qui se produit lorsque les besoins en oxygène surpassent l'apport d'oxygène qui peut être transporté par le flux sanguin diminué [49]. Les symptômes de l'angine stable se manifestent souvent par une douleur à la poitrine lors d'un effort physique effectué par le patient [50]. L'angine stable ne produit pas de nécrose [51]. De plus, les patients atteints d'angine stable sont moins à risque de mener à un infarctus puisque la lésion n'est pas vulnérable et que sa progression est lente.

La formation d'un caillot occlusif produira un syndrome coronarien aigu qui peut se traduire soit par une angine instable, un infarctus du myocarde avec ou sans élévation du segment ST, ou la mort subite [52]. Un thrombus qui occlue la totalité du vaisseau est souvent associée aux STEMI alors qu'un thrombus moins occlusif est associé à la formation d'embolie distale qui se traduit soit par l'angine instable ou le NSTEMI [53].

L'angine instable et le NSTEMI ont de nombreuses similarités mais on les distingue par leur degré de sévérité, leur durée et le niveau de la douleur. On différencie le NSTEMI de l'angine instable par la présence de marqueurs biochimiques de nécrose myocardique dont les troponines-T et -I [54]. De surcroît, contrairement à l'angine instable, le NSTEMI présente habituellement un sous-décalage du segment ST à l'électrocardiogramme. De plus, les douleurs répétitives ressenties par le patient sont généralement d'une plus longue durée lors de NSTEMI que lors d'angine instable, soit plus de 20 à 30 minutes lors de NSTEMI et de plus courte durée lors d'angine instable [55]. Quant au STEMI, il s'apparente au NSTEMI mais présente en plus une élévation du segment ST à l'électrocardiogramme [54]. De plus, les douleurs associées au STEMI sont beaucoup plus prolongées que dans le cas de NSTEMI [55]. Les dommages engendrés par un STEMI sont également d'un ordre beaucoup plus sévère que dans le cas des NSTEMI, alors qu'ils peuvent s'étendre sur toute l'épaisseur du myocarde.

1.5.1 Interaction leucocytes-plaquettes

Il est connu que l'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique. Tel que mentionné précédemment, cette maladie se caractérise entre autre par une

accumulation de leucocytes au niveau de la lésion. L'infiltration des leucocytes vers l'intima, nommé diapédèse, est d'abord rendu possible par l'intermédiaire de molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules endothéliales activées en condition d'athérosclérose [56]. En premier lieu, le leucocyte s'attachera initialement et faiblement à l'endothélium. Cette étape fait intervenir les molécules VLA-4 et L-sélectine qui sont toutes deux constitutivement exprimées à la membrane du leucocyte, avec respectivement sur l'endothélium, le sialyl-Lewis^x ainsi que VCAM-1, molécule dont l'expression est grandement augmentée suite à une activation de la cellule [57, 58]. Les cellules endothéliales activées exprimeront à leur surface la P-sélectine suite à l'exocytose des corps de Weibel-Palade ainsi que la E-sélectine. Ces molécules pourront interagir respectivement avec la PSGL-1 et la ESL-1, molécules constitutivement exprimé à la surface des leucocytes, afin d'initier avec l'aide de VLA-4, VCAM-1, L-sélectine et sialyl-Lewis^x, le roulement du leucocyte sur l'endothélium [58]. Après s'être étalé, le globule blanc sera activé puis pourra fermement adhérer aux cellules endothéliales. Cette étape nécessite l'interaction de LFA-1, VLA-4 et la β 2 intégrine MAC-1, sur le leucocyte avec respectivement, sur la cellule endothéliale, ICAM-1 dont l'expression est grandement augmentée suite à une activation, VCAM-1 ainsi que ICAM-2. La migration du leucocyte via les jonctions intercellulaires des cellules endothéliales sera ensuite rendue possible par PECAM-1 et CD99 [58].

La plaquette peut également jouer un rôle prépondérant dans ce processus d'infiltration des leucocytes. En effet, non seulement les plaquettes interagissent entre elles mais elles peuvent également interagir avec les leucocytes par l'entremise de

cytokines et chemokines telles le facteur plaquettaire-4, SDF-1, IL-1 β , CD40L ainsi que RANTES ou par leur interaction directe avec ceux-ci [59, 60].

1.5.1.1 Molécules impliquées dans l'interaction directe plaquettes-leucocytes

L'interaction plaquette-leucocyte met en jeu diverses molécules, les plus importantes étant PSGL-1, MAC-1 et LFA-1 que l'on retrouve à la surface de la membrane leucocytaire [60].

L'attachement initial de la plaquette avec le leucocyte nécessite la liaison de la P-sélectine plaquettaire à la PSGL-1 leucocytaire. Alors que la PSGL-1 est exprimée de façon constitutive par le leucocyte, la P-sélectine, composante des granules α de la plaquette, n'est extériorisée qu'après l'activation de cette dernière [61].

Après ce premier contact entre les deux cellules, une adhésion plus ferme sera réalisée par MAC-1. MAC-1 est une β_2 intégrine ($\alpha_M\beta_2$) exclusive aux leucocytes. Il peut interagir avec une multitude de récepteurs plaquettaires dont la portion GP Ib α du complexe GP Ib/IX/V [62], le CD40L [63] et le fibrinogène qui est lié au récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ [64]. L'interaction de MAC-1 avec l'ICAM-2 est plutôt controversée. En effet, une équipe a montré la possibilité d'une telle interaction [65] alors que deux autres équipes ont démontré le contraire [66-68]. MAC-1 est présent en très faible quantité à la membrane des leucocytes mais son expression est grandement augmentée suite à l'activation par certains agonistes leucocytaires [69]. Étant donné sa nature d'intégrine, MAC-1 doit être activé avant de pouvoir effectuer ses fonctions. Son activation peut être régulée soit par la formation de "cluster" augmentant ainsi son avidité pour son ligand ou par un changement de conformation [70]. MAC-1 peut adopter 3 types de conformations qui lui attribueront chacune un

état d'activité spécifique. Ainsi, le récepteur peut adopter une conformation ouverte qui se traduit par un état actif ou de haute affinité. Une conformation intermédiaire lui procure un état moyennement actif ou de faible affinité, alors qu'une conformation fermée, lui confère un état de repos, de très faible ou d'indélectable affinité [70]. La P-sélectine a un rôle dans l'activation de MAC-1 puisque son interaction avec la PSGL-1 amène la β_2 -intégrine à adopter une conformation intermédiaire via la phosphorylation de tyrosines kinases [71, 72].

Finalement, l'interaction des leucocytes peut également faire intervenir l'intégrine LFA-1 qui a la capacité de se lier à l'ICAM-2 plaquettaire [73].

1.5.1.2 Modèles de l'interaction leucocytes-plaquettes

L'interaction directe leucocytes-plaquettes peut mener à l'infiltration du leucocyte selon 2 modèles. Tout d'abord, une plaquette activée peut se lier au leucocyte dans la circulation de façon à former des conjugués leucocytes-plaquettes et facilitant son interaction avec l'endothélium. Deuxièmement, le leucocyte peut adhérer à des plaquettes activées situées à la paroi vasculaire [60]. Ces deux mécanismes sont montrés dans la figure 2.

1.5.1.3 Effet de l'interaction leucocytes-plaquettes

De surcroît à son rôle dans l'infiltration de leucocytes au niveau de la lésion athérosclérotique, l'interaction leucocytes-plaquettes entraîne l'activation du leucocyte ainsi que l'amplification de la réponse plaquettaire. Il a été démontré que la plaquette activée exprimant la P-sélectine et libérant la chemokine RANTES induit la sécrétion de chemokine par le monocyte au niveau de lésions inflammatoires [74]. De

plus, les leucocytes liés à des plaquettes activées montrent des niveaux augmentés de médiateurs proinflammatoires tels que l'IL-1 β , l'IL-8, le MCP-1 et des métalloprotéinases [74]. L'activation du leucocyte engendrerait également un phénotype procoagulant tel que l'expression du TF via un processus impliquant la p-sélectine et MAC-1 [75, 76].

Il est connu que des conjugués leucocytes-plaquettes sont retrouvés en grandes proportions entre autres chez les patients souffrant d'athérosclérose, d'angine instable et d'infarctus du myocarde ainsi que suite à une angioplastie [77-79]. Il semblerait que la présence de conjugués leucocytes-plaquettes soit un très bon prédicteur de l'activité plaquettaire et qu'ils puissent contribuer à l'activation des leucocytes dans la pathologie de l'angine instable [79, 80]. De plus, une équipe soutient que les conjugués leucocytes-plaquettes soient un marqueur précoce et sensible de l'infarctus du myocarde [78].

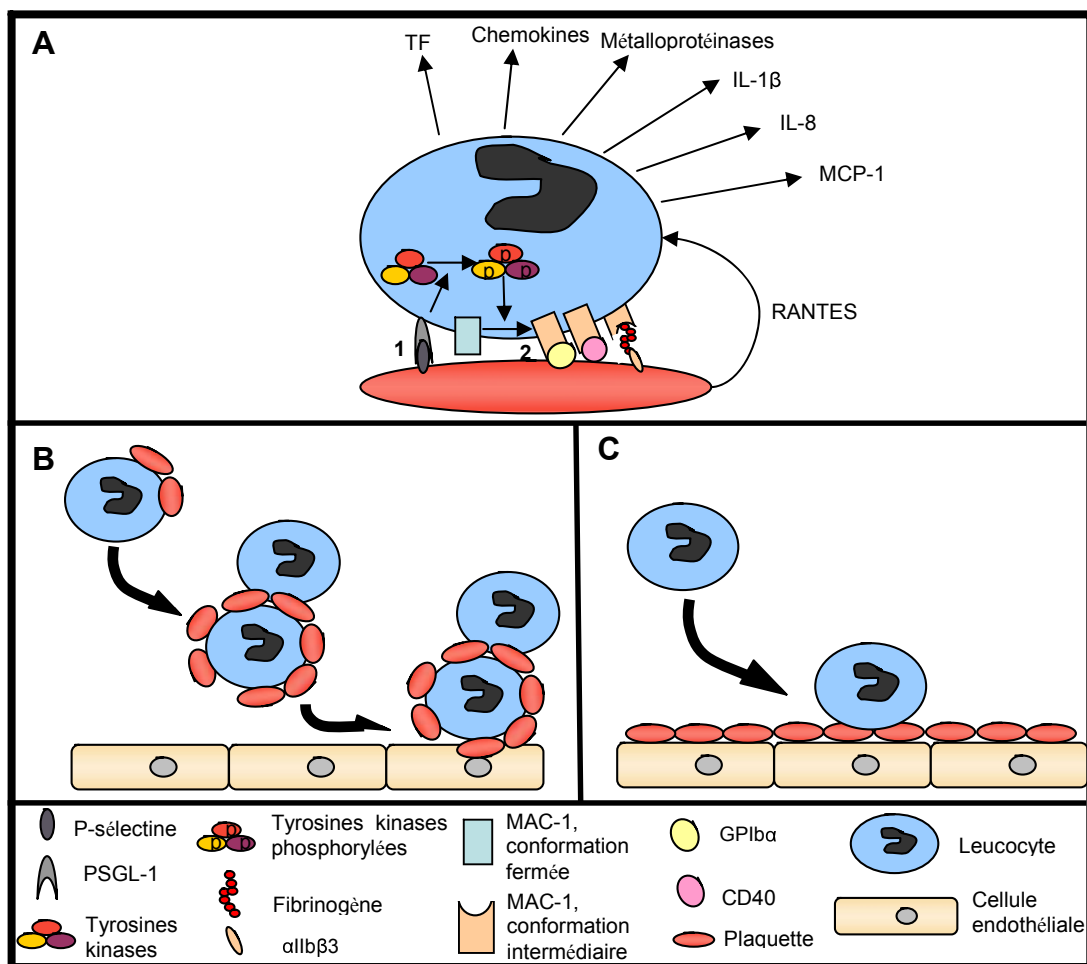


Figure 2 : Types d'interactions possibles entre les leucocytes et les plaquettes. A. Molécules impliquées dans l'interaction leucocyte-plaquette. B. Formation de conjugués leucocytes-plaquettes en circulation. Les plaquettes activées situées à la périphérie du leucocyte vont faciliter l'interaction de ce dernier avec l'endothélium. C. Le leucocyte peut interagir avec des plaquettes activées situées au niveau de l'endothélium. Adapté de Seizer et coll. [60]

1.5.2 Implication des récepteurs couplés aux protéines G. Exemple des récepteurs purinergiques et des récepteurs à la thrombine

Tel que mentionné précédemment, la réponse plaquettaire est engendrée par une multitude de stimuli. L'effet de nombreux agonistes implique l'activation de RCPG.

Les RCPG, récepteurs à 7 passages transmembranaires, regroupent entre autres les récepteurs purinergiques ainsi que les récepteurs à la thrombine.

1.5.2.1 Les récepteurs purinergiques

Bien qu'il ne soit pas l'agoniste plaquettaire le plus puissant, l'ADP joue un rôle indispensable dans la réponse plaquettaire par l'intermédiaire des récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂. Tel que décrit plus haut, une fois la plaquette activée, celle-ci libère le contenu de ses granules de sécrétion relâchant par le fait même une importante quantité d'ADP dans la circulation. L'ADP ainsi libéré agira comme agoniste secondaire sur les plaquettes à proximité afin d'amplifier la réponse des cellules préalablement activées par d'autres substances.

P2Y₁ se retrouve au nombre d'environ 150 sur la membrane plaquettaire [81] et il est couplé à la protéine G α_q [82]. Une fois activé, P2Y₁ initie un signal intracellulaire que P2Y₁₂ vient amplifier. Ce signal se traduit par une mobilisation du calcium intracellulaire menant à un changement de forme de la cellule et à une faible agrégation [83]. Le rôle de P2Y₁ est crucial à la réponse à l'ADP, sans lui, la réponse est complètement inhibée.

P2Y₁₂, que l'on retrouve au nombre d'environ 1500 sur la membrane plaquettaire, est couplé à la protéine G α_{i2} . [84] Son rôle complémentaire à P2Y₁ est d'amplifier la réponse plaquettaire induite par ce dernier et de maintenir une agrégation soutenue; lorsque le récepteur est inhibé, une désagrégation rapide suit l'agrégation. Le mécanisme intracellulaire entraîné par l'activation de P2Y₁₂ implique entre autre l'inhibition de la production d'AMP cyclique, de la déphosphorylation de la VASP, de la PI 3-K et de Rap1B [85, 86].

1.5.2.2 Les récepteurs à la thrombine

Quant à la thrombine, plus puissant agoniste physiologique de la plaquette, elle a un rôle primordial dans la formation de l'agrégat. Contrairement à l'ADP, la thrombine engendre une réponse plaquettaire irréversible [87]. Ses effets sur la plaquette sont produits par les récepteurs PAR-1 et PAR-4. Il est à noter que ces récepteurs ne se retrouvent pas exclusivement sur la plaquette et que leur présence a également été démontrée entre autres à la surface de leucocytes, de cellules endothéliales [88] et de cellules du cerveau [89].

Le récepteur PAR-1 qui a été décrit pour la première fois en 1991 [90] ne nécessite qu'une très faible concentration de thrombine pour être activé comparativement à PAR-4 qui est beaucoup moins sensible et qui nécessite des concentrations plus élevées [91]. Les récepteurs PAR possèdent un mécanisme d'activation qui leur est bien spécifique. La thrombine formée qui se trouve en circulation suite à un trauma ou à la rupture d'une plaque athérosclérotique ira cliver l'extrémité N-terminal extracellulaire des récepteurs PAR-1 et PAR-4 aux segments Arg41/Ser42 et Arg47/Gly48 respectivement [28, 92]. La nouvelle extrémité N-terminale ainsi formée agira de ligand et ira se lier sur une autre portion du récepteur. De cette façon, le récepteur s'autoactivera. Ce mécanisme est illustré à la figure 3. Une fois activés les récepteurs à la thrombine adopteront une conformation facilitant le couplage aux protéines G. PAR-1 se couple aux protéines $G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$ et $G\alpha_i$ tandis que PAR-4 peut être couplé à $G\alpha_q$ ainsi qu'à $G\alpha_{12/13}$. PAR-1 activé peut ainsi entre autre induire l'activation de MAP kinases, une mobilisation du calcium intracellulaire ainsi que la signalisation par Rho et Rac [93]. Il semblerait que l'augmentation de calcium intracellulaire produit par l'activation de PAR-1 soit rapide et transitoire alors que

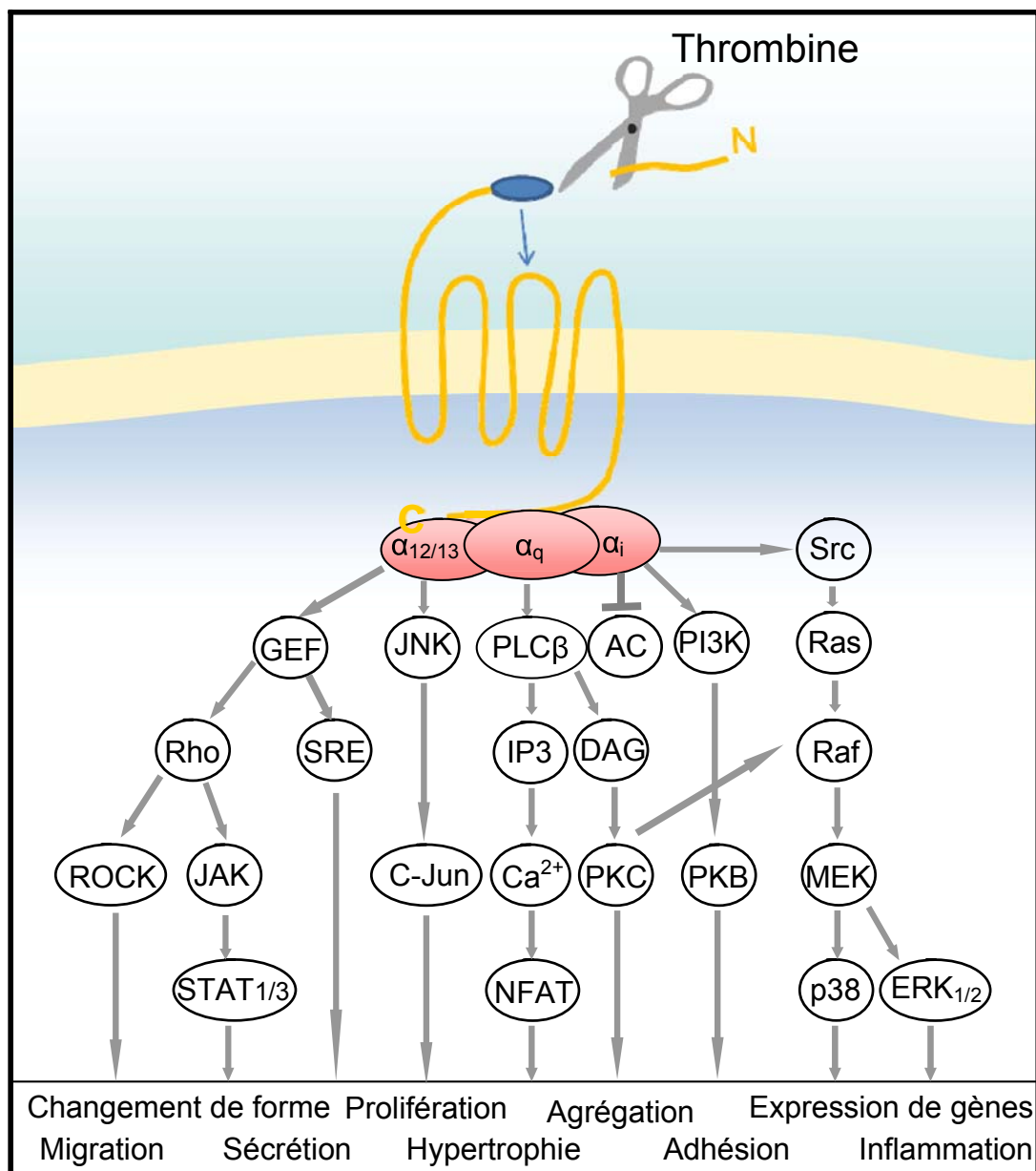


Figure 3. Mécanisme d'action des récepteurs PARs, exemple du récepteur PAR-1. Après avoir été clivés par la thrombine, la nouvelle extrémité N-terminale formée ira se lier à une boucle extracellulaire du récepteur afin de l'activer et d'enclencher une signalisation intracellulaire impliquant les protéines G. AC : Adénylate cyclase ; DAG : Diacylglycérol ; ERK_{1/2} : Extracellular signal regulated kinase 1 and 2 ; GEF : Guanine nucleotide exchanging factors ; IP3 : Inositol triphosphate ; JAK : Janus-activated kinase ; JNK : c-Jun N-terminal kinase ; NFAT : Nuclear factor of activated T cell ; PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase ; PKB : Protéine kinase B ; PKC : Protein kinase C ; PLCβ : Phospholipase C-β ; ROCK : Rho/Rho Kinases ; SRE : Serum response element ; STAT1/3 : Signal transducer and activator of transcription 1 and 3. Adapté de Coughlin [91] et Martorelle [94].

PAR-4 amènerait une réponse plus lente mais également plus prolongée [95]. De cette façon, PAR-4 permet le maintien du niveau de calcium intracellulaire engendré par PAR-1 afin de soutenir les processus de l'agrégation tardive [96].

Du côté des leucocytes, l'activation des monocytes et des macrophages par la thrombine amènerait la sécrétion de cytokines inflammatoires ayant un rôle connu dans les pathologies cardiovasculaire telles que l'IL-1, IL-6, l'oncostatin-M et MCP-1 [97]. De plus, la thrombine a un effet chimiotactique et stimule la prolifération ainsi que l'activité phagocytaire des monocytes [97].

Les récepteurs PAR-2 et PAR-3 ne sont pas exprimés au niveau de la plaquette humaine mais leur mécanisme d'activation est le même que pour PAR-1 et PAR-4. PAR-2 est le seul récepteur de la famille des PARs qui ne soit pas activé par la thrombine. Il peut par contre être activé par un clivage au niveau de son segment Ser34/Arg35 [98] par un grand nombre de sérine protéases dont la trypsine et par des facteurs de coagulation [99]. PAR-2 est exprimé entre autre sur les cellules endothéliales vasculaires, les éosinophiles, les neutrophiles ainsi que les cellules musculaires lisses. L'activation de ce récepteur est généralement lié à une activité pro-inflammatoire [99, 100] incluant l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ainsi que l'augmentation du roulement des leucocytes sur la surface endothéliale vasculaire, de l'adhésion et de la migration *in vivo* chez le modèle murin dû à l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion [101, 102]. Une étude de Sandberg et coll.[103] suggère que PAR-2 aurait un rôle dans l'athérogénèse.

Pour sa part, PAR-3 peut à la fois être activé par la thrombine et la trypsine qui le clive au segment Lys38/Thr39 [100, 104]. La fonction de ce récepteur qui se retrouve entre autre au niveau du cœur, de la moelle osseuse, du cerveau et du foie n'est à

présent pas tout à fait élucidée [105]. Il a été montré qu'il avait la possibilité de se dimériser avec le récepteur PAR-1 afin de réguler la signalisation de ce dernier [106]. Alors qu'on croyait que PAR-3 était incapable d'induire une signalisation à lui seul, E. Ostrowska et G. Reiser ont prouvé le contraire en démontrant que l'activation de PAR-3 seul amenait la libération d'IL-8 par le biais d'une phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$, favorisant une réponse inflammatoire [107]. Ce récepteur reste toutefois encore méconnu et beaucoup reste à découvrir à son sujet.

1.6 Antiplaquettaires

Au cours des deux dernières décennies, le développement d'anticoagulants et d'antiplaquettaires a fait chuter le nombre de décès causés par la maladie coronarienne. Voici un résumé des principaux agents antiplaquettaires présentement sur le marché et en développement.

1.6.1 Aspirin

Outre ses effets anti-inflammatoires, l'AAS est également une pierre angulaire dans le traitement primaire et secondaire des maladies cardiovasculaires [108]. L'effet antiplaquettaire de l'AAS est principalement attribué à son inhibition irréversible de la COX-1, enzyme plaquettaire catalysant la première étape de la conversion de l'acide arachidonique en TXA₂ [109]. L'AAS acétyle donc le résidu sérine 529 de la COX-1, empêchant conséquemment la synthèse du TXA₂. Le TXA₂ est un important activateur plaquettaire qui induit l'expression du récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la membrane de la plaquette et qui active les plaquettes environnantes en se liant à ses récepteurs spécifiques [110].

L'AAS est également connu pour diminuer la production de thrombine, pour augmenter la perméabilité des caillots de fibrine ainsi que la lyse des caillots, et de promouvoir la production d'oxyde nitrique chez la plaquette [111].

En tant que traitement primaire des maladies cardiovasculaires, une dose initiale de 150 et 300 mg de comprimés d'AAS non enrobé ou à croquer est administrée et produit une inhibition presque complète de la production de TXA₂ dans les 15 minutes suivant l'administration. Une dose quotidienne d'au moins 75mg est par la suite continuée comme traitement secondaire, 100mg étant la dose standard [112].

Le risque de saignement après traitement à l'AAS est relativement faible : Les faibles doses d'AAS augmentent les risques de saignement de tous genres de 1,7 à 2,1 fois plus que lors de l'administration d'un placebo. Quant à eux, les risques de saignement majeurs attribuables à la prise d'AAS ne seraient que de 0,13% plus élevés qu'après la prise d'un placebo [113]. On considère donc que les bienfaits associés à la molécule dépassent largement les risques de saignement encourus par la prise du médicament.

En tant que stratégie de prévention secondaire, l'addition de thiénoxyridines au traitement d'AAS démontre des bienfaits additifs non observés avec de l'AAS seul chez les patients ayant eu un syndrome coronarien aigu et ceux ayant reçu une endoprothèse vasculaire [114].

1.6.2 Les thiénoxyridines

À présent, le récepteur P2Y₁₂ est le seul récepteur plaquettaire à l'ADP qui soit une cible thérapeutique utilisée en clinique. Le clopidogrel, la ticlopidine et, depuis peu,

le prasugrel, membres de la famille des thienopyridines, sont les trois antagonistes de cette classe retrouvés sur le marché. Ces molécules se lient au récepteur P2Y₁₂ empêchant par le fait même la liaison de l'ADP à celui-ci et résultant en une inhibition du récepteur. En plus de leur structure analogue, ils sont tous les trois métabolisés au niveau du cytochrome P450 [115] et ont une activité irréversible.

Le clopidogrel provoquerait moins d'effets secondaires [116] que la ticlopidine et sa posologie serait plus simple avec 1 seule administration par jour plutôt que 2 pour la ticlopidine [115]. Malgré son efficacité prouvée, on attribue au clopidogrel de nombreux désavantages tel qu'une résistance chez certains patients, un long temps de début d'action dû à la nécessité de la molécule à être métabolisée, et des risques de saignements à cause de l'effet irréversible chez les patients nécessitant une intervention dû à une inhibition irréversible du récepteur [117]. Une proportion de 4 à 30% des patients présenteraient une résistance au clopidogrel, partiellement associé à des polymorphismes du cytochrome 2C19 (P450). Cette résistance se définit par l'incapacité du clopidogrel à produire son effet pharmacologique habituel, se traduisant par une activité plaquettaire *in vitro* insuffisamment inhibée suite au traitement du patient avec des doses standards de cet antagoniste [118]. Il a récemment été démontré qu'une résistance au clopidogrel augmentait la survenue d'événements thrombotiques chez des patients atteints de maladie coronarienne, 1 an après la pose d'endoprothèse vasculaire médicamenteuse [119]. Plusieurs explications ont émergées afin de justifier cette résistance au clopidogrel. Certains proposent que ce soit la cause d'interactions médicamenteuses [120] alors que d'autres estiment que quelques facteurs individuels tels que l'hyperlipidémie, le tabac ainsi que le stress mental et physique aient un rôle à jouer [121]. L'explication la plus plausible réside

toutefois dans de possibles différences interindividuelles telles que des mutations au niveau des enzymes hépatiques impliquées dans le métabolisme du clopidogrel [122], des différences préexistantes de la fonction plaquettaire [123] ou une variation dans l'absorption intestinale de la molécule [124].

Quant à lui, le prasugrel est absorbé beaucoup plus efficacement que le clopidogrel, permettant ainsi une plus grande biodisponibilité [112]. Le prasugrel s'avère un inhibiteur plus puissant de l'activité plaquettaire et affiche un taux d'événements cardiovasculaires inférieur au clopidogrel. Par contre, les essais cliniques ont montré que le prasugrel causait davantage de saignements que le clopidogrel [112].

1.6.3 Inhibiteurs de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (récepteur GPIIb/IIIa)

On retrouve un grand nombre de récepteurs GPIIb/IIIa à la surface membranaire de la plaquette, soit entre 50 000 et 80 000 récepteurs [125]. Les agents antiplaquettaires visant ce récepteur incluent l'abciximab, le tirofiban ainsi que l'eptifibatide. Ces antiplaquettaires sont utilisés pour le traitement des infarctus du myocarde avec ou sans élévation du segment ST, de l'angine instable ainsi que lors d'angioplastie coronarienne [126]. Ces agents sont utilisés sous la forme intraveineuse et sont administrés dans les premières 24 à 48 heures d'un syndrome coronarien aigu [112]. En bloquant la liaison plaquette-fibrinogène, ces antiplaquettaires bloquent le mécanisme final de l'agrégation plaquettaire.

La première molécule de cette classe à avoir été utilisée en milieu clinique est l'abciximab. Cette grosse molécule constitue le fragment Fab d'un anticorps monoclonal chimérique (c7E3) dirigé à la fois contre la séquence arginine-glycine-aspartate (RGD) de la poche de liaison et contre la séquence lysine-glutamine-

alanine-glycine-aspartate-valine (KQAGDV) du site de liaison secondaire du fibrinogène sur le récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ [127]. L'abciximab a une grande affinité pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et, par conséquent, son effet peut perdurer pour toute la durée de vie de la plaquette [127, 128]. Cette propriété de l'abciximab peut s'avérer désavantageuse pour les patients nécessitant une intervention d'urgence, favorisant les risques de saignement. Toutefois, ce médicament s'avère sécuritaire chez les patients à haut risque devant subir une angioplastie coronaire [129].

Le tirofiban et l'eptifibatide font tous deux partie de la même sous-classe d'antiplaquettaires. Tout comme l'abciximab, ces deux antagonistes ont une haute affinité ainsi qu'une grande spécificité pour le récepteur GPIIb/IIIa [130]. Toutefois, contrairement à l'abciximab, le tirofiban et l'eptifibatide sont des molécules de petite taille. Le tirofiban est un dérivé tyrosine non-peptidique [131] alors que l'eptifibatide est un dérivé tronqué synthétique d'un peptide retrouvé dans le venin du serpent *Sistrurus milaris barbouri* [125]. Le tirofiban se lie à la séquence RGD de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ [125] alors que l'eptifibatide se lie à la séquence lysine-glycine-aspartate (KGD)[132]. Leur effet sur le récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ est réversible: La liaison du tirofiban ne dure qu'entre 2 à 4 heures [131] et l'activité plaquettaire normale est retrouvée environ 4 heures après l'administration d'eptifibatide [133]. De plus, contrairement à l'abciximab, ces 2 antiplaquettaires ne sont pas immunogènes [125].

1.6.4 Thérapies anti-plaquettaires en voie de développement

Malgré l'efficacité prouvée des thérapies antiplaquettaires actuelles, il y a toutefois encore largement place à l'amélioration, forçant la recherche de nouvelles alternatives

thérapeutiques. Un résumé de l'état des découvertes dans ce domaine est décrit ci-dessous.

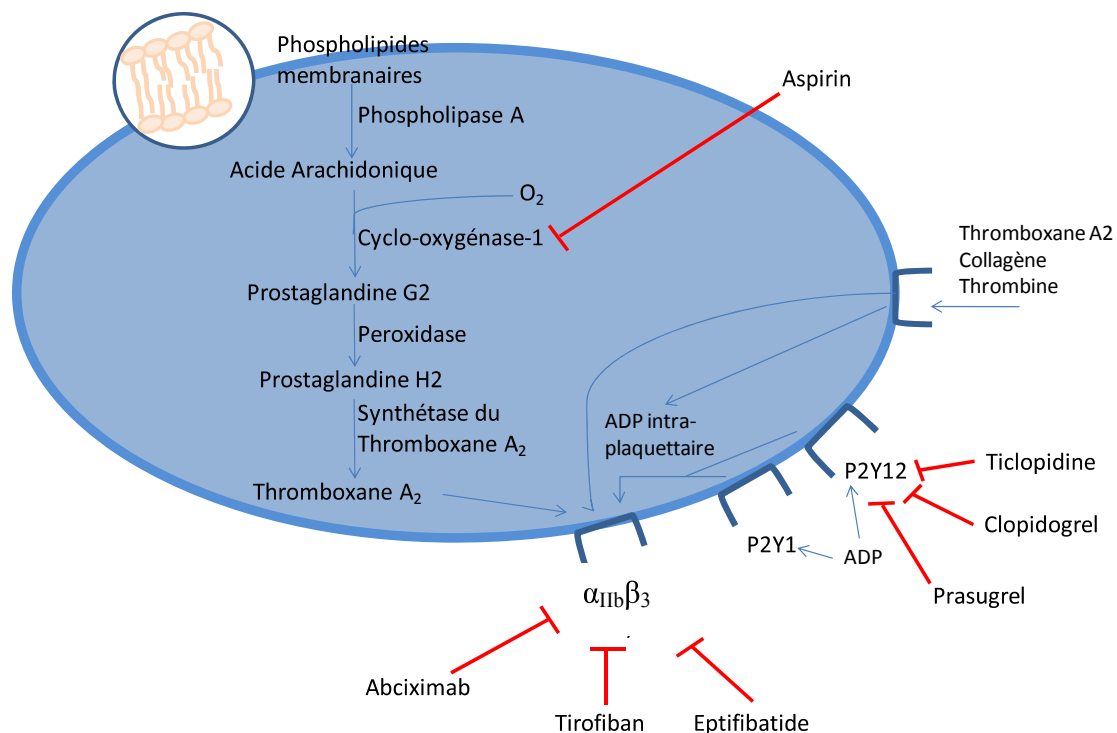


Figure 4 : Voies d'inhibition des agents antiplaquettaires présentement utilisés en clinique. Adapté de Meyer [134].

1.6.4.1 Inhibiteurs du récepteur P2Y₁₂

Les nouveaux inhibiteurs du récepteur P2Y₁₂ en sont tous deux présentement à la phase III de leur développement clinique [117] et affichent de toute vraisemblance un grand potentiel d'inhibition de l'activité plaquettaire. Contrairement aux thienopyridines, le cangrelor et le ticagrelor sont des antagonistes directs de P2Y₁₂ et ne nécessitent donc pas d'être métabolisés. De ce fait, leur effet se fait sentir beaucoup plus rapidement. De plus, leur liaison au récepteur est réversible.

L'effet du ticagrelor, s'avère beaucoup plus rapide et prononcé que l'effet du clopidogrel [112]. Le taux de saignement engendré par l'administration du ticagrelor est quant à lui similaire à celui engendré par l'administration du clopidogrel [112].

Quant au cangrelor, les études n'ont par contre pas réussi à montrer un effet supérieur au clopidogrel [135].

1.6.4.2 Inhibiteurs du thromboxane A_2

Bien que l'aspirin soit un antiplaquettaire fort utile, il n'arrive toutefois pas à interférer aussi efficacement avec la production de TXA_2 extra-plaquettaire que la production intra-plaquettaire [136]. Des antagonistes du récepteur du TXA_2 pourraient ainsi potentiellement être bénéfiques. Le terutroban est en ce moment en phase III de son développement clinique mais les études n'ont pas réussi à démontrer un effet supérieur de cet agent comparativement à l'AAS [135].

1.6.4.3 Inhibiteurs des récepteurs à la thrombine

Bien que de nombreux inhibiteurs directs de la thrombine existent, l'inhibition des récepteurs à la thrombine n'est présentement pas une avenue utilisée en clinique mais il s'agit toutefois d'une voie très prometteuse. Plusieurs recherches ont mené au développement d'antagonistes de ces récepteurs. Les antagonistes de PAR-1 sont en phases de développement beaucoup plus avancées que les antagonistes de PAR-4. Les nouveaux antiplaquetitaires anti-PAR-1 sont le E5555 (Eisai Inc.) ainsi que le SCH 530348 (Schering-Plough) et sont respectivement en phase II et III de leur développement clinique [137]. Le SCH 530348 est un antagoniste oral qui est compétitif, de haute affinité et spécifique au récepteur PAR-1 [138]. Lors des études

de phase II, il a été montré qu'il était bien toléré, qu'il n'augmentait pas le taux de saignement comparativement au placebo et qu'il diminuait le taux d'infarctus du myocarde ainsi que le taux d'avènement d'autres complications cardiovasculaires majeures chez les patients ayant subi une angioplastie [139]. Contrairement aux inhibiteurs directs de la thrombine, en n'agissant pas sur la thrombine elle-même, les antagonistes de PAR-1 n'interfèrent pas avec la formation de fibrine et permettent une coagulation normale [138].

1.6.4.4 Autres cibles thérapeutiques

Une des autres cibles thérapeutique antiplaquettaires en voie de développement vise le vWf. Le ARC1779, un aptamère qui inhibe le domaine A1 du vWf a récemment terminé une étude de phase II avec succès. Son effet qui est d'une durée de 12 à 16 heures est répercuté sur plus de 95% du vWf [135].

À un niveau pré-clinique, plusieurs avenues de traitement antiplaquettaire sont envisagées. Bien qu'aucun antagoniste ciblant le récepteur P2Y₁ ne soit utilisé chez l'humain ou ne soit en développement clinique, ce récepteur est toutefois une voie de recherche importante. Il existe de nombreux antagonistes du récepteur P2Y₁ dont les antagonistes de l'urée et les dérivés de la famille du MRS2179 [140]. Une résistance au thromboembolisme a été montrée suite à l'inhibition ou par une déficience de P2Y₁ chez le modèle murin suggérant que le récepteur P2Y₁ soit une cible potentielle pour le développement de nouveaux antiplaquettaires chez l'humain [141, 142]. Cette classe de médicaments reste encore toutefois à un stade pré-clinique d'investigation.

1.7 Introduction au travail de recherche

Le travail que j'ai effectué au cours de ma maîtrise concerne l'étude des effets que procure l'inhibition de quelques RCPG plaquettaires. Dans un premier temps, puisque l'avenue thérapeutique du récepteur P2Y₁₂ est bien développée mais qu'elle renferme plusieurs désavantages, et que l'inhibition du récepteur P2Y₁ dans le modèle murin montre un effet bénéfique, nous avons voulu observer l'effet de son inhibition chez des patients souffrant de maladie coronarienne. Nous avons posé comme hypothèse que l'inhibition de P2Y₁ pourrait compléter l'inhibition plaquettaire engendrée par les thérapies visant le récepteur P2Y₁₂ chez ces patients. Nous avons montré que l'inhibition du récepteur P2Y₁, seul ou en combinaison avec un inhibiteur du récepteur P2Y₁₂ inhibe efficacement la fonction plaquettaire dans un modèle de perfusion de sang total en temps réel sur 9 minutes. Ceci suggère que l'utilisation d'inhibiteurs de P2Y₁ pourrait être une voie prometteuse pour l'inhibition de la fonction plaquettaire en thérapeutique.

Dans un deuxième temps, l'effet du SCH 530348 sur les marqueurs d'inflammation systémique a été évalué. Bien que l'effet du SCH 530348 sur la plaquette a été étudié, son effet sur les cellules inflammatoires qui sont tout aussi impliquées dans l'athéromatose et qui possèdent également le récepteur PAR-1 à leur surface est très peu documenté. Nous avons ainsi réalisé une sous-étude dans le cadre de l'étude de phase III TRA 2°P-TIMI 50 visant à démontrer cet effet. Effectivement, comme discuté précédemment, la thrombine a un effet marqué sur certains marqueurs inflammatoires. Ainsi, nous avons posé comme hypothèse que l'utilisation d'un antagoniste du récepteur de la thrombine PAR-1 diminuerait ces marqueurs inflammatoires sur les leucocytes. Nos résultats préliminaires suggèrent que le SCH

530348 inhibe de façon drastique plusieurs marqueurs de l'inflammation évoquant l'existence d'un second mécanisme protecteur du SCH 530348 contre l'athérombose.

2. Résultats

2.1 Présentation de l'article 1

Les deux articles qui seront présentés dans le cadre de ce mémoire traitent de l'inhibition de l'activité plaquettaire par des voies jusqu'à maintenant non ciblées en clinique. Ici, les efforts ont été concentrés sur l'étude du RCPG à l'ADP P2Y₁.

La thérapie antiplaquettaire est le traitement standard destiné aux patients atteints de maladie coronarienne et a depuis longtemps prouvé son efficacité. Or, malgré cela, la survenue d'événements thrombotiques reste un phénomène qui n'est pas rare. Les voies du thromboxane A₂ ainsi que de l'ADP ont déjà été explorées en clinique. L'inhibition de la réponse plaquettaire engendrée par l'ADP est présentement accomplie par des antagonistes du récepteur P2Y₁₂. Or, sachant que l'ADP procure également une activation plaquettaire via le récepteur P2Y₁, cela nous pousse à l'étude plus approfondie de ce récepteur.

Ainsi, c'est dans ce contexte que cette première étude a éclos. Nos observations ont donc permis de caractériser l'effet de l'inhibition du récepteur P2Y₁ seul ou en combinaison avec un antagoniste du récepteur P2Y₁₂ chez des patients coronariens stables.

B.L. : Réalisation des expériences de cytométrie, analyse des résultats, rédaction de l'article

J.B. : Réalisation des expériences de flux, analyse des résultats, rédaction de l'article

A.B. : Supervision, rédaction de l'article

P.T. : Supervision, rédaction de l'article

**Effects of P2Y1 receptor antagonism on platelets from patients with
stable angina under clopidogrel and aspirin therapy**

Benoît Labarthe,^{1#} Judith Babin,^{1#} Arnaud Bonnefoy^{1,2}, Pierre Théroux¹

Article soumis pour révision par les pairs

Short Title: P2Y1 and P2Y12 inhibition

From

¹ Department of Medicine, Montreal Heart Institute and University of Montreal,
Montreal, Quebec, Canada, H1T1C8.

² INSERM U743, University of Montreal, Quebec, Canada, H2X1P1.

BL and JB contributed equally to this work

Correspondence to Pierre Théroux, MD

Address: Montreal Heart Institute, 5000 Belanger E, Montreal, QC (Quebec), Canada
H1T 1C8

Tel: (514) 376-3330 ext 3616

Fax: (514) 376-1076

There exist no conflicts of interest with any of the authors in this manuscript.

2.1.1 Abstract

The ADP receptor P2Y₁ plays an important role in platelet aggregation. However, the consequences of its blockade on platelets from atherosclerotic patients are not known. Blood from patients with stable angina under aspirin (80 mg/day) was treated in vitro with 100 μM MRS2179 (P2Y₁ inhibitor) before and 24h after receiving 450 mg of clopidogrel (P2Y₁₂ antagonist). MRS2179 was superior to clopidogrel to inhibit ADP (2.5 μM)-induced platelet peak aggregation (90% vs 30%, median, p<0.004) and P-selectin expression (86% vs 74%, p<0.006) whereas late aggregation (87% vs 67%), α_{IIb}β₃ activation (66% vs 50%), platelet-monocyte (80% vs 64%) and platelet-neutrophil (68% vs 61%) conjugate formation were similarly inhibited. MRS2179 combined with clopidogrel was superior to clopidogrel to inhibit all above parameters (p<0.05) excluding late aggregation. Clopidogrel or MRS2179 moderately affected TRAP (2.5 μM)-induced platelet activation and aggregation, except for α_{IIb}β₃ activation that was markedly inhibited by clopidogrel (54%) but also by MRS2179 (30%, p<0.01 vs control). The drug combination showed additive inhibitory effects on TRAP-induced late aggregation (83% vs 37% for clopidogrel, p<0.04, and 22% for MRS2179, p<0.008). When the blood was perfused into collagen-coated glass capillaries at an arterial wall shear rate (1500 s⁻¹), clopidogrel induced thrombus embolization that precluded thrombus growth beyond 5 minutes, whereas MRS2179, with or without clopidogrel, surprisingly abolished thrombus formation. The present study shows that in the blood of atherosclerotic patients treated with aspirin and clopidogrel, P2Y₁ plays a more important role in platelet activation and thrombus formation than anticipated from previous work.

Keywords: platelets, P2Y1, P2Y12, clopidogrel, MRS2179, aspirin

Abbreviation list:

Aggmax: Peak aggregation

Agg6min: Late aggregation

ADP: Adenosine 5'-diphosphate

CAD: coronary artery disease

MRS2179: N6-methyl-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate

PAC-1: monoclonal antibody binding activated α IIb β 3receptors

PPACK: D-phenylalanyl-prolyl-argininechloromethylketone

plt-PMN: platelet-polymorphonuclear cell conjugates

plt-mono: platelet-monocyte conjugates

TBS: Tris-buffered saline

TRAP: Thrombin Receptor Agonist Peptide

2.1.2 Introduction

Upon blood vessel injury, platelets rapidly adhere to subendothelial collagen-bound von Willebrand factor, via GPIb-IX-V, and to collagen fibres through glycoprotein VI and integrin $\alpha_2\beta_1$. These interactions trigger intracellular signals that lead to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation, alteration of the plasma membrane towards a procoagulant state, and release of secondary soluble agonists that amplify platelet activation and secondary platelet recruitment [1, 2]. Among the secreted agents, adenosine 5' diphosphate (ADP) plays a key role in the positive feedback mechanisms mediated by the purinergic receptors P2Y₁ and P2Y₁₂ leading to full platelet activation. All these processes are exacerbated during atherothrombotic diseases.

The success of the thienopyridine inhibitors ticlopidine and clopidogrel to prevent acute thrombotic events in patients with cardiovascular disease and patients undergoing stent implantation illustrates the major contribution of the P2Y₁₂ receptor in thrombosis and haemostasis and prompted the development of other P2Y₁₂ inhibitors, approved or under clinical investigation: the thienopyridine prasugrel, the ATP analogue cangrelor, and the non-thienopyridines ticagrelor and elinogrel. By contrast, although various inhibitors of P2Y₁ have been identified, including derivatives of adenosine-3'-phosphate-5'-phosphate (A3P5P) [3], and derivatives of N6-methyl-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate (MRS2179) [4], P2Y₁-based anti-thrombotic therapies are only at a pre-clinical stage of investigation.

Whereas P2Y₁₂ reduces adenylyl cyclase activity by coupling with G(i) proteins, activates $\alpha_{IIb}\beta_3$ and stabilizes platelet aggregates [5, 6], P2Y₁ acts via G(q) proteins to increase the intracellular calcium concentration through the stimulation of phospholipase C, thereby triggering shape change and the initiation of aggregation, in

synergy with the other platelet agonists collagen and thrombin [7]. An important trait of P2Y₁ function, making the receptor an appealing target for anti-platelet drug, is the fact that its absence, in contrast to P2Y₁₂ deficiency, is associated with only a moderate bleeding diathesis, as reported in mouse knock out models [8, 9, 10]

The fate of anti-P2Y₁ therapy is likely to be used in conjunction with golden standard antiplatelet therapies, i.e. cyclooxygenase 1 inhibitor and P2Y₁₂ antagonist, to repress a systemic platelet activation state for the primary or secondary prevention of atherothrombotic disease [11-13]. Though, the effect of P2Y₁ blockade on platelets from patients with stable angina is not known.

The present study was therefore carried out to evaluate the efficacy of P2Y₁ blockade in such a context of disease, using the blood of atherosclerotic patients under mono or dual anti-platelet treatments. In a first set of experiments, the effect of the P2Y₁ inhibitor MRS2179 on platelet aggregation and activation markers was analyzed following stimulation by ADP or by the thrombin receptor (PAR-1) agonist peptide (TRAP) in both citrated and anti-thrombin anticoagulated blood. In a second set of experiments, the effect of MRS2179 on platelet adhesion and thrombus formation onto collagen-coated glass capillaries was analysed in arterial flow conditions. The results give a broad overview of the platelet response to P2Y₁-receptor blockade in a clinical context.

2.1.3 Methods

Study population

Studies were performed with the blood from patients with stable angina, all on aspirin 80 mg daily and a statin and with no contraindications to clopidogrel. The study was

approved by the Montreal Heart Institute Internal Ethics Committee and carried out in compliance with the Declaration of Helsinki's recommendations after having obtained a signed informed consent from all participants.

Blood collection

The patients had two nontraumatic punctures from a forearm vein in a fasting state, one before the administration of a loading dose of clopidogrel (450 mg) and, the second, 24 hours later. Clopidogrel was administered under the direct supervision of a research nurse immediately after the first blood collection. For aggregation and flow cytometry studies, the blood was drawn in tubes containing 0.38% sodium citrate or a mix of recombinant Hirudin (2 U/mL) and of D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininechloromethylketone (PPACK) (Calbiochem, La Jolla, Ca.) (40 μ M). For the perfusions experiments, the blood was drawn into PPACK (40 μ M). When used, MRS2179 (Sigma Chemical Co, St-Louis, Mo) was dissolved in Tyrode's buffer and added into the tube immediately before the blood sampling to a final concentration of 100 μ M.

Platelet aggregation

Platelet aggregation in response to ADP (2.5 μ M) or to the thrombin receptor activating peptide SFLLRN 2.5 μ M (TRAP, Sigma Chemical Co, St-Louis, Mo) was evaluated by turbidometry in stirred (1000 rpm) platelet-rich plasma (PRP) using a Chronolog 570VS aggregometer (Chronolog Corp with AggroLink Software package, Havertown, PA). Maximum aggregation (Agg_{max}), corresponding to the peak of maximum light transmission and aggregation at 6 minutes (Agg_{6min}) were

measured. A percentage of disaggregation was calculated as $100 \times (1 - \text{Agg}_{6\text{min}} / \text{Agg}_{\text{max}})$.

Flow cytometry analyses

All flow cytometry measurements were conducted on an Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter, Florida). Platelet P-selectin expression was measured in PRP using a phycoerythrin-conjugated (PE) anti-CD62-P murine IgG1 MoAb (Becton Dickinson, California). Activated $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ expression was measured in PRP using the FITC-conjugated murine IgM MoAb PAC-1 (Becton Dickinson). Platelet-monocyte and platelet-polymorphonuclear cell co-aggregate formation in response to ADP or TRAP were measured in whole blood after a 30-minute incubation in static conditions at room temperature, in the presence of saturating concentrations of anti-CD14 (CD14-PE; Beckman Coulter) and anti-CD42 (CD42-FITC; Becton Dickinson) MoAbs. Monocytes and neutrophils positive for CD42 were differentiated according to their granularity and CD14 level of expression.

Perfusion studies

PPACK (40 μM) anticoagulated blood was incubated with rhodamine 6G (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (EMD Biosciences, Gibbstown, USA) for 15 minutes at 37°C and perfused in glass capillaries (Vitrocom Hollow Rectangle Capillaries, Fiber Optic Center, New Bedford, USA) pre-coated overnight at 4°C with fibrillar equine type 1 collagen (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Chronolog, Havertown, USA) at an arterial wall-shear rate of 1500 s^{-1} and constant volume output using a syringe pump (Fisher Scientific, Ottawa, Canada).

Platelet recruitment was monitored in a continuous motion (1 frame/4 seconds) during 9 minutes using a CCD digital Camera (Hamamatsu, C9300-201) connected to a Zeiss Observer Z1 inverted microscope. The surface covered by platelets and their fluorescence intensity were measured as indicators of platelet adhesion and thrombus formation, respectively. Surface coverage was expressed as the percentage of the observed field covered by platelets while thrombus mass was expressed in fluorescence intensity units (*Analog to Digital Units*, ADU). Image analyses were performed with the Slidebook 4.2 software (Intelligent Imaging Innovation, Inc, Denver, CO, USA).

Statistical analysis

Aggregation percentages and flow cytometry values were non-normally distributed and therefore analyzed with non-parametric statistics and expressed as medians and interquartile ranges. Friedman non-parametric ANOVAs were first performed; when statistically significant, the differences were located with Wilcoxon paired tests. The level of significance for two-sided hypothesis tests was set at a p-value less than 0.05; no correction factors were introduced for the multiplicity of analyses. Adhesion and aggregation kinetics in blood perfusion chambers were expressed as means +/- SEM and analyzed using parametric paired t-tests. The SPSS 10.0 (Chicago, Il) was used for all analyses. Graphs were designed with the Prism-5 software (GraphPad Software, USA).

2.1.4 Results

Study population

Valid data were obtained from all perfusion and activation studies. One woman and 8 men (mean age 64 years, range 57-70) were included in the perfusion study. One woman and 9 men (mean age 62 years, 53-75) were included in the aggregometry and platelet activation study. All patients included in the study were suffering from stable coronary artery disease and were having hyperdislipidemia. All patients were using aspirin 80 mg daily and most of them were using atorvastatin 40 mg daily. Two of the patients were using rosuvastatin 20 mg or 40 mg daily.

Platelet recruitment in perfusion chambers

Fig 1 illustrates the effects of MRS2179 (100 μ M) on platelet deposition on the collagen matrix at an arterial wall-shear rate (1,500 s^{-1}) before and 24h after a loading dose of clopidogrel. In panel A, B, and C, platelet recruitment accrues throughout the perfusion period in basal conditions to near completely cover the surface ($86.9 \pm 3.7\%$ SEM) after 9 min; large thrombi are formed (mean fluorescence intensity 377.5 ± 57.9 ADU (SE) (panels B and C).

MRS2179 had an accelerating effect on platelet surface coverage that reached $67 \pm 5\%$ and $79 \pm 5\%$ at 5 min and 6 minutes respectively compared with $45 \pm 4\%$ and $56 \pm 4\%$ in the control ($p < 0.05$). This process decelerates afterwards resulting in similar surface coverage as controls after 9 minutes ($93 \pm 2\%$). By contrast, thrombus formation barely manifests in the first 3 minutes, then plateau for a mean fluorescence intensity at 9 minutes much lower than in controls (74 ± 10 ADU,

P<0.001) (Figure 1B, 1C) and a monolayer of adherent platelets with sparse small thrombi was observed.

Clopidogrel, as MRS2179 had an accelerating effect on surface coverage in the first minutes of experiment ($59 \pm 4\%$ ($p=0.03$), $71 \pm 4\%$ ($p=0.03$) and $93 \pm 2\%$ ($p=0.1654$, NS vs. control) at 5, 6, and 9 min respectively); the process again decelerates once 80% to 90% surface coverage is reached (Figure 1A). Clopidogrel barely inhibits the rate of thrombus growth during the first 30 sec ($1.11 \text{ ADU} \times \text{s}^{-1}$ vs. $1.24 \text{ ADU} \times \text{s}^{-1}$) compared to MRS2179 ($0.54 \text{ ADU} \times \text{s}^{-1}$ for MRS2179); the rate of formation then falls down rapidly to nearly stop after 5 minutes ($0.07 \text{ ADU} \times \text{s}^{-1}$ vs. $0.52 \text{ ADU} \times \text{s}^{-1}$ for controls at 9 min). After 9 min, ADU was 2.5-fold less than in controls ($151.8 \pm 11.2 \text{ ADU}$ at 9 min $P<0.001$; Fig 1B), still 2-fold more than with MRS2179 (Fig 1A and B). Videomicroscopy studies could show that this slow down was in fact linked to ongoing active thrombus formation but associated with active shedding and distal embolization of thrombi; this process perpetuates itself during the full course of observation.

Joint exposures to the two inhibitors leads to mixed effects (Fig 1A, 1B, and 1C), achieving a surface coverage as that observed with clopidogrel throughout the perfusion ($61.7 \pm 6.7\%$ at 5 min, $72.3 \pm 6.3\%$ at 6 min and $93.9 \pm 2.7\%$ at 9 min), and an inhibition of thrombus formation greater than that achieved with MRS279 alone until the last minute of observations when the differences disappear (initial growth rate of $0.45 \text{ ADU} \times \text{s}^{-1}$ MRS alone, final ADU $62.5 \pm 5.9 \text{ ADU}$, $P<0.001$, vs control).

Data in Fig 1D are obtained by multiplying surface coverage with fluorescence intensity to provide an estimate of the total mass of platelet deposition. The figures

thus obtained confirm a greater inhibition of platelet adhesion and aggregation with MRS2179 compared with clopidogrel, which is more marked beyond 6 min. It also documents an additive effect of drug combination to inhibit total platelet mass deposition, an effect not sustained, however after 9 min (Fig 1D).

Platelet activation and aggregation

A representative example of the effects of P2Y₁, P2Y₁₂ and joint receptors inhibition on ADP-induced platelet aggregation, CD62P expression and $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation (PAC-1 binding) is shown in Figure 2. Table 1 provides the individual results and medians and interquartiles ranges for each parameter studied.

MRS2179 inhibits ADP-induced peak and late aggregation and P-selectin expression by more than 90% (Fig 2 and 3), PAC-1 binding by 54%, platelet-monocyte by 84%, and platelet-neutrophil conjugates formation by 69%. Only minor changes, however, are observed with TRAP as agonist.

Clopidogrel reduces peak and late aggregation to ADP by 30% (p=0.005) and 67% (p=0.005) respectively, and to TRAP by 19% (p=0.03) and 31% (p=0.01). The greater effect on late aggregation is explained by a marked disaggregation with clopidogrel reaching 85% and 32% in ADP and TRAP studies compared with spontaneous disaggregation of 43% and 10% respectively in the basal state (p=0.005). The inhibition of ADP effects on P-selectin expression, PAC-1 binding, and platelet-leukocytes conjugates are all statistically significant (Table 1). Clopidogrel also inhibits more modestly but significantly TRAP effects on all these parameters.

The combination adds little to the already maximal inhibition of peak and late aggregation achieved with MRS2179 alone, but completes the partial inhibition achieved with clopidogrel alone. It also adds over clopidogrel to inhibit P-selectin and platelet-monocyte conjugates, and over each drug alone to reduce PAC-1 binding and platelet-neutrophils conjugates.

With TRAP as an agonist, the combination amplifies the effects of each drug alone in inhibiting peak and late aggregation and promoting disaggregation, but has no additional effects in inhibiting P-selectin expression, PAC-1 binding, platelet-monocyte and platelet-neutrophil conjugates formation.

Influence of citrate vs. antithrombins on results

The comparative data are shown in Table 1. Peak aggregation to ADP in the basal state reached 67% in antithrombin and was one third less in citrate. Percent inhibition of peak aggregation was 30% in antithrombin and 28% in citrate, and of late aggregation 80% and 53% respectively. With the combination of MRS2179 and clopidogrel, both peak and late aggregation in antithrombin were reduced by 95% compared with 32% and 52% respectively in citrate.

2.1.5 Discussion

This study originally describes the effects of blocking the P2Y₁ receptors, the P2Y₁₂ receptors, and both receptor types on a broad spectrum of platelet function tests in blood of patients with coronary artery disease. As such, it provides insight on the expected effects of these drugs as therapeutic agents. The well-documented efficacy of P2Y₁₂ receptors antagonists in preventing thrombotic events has highlighted the

critical role of ADP in platelets activation in cardiovascular diseases. Yet, all agents evaluated so far clinically specifically target the P2Y₁₂ receptors, leaving untouched the P2Y₁ receptors which role in the initiation of platelet activation by ADP and collagen is crucial [14].

It was found that P2Y₁ inhibition or P2Y₁₂ inhibition slightly promoted platelet adhesion on a collagen surface in high-shear condition while markedly inhibiting thrombus growth in the same conditions. The inhibition of platelet aggregation through the P2Y receptors inhibition increases the amount of free platelets in the blood circulation, therefore increasing their availability to adhere to the thrombogenic surface, which may explain the high level of surface coverage. Our observation could also be the result of inhibition of clot retraction by MRS2179 and clopidogrel. The clot retraction is a process that involves the actin-rich cytoskeleton and the engagement of the activated form of $\alpha_{IIb}\beta_3$ to the fibrinogen/fibrin. This process produces a clot contraction, reducing its size [15]. Since MRS2179 and clopidogrel both indirectly inhibit the activation of $\alpha_{IIb}\beta_3$ through their inhibition of the P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors, respectively [16], it might unable the clot retraction and therefore, explain the high level of platelet adhesion in these conditions.

MRS2179 also inhibited the initiation of aggregation and platelet activation in response to ADP. P2Y₁₂ inhibition showed similar but less marked effect on adhesion while self-limiting thrombus growth by promoting shedding and distal embolization of platelet thrombi as they formed. It also inhibited late aggregation and activation to ADP while blocking TRAP effects more effectively than MRS2179.

Dual inhibition preserved adhesion and nearly prevented all thrombus formation in high shear, and platelet aggregation and activation in static conditions.

Thrombus formation in flow

Although light transmission-based aggregometry studies are representative of many platelet functions, they are little informative on shear-dependent activation processes. These are complex and involve red cells, extracellular Ca^{2+} , platelet membrane glycoprotein Ib/IX/V and $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$, von Willebrand factor and ADP. These mechanisms are particularly important in blood haemostasis, pathogenesis of arterial thrombosis, and modulation of drugs effects in flow conditions and possible synergistic properties [17]. In this study, a model of PPACK-anticoagulated whole blood circulating over fibrillar collagen in arterial flow conditions was used to mimic the major steps in primary haemostasis i.e. platelet adhesion, activation and aggregation on a thrombogenic surface. Such an approach has been successfully used previously looking at platelet deposition at a fixed time point, usually after a 60-second period of shear [18]. For the purpose of this study that looks at differential purinergic receptors blockade, we performed real-time measurements of platelet adhesion and thrombus growth onto collagen over a period of perfusion extending to 9 minutes for better appraisal of drug effects. The results indicated that platelet recruitment onto thrombogenic surfaces monitored at a fixed time points during short periods of time should be carefully interpreted. Thus, one-minute perfusion studies would not have allowed the detection of a higher surface coverage 1 to 6 minutes after the start of the perfusion, and the true dynamic and differential changes in thrombus formation following blockage of the PY12 and P2Y1 receptors (Figure 1). Videodensitometry, as performed in the current study, gave a precise measurement of thrombus density over a longer period of time.

Although clopidogrel slightly increased adhesion on the collagen surface on shear, total platelet mass deposition was markedly decreased, as clots formed were frail and promptly washed downstream the flow. This absence of a firm aggregation after clopidogrel was also seen in the platelet aggregation studies as the drug inhibited much more late aggregation than peak aggregation.

This role of the P2Y₁₂ is linked to its implication in the amplification of platelet aggregation in response to a number of agonists that include collagen, thrombin, and thromboxane A₂. All patients in this study have received ASA and the inhibition of cyclooxygenase-1 preventing thromboxane A₂ production likely contributed to clopidogrel effects in the shear model. This kind of synergistic effect between a P2Y₁₂ inhibitor and aspirin was previously observed in an *ex vivo* model of perfusion similar to our model [19]. In contrast to clopidogrel, the *ex vivo* blockade of P2Y₁ by MRS2179 in the blood of patients with stable angina almost abrogated thrombus formation on collagen in flow. This strong effect was likely due to the presence of aspirin which is known to have a synergistic effect with MRS2179 on the inhibition of collagen-induced platelet activation, shape change and aggregation [14, 20, 21]. The potentiating observed with dual blockade of P2Y₁ and P2Y₁₂ in this study to inhibit thrombus formation supports the notion that the two-receptors act complementarily in determining the platelet response to ADP with both a collagen and an arterial shear stress stimulus.

Knowledge of these interactions can help develop strategies to prevent thrombosis in high-arterial shear situations such as in severely obstructed coronary arteries or ruptured plaques.

ADP-induced platelet activation

To date, only few studies examined the effects of dual blockage of P2Y₁ and P2Y₁₂. Leon et al [9] and Fabre et al [8] previously showed that P2Y₁^{-/-} mice were viable and had decreased platelet aggregation and a moderate increased of bleeding time. Adding a P2Y₁₂ inhibitor to these mice led to further platelet inhibition [22] since an ADP activation of P2Y₁₂ is known to activate the $\alpha_{IIb}\beta_3$ and to potentiate intracellular granules secretion [16].

Consistently, MRS2500, a potent inhibitor of P2Y₁ was subsequently found active in mice *in vivo* to prolong bleeding time and inhibit thromboembolism formation with collagen and adrenaline [23]. In another study, selective blockage of P2Y₁₂ with the reversible agonist AR-C69931MX prevented thrombin-induced generation of tissue factor in PRP while P2Y₁ blockade with MRS2179 had no such effects. However both drug combined inhibited P-selectin-induced platelet-leukocyte interactions and tissue factor exposure by leukocytes [24]. A synergistic effect to prevent $\alpha_{IIb}\beta_3$ receptors activation was described in isolated healthy human platelets following agonist stimulation with ADP 10 μ M; but no other parameters of platelet function were examined in the study [25]. Our study extend these observations to characterize the effects of selective and dual receptor blockage to parameters of platelet function including activation, secretion and aggregation in blood of patients with coronary artery disease before and after oral treatment with clopidogrel, and with or without MRS2179 added *ex vivo*.

MRS2179 near completely prevented platelet aggregation. Disaggregation, therefore, could not occur, and clopidogrel acting mainly on disaggregation had thus no

additional inhibitory effects. The combination, however, decreased platelet p-selectin secretion by 66%, $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation by 93% ($p=0.002$), and platelet binding to monocytes and to neutrophils more effectively than each drug alone. Altogether, these data suggest that P2Y₁ is the main driver to the agonist effects of ADP, at least at the low concentration of 2.5 μ M of ADP used in this study. This observation is consistent with previous work that showed that an activity of the P2Y₁ receptor was a prerequisite to the aggregation response to ADP at low to normal concentrations [9, 20,26]. The data obtained with TRAP are also consistent with these hypotheses.

TRAP-induced platelet activation

The ADP secreted by activated platelets acts as a secondary agonist in recruiting circulating platelets into the thrombus and facilitating the effects of other agonists such as collagen and thrombin [27]. Consistently, clopidogrel in this study significantly inhibited TRAP-induced peak aggregation by 12%; disaggregation was also promoted resulting in more than a three-fold decrease in late aggregation. The drug also partially inhibited P-selectin expression, PAC-1 binding, and formation of platelet-monocyte and platelet-neutrophil conjugates, as previously reported by our group [28].

These effects of clopidogrel exceeded those of MRS2179 particularly on disaggregation, late aggregation and P-selectin and PAC-1 expression. It has previously been shown that there was a crossreactivity between ADP and protease-activated receptors (PARs). PARs are G-coupled protein receptors and PAR-1 has been shown to be the main receptor responsible for the induction of thrombin (and

TRAP) actions in the platelet. It is known that PAR-1 activation leads to the secretion of ADP, which will subsequently activate P2Y₁₂, itself having the ability to potentiate platelet secretion and to activate $\alpha_{IIb}\beta_3$ [29]. Therefore, an inhibition of the P2Y₁₂ receptor with clopidogrel significantly decreases the platelet activation produced by TRAP. However, since there is no crossreactivity between PAR-1 and P2Y₁, an inhibition of P2Y₁ would not produce an effect similar to a P2Y₁₂ inhibition.

The combination of the 2 drugs strikingly magnified the inhibition of aggregation, most notably late aggregation indicating reduction of the stability of the platelet aggregates induced by TRAP. Notwithstanding this effect on aggregation, the addition of MRS2179 to clopidogrel added little on other parameters. More specifically, the combination had no additional effects on P-selectin, PAC-1, and on platelet-monocyte and platelet-neutrophil conjugates formation. The small effect on PAC-1 binding has been already described, [30] and another study using a higher concentration of TRAP reported greater inhibition of conjugates. [24] All together, these results support a significant contribution of P2Y₁₂ in the ADP dependent pathway to PAR-1 activation and aggregation as already suggested by Nylander et al. [30]. Studies have generally suggested that in shear stress conditions, P-selectin is essential to initiate platelet-leukocyte conjugates formation while integrin-mediated bridging contributes to the stability of these heterotypic aggregates.

Citrate versus anti-thrombin

Studies conducted in citrate compared with antithrombin underestimated the inhibition of P-selectin expression, PAC-1 binding and percentage of platelet aggregation. The percentages of platelet-monocyte and platelet-neutrophil conjugates

were 3-5-fold higher in antithrombin in the basal state allowing detection of amount of inhibition in the range of 60% to 80%, twice as much as for citrate. Such differences were not as pronounced in another study that made a similar comparison; higher concentrations of ADP (20 μ M) were used in the study, possibly attenuating the differences [31]. Although the differential results observed between anticoagulants are more quantitative than qualitative and unlikely to influence such diagnoses as biological non-responsiveness [32], our results clearly show that measures of platelet functions in sodium citrate and antithrombins are not equivalent at least at low ADP concentrations. They also suggest that the impact of anticoagulants should be integrated in the evaluation of new antiplatelet drugs as was previously highlighted in studies with P2Y₁₂ inhibitors [19, 33, 34] and with $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ antagonists [35].

Study limitations and perspectives.

An obvious limitation of the study is that MRS2179 could not be administered to the patients since it is not an approved drug for human use. For this reason, it was added in whole blood immediately after its withdrawal. The use of aspirin and of a statin could have had some impact on the results of platelet function tests in this study. Atorvastatin and clopidogrel are both metabolized by cytochrome P450 (CYP) 3A4; it was proposed that this competitive metabolism could partially inhibit clopidogrel effects and thus impair its anti-platelet efficacy [36]. These platelet studies, however, could not consistently be reproduced, and a wealth of data from large databank failed to show reduced efficacy of clopidogrel in patients using atorvastatin. Thus, although

the drug could possibly have influenced quantitatively the response to clopidogrel, the effect would be minor, would not have modified the directional changes, and would not be clinically relevant. Indeed, this design valued one of the objectives of the study that was to get insight on the effects of P2Y₁ and P2Y₁₂ inhibition in a clinical setting, these drugs being standard therapy in patients with or at risk of cardiovascular disease. Interferences between P2Y₁ blockers and statin have not been investigated to our knowledge, but are unlikely in the case of MRS2179 which is not a substrate of CYP3A4. In fact, MRS2179 does not need to be metabolized to be active. MRS2179 is a selective and competitive antagonist of the P2Y₁ platelet receptor and shows no partial agonist activity. It inhibits aggregation of human platelets induced by ADP with an IC₅₀ value in the submicromolar range and has a K_d value in the 100 nM range [37].

In the current study, MRS2179 was used in a high concentration in order to achieve a maximal platelet activation inhibition. The specificity of MRS2179 on the P2Y₁ in these conditions was investigated through a Vasodilator Stimulated Phosphoprotein (VASP) phosphorylation assay which is a marker of ADP-mediated P2Y₁₂ receptor activity. The results showed no interaction of MRS2179 with the P2Y₁₂ receptor at a concentration of 100 μM. (Data not shown)

As shown in a previous study, a large proportion (44%) of patients show a low response to a 300 mg loading dose of clopidogrel, even 24 hours after its administration, which support our choice of a 450 mg loading dose of clopidogrel in the current study [38].

Furthermore, in the current study, ADP was used at a low concentration of 2.5 $\mu\text{mol/l}$ to more selectively study the effects of this agonist on dependent receptors and pathways [39].

Perspectives

The present study documents the differential effects of blocking platelet P2Y₁ or P2Y₁₂, and the additive effects of blocking both purinergic receptor types. It purposely used various methodologies yielding different perspectives on platelet functions in blood of patients with coronary artery disease using a statin and aspirin so as to yield a prospective of effects to be expected in a clinical setting.

A previous study reported a moderate prolonged bleeding time in mice after treatment with a P2Y₁ saturating dose of MRS2179 compared to control. However, in the same conditions, clopidogrel showed a higher increase of bleeding time than MRS2179, suggesting that the inhibition of P2Y₁ shows a great safety [40, 41].

Unfortunately, MRS2500, a new compound that seems to be more potent, more stable and of greater affinity (100 times more) than MRS2179 was not yet available at the beginning of the current study and therefore could not be used for the experiments. Nevertheless, it would be of interest to investigate its inhibitory effect on the P2Y₁ receptor in order to confirm our results [42].

From the data, ones could speculate that using a P2Y₁ inhibitor in human could be highly effective in inhibiting platelet functions while resulting in no excessive bleeding as adhesion to a collagen surface in high shear rate is preserved, and added benefit to a P2Y₁₂ inhibitor and/or aspirin in a combination therapy approach.

Acknowledgment: We thank Dr. Frédéric Adam for his assistance in the glass capillary perfusion mode, and M. Ghitescu and J. Rivard for their technical assistance. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-05-PCOD-031-02)

Bibliography

1. Reed, G.L., *Platelet secretory mechanisms*. Semin Thromb Hemost, 2004. **30**(4): p. 441-50
2. Mann, K.G., et al., *Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes*. Blood, 1990. **76**(1): p. 1-16
3. Boyer JL, Romero-Avila T, Schachter JB, Harden TK. *Identification of competitive antagonists of the P2Y1 receptor*. Mol Pharmacol. 1996 Nov;**50**(5):1323-
4. Camaioni E, Boyer JL, Mohanram A, Harden TK, Jacobson KA. *Deoxyadenosine bisphosphate derivatives as potent antagonists at P2Y1 receptors*. J Med Chem. 1998 Jan 15;**41**(2):183-90.
5. Cattaneo M. *Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs. Expert review of cardiovascular therapy*. 2007 Jan;**5**(1):45-55.
6. Gachet C. *The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs*. Pharmacol Ther. 2005 Nov;**108**(2):180-92.
7. Kahner BN, Shankar H, Murugappan S, Prasad GL, Kunapuli SP. *Nucleotide receptor signaling in platelets*. J Thromb Haemost 2006; 4: 2317–26.
8. Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM, et al. *Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice*. Nat Med. 1999 Oct;**5**(10):1199-202.
9. Leon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, et al. *Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice*. J Clin Invest. 1999 Dec;**104**(12):1731-7.
10. Gachet C, Hechler B. *The platelet P2 receptors in thrombosis*. Semin Thromb Hemost. 2005 Apr;**31**(2):162-7.
11. Fuchs et al. *Circulating aggregated platelets in coronary artery disease*. Am J Cardiol. 1987 Sep 1;**60**(7):534-7
12. Furman et al. *Increased Platelet Reactivity and Circulating Monocyte-Platelet Aggregates in Patients With Stable Coronary Artery Disease*. J Am Coll Cardiol. 1998 Feb;**31**(2):352-8
13. Osmancik et al. *Glycemia, triglycerides and disease severity are best associated with higher platelet activity in patients with stable coronary artery disease*. J Thromb Thrombolysis. 2007 Oct;**24**(2):105-7. Epub 2007 Feb 17
14. Gachet C. *P2 receptors, platelet function and pharmacological implications*. Thrombosis and haemostasis. 2008 Mar;**99**(3):466-72.
15. Berndt MC, Andrews RK. Full clot retraction: running on mTOR. Blood. 2007 Mar; **109**(5):1791-1792
16. Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. J Clin Invest. 2004 Feb;**113**(3):340-5
17. Zwaginga JJ, Nash G, King MR, Heemskerk JW, Frojmovic M, Hoylaerts MF, et al. Flow-based assays for global assessment of hemostasis. Part 1: Biorheologic considerations. J Thromb Haemost. 2006 Nov;**4**(11):2486-7.

18. Turner NA, Moake JL, McIntire LV. *Blockade of adenosine diphosphate receptors P2Y₁₂ and P2Y₁ is required to inhibit platelet aggregation in whole blood under flow*. Blood. 2001 Dec 1;**98**(12):3340-5.
19. Andre P, LaRocca T, Delaney SM, Lin PH, Vincent D, Sinha U, et al. *Anticoagulants (thrombin inhibitors) and aspirin synergize with P2Y₁₂ receptor antagonism in thrombosis*. Circulation. 2003 Nov 25;**108**(21):2697-703.
20. Mangin P, Ohlmann P, Eckly A, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C. *The P2Y₁ receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA₂ formation is prevented*. J Thromb Haemost. 2004 Jun;**2**(6):969-77.
21. Ohlmann P, Eckly A, Mangin P, Lanza F, Gachet C. *Further evidence that fibrillar collagen is unable to promote platelet shape change and aggregation in the absence of secondary agonists*. J Thromb Haemost. 2005 Sep;**3**(9):2119-21.
22. Lenain N, Freund M, Leon C, Cazenave JP, Gachet C. *Inhibition of localized thrombosis in P2Y₁-deficient mice and rodents treated with MRS2179, a P2Y₁ receptor antagonist*. J Thromb Haemost. 2003 Jun;**1**(6):1144-9.
23. Hechler B, Nonne C, Roh EJ, Cattaneo M, Cazenave JP, Lanza F, et al. *MRS2500 [2-iodo-N⁶-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y₁ receptor with strong antithrombotic activity in mice*. J Pharmacol Exp Ther. 2006 Feb;**316**(2):556-63.
24. Leon C, Ravanat C, Freund M, Cazenave JP, Gachet C. *Differential involvement of the P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors in platelet procoagulant activity*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Oct 1;**23**(10):1941-7.
25. Nylander S, Mattsson C, Ramstrom S, Lindahl TL. *Synergistic action between inhibition of P2Y₁₂/P2Y₁ and P2Y₁₂/thrombin in ADP- and thrombin-induced human platelet activation*. Br J Pharmacol. 2004 Aug;**142**(8):1325-31.
26. Hechler B, Leon C, Vial C, Vigne P, Frelin C, Cazenave JP, et al. *The P2Y₁ receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation*. Blood. 1998 Jul 1;**92**(1):152-9.
27. Dorsam RT, Kunapuli SP. *Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation*. J Clin Invest. 2004 Feb;**113**(3):340-5.
28. Xiao Z, Theroux P. *Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome*. J Am Coll Cardiol. 2004 Jun 2;**43**(11):1982-8.
29. Kim S. et al. *Protease-activated receptors 1 and 4 do not stimulate G(i) signaling pathways in the absence of secreted ADP and cause human platelet aggregation independently of G(i) signalling*. Blood. 2002 May 15;**99**(10):3629-26
30. Nylander S, Mattsson C, Ramstrom S, Lindahl TL. *The relative importance of the ADP receptors, P2Y₁₂ and P2Y₁, in thrombin-induced platelet activation*. Thromb Res. 2003;**111**(1-2):65-73.
31. Tantry U, Bliden K, Etherington A, Gurbel P. *Is the assessment of clopidogrel responsiveness affected by the anticoagulant or measurement of maximum*

- platelet aggregation or final platelet aggregation?* (Abstr). *J Thromb Haemost.* 2007;**5**(suppl 2).
32. Gurbel PA, Bliden KP, Etherington A, Tantry US. *Assessment of clopidogrel responsiveness: Measurements of maximum platelet aggregation, final platelet aggregation and their correlation with vasodilator-stimulated phosphoprotein in resistant patients.* *Thromb Res.* 2007 Mar 30.
 33. Frelinger AL, 3rd, Jakubowski JA, Li Y, Barnard MR, Fox ML, Linden MD, et al. *The active metabolite of prasugrel inhibits ADP-stimulated thrombo-inflammatory markers of platelet activation: Influence of other blood cells, calcium, and aspirin.* *Thromb Haemost.* 2007 Jul;**98**(1):192-200.
 34. Patel P, Gonzalez R, Dokainish H, Lakkis N. *Impact of adenosine diphosphate and calcium chelation on platelet aggregation testing in patients receiving clopidogrel therapy.* *J Am Coll Cardiol.* 2006 Jan 17;**47**(2):464-5.
 35. Marciniak SJ, Jr., Jordan RE, Mascelli MA. *Effect of Ca²⁺ chelation on the platelet inhibitory ability of the GPIIb/IIIa antagonists abciximab, eptifibatide and tirofiban.* *Thromb Haemost.* 2001 Mar;**85**(3):539-43.
 36. Lau WC, Waskell LA, Watkins PB, Neer CJ, Horowitz K, Hopp AS, et al. *Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction.* *Circulation.* 2003 Jan 7;**107**(1):32-7.
 37. Baurand A. and Gachet C. *The P2Y1 Receptor as a Target for New Antithrombotic Drugs: A Review of the P2Y1 Antagonist MRS-2179.* *Cardiovasc drug Rev.* 2003 Spring; **21**(1): 67-76.
 38. Angiolillo DJ, et al. *Identification of low responders to a 300-mg clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stenting.* *Thromb Rev.* 2005; **115**(1-2): 101-8.
 39. Labarthe B, Théroux P, Angioi M, Ghitecu M. *Matching the evaluation of the clinical efficacy of clopidogrel to platelet function tests relevant to the biological properties of the drug.* *J Am Coll Cardiol.* 2005 Aug 16; **46**(4):638-45.
 40. Baurand A, Raboisson P, Freund M, et al. *Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist.* *Eur J Pharmacol* 2001;**412**:213–221.
 41. Foster CJ, Prosser DM, Agans JM, et al. *Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs.* *J Clin Invest* 2001;**107**:1591–1598.
 42. Hechler B et al. *MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice.* *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Feb; **316**(2): 556-63.

Legends to figures:

Figure 1: (A) Effects of the ex vivo addition of MRS2179 (100 μ M) on the dynamics of platelet deposition onto collagen fibers in flow before and 24h after a loading dose of clopidogrel. PPACK-anticoagulated whole blood labelled with rhodamine 6G was circulated for 540 seconds at 1500 s⁻¹ in rectangular glass capillaries coated with fibrillar collagen. Real-time deposition of fluorescent platelets was measured: panel A shows the real-time platelet surface coverage in percent and B the fluorescence intensity (ADU) as indicators of platelet adhesion and thrombus formation respectively; C are representative examples of platelet deposition on the collagen fibers in each of the 4 experimental conditions obtained after 7 min to 8 min of perfusion showing; and D is an index of the total mass of platelet deposition calculated as the product of surface coverage time fluorescence intensity.

Figure 2: Representative tracings of platelet aggregation curves obtained in PRP containing an anti-thrombin (A), and of platelet membrane P-selectin expression and PAC-1 binding studied in whole blood by flow cytometry (B). The agonist is ADP 2.5 μ M. Tracings are obtained at baseline before (baseline) and after the addition of MRS2179 (MRS2179); this sequence is again repeated 24h after a loading dose of 450 mg of clopidogrel (clopidogrel and clopidogrel plus MRS2179). Platelet aggregation is partially inhibited by clopidogrel and completely abrogated by MRS2179. P-selectin expression and of α IIB β 3 activation are increasingly inhibited with clopidogrel, MRS2179, and clopidogrel plus MRS2179).

Figure 3: Inhibition of platelet ADP- and TRAP-induced aggregation, secretion, activation, and platelet-monocyte (Plt-Mono) and platelet-neutrophil (Plt-PMN) conjugates formation by clopidogrel, MRS2179 and the combination. Medians are shown and at the bottom, p-values: * = $p < 0.05$.

Legends to tables

Table 1: Platelet parameters in response to MRS2179, clopidogrel, and the combination. Values are medians and 25th and 75th percentiles; *p<0.05 vs. baseline ; † p<0.05 vs. Clop; ζ p<0.05 vs. MRS2179. HP: Hirudin/PPACK; Aggmax: Peak aggregation; Agg6min: late aggregation; Disagg: Platelet disaggregation between peak and 6 min; Psel: membrane P-selectin expression; PAC-1: activated α IIB β 3 receptors; Plt-Mono: Percentage monocytes co-aggregated with platelets; Plt-PMN: Percentage of neutrophils co-aggregated with platelets.

Figure 1

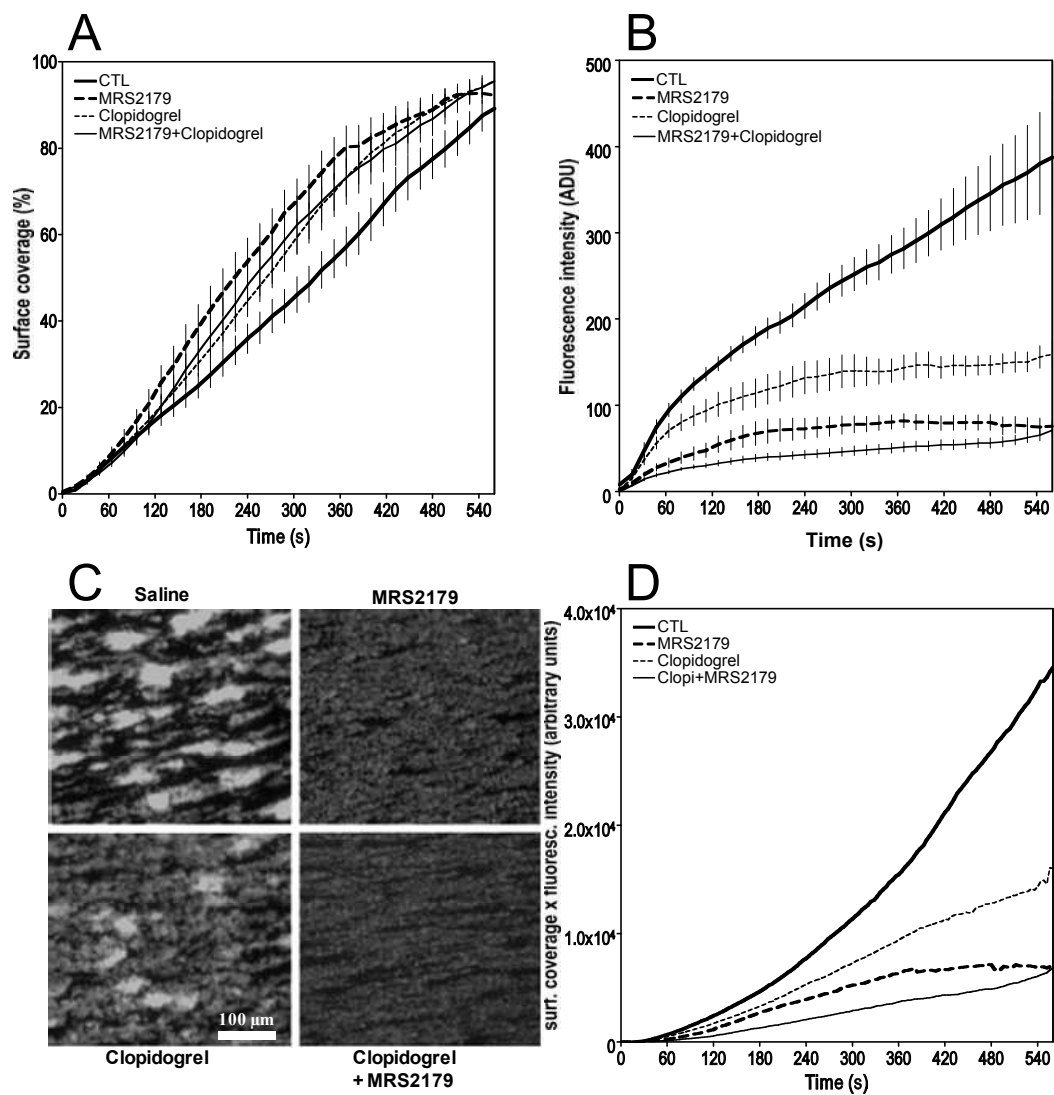


Figure 2

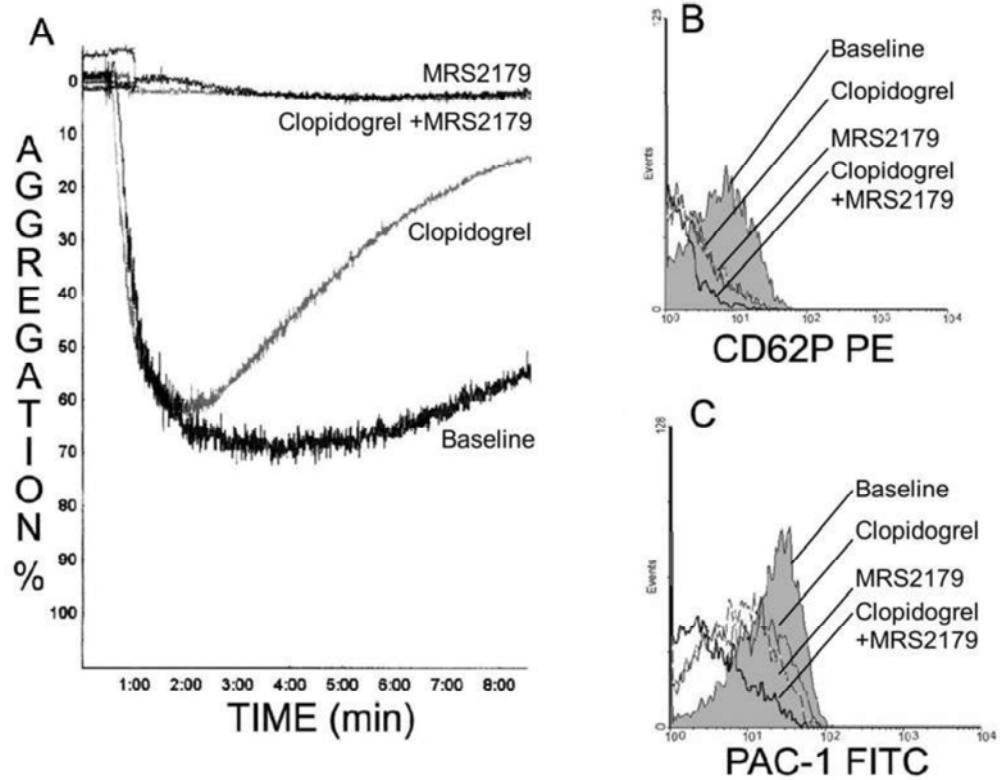


Figure 3

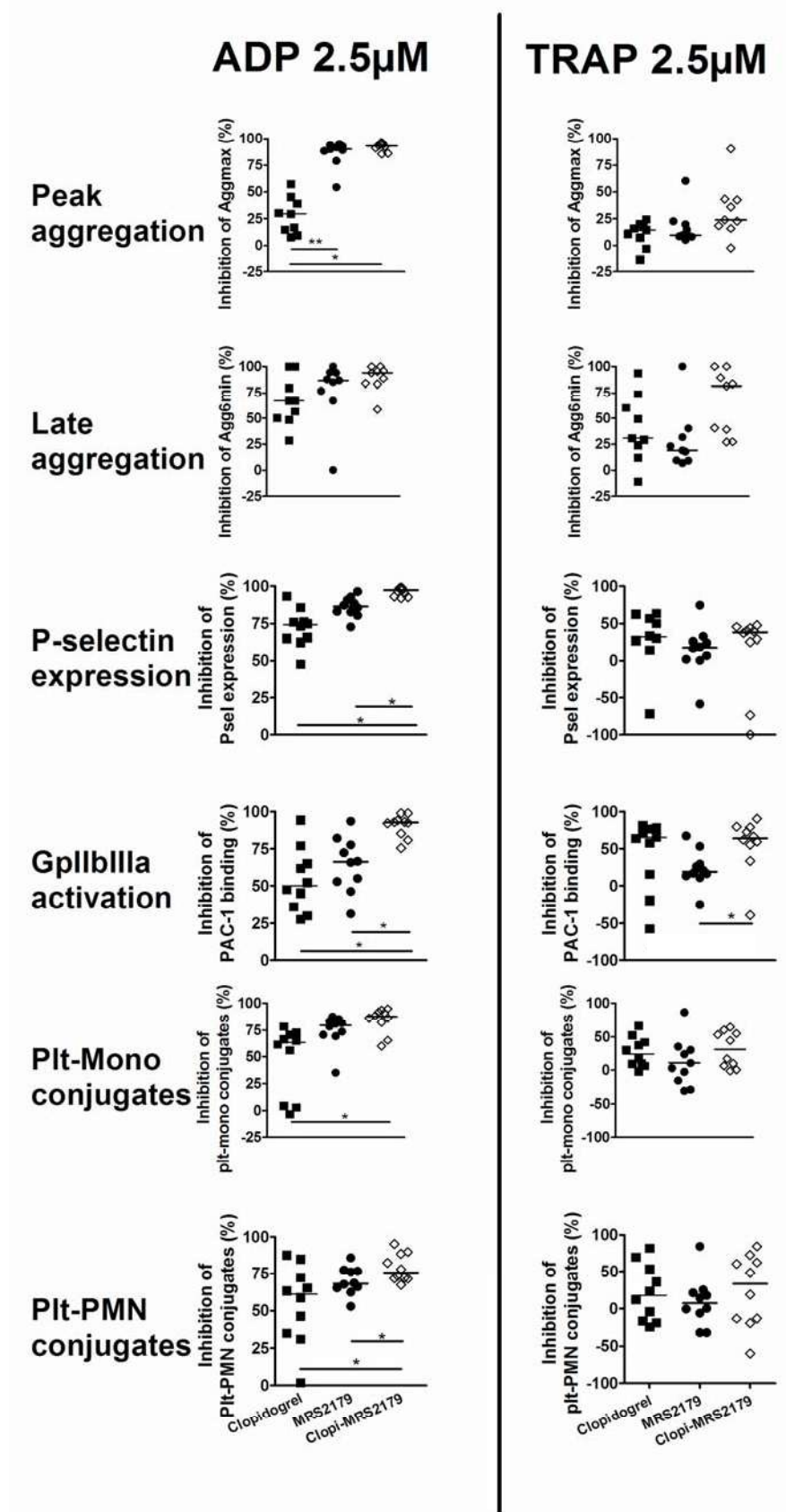


Table 1: Platelet parameters in response to MRS2179, clopidogrel, and the combination in Hirudin-PPACK and in citrate

		Aggmax	Agg6min	Disagg	P-sel	PAC-1	Plt-mono	Plt-PMN		
TBS	Baseline	HP	3* (1.5- 4.5)	1.5* (0- 3)	NA NA	0.04* (0.02- 0.07)	0.05* (0.02- 0.13)	2.25 (1.77- 3)	0.94 (0.75- 1.31)	
		Citrate	5.5 (4- 8.5)	5.5 (3.5- 8)	NA NA	0.1 (0.1- 0.2)	0.2 (0.1- 0.5)	2,0 (1.6- 2.8)	1 (0.5- 1.4)	
	Baseline	HP	3* (1.5- 4)	2* (0- 3.5)	NA NA	0.07 (0- 0.12)	0.11 (0.04- 0.18)	2.46 (1.98- 3.09)	1.47 (0.71- 1.89)	
		MRS2179 Citrate	7 (4- 12)	7 (4- 11)	NA NA	0.1 (0- 0.2)	0.3 (0.1- 0.4)	2.4 (1.8- 2.6)	1.1 (0.7- 1.5)	
	24h post clopidogrel	HP	3* 1- 4	3* 1- 4	NA NA	0.06 (0.02- 0.08)	0.08* (0.04- 0.14)	2.57 (1.96- 3.33)	1.08 (0.87- 1.32)	
		Citrate	6.5 (4.5- 14)	6.5 (4- 8.5)	NA NA	0.1 (0- 0.1)	0.2 (0.1- 0.4)	2.3 (1.5- 2.9)	1 (0.6- 1.7)	
	24h post clopidogrel	HP	3* (2- 4.5)	2.5* (2- 4)	NA NA	0.06 (0.04- 0.11)	0.1 (0.06- 0.15)	2.79 (2.09- 3.62)	1.21 (0.91- 1.32)	
		MRS2179 Citrate	8 (6.0- 11)	6.5 (5.5- 10)	NA NA	0.1 (0- 0.7)	0.2 (0.1- 0.3)	2.6 (1.6- 3.4)	1.3 (1.1- 2.8)	
	ADP 2.5µM	Baseline	HP	67† (54.0- 74.8)	39.5 (7.3- 65.3)	43.4 (13.0- 87.5)	29.9 (26.7- 42.9)	78.2* (49.8- 81.8)	21.6† (12.3- 34.3)	6.2† (4.1- 11.2)
			Citrate	43 (34.8- 57.5)	29 (22.5- 41.8)	29.5 (22.3- 40.6)	30.9 (22.9- 52.6)	82.7 (70.2- 87.1)	5.4 (3.0- 9.3)	2.1 (1.3- 4.6)
		Baseline	HP	4.5* (4- 8)	4* (3- 6.5)	0 (0- 35.0)	3.8* (2.9- 7.16)	24.7† (12.8- 38.3)	3.5† (2.7- 6.4)	1.6* (1.3- 2.8)
			MRS2179 Citrate	27 (17- 35)	25 (17.5- 34)	0 (0- 7.5)	7.1 (2.7- 11)	44 (27.9- 61.8)	2.8 (2.25- 3)	1.1 (0.8- 1.6)
24h post clopidogrel		HP	47.5 (36.5- 56.3)	8 (0- 25.8)	84.6* (50.8- 100)	8.2* (4.4- 15.6)	39.4* (13.6- 51.7)	7.7† (6.1- 16.9)	2.7* (1.3- 5.5)	
		Citrate	31.0 (27.5- 39.8)	12.5 (7.5- 22.3)	59.1 (32.0- 81.0)	14.8 (6.5- 21.5)	58.2 (16.3- 69.7)	3.5 (3- 5.4)	1.2 (0.9- 1.9)	
24h post clopidogrel		HP	5† (2.8- 6.3)	3* (1.5- 5.3)	0 (0-34.3)	0.69† (0.28- 3.0)	5.9† (2.4- 12.1)	2.5 (2.39- 3.0)	1.3 (1.1- 1.6)	
		MRS2179 Citrate	14.0 (7.3- 18.3)	14 (7- 17.5)	0 (0- 11.7)	2.96 (1.46- 5.16)	22.5 (15.4- 33.1)	2.9 (1.8- 5.9)	1.2 (1.1- 10.8)	

		Aggmax	Agg6min	Disagg	P-sel	PAC-1	Plt-mono	Plt-PMN	
TRAP 2.5µM	Baseline	HP	81.5†	74.5	9.3	62.2	60.5	37.4†	17.9†
			73- 85	60- 78.5	7.45- 17.35	(39.7- 67.6)	(31.1- 86.1)	(30.1- 52.8)	(13.1- 24.1)
		Citrate	68	63	11.3	62	79	15.7	7.2
			60- 81	51.5- 76	5.15- 17.7	(36.9- 66.8)	(54.3- 84)	(9.2- 19.8)	(5.3- 11.6)
	Baseline	HP	69.5	58	0	49.8†	42.2†	36.9†	17.2*
			56.5- 76	22- 66	0- 75	(30.7- 61.2)	(18.6- 72.5)	(23.8- 43.3)	(12.6- 22.2)
		MRS2179	62	55	12.9	60.7	59.8	18,0	7,0
		Citrate	59.5- 67.5	46.5- 61.5	9- 21.8	(37.9- 66.1)	(33- 78.3)	(10.9- 30.9)	(4.9- 18.2)
	24h post clopidogrel	HP	71	47	81.9	32.8	27.8*	31.2*	14.7
			66- 75.5	22.5- 62.5	49.55- 100	(24.3- 48.4)	(14- 50.7)	(23.3- 33)	(10.3- 18.6)
		Citrate	62.5	42	34.3	46.3	53.8	14.1	6.8
			47- 72.5	18.5- 62	10.4- 62.45	(23.9- 57.7)	(21.6- 66)	(12.2- 22.5)	(4.4- 12.7)
	24h post clopidogrel	HP	53.5	12.5	14.3	38.9	21.8*	28.3*	10.1
			47- 67	0- 47	0- 100	(29.2- 51)	(14.1- 32.3)	(19.1- 30.5)	(9- 18.3)
		MRS2179	54.5	35	34.55	48.5	37.1	15.9	7
		Citrate	37.5- 63.5	10- 47.5	20.3- 70.5	(30.9- 50.5)	(14- 54.8)	(9.5- 24.4)	(4.9- 13.6)

2.2 Présentation de l'article 2

Toujours dans l'optique d'évaluer la fonction de molécules antiplaquettaires, cette deuxième étude a été réalisée dans le but d'évaluer l'effet d'un second inhibiteur de récepteurs couplés aux protéines G, soit le SCH 530348. La précédente étude chevauchant la recherche fondamentale et clinique, celle-ci est davantage axée sur des bases cliniques.

Le SCH 530348, un inhibiteur du récepteur PAR-1 en est déjà à la phase III de son développement clinique et semble très prometteur : Son effet sur l'activité plaquettaire est désormais très bien démontré. On ne trouve toutefois pas ou très peu de données concernant son effet sur les leucocytes qui, eux aussi, expriment le récepteur PAR-1 et qui ont une contribution majeure dans un nombre accru de désordres inflammatoires tel que dans les maladies cardiovasculaires.

C'est donc sur ce concept que la présente étude a été élaborée et que l'action du SCH 530348 sur les cellules de l'inflammation a été déterminée.

Un traitement par placebo ou par SCH 530348 a été remis à des patients souffrant de maladie coronarienne stable et une prise de sang a été réalisée chez les sujets avant ainsi que 30 jours après le début du traitement. L'étude a été traitée en double aveugle.

Bien qu'il faille maintenant attendre la levée de l'aveugle pour mesurer l'efficacité anti-inflammatoire du SCH 530348, nous présentons ci-après des résultats

préliminaires présentés sous forme d'article et provenant d'un nombre restreint de patients.

Activité anti-inflammatoire de l'inhibiteur du récepteur PAR-1, le SCH 530348. Résultats préliminaires d'une sous-étude de l'étude clinique de phase III TRA 2°P-TIMI 50

Judith Babin*, Arnaud Bonnefoy*†, Pierre Thérioux*

Article en préparation

* Faculté de Médecine, Institut de Cardiologie de Montréal et Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H1T1C8.

† INSERM U743, Université of Montréal, Québec, Canada, H2X1P1.

Correspondance à Pierre Thérioux, MD

Adresse: Institut de Cardiologie de Montréal, 5000 Bélanger E, Montréal, QC, Canada H1T 1C8

Tél: (514) 376-3330 ext 3616

Fax: (514) 376-1076

Étude subventionnée par la compagnie Merck (Shering-Plough).

2.2.1 Résumé

Le SCH 530348, un nouvel inhibiteur du récepteur PAR-1, a prouvé avoir des effets très favorables sur l'activité plaquettaire. Or peu d'informations sont disponibles sur ses effets sur les leucocytes qui expriment également ce récepteur et qui ont aussi un rôle majeur dans l'athérosclérose. Cette étude a donc pour but de déterminer l'effet du SCH 530348 sur l'inflammation. Des échantillons de sang de patients avec histoire de maladie cardiovasculaire ont été activés soit par du tampon tyrode, de l'ADP (10 μ m), du collagène de type 1 (2,5 μ g/ml) ou du TRAP-6 (10 μ M). L'expression des marqueurs inflammatoires MAC-1 et facteur tissulaire ont subséquemment été mesurés sur les monocytes, granulocytes (PMNs) ainsi que sur les conjugués monocytes-plaquettes (Mono-plts) et granulocytes-plaquettes (PMNs-plts). La formation de Mono-plts de PMNs-plts a également été mesurée. Les mesures ont été effectuées à base et 30 jours après le début d'un traitement des patients avec soit le SCH 530348 ou le placebo. À 30 jours, les patients ayant une réponse fortement diminuée lors de l'agrégation plaquettaire induite par le TRAP-6 (agoniste de PAR- 1) par rapport à la mesure à la base présentent également une diminution de l'expression de MAC-1 sur tous types de cellules (Intensités de fluorescence (Base vs 30 jours) : monocytes 15,7 \pm 3,9 vs 9,5 \pm 1,7, PMNs 18,4 \pm 5,2 vs 8,3 \pm 2,3, Mono-plts 25,8 \pm 5,7 vs 16,8 \pm 3,6, PMNs-plts 24,6 \pm 4,9 vs 14,3 \pm 4,2) (tous $p < 0,05$). De plus, ces mêmes patients montrent une diminution du pourcentage de cellules ayant un signal positif en facteur tissulaire sur les mono-plts (68,4 \pm 16,3% vs 30,1 \pm 16,2%) et PMNs-plts (44,2 \pm 21,8% vs 16,4 \pm 9,3%) ($p < 0,01$) ainsi que du pourcentage de conjugués mono-plts (88,5 \pm 10,3% vs 33,7 \pm 17,7%) et PMNs-plts (70,5 \pm 21,3% vs 16,5 \pm 9,8%)

formés ($p < 0,001$). En conclusion, ces résultats préliminaires suggèrent que le SCH 530348 a une influence sur les leucocytes en faisant abaisser l'expression des marqueurs d'inflammations.

2.2.2 Introduction

Le récepteur activé par les protéases 1 (PAR-1) est un récepteur à 7 passages transmembranaires qui peut coupler les protéines G des familles Gi/z, Gq ainsi que G_{12/13} [1-3] et qui se retrouve, entre autres, chez les plaquettes et les leucocytes [4]. Son agoniste classique est la thrombine, produit de la cascade de coagulation et le plus puissant activateur plaquettaire [5]: Elle clive l'extrémité N-terminale extracellulaire du récepteur entre les acides aminés Arg41 et Ser42 puis la nouvelle extrémité ainsi formée peut se lier de façon intramoléculaire au récepteur afin qu'il soit autoactivé. Cette activation entraîne une signalisation transmembranaire impliquant, entre autres, l'activation de MAPK (mitogen-activated protein kinases), la mobilisation de calcium intracellulaire et l'activation des protéines Rho et Rac [6, 7]. S'en suivra une multitude de bouleversements chez la cellule tels qu'un changement de forme [8, 9], la sécrétion de divers molécules et l'activation d'intégrines [10, 11].

En conditions physiologiques, chez les plaquettes, ce processus est important pour l'hémostase mais, en cas de pathologies, les plaquettes ainsi activées favoriseront la formation de thrombose [5].

Ce n'est que récemment que des inhibiteurs du récepteur PAR-1 ont fait l'objet de premières investigations cliniques chez l'humain. Le SCH 530348, un des deux antiplaquettaires présentement à l'étude, est un antagoniste compétitif du ligand de PAR-1 qui a été développé à des fins de prévention et de traitement de l'athérombose [12].

Contrairement aux inhibiteurs directs de la thrombine, en n'agissant pas sur la thrombine elle-même, le SCH530348 n'interfère pas avec la formation de fibrine et permet une coagulation normale [14, 15].

Le SCH530348 a récemment complété trois études cliniques de phase II avec succès. Au moment présent, deux grandes études de phase III visant à montrer l'efficacité et la sûreté de la molécule sont en cours. L'une d'entre elle, TRA 2°P-TIMI 50 (Thrombin Receptor Antagonist in Secondary Prevention of Atherothrombotic Ischaemic Events), a pour but de déterminer l'efficacité de l'antiplaquettaire comme traitement secondaire chez des patients avec historique de maladie athérosclérotique [16]. Quant à elle, l'étude TRA-CER (Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction in Acute Coronary Syndrome) vise à déterminer si le SCH 530348 (Dose bolus de 40 mg, suivie de 2,5 mg/jour pour un minimum d'un an) peut diminuer le risque d'événements ischémiques lorsqu'il est administré en combinaison avec les thérapies standards chez les patients ayant un infarctus du myocarde sans élévation du segment ST (NSTEMI).[16]

Tout au long de son développement, il a été démontré que le SCH 530348 avait une importante influence sur les mesures pharmacodynamiques de la plaquette [14]. Sachant que certains leucocytes expriment également le récepteur PAR-1, il est étonnant de constater que les données concernant l'effet du nouvel agent antiplaquettaire sur l'inflammation systémique se font très rares.

Ainsi, la présente étude, qui est une sous-étude de l'étude TRA 2°P-TIMI 50, a été conduite dans le but de déterminer si le SCH 530348 avait un effet sur les cellules inflammatoires impliquées dans l'athérombose. La substance (placebo ou SCH 530348), administrée à chaque patient n'ayant pas encore été dévoilée dans le cadre

de l'étude TRA 2°P-TIMI 50, les résultats sont donc présentés sous forme de tableaux comparant les marqueurs inflammatoires chez les patients ayant une réponse positive à l'agrégation plaquettaire induite par le TRAP-6, après 30 jours de traitement, et ceux ayant une réponse négative.

2.2.3 Matériel et méthodes

Conception de l'étude

L'étude TRA 2°P-TIMI 50 est une étude multicentrique, randomisée, à double-aveugle où l'agent antiplaquettaire testé (SCH530348) est comparé à un contrôle placebo. L'objectif principal de l'étude est d'évaluer l'efficacité du SCH530348, antagoniste du récepteur PAR-1, comme traitement secondaire chez des patients avec une histoire documentée de maladie athérosclérotique.

La présente étude est une sous-étude de l'essai clinique TRA 2°P-TIMI 50 et a pour but de déterminer l'effet du SCH530348 sur l'activité inflammatoire des leucocytes. L'expression des marqueurs MAC-1 et facteur tissulaire, ainsi que le niveau de formation de conjugués leucocytes-plaquettes ont été mesurés avant et 30 jours après le début d'un traitement des patients avec soit le SCH 530348 ou un placebo. Au moment du recrutement des patients (base), ceux-ci ont reçu de façon aléatoire soit le SCH530348 (2,5 mg/jour) ou le placebo qu'ils ont dû prendre quotidiennement pour une période de 30 jours. Des échantillons de sang ont été recueillis chez le patient à base et 30 jours après le début du traitement afin d'effectuer les tests nécessaires.

Population de l'étude

L'enrôlement de patients pour l'étude TRA 2°P-TIMI 50 s'est terminé en novembre 2009 et inclue 25 000 patients avec une histoire de maladie athérosclérotique documentée. Les patients ont une histoire documentée d'infarctus du myocarde ou d'accident vasculaire cérébral entre 2 semaines et 12 mois avant leur inclusion dans l'étude. Les patients ayant une maladie artérielle périphérique étaient éligibles pour l'inclusion s'ils avaient eu une claudication intermittente conjointement avec un index cheville-bras <0.85 ou une précédente revascularisation suite à une ischémie aiguë des membres inférieurs. Les patients ont été randomisés soit pour le SCH 530348 (2,5 mg/jour) ou le placebo à un ratio 1:1 en combinaison avec une thérapie standard pour une durée d'un minimum d'un an.

La présente sous-étude a été réalisée sur du sang provenant de 60 patients enrôlés à l'Institut de Cardiologie de Montréal dans le cadre de l'étude TRA 2°P-TIMI 50. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique de l'Institut de Cardiologie de Montréal en accord avec les recommandations de la déclaration d'Helsinki. Préalablement à leur participation, tous les patients ont dû signer un formulaire de consentement libre et éclairé acceptant que 25 ml de sang supplémentaires soit recueillis en plus des échantillons de sang récoltés pour l'étude principale TRA 2°P-TIMI 50 à base et 1 mois après le début de la médication. Dans le présent article, les résultats préliminaires des tests effectués chez 12 patients sont présentés.

Collecte des échantillons de sang

Les patients ont eu deux prises de sang non traumatiques à partir d'une veine de l'avant-bras, une avant l'administration de la première dose de SCH530348 (2,5

mg/jour) ou placebo et une autre après 30 jours de traitement. Le sang a été recueilli dans des tubes contenant du citrate de sodium 0.38% (Becton Dickson and Co, Franklin Lakes, NJ). Le traitement a été déterminé aléatoirement par un pharmacien de recherche et a été remis au patient par une infirmière de recherche après la première collecte de sang.

Agrégation plaquettaire

Les agrégations plaquettaires en réponse au TBS, à l'adénosine diphosphate (10 μ M) (ADP, Sigma Chemical Co, St-Louis, Mo) et au peptide activateur du récepteur à la thrombine-6 (10 μ M) (TRAP-6, Sigma Chemical Co, St-Louis, Mo) ont été évalués par agrégométrie avec agitation (1000 rpm) dans des échantillons de plasma riche en plaquettes (PRP) (250 000 plaquettes/ μ l de PRP) à l'aide d'un agrégomètre Chronolog 570 VS (Chronolog Corp with AggroLink Software package, Havertown, PA). L'agrégation maximale, correspondant à la transmission maximale du faisceau lumineux à travers l'échantillon, a été mesurée.

Analyses par cytométrie de flux

Toutes les mesures par cytométrie de flux ont été effectuées à partir d'un cytomètre de flux EPICS XL (Beckman Coulter, Floride). Les mesures du pourcentage de conjugués leucocyte-plaquettes formés, du niveau d'expression de MAC-1 sur leucocytes seuls ou conjugués et du pourcentage de leucocytes ou de conjugués leucocytes-plaquettes exprimant le facteur tissulaire (TF) à leur surface sont tous des tests qui ont été effectués dans les mêmes conditions : Du sang total a été incubé 30 minutes à 37°C en condition statique avec soit une solution saline, de l'ADP (5 μ M)

(Sigma), du collagène fibrillaire de type I (2,5 µg/mL) (Chronolog, Havertown, USA) ou du TRAP-6 (5 µM) (Sigma) en présence d'un anticorps monoclonal IgG1 murin anti-CD42a conjugué à la R-phycoerythrine (RPE) (AbD Serotec, Oxford, Angleterre) et d'un anticorps monoclonal IgG2a murin anti-CD14 conjugué à de la phycoerythrin-CY5 (PC5) (Beckman Coulter, Floride). Le niveau d'expression de MAC-1 sur les leucocytes a été mesuré à l'aide d'un anticorps monoclonal IgM murin anti-MAC-1 conjugué au FITC (Beckman Coulter, Floride) et le pourcentage de cellules exprimant le facteur tissulaire à l'aide d'un anticorps monoclonal IgG1 murin anti-TF conjugué à la R-phycoerythrine (RPE) (AbD Serotec, Oxford, Angleterre). Les monocytes et les granulocytes ont été différenciés par leur granularité et leur niveau d'expression du CD14 [22]. Toutes les lectures de cytométrie de flux ont été effectuées sur 10 000 cellules et ont toutes été réalisées en duplicata.

Analyses statistiques

Étant donné que les paramètres de l'étude suivaient une distribution normale, un test t de student apparié a été utilisé afin de comparer les paires de données à base et 30 jours après le début du traitement à l'intérieur de chaque groupe de patient. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à partir du logiciel Prism-4 (GraphPad Software, USA). La significativité des tests est déterminée par des valeurs p bilatérales de moins de 0,05.

# patient	Sexe	Âge	Ethnicité	IMC	Tabac	HTA	Cholestérol	Diabète Type II	Événement thrombotique	Temps écoulé depuis l'événement	ASA Dose (mg)	Plavix Dose (mg)	Tx pour diminution du cholestérol	
													Type	Dose (mg)
1	M	46	Caucasien	34,5	Cessé	OUI	NON	OUI	IMNQ	1 mois	80	75	Lipitor	80
2	M	42	Caucasien	35,9	OUI	NON	OUI	NON	STEMI	3 mois 1/2	80	75	Lescol+ Ezetrol	80
3	M	54	Caucasien	23,6	OUI	NON	OUI	NON	STEMI	3 mois 1/2	80	75	Lipitor	80
4	M	48	Caucasien	41,2	OUI	OUI	OUI	NON	IAM	9 mois	80	NON	Lipitor	40
5	M	44	Caucasien	31,7	Cessé	OUI	NON	NON	IAM	3 semaines	80	75	Lipitor	80
6	M	76	Caucasien	32,1	NON	OUI	OUI	OUI	Claudication	NA	80	NON	Lipitor	40
7	M	74	Égyptien	25	OUI	ND	OUI	OUI	Claudication	NA	80	NON	Lipitor	40
8	M	80	Caucasien	32,8	OUI	OUI	OUI	OUI	Claudication	NA	325	NON	Lipitor	40
9	M	81	Caucasien	37,2	Cessé	OUI	OUI	OUI	Claudication	NA	80	NON	Lipitor	40
10	M	72	Caucasien	31,2	OUI	OUI	OUI	OUI	Claudication	NA	80	75	NON	NA
11	M	61	Caucasien	39,1	OUI	OUI	OUI	OUI	Claudication	NA	80	NON	Crestor	40
12	M	67	Caucasien	39,6	Cessé	OUI	OUI	OUI	Infarctus	ND	80	NON	Pravachol	20

Tableau I. Informations et histoire clinique des patients inclus dans l'étude TRA 2P.

Informations recueillies chez les patients inclus dans l'étude TRA 2P lors de leur premier rendez-vous afin de déterminer les facteurs pouvant influencer certains résultats aux divers tests effectués au cours de l'étude TRA 2P.

IMC : Indice de masse corporelle. HTA : Hypertension artérielle. IMNQ : Infarctus du myocarde sans onde Q. STEMI : Infarctus du myocarde avec élévation du segment ST. IAM : Infarctus aigu du myocarde. ASA : Aspirin. Tx : Traitement. NA : Non applicable ND : Non disponible

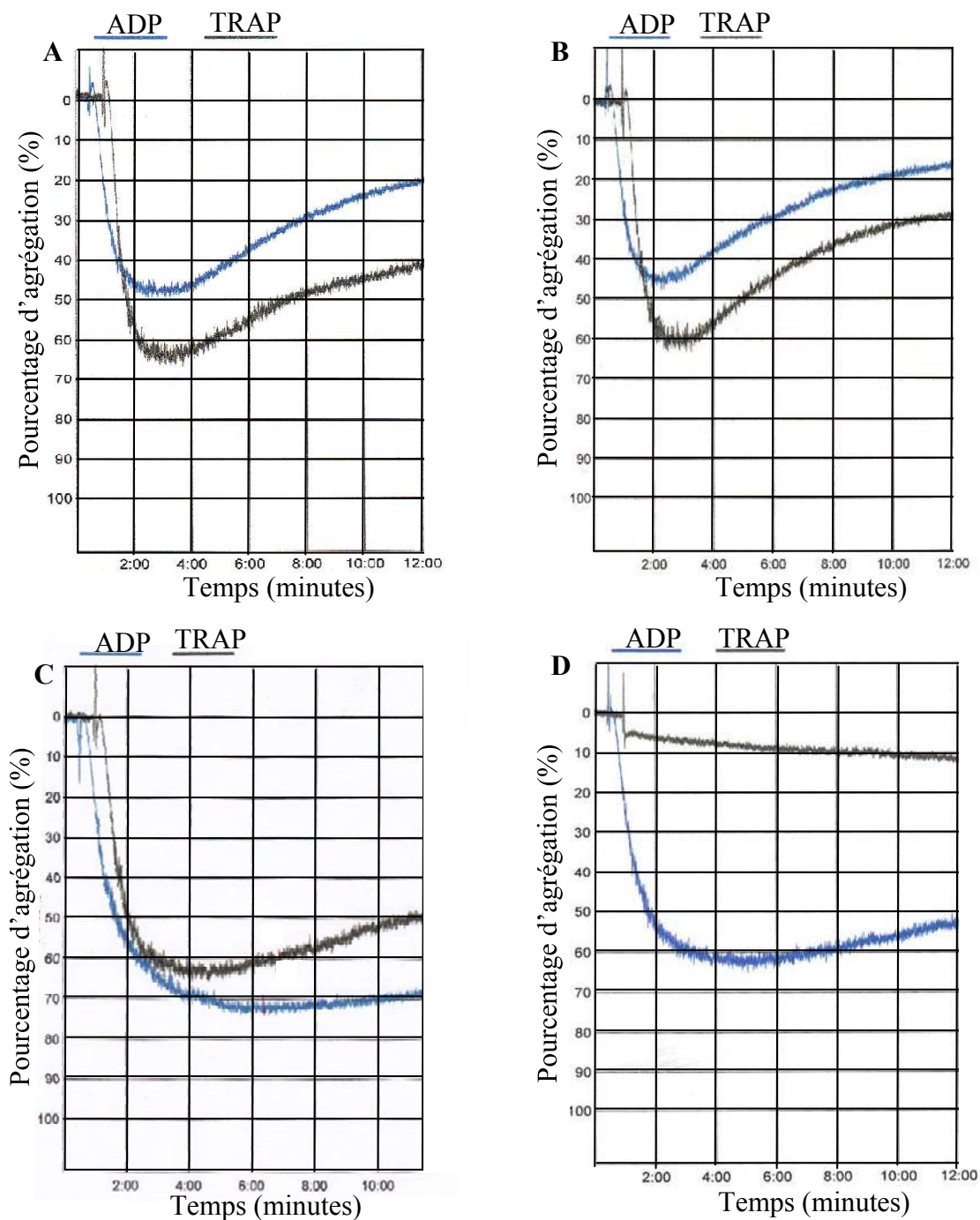


Figure 1 : Exemple de courbes d'agrégation avant et 30 jours après le début du traitement au placebo ou au SCH 530348. Des agrégations plaquettaires ont été réalisées à partir d'échantillons de plasma riche en plaquettes suite à des activations par l'ADP (courbe bleue) et le TRAP-6 (courbe verte). Les observations sont présentées sous forme de pourcentage d'agrégation en fonction du temps. A. Courbe d'agrégation à base d'un patient TRAP+. B. Courbe d'agrégation du même patient TRAP+, 30 jours après le début du traitement. C. Courbe d'agrégation d'un patient TRAP- avant le début du traitement. D. Courbe d'agrégation du même patient TRAP- après 30 jours de traitement.

# de patient	Base		30 jours	
	ADP (%)	TRAP (%)	ADP (%)	TRAP (%)
1	ND	ND	67%	4%
2	45%	83%	50%	59%
3	23%	32%	62%	11%
4	65%	84%	72%	88%
5	22%	26%	21%	15%
6	60%	53%	74%	61%
7	53%	ND	63%	12%
8	64%	78%	73%	23%
9	60%	71%	71%	75%
10	35%	37%	50%	14%
11	66%	76%	55%	79%
12	72%	64%	64%	12%

Tableau II. Pourcentage d'agrégation plaquettaire maximale en présence d'ADP et de TRAP à base et 30 jours après le début du traitement. Des échantillons de plaquettes lavées ont été préparés à partir de sang prélevé sur citrate chez les patients inclus dans l'étude avant et 30 jours après le début du traitement. Pour chaque patient, les échantillons de plaquettes lavées ont été activés par l'ADP (10 μ m) ainsi que par le TRAP-6 (10 μ m) sous agitation durant 10 minutes et le pourcentage d'agrégation plaquettaire maximal a par la suite été mesuré. Patients TRAP- : 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12. Patients TRAP+ : 2, 4, 6, 9, 11.

Agoniste	Agrégation négative au TRAP		Agrégation positive au TRAP		
	Base (%)	30 jours (%)	Base (%)	30 jours (%)	
Monocyte-plaquettes	TBS	25,5 \pm 12,8	35,7 \pm 16,1	21,0 \pm 6,3	34,5 \pm 14,1
	ADP	66,5 \pm 26,3	78,5 \pm 14,3	79,8 \pm 11,9	75,3 \pm 17,3
	Collagène	33,9 \pm 14,1	42,0 \pm 18,6	32,5 \pm 5,0	41,7 \pm 10,2
	TRAP	88,5 \pm 10,3	33,7 \pm 17,7*	92,5 \pm 4,4	94,3 \pm 3,1
PMN-plaquettes	TBS	11,0 \pm 5,2	17,2 \pm 8,9	9,2 \pm 1,9	20,4 \pm 12,4
	ADP	31,7 \pm 22,0	43,6 \pm 20,8	43,9 \pm 11,1	45,3 \pm 15,9
	Collagène	12,5 \pm 4,3	17,3 \pm 10,2	12,5 \pm 5,2	18,7 \pm 9,8
	TRAP	70,5 \pm 21,3	16,5 \pm 9,8*	77,2 \pm 7,8	84,9 \pm 5,4

Tableau III. Effet du traitement sur le pourcentage de conjugués leucocyte-plaquettes formés suite à une activation par différents agonistes chez des patients ayant ou non une agrégation positive au TRAP

Le pourcentage de conjugués leucocyte-plaquettes a été mesuré sur du sang prélevé sur citrate chez des patients stables avant et 30 jours après le début de la médication/placebo. Après activation des échantillons de sang par divers agonistes (TBS, ADP 5 μ m, Collagène 2,5 μ g/ml, TRAP-6 5 μ m) tel que décrit dans la section méthodes et la mesure a ensuite été effectuée par cytométrie de flux. Les patients ont été classifiés selon qu'ils avaient une agrégation positive ou négative au TRAP lors d'une activation antérieure. Une moyenne des pourcentages de conjugués formés pour chaque groupe de patient ainsi que leur écart-type respectifs sont inscrit dans cette table. * Résultat significatif entre base et 30 jours. $p < 0,05$

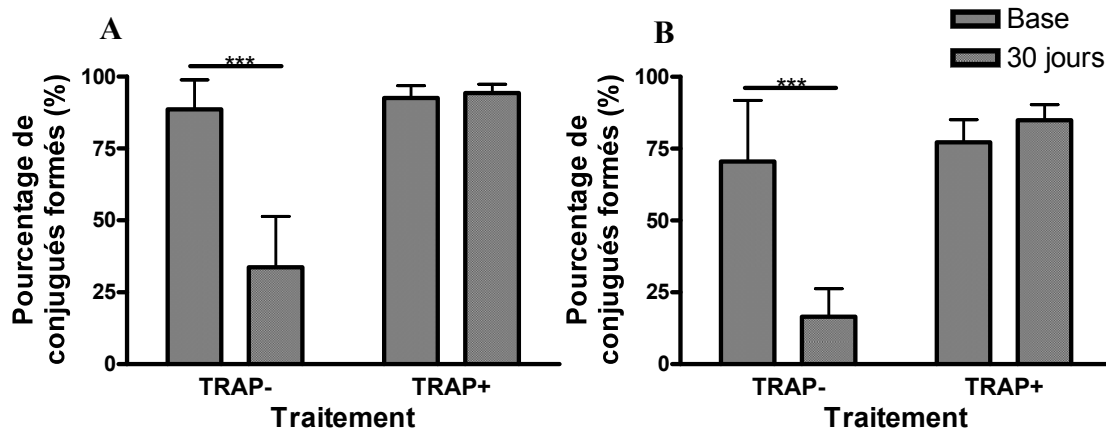


Figure 2 : Représentation graphique du pourcentage de conjugués leucocyte-plaquette formés suite à une activation par le TRAP-6 à base et à 30 jours pour chaque groupe de patients. A. Pourcentage de conjugués monocyte-plaquettes formés. B. Pourcentage de conjugués granulocyte-plaquette formés. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne et de leur écart-type correspondant. *Résultat significatif entre base et 30 jours. $p < 0,001$.**

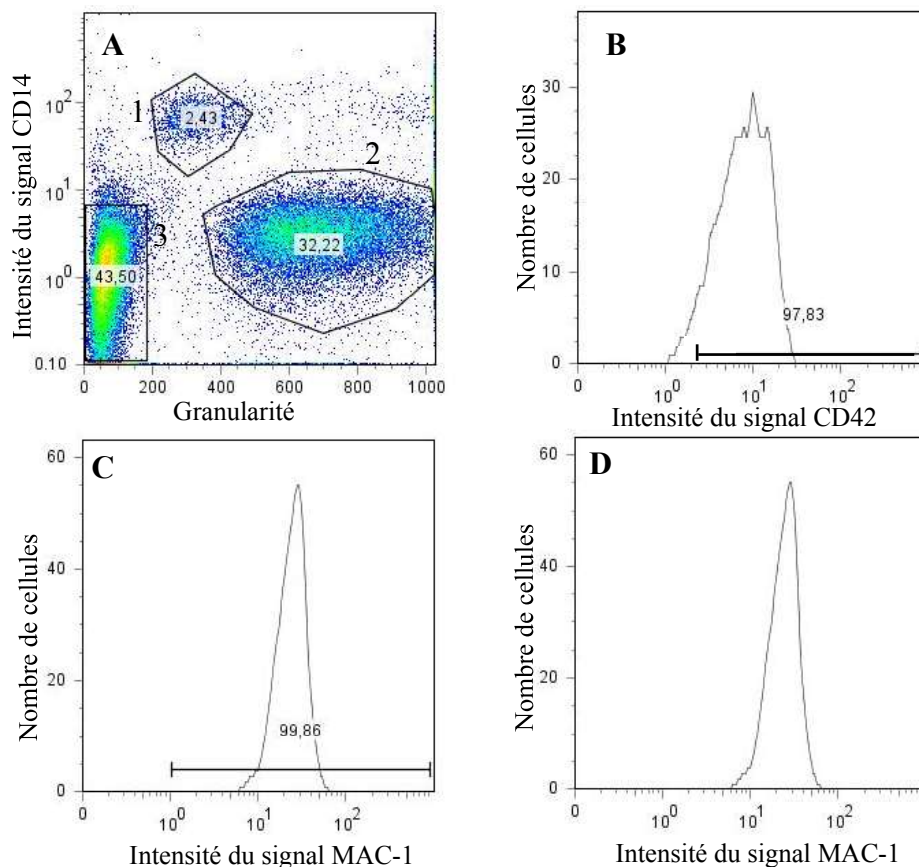


Figure 3 : Analyse en cytométrie de flux pour la détermination du niveau d'expression de MAC-1 à la surface de leucocytes seuls ou conjugués. Exemple des conjugués monocytes-plaquettes à base suite à une activation par l'ADP. A. Des lectures de cytométrie de flux sont effectuées sur des échantillons de sang total. Les cellules sont différenciées selon leur niveau de signal CD14 ainsi que leur granularité. (1. Monocytes 2. Granulocytes 3. Lymphocytes). Une fois la population de monocytes sélectionnée, le signal CD42 nous permet d'identifier les monocytes seuls des monocytes conjugués avec des plaquettes (B). Une fois la population de conjugués monocyte-plaquette sélectionnée, le pourcentage de cellules exprimant le MAC-1 à leur surface est déterminé (C). Ensuite, la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) du signal MAC-1 est déterminée sur ces cellules. Dans la présente étude, la MFI du signal MAC-1 a été déterminée pour les monocytes, les conjugués monocyte-plaquette, les granulocytes et les conjugués granulocyte-plaquette exprimant MAC-1 suite à l'activation des échantillons par le TBS, l'ADP, le collagène ainsi que le TRAP-6. Toutes les lectures de cytométrie sont effectuées en duplicata.

	Agoniste	Agrégation négative au TRAP		Agrégation positive au TRAP	
		Base (MFI)	30 jours (MFI)	Base (MFI)	30 jours (MFI)
Monocytes	TBS	8,8 ± 1,4	9,3 ± 1,5	8,1 ± 1,6	9,4 ± 1,6
	ADP	12,9 ± 3,3	14,1 ± 2,5	13,9 ± 2,8	13,3 ± 4,3
	Collagène	9,6 ± 1,5	9,7 ± 1,8	9,0 ± 1,3	9,9 ± 1,6
	TRAP	15,7 ± 3,9	9,5 ± 1,7*	15,4 ± 3,3	18,0 ± 3,1
Monocytes conjugués	TBS	15,4 ± 5,6	15,7 ± 3,7	12,8 ± 2,3	15,6 ± 3,5
	ADP	19,4 ± 4,8	22,1 ± 4,1	21,5 ± 5,2	22,2 ± 6,7
	Collagène	18,4 ± 5,2	20,1 ± 7,9	17,3 ± 4,1	19,8 ± 5,3
	TRAP	25,8 ± 5,7	16,8 ± 3,6*	24,7 ± 5,6	28,8 ± 3,0
PMNs	TBS	7,1 ± 0,9	7,9 ± 2,2	6,8 ± 1,0	9,2 ± 1,6
	ADP	10,4 ± 3,0	12,2 ± 2,3	14,3 ± 1,7	12,4 ± 3,4
	Collagène	7,3 ± 0,9	8,0 ± 2,0	7,6 ± 1,7	8,4 ± 2,0
	TRAP	18,4 ± 3,7	8,3 ± 2,3*	19,2 ± 3,0	20,5 ± 3,4
PMNs conjugués	TBS	11,9 ± 2,4	13,2 ± 4,4	11,3 ± 3,0	14,7 ± 3,8
	ADP	15,9 ± 4,0	18,1 ± 3,5	20,1 ± 1,7	18,7 ± 5,4
	Collagène	12,8 ± 1,9	13,8 ± 3,8	14,0 ± 4,2	14,2 ± 4,8
	TRAP	24,6 ± 4,9	14,3 ± 4,2*	25,4 ± 2,6	27,5 ± 2,2

Tableau IV. Effet du traitement sur le niveau d'expression de MAC-1 à la surface de leucocytes seuls ou conjugués après activation d'échantillons de sang de patients ayant une agrégation positive ou négative au TRAP par différents agonistes.

Des échantillons de sang provenant de patients stables ayant ou non une agrégation positive au TRAP après 1 mois de traitement ont été recueillis dans des tubes contenant du citrate à base et 30 jours après le début de la médication. Après marquage par un anticorps dirigé contre MAC-1, les échantillons ont été activés par divers agonistes (TBS, ADP 5 μ m, Collagène 2,5 μ g/ml, TRAP-6 5 μ m) en condition statique durant 30 minutes puis la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) du signal MAC-1 a été déterminée par cytométrie de flux. Les données du tableau sont des moyennes de MFI et les écart-types respectifs calculés pour chaque groupe de patients. * Résultat significatif entre base et 30 jours. $p < 0,05$

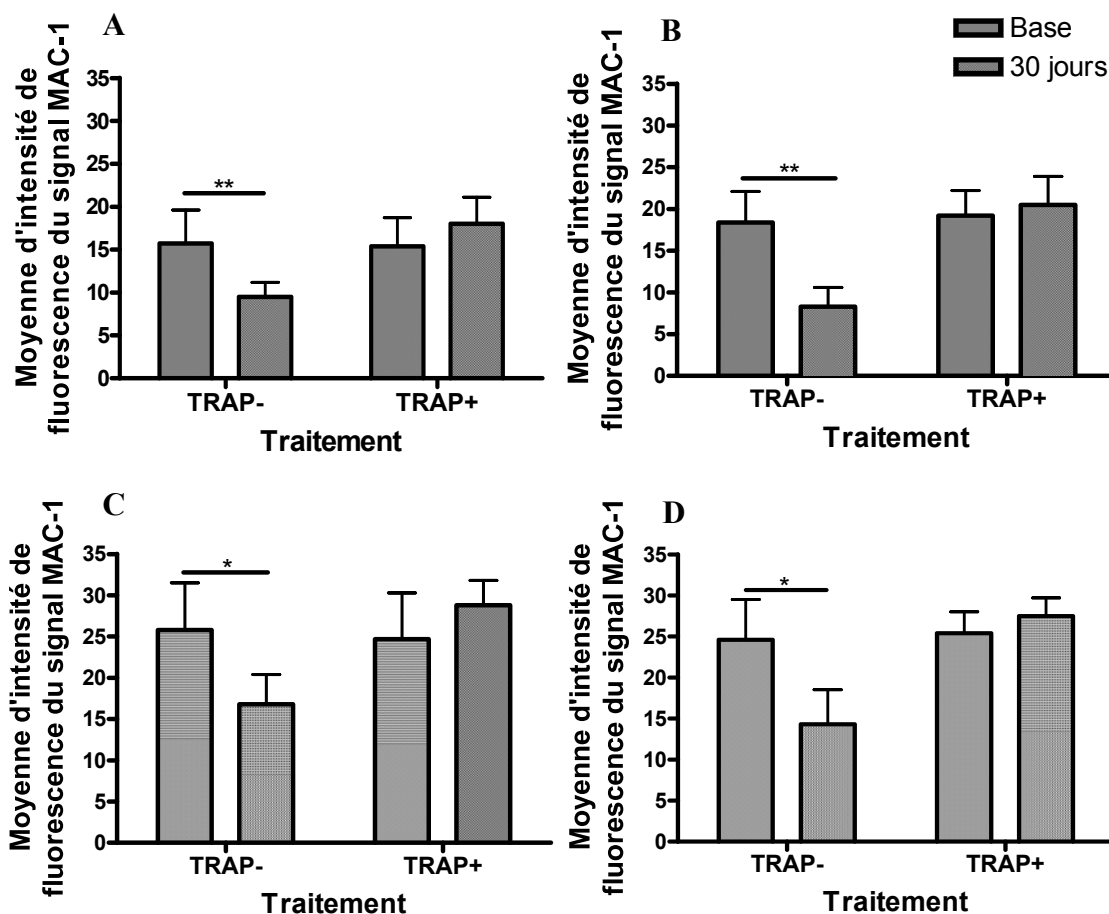


Figure 4 : Représentation graphique de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) du signal MAC-1 à la surface de leucocytes seuls ou conjugués suite à une activation par le TRAP-6 à base et à 30 jours pour chaque groupe de patients. A. MFI du signal MAC-1 sur les monocytes. B. MFI du signal MAC-1 sur les granulocytes. C. MFI du signal MAC-1 sur les monocytes conjugués. D. MFI du signal MAC-1 sur les granulocytes conjugués. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne et de leur écart-type correspondant. * Résultat significatif entre base et 30 jours. $p < 0,05$. **Résultat significatif entre base et 30 jours. $p < 0,01$.

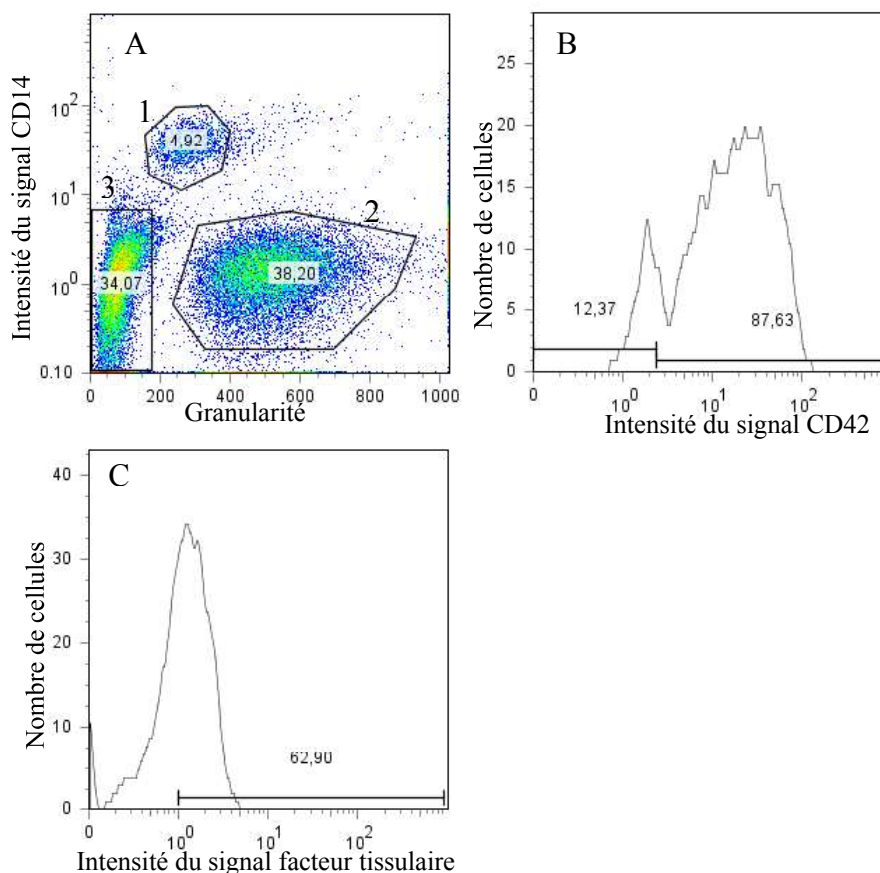


Figure 5 : Analyse en cytométrie de flux pour la détermination du pourcentage de cellules exprimant le facteur tissulaire à leur surface. Exemple des conjugués monocytes-plaquettes à base suite à une activation par l'ADP. A. Des lectures de cytométrie de flux sont effectuées sur des échantillons de sang total. Les cellules sont différenciées selon leur niveau de signal CD14 ainsi que leur granularité. (1. Monocytes 2. Granulocytes 3. Lymphocytes). Une fois la population de monocytes sélectionnée, le signal CD42 nous permet d'identifier les monocytes seuls des monocytes conjugués avec des plaquettes (B). Une fois la population de conjugués monocyte-plaquette sélectionnée, le pourcentage de cellules exprimant le facteur tissulaire à leur surface est déterminé (C). Dans la présente étude, le pourcentage de monocytes, de conjugués monocyte-plaquette, de granulocyte et de conjugués granulocyte-plaquette exprimant le facteur tissulaire a été déterminé suite à l'activation des échantillons par le TBS, l'ADP, le collagène ainsi que le TRAP-6. Toutes les lectures sont effectuées en duplicata.

	Agoniste	Agrégation négative au TRAP		Agrégation positive au TRAP	
		Base (%)	30 jours (%)	Base (%)	30 jours (%)
Monocytes	TBS	9,8 ± 2,0	12,0 ± 4,4	8,7 ± 1,1	11,8 ± 7,6
	ADP	15,4 ± 5,4	23,8 ± 17,8	13,7 ± 2,6	18,5 ± 9,0
	Collagène	11,5 ± 1,9	13,6 ± 7,6	9,9 ± 1,4	12,2 ± 8,5
	TRAP	23,3 ± 11,3	14,0 ± 6,9	19,7 ± 7,3	28,1 ± 11,9
Monocytes conjugués	TBS	20,5 ± 6,6	28,6 ± 11,4	19,2 ± 5,4	25,9 ± 11,9
	ADP	48,8 ± 18,3	58,4 ± 24,9	55,8 ± 10,6	62,3 ± 16,9
	Collagène	29,1 ± 10,8	40,0 ± 14,8	28,9 ± 9,3	34,1 ± 12,4
	TRAP	68,4 ± 16,3	30,1 ± 16,2*	74,7 ± 3,5	77,7 ± 12,7
PMNs	TBS	5,4 ± 2,3	6,9 ± 2,5	5,0 ± 1,7	7,7 ± 5,2
	ADP	7,7 ± 4,9	10,5 ± 7,4	7,2 ± 3,8	11,3 ± 8,1
	Collagène	5,9 ± 2,9	7,8 ± 4,7	5,2 ± 1,9	7,8 ± 5,5
	TRAP	11,3 ± 7,1	8,0 ± 4,3	11,0 ± 4,3	15,4 ± 9,3
PMNs conjugués	TBS	11,8 ± 4,5	15,6 ± 7,1	9,9 ± 3,5	14,5 ± 8,4
	ADP	23,3 ± 15,4	32,4 ± 21,8	25,5 ± 12,1	34,3 ± 21,2
	Collagène	14,2 ± 4,7	17,2 ± 9,9	12,0 ± 3,3	16,1 ± 10,0
	TRAP	44,2 ± 21,8	16,4 ± 9,3*	52,1 ± 5,0	59,0 ± 16,6

Tableau V. Effet du traitement sur le pourcentage de leucocytes et de conjugués leucocyte-plaquettes exprimant le facteur tissulaire à leur surface suite à une activation du sang de patients ayant une agrégation négative ou positive au TRAP par différents agonistes. Divers agonistes (TBS, ADP 5 μ m, Collagène 2,5 μ g/ml, TRAP-6 5 μ m) ont été incubés en condition statique pour une période de 30 minutes à 37°C avec du sang prélevé sur citrate provenant de 12 patients stables ayant reçu soit le SCH 530348 ou le placebo après leur premier rendez-vous (base). Le pourcentage de leucocytes et de conjugués leucocytes-plaquettes ayant un signal positif en facteur tissulaire a été déterminé par cytométrie de flux à base et 30 jours après le début du traitement. Les patients ont été divisés préalablement selon qu'ils répondaient ou non à une activation par le TRAP. La moyenne des pourcentages de cellules exprimant un signal positif en TF ainsi leur écart-type respectif ont été calculés pour chaque groupe de patients (Répondeurs ou non répondeurs au TRAP).

*Résultat significatif entre base et 30 jours. $p < 0,05$

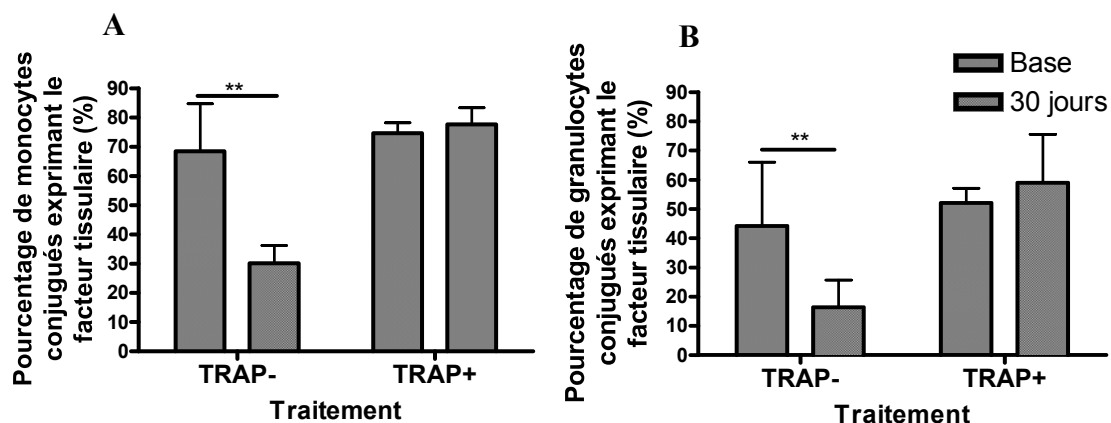


Figure 6 : Représentation graphique du pourcentage de leucocytes conjugués exprimant le facteur tissulaire à leur surface membranaire suite à une activation par le TRAP-6 à base et à 30 jours pour chaque groupe de patients.

A. Pourcentage de monocytes conjugués exprimant le facteur tissulaire à leur surface membranaire. B. Pourcentage de granulocytes exprimant le facteur tissulaire à leur membrane. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne et de leur écart-type correspondant. **Résultat significatif entre base et 30 jours. $p < 0,01$.

2.2.4 Résultats

Population de l'étude

Les résultats préliminaires de l'étude TRA 2°P-TIMI 50 ont été obtenus à partir d'échantillons de sang provenant de douze patients (12 hommes, 0 femme) dont la moyenne d'âge est $62,1 \pm 14,7$ ans (Table 1). Tous étaient sous traitement quotidien à l'aspirin au moment de l'étude et la majorité recevaient également un traitement aidant à diminuer le cholestérol. Étant donné la nature ainsi que le temps écoulé depuis l'événement thrombotique de chaque patient, 5 d'entre eux recevaient également un traitement au clopidogrel. Dix des patients souffraient d'obésité et huit souffraient de diabète de type II. La majorité des patients souffraient d'HTA et avaient un taux de cholestérol plus élevé que la normale. La moitié du groupe de patients a été recrutée après historique médical de claudication et les 6 autres patients après infarctus du myocarde. Ces derniers ont été recrutés de 3 semaines à 9 mois après l'événement.

Agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire maximale induite par l'ADP (10 μ M) ou le TRAP-6 (10 μ M) a été mesurée dans les échantillons de sang de patients avant et 30 jours après le début du traitement (Table 2). Puisque la médication à l'essai consiste en un inhibiteur du récepteur PAR-1, le pourcentage d'agrégation suite à une activation par le TRAP-6 (agoniste de PAR-1) est utilisé à titre indicatif pour identifier les patients ayant potentiellement reçu un traitement au SCH530348. Cette mesure n'est toutefois pas un critère absolu et n'indique pas avec certitude le traitement reçu par chaque patient. On considère un patient comme non répondant au TRAP-6 (TRAP⁻) lorsque

l'agrégation est négative, c'est-à-dire que son profil d'agrégation plaquettaire suite à l'activation de l'échantillon par le TRAP-6 produit une droite plutôt qu'une courbe après 30 jours de traitement et que le pourcentage d'agrégation ne dépasse pas 25%, tel que montré à la figure 1. L'agrégation à l'ADP n'a été significativement changée dans aucun cas si l'on compare avant et 1 mois après le début du traitement.

Formation de conjugués

Le pourcentage de conjugués monocyte-plaquettes et PMN-plaquettes formés a été déterminé suite à l'activation d'échantillons de sang par le TBS, l'ADP 5 μ M, le collagène 2,5 μ g/ml et le TRAP 5 μ M (Table 3). La formation de conjugués monocyte-plaquettes et PMN-plaquettes suite à une activation par le TRAP est diminuée de plus de la moitié chez les patients TRAP⁻ à 30 jours comparativement à base : 88,5 \pm 10,3% à base contre 33,7 \pm 17,7% à 30 jours pour les monocytes (p=0,0004) et 70,5 \pm 21,3% à base contre 16,5 \pm 9,8% 1 mois après le début du traitement pour les PMN (p=0,0008). Chez les patients TRAP⁺, le pourcentage de conjugués leucocyte-plaquettes formés reste inchangé suite à une activation par le TRAP à 30 jours par rapport à base. Dans tous les cas, aucune différence significative n'est présente entre les résultats à base et à 30 jours suite à une activation par un autre agoniste.

Expression de MAC-1

La MFI du signal MAC-1 à la surface des monocytes et PMNs seuls ou conjugués a été mesurée suite à des activations d'échantillons de sang par le TBS, l'ADP 5 μ M, le collagène 2,5 μ g/ml et le TRAP 5 μ M (Table 4). Chez les patients TRAP⁻, la MFI du signal MAC-1 sur les monocytes seuls suite à une activation par le TRAP est

diminuée de 40% ($15,7 \pm 3,9$ vs $9,5 \pm 1,7$) ($p=0,0095$) à 30 jours par rapport à base alors que pour les monocytes conjugués, la diminution est de 35% ($25,8 \pm 5,7$ vs $16,8 \pm 3,6$) ($p=0,0104$). Pour les PMNs, la MFI chute de 55% à 30 jours comparativement à base ($18,4 \pm 3,7$ vs $8,3 \pm 2,3$) ($p=0,0035$) tandis que pour les PMNs conjugués, les valeurs de MFI déclinent de 42% ($24,6 \pm 4,9$ vs $14,3 \pm 4,2$) ($p=0,0174$). Les 2 groupes de patients ne montrent aucune différence significative entre le niveau d'expression de MAC-1 à base et à 30 jours suite à des activations par les autres agonistes. À 30 jours, les leucocytes seuls ou conjugués des patients TRAP⁺ ne montrent aucune variation significative de l'expression de MAC-1 comparativement aux données obtenues à base suite à une activation au TRAP.

Expression du facteur tissulaire

Le pourcentage de monocytes seuls, de PMN seuls, de conjugués monocytes-plaquettes et de PMN-plaquettes ayant un signal positif en TF a été déterminé après activation d'échantillons de sang par du TBS, de l'ADP 5 μ M, du collagène 2,5 μ g/ml et du TRAP 5 μ M (Table 5). Trente jours après le début du traitement, c'est seulement chez les patients TRAP⁻ que les pourcentages de conjugués monocyte-plaquettes et PMN-plaquettes ayant un signal positif en TF sont diminués, soit de 56% ($68,4 \pm 16,3\%$ vs $30,1 \pm 16,2\%$) ($p=0,0015$) et 63% ($44,2 \pm 21,8\%$ vs $16,4 \pm 9,3\%$) ($p=0,0071$) respectivement comparativement aux valeurs à base suite à une activation par le TRAP. Chez les patients TRAP⁺, bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre base et 30 jours quant au pourcentage de monocytes ayant un signal positif en TF suite à une activation au TRAP, on peut toutefois y déceler une tendance à la baisse à 30 jours comparativement à base ($23,3 \pm 11,3$ à base vs $14,0 \pm$

6,9 à 30 jours pour les monocytes). Dans les deux groupes de patients, aucune différence dans le pourcentage de leucocytes ou de conjugués leucocytes-plaquettes ayant un signal positif en TF n'est notable entre base et 30 jours après des activations autres que le TRAP.

2.2.5 Discussion

La présente étude a pour but de mesurer les effets de l'antagoniste du récepteur PAR-1, le SCH 530348 sur des marqueurs d'activation de l'inflammation. Elle se base sur l'analyse d'échantillons de sang de patients ayant été traités soit par un placebo soit par le SCH 530348 dans le cadre de l'étude. Le traitement ayant été donné en double aveugle et le code de l'étude n'ayant pas été révélé au moment de la rédaction de ce document, nous avons choisi de comparer les marqueurs d'inflammations chez les patients ayant une bonne (TRAP⁺) versus mauvaise (TRAP⁻) réponse à l'agrégation plaquettaire au TRAP-6 qui est un agoniste spécifique de PAR-1. Une mauvaise réponse au TRAP-6 ne constitue pas une preuve de l'administration du SCH 530348. L'ensemble des données sera ré-analysé une fois le code dévoilé.

Expression du récepteur PAR-1 sur les leucocytes

La présente étude vise à étudier l'effet de l'inhibition du récepteur PAR-1 sur l'activité leucocytaire. L'expression de ce récepteur sur les monocytes a rigoureusement été démontrée [18] mais les données sont néanmoins très peu nombreuses ou incertaines quant aux granulocytes (PMNs). Bien que deux équipes ont montré l'absence de PAR-1 sur des neutrophiles de volontaires sains [19, 20], Wang *et al.*[21] ont montré la présence d'ARNm de PAR-1 chez les neutrophiles de

femmes enceintes. Ainsi, il semblerait que ce récepteur puisse être induit chez les neutrophiles dans certaines conditions. Aucune donnée n'a présentement été publiée quant à leur présence sur les granulocytes de patients atteints de maladies cardiovasculaires. Or, nous avons récemment démontré que les neutrophiles posséderaient bel et bien ce récepteur dans la cohorte de patients de l'étude TRA 2°P-TIMI 50. Quant à eux, les basophiles n'exprimeraient pas PAR-1. Tandis qu'une équipe n'a pas pu montrer la présence d'ARNm chez les éosinophiles [19], les données les plus récentes suggèrent par contre que les éosinophiles possèdent ce récepteur à leur surface membranaire [20].

Conjugués leucocytes-plaquettes

Les conjugués leucocytes-plaquettes sont un marqueur de l'activation plaquettaire [24], de l'instabilité de la plaque et de l'inflammation [25]. Leur quantité en circulation serait grandement augmentée dans certaines pathologies : Il est entre autre connu que les patients souffrant d'angine instable en ont en quantité plus élevée que ceux souffrant d'angine stable [26, 27]. Dans nos expériences, la formation des conjugués leucocytes-plaquettes suite à une activation par le TRAP-6 est grandement diminuée chez les patients TRAP- après 30 jours de traitement. Il a déjà été montré que différents antiplaquettaires tels que le clopidogrel ou une combinaison clopidogrel/aspirin, en inhibant l'activité plaquettaire, avaient la possibilité de diminuer la formation d'agrégats leucocytes-plaquettes [28]. Ainsi, puisqu'il a déjà été démontré que le SCH 530348 avait un impact sur l'activation plaquettaire [14], la diminution marquée de formation de conjugués leucocytes-plaquettes remarquée dans

la présente étude pourrait en partie être attribuable à l'inhibition de l'activation plaquettaire par le SCH 530348.

MAC-1

MAC-1 est une intégrine présente dans les granules intracellulaires des neutrophiles et des monocytes [29, 30]. Une fois ces cellules activées, le contenu des granules, dont MAC-1, est transposé à la membrane. Dans une précédente étude, il a été montré que l'expression de MAC-1 chez les monocytes et les granulocytes pouvait être induite suite à une activation par la thrombine dans des échantillons de sang total [31]. Nos résultats suggèrent qu'une inhibition de la voie de la thrombine par le SCH 530348 amène une diminution de cet effet sur l'expression de MAC-1. En effet, la diminution de l'expression de MAC-1 est notée chez tous les types de cellules des patients TRAP- après 30 jours de traitement.

MAC-1 a la capacité d'interagir entre autre avec une panoplie de molécules plaquettaires soit le récepteur glycoprotéine Iba (GP Iba) [32], le CD40 Ligand (CD40L) [33], ICAM-2 (intercellular adhesion molecule 2) [34], le JAM-3 (junctional adhesion molecule-C) [35] et le fibrinogène qui est lié au récepteur GPIIbIIIa [36]. Après l'adhésion primaire du leucocyte à la plaquette via PSGL-1 (P-selectin glycoprotein-1) et la P-sélectine respectivement, MAC-1 se lie et permet une adhésion plus ferme [37]. Nos résultats montrent une diminution de MAC-1 sur les leucocytes seuls ou conjugués chez les patients TRAP- après 30 jours de traitement. Ainsi, vu le rôle de MAC-1 dans l'adhésion du leucocyte à la plaquette, sa diminution d'expression à la membrane pourrait possiblement être une deuxième explication à la diminution de la formation de conjugués observée plus tôt.

Il est à noter que l'activation des leucocytes peut également être induite par certaines molécules découlant de l'activation plaquettaire tel que le CD40L [38], le thromboxane A2 [39] et le PAF [36] (platelet activating factor). Ainsi, la diminution de MAC-1 présentement observée pourrait également être la conséquence d'une activité indirecte du SCH 530348 sur le leucocyte, soit en inhibant l'activité plaquettaire.

Facteur tissulaire

Afin d'évaluer le lien entre l'inflammation et la coagulation, l'expression de TF a été observée suite à une activation au TRAP. Il est connu que les cellules sous endothéliales expriment de façon constitutive le TF et qu'en condition pathologique, certaines cellules de la circulation peuvent également exprimer le TF sous l'effet de diverses substances [40]. Suite à nos expériences, la diminution de la proportion de cellules exprimant le TF suite à une activation par le TRAP à 30 jours chez les patients TRAP- comparé à base sur les conjugués leucocytes-plaquettes n'est cependant pas observée sur les leucocytes seuls. À présent, l'existence de TF chez les monocytes est généralement acceptée [41] mais sa présence chez les granulocytes et les plaquettes est beaucoup plus controversée [42-45]. Pour les monocytes, bien que nos résultats ne montrent aucune significativité, possiblement dû à une taille d'échantillonnage très restreinte, on note toutefois une tendance à la baisse de l'expression de TF chez les patients TRAP- suite à une activation au TRAP à 30 jours. Quant aux neutrophiles et aux plaquettes, certains rapports soutiennent qu'ils ont la capacité d'exprimer et/ou de synthétiser le TF alors que d'autres affirment le contraire [42-45]. Certains de ceux qui prétendent que les neutrophiles peuvent

exprimer le TF se ravisent toutefois en indiquant que seulement une proportion d'environ 40% des neutrophiles possède du TF intracellulaire [46]. Les valeurs très faibles de TF que nous avons mesurées suite à une activation par le TRAP chez les patients TRAP- sur les neutrophiles pourrait ainsi s'expliquer. Vu de très faibles valeurs et un nombre faible de patients dans l'étude, il est donc difficile de prédire une tendance à la baisse chez les patients TRAP- à 30 jours si jamais il devait y en avoir une.

Pour ce qui est des plaquettes, certains affirment que du TF pourrait se trouver à la surface mais qu'il proviendrait de microparticules dérivées de cellules ayant la capacité d'exprimer le TF [47]. Par contre, une équipe a montré que dans des échantillons de plaquettes lavées, l'activation par le TRAP ou l'ADP amenait une grande augmentation de l'expression de TF [48], suggérant qu'il provient de la plaquette elle-même. Ainsi, une inhibition de la voie du TRAP pourrait donc en effet inhiber l'expression de TF sur les plaquettes. On constate que chez les patients TRAP-, suite à une activation par le TRAP, les valeurs d'expression de TF sont largement diminuées chez les conjugués à 30 jours, ainsi, il n'est pas impossible que cette observation soit en partie l'effet que le SCH 530348 procure sur la plaquette. De plus, nous avons montré que l'expression de TF diminue bel et bien chez les plaquettes non conjuguées après 30 jours de traitement chez les patients TRAP- (Résultats non montrés).

Puisque nos expériences sont faites en condition de sang total, on ne peut toutefois pas éliminer la possibilité que le TF situé à la surface des différents types cellulaires ne soit pas le produit de l'adhésion de microparticules provenant d'autres cellules sanguines exprimant le TF. En étant plus activées, ces cellules auraient davantage la

possibilité de produire des microparticules qu'en état moins activé et pourrait donc expliquer la diminution de TF sur la plaquette après 30 jours de traitement chez les patients TRAP-.

Tout comme pour MAC-1, il semblerait que l'expression de TF soit également inductible par le CD40L [49] et certains affirment que la P-sélectine aurait également un rôle à jouer dans ce processus [50]. De cette façon, une inhibition du PAR-1 plaquettaire via le SCH 530348 serait une possible explication de la diminution d'expression de TF qui est observé dans la présente étude.

Il a également été montré que, chez les macrophages, en synergie avec un agoniste primaire, MAC-1 augmentait l'expression de TF [51]. Il reste à vérifier si ce mécanisme est valable pour les autres types de leucocytes, mais on pourrait poser comme hypothèse qu'en inhibant l'expression de MAC-1 chez les patients TRAP- à 30 jours, le SCH 530348 aurait la possibilité de diminuer par le fait même l'expression de TF.

Informations additionnelles

En complément à cette étude, on remarque que l'utilisation du nouvel inhibiteur de PAR-1 lors d'activations par d'autres agonistes que le TRAP nous informe sur la fonction du SCH 530348. En premier lieu, l'absence d'augmentation de tous les paramètres (MAC-1, TF et conjugués formés) sur les cellules seules ou conjuguées pour tous les patients à 30 jours suite à l'activation du PAR-1 leucocytaire par le tampon tyrode démontre que l'inhibiteur est bien un antagoniste pur et qu'il n'a aucune activité agoniste, ce qui correspond à ce qui a précédemment été observé chez la plaquette. En deuxième lieu, les données obtenues pour les 3 paramètres étudiés en

présence d'ADP ou de collagène étant identiques à 30 jours comparé à base sur tous types de cellules chez tous les patients, suggère que, en accord avec ce qui a été démontré chez la plaquette [14], l'antiplaquettaire est bien spécifique au récepteur PAR-1 et n'a aucun effet sur les signalisations de l'ADP et du collagène. Il est toutefois intéressant de constater une tendance à la hausse (non significative) des paramètres d'inflammation étudiés après 30 jours de traitement (placébo ou SCH530348) peu importe le type d'activation effectué (ADP, Collagène, TBS). Bien qu'il ne semble pas que cette tendance soit associée à l'avènement d'événement clinique chez le patient puisqu'aucun des patients de la présente étude n'a eu d'événement thrombotique durant les premiers mois de traitement, cela montre un profile d'inflammation augmenté au cours du mois suivant le début du traitement. Finalement, il est intéressant de noter qu'aucun effet n'est observé après 30 jours de traitement sur tous les marqueurs d'inflammation étudiés suite à une activation par le TBS chez les patients TRAP-. Puisque le niveau de marqueurs d'inflammation à l'état de base est faible, un effet du SCH530348 est ainsi plus difficilement perceptible, ce qui pourrait expliquer cette observation.

2.2.6 Limites de l'étude

Notre étude suggère que le SCH 530348 peut diminuer l'expression de marqueurs de surface cellulaire chez les cellules impliquées dans l'athéromatose. Une limite évidente de la présente étude consiste en la faible taille d'échantillonnage. En effet, les analyses préliminaires que de 12 patients ont pu être complétées au moment de la remise du présent mémoire. Les études impliquant des patients engendrent une quantité considérable de variables qui ne peuvent être contrôlées. Par conséquent, il

est nécessaire de disposer d'un grand nombre d'échantillons afin d'effectuer des conclusions justes. De plus, étant donné cette contrainte, il n'a pas été possible de tenir compte des paramètres cliniques de base des patients dans les analyses statistiques et ainsi d'introduire une correction statistique adéquate. Toutefois, tel qu'observé plus haut, les tendances présentées permettent souvent de bien distinguer les deux groupes de patients, nous laissant croire qu'une telle correction statistique n'aurait possiblement pas d'effet considérable sur ces tendances. Les présents résultats devront tout de même être confirmés suite à l'analyse des résultats sur l'ensemble des 60 patients inclus dans la présente sous-étude.

De surcroît, l'aveugle sur le projet TRA 2°P-TIMI 50 n'étant toujours pas levée, il est à présent impossible de déterminer avec justesse quels sont les patients auxquels on a administré le SCH 530348 ou le placebo. Une fois l'aveugle levée, nous pourrions évaluer de façon plus juste l'effet du SCH 530348 sur les marqueurs inflammatoires étudiés.

2.2.7 Perspectives

Le mécanisme anti-inflammatoire du SCH 530348 qui est décrit dans la présente étude sera davantage étudié par le biais d'observation de son effet sur d'autres marqueurs inflammatoires. Ainsi, les marqueurs HLA-DR et TLR qui ont un rôle important dans l'athérombose et qui ont été montrés comme étant plus élevés chez certaines populations de patients seront également étudiés.

Le SCH 530348 a couronné la phase II de son développement clinique avec succès. En effet, aucune différence n'a été relevée quant au taux de saignement dans les groupes de patients traités au SCH 530348 ou avec le placebo et il semble que

l'antiplaquettaire soit bien toléré. Il a également été montré que le SCH 530348 avait une activité clinique évidente : On note une diminution de l'avènement d'infarctus du myocarde avec le SCH 530348 par rapport au placebo chez des patients ayant subi une angioplastie coronarienne [13]. Compte tenu de la sécurité et de l'efficacité démontrée ainsi que des résultats obtenus dans la présente étude, le SCH530348 montre des résultats très encourageants. La phase III étant dans ces derniers développements, les résultats nous indiqueront davantage le potentiel clinique de la molécule.

Remerciements

Nous tenons à remercier Marta Ghitescu ainsi que Jacinthe Rivard pour leur support technique. Ce travail a en partie été financé par l'Agence Nationale pour la Recherche, financement ANR-05-PCOD-031-02.

Bibliographie

1. Barr, A.J., L.F. Brass, and D.R. Manning, *Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor.G protein coupling.* J Biol Chem, 1997. **272**(4): p. 2223-9.
2. Hung, D.T., et al., *The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase.* J Biol Chem, 1992. **267**(29): p. 20831-4.
3. Offermanns, S., et al., *G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(2): p. 504-8.
4. Shpacovitch, V., et al., *Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity.* J Leukoc Biol, 2008. **83**(6): p. 1309-22.
5. Jennings, L.K., *Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis.* Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 248-57.
6. Coughlin, S.R., *Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology.* J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1800-14.
7. Vu, T.K., et al., *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation.* Cell, 1991. **64**(6): p. 1057-68.
8. Moers, A., et al., *G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis.* Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1418-22.
9. Klages, B., et al., *Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets.* J Cell Biol, 1999. **144**(4): p. 745-54.
10. Offermanns, S., et al., *Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice.* Nature, 1997. **389**(6647): p. 183-6.
11. Rivera, J., et al., *Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation.* Haematologica, 2009. **94**(5): p. 700-11.
12. Oestreich, J., *SCH-530348, a thrombin receptor (PAR-1) antagonist for the prevention and treatment of atherothrombosis.* Curr Opin Investig Drugs, 2009. **10**(9): p. 988-96.
13. Becker, R.C., 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. **373**(9667): p. 919-28.
14. Chackalamannil, S., et al., *Discovery of a novel, orally active himbacine-based thrombin receptor antagonist (SCH 530348) with potent antiplatelet activity.* J Med Chem, 2008. **51**(11): p. 3061-4.
15. Derian, C.K., 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. **304**(2): p. 855-61.

16. The TRA•CER Executive and Steering Committees, *The Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction in Acute Coronary Syndrome (TRA•CER) trial: study design and rationale*. Am Heart J, 2009. **158**(3): p.327-334.
17. *Trial to assess the effects of SCH 530348 in preventing heart attack and stroke in patients with atherosclerosis (TRA 2°P – TIMI 50; study P04737, NCT00526474)* Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00526474?term=SCH+530348&rank=4&flds=Xabef>
18. Naldini, A., et al., *Thrombin-mediated IL-10 up-regulation involves protease-activated receptor (PAR)-1 expression in human mononuclear leukocytes*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(3): p. 736-44.
19. Miike, S., A.S. McWilliam, and H. Kita, *Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2*. J Immunol, 2001. **167**(11): p. 6615-22.
20. Bolton, S.J., et al., *Expression of and functional responses to protease-activated receptors on human eosinophils*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(1): p. 60-8.
21. Wang, Y., Y. Gu, and M.J. Lucas, *Expression of thrombin receptors in endothelial cells and neutrophils from normal and preeclamptic pregnancies*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(8): p. 3728-34.
22. Eriksson, E.E., *Mechanisms of leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions: future prospects*. Curr Opin Lipidol, 2004. **15**(5): p. 553-8.
23. Labarthe, B., et al., *Matching the evaluation of the clinical efficacy of clopidogrel to platelet function tests relevant to the biological properties of the drug*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(4): p. 638-45.
24. Michelson, A.D., et al., *Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction*. Circulation, 2001. **104**(13): p. 1533-7.
25. Freedman, J.E. and J. Loscalzo, *Platelet-monocyte aggregates: bridging thrombosis and inflammation*. Circulation, 2002. **105**(18): p. 2130-2.
26. Ott, I., et al., *Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina*. Circulation, 1996. **94**(6): p. 1239-46.
27. Furman, M.I., et al., *Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(2): p. 352-8.
28. Klinkhardt, U., et al., *Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression and formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease*. Clin Pharmacol Ther, 2003. **73**(3): p. 232-41.
29. Borregaard, N., et al., *Granules and secretory vesicles of the human neutrophil*. Clin Exp Immunol, 1995. **101 Suppl 1**: p. 6-9.
30. Miller, L.J., et al., *Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface*. J Clin Invest, 1987. **80**(2): p. 535-44.

31. Li, N., G. Hallden, and P. Hjendahl, *A whole-blood flow cytometric assay for leukocyte CD11b expression using fluorescence signal triggering*. Eur J Haematol, 2000. **65**(1): p. 57-65.
32. Simon, D.I., et al., *Platelet glycoprotein Ibalpha is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 193-204.
33. Zirlik, A., et al., *CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1*. Circulation, 2007. **115**(12): p. 1571-80.
34. Diacovo, T.G., et al., *A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 1243-51.
35. Santoso, S., et al., *The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1*. J Exp Med, 2002. **196**(5): p. 679-91.
36. Weber, C. and T.A. Springer, *Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alphaIIbbeta3 and stimulated by platelet-activating factor*. J Clin Invest, 1997. **100**(8): p. 2085-93.
37. Seizer, P., M. Gawaz, and A.E. May, *Platelet-monocyte interactions--a dangerous liaison linking thrombosis, inflammation and atherosclerosis*. Curr Med Chem, 2008. **15**(20): p. 1976-80.
38. Rahman, M., et al., *Platelet-derived CD40L (CD154) Mediates Neutrophil Upregulation of Mac-1 and recruitment in septic lung injury*. Ann Surg, 2009. **250**(5): p. 783-90.
39. Wiles, M.E., et al., *Thromboxane-induced neutrophil adhesion to pulmonary microvascular and aortic endothelium is regulated by CD18*. Inflammation, 1991. **15**(3): p. 181-99.
40. Drake, T.A., J.H. Morrissey, and T.S. Edgington, *Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis*. Am J Pathol, 1989. **134**(5): p. 1087-97.
41. Herbert, J.M., et al., *IL-4 inhibits LPS-, IL-1 beta- and TNF alpha-induced expression of tissue factor in endothelial cells and monocytes*. FEBS Lett, 1992. **310**(1): p. 31-3.
42. Brambilla, M., et al., *Tissue factor in patients with acute coronary syndromes: expression in platelets, leukocytes, and platelet-leukocyte aggregates*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(5): p. 947-53.
43. Butenas, S., et al., *Tissue factor activity in whole blood*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2764-70.
44. Ritis, K., et al., *A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4794-802.
45. Osterud, B., L.V. Rao, and J.O. Olsen, *Induction of tissue factor expression in whole blood: lack of evidence for the presence of tissue factor expression in granulocytes*. Thromb Haemost, 2000. **83**(6): p. 861-7.
46. Maugeri, N., et al., *Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(6): p. 1323-30.

47. Lopez-Vilchez, I., et al., *Tissue factor-enriched vesicles are taken up by platelets and induce platelet aggregation in the presence of factor VIIa*. Thromb Haemost, 2007. **97**(2): p. 202-11.
48. Camera, M., et al., *Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(9): p. 1690-6.
49. Sanguigni, V., et al., *CD40 ligand enhances monocyte tissue factor expression and thrombin generation via oxidative stress in patients with hypercholesterolemia*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(1): p. 35-42.
50. Celi, A., et al., *P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 8767-71.
51. Fan, S.T. and T.S. Edgington, *Coupling of the adhesive receptor CD11b/CD18 to functional enhancement of effector macrophage tissue factor response*. J Clin Invest, 1991. **87**(1): p. 50-7.

3. Discussion

Résumé des principaux résultats

Article 1

La famille des RCPG, dont font partie les récepteurs à l'ADP ainsi que les récepteurs à la thrombine, jouent un rôle essentiel dans la fonction plaquettaire. Ces récepteurs sont ainsi une cible de choix pour de nombreux antiplaquettaires utilisés en clinique ou en développement. Le récepteur P2Y₁ participe au changement de forme des plaquettes et à l'initiation de leur agrégation, tandis que P2Y₁₂ contribue davantage à la stabilisation de l'agrégation [143]. Les inhibiteurs du récepteur purinergique P2Y₁₂ sont nombreux alors qu'aucun antagoniste ne vise à présent le récepteur P2Y₁. Ce dernier procure pourtant une activité importante à la plaquette et son rôle dans la formation de la thrombose a été montré auparavant [144]. L'inhibition de P2Y₁ ou sa déficience chez la souris montre une diminution de la thrombose [141]. De plus, malgré l'efficacité prouvée des inhibiteurs du récepteur P2Y₁₂ utilisés chez l'humain, l'avènement d'événements clinique chez les patients traités reste toujours une grande préoccupation et une résistance au traitement serait chose possible. Les résultats de la première étude réalisée dans le cadre de ma maîtrise démontrent clairement que l'inhibition du récepteur P2Y₁ seul ou en combinaison avec l'inhibition du récepteur P2Y₁₂ a des effets plus marqués sur la diminution de la formation de la thrombose par rapport à l'utilisation d'un antagoniste du récepteur P2Y₁₂ seul. En effet, il semble que l'inhibition concurrente de P2Y₁₂ (clopidogrel) et de P2Y₁ (MRS2179) ait un effet synergique sur divers paramètres plaquettaires classiques d'agrégation et

d'activation suite à une activation par l'ADP ou le TRAP lors d'expériences réalisées en condition *in vitro* sur du sang de patients souffrant d'angine stable. L'observation du niveau d'agrégation nous indique que l'utilisation des deux inhibiteurs diminue ce paramètre suite à une activation par le TRAP ou par l'ADP comparativement à l'utilisation de l'anti-P2Y₁₂ seul. L'observation de marqueurs d'activation plaquettaire tels que la P-sélectine, le GPIIb/IIIa activé ainsi que la formation de conjugués leucocytes-plaquettes indique que la combinaison des deux inhibiteurs diminue davantage l'activité plaquettaire que le clopidogrel seul suite à une activation par l'ADP.

Nous avons également réalisé des observations en conditions de cisaillement élevé recréées dans un modèle de chambre de perfusion où l'adhésion plaquettaire ainsi que la formation de thrombi est observée en temps réel sur une période de 9 minutes. Le MRS2179 utilisé seul ne procure pas d'inhibition de l'adhésion plaquettaire à la matrice de collagène mais diminue significativement le recrutement plaquettaire, défavorisant ainsi la croissance du thrombus. Quant à l'inhibition du récepteur P2Y₁₂ par le clopidogrel, son effet sur l'adhésion plaquettaire est similaire au MRS2179 et il procure une diminution significative de la formation de thrombus bien que moins prononcée que celle engendrée par le MRS2179. Une faible inhibition de l'adhésion plaquettaire en présence d'un inhibiteur de P2Y₁₂ ou chez un patient déficient en P2Y₁₂ a déjà préalablement été décrit dans une étude menée par Remjin *et coll.* [145]. Dans nos expériences, nous démontrons que l'inhibition concomitante des deux récepteurs purinergiques prévient largement la formation de thrombi ainsi que l'adhésion plaquettaire.

Contrairement à ce qui a déjà été effectué par d'autres équipes [146, 147], notre modèle de perfusion est réalisé sur une plus longue période de temps. Ceci permet donc l'observation de phénomènes qui ne seraient pas visibles après une perfusion d'une durée d'une seule minute, comme habituellement fait, et permet de mettre en évidence l'effet tardif, peut-être plus important, des antiplaquettaires utilisés. Notre étude est la première à étudier sur des plaquettes de patients avec maladie coronarienne l'interaction entre le clopidogrel et un inhibiteur du récepteur P2Y₁, le MRS2179 sur des paramètres cliniques. Nous avons démontré que l'inhibition de P2Y₁ concomitante avec un antagoniste de P2Y₁₂ amène une diminution supplémentaire de l'activité plaquettaire comparativement à l'utilisation seule de l'anti-P2Y₁₂. Ces résultats sont dans la même lignée que certaines études réalisées chez la souris. En effet, il a été montré que l'inhibition simultanée des récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ augmentait la résistance au thromboembolisme comparativement à l'utilisation de ces inhibiteurs seuls dans un modèle murin [144]. Il est à noter que l'inhibition de P2Y₁ n'amènerait qu'une prolongation modérée du temps de saignement, suggérant une certaine sécurité à l'inhibition de ce récepteur [148]. Tous ces résultats suggèrent donc que le récepteur P2Y₁ soit une cible potentiellement intéressante pour le développement d'antiplaquettaires chez l'humain et que sa combinaison avec des thérapies couramment utilisées en clinique tels que le clopidogrel et l'aspirin pourrait s'avérer spécialement bénéfique chez les patients présentant une résistance au clopidogrel.

Article 2

La thrombine active la plaquette via les RCPG PAR-1 et PAR-4. Alors que PAR-1 est activé de façon rapide et transitoire, l'activation de PAR-4 est retardée mais persiste plus longtemps. Aucun antagoniste de ces récepteurs n'est présentement utilisé chez l'humain mais le développement clinique de deux inhibiteurs de PAR-1 s'avère encourageant. L'un d'eux, le SCH 530348 a été au cœur de la deuxième étude effectuée au cours de ma maîtrise. La phase I et II du développement clinique de cet antiplaquettaire a montré sa bonne tolérance et sa sécurité [149, 150]: L'administration du SCH 530348 en combinaison avec une thérapie standard n'augmenterait pas le risque de saignements. Les études pré-cliniques ont montré que le SCH 530348, inhibiteur compétitif et spécifique de PAR-1, avait un grand pouvoir sur la diminution de l'activité plaquettaire. En effet, il a été observé que l'administration de SCH 530348 chez les macaques amenait une inhibition de 100% de l'agrégation plaquettaire induite par le TRAP pour une période de 24h [138]. De plus, des études réalisées avec du plasma riche en plaquettes (PRP) d'humain a également montré une inhibition de l'agrégation induite par le TRAP et la thrombine [138]. Malgré un effet incontestable sur l'activité plaquettaire, on ignorait néanmoins jusqu'à présent ses effets "pléiotropiques" dont son rôle dans l'inflammation systémique. On sait toutefois qu'une majorité des leucocytes expriment le récepteur PAR-1 à leur surface membranaire et que le rôle de ces cellules a également été largement démontré dans la maladie de l'athérosclérose. L'étude que nous avons réalisée est donc la première à notre connaissance à avoir exploré l'effet de l'inhibiteur sur les paramètres de l'inflammation. Nous avons montré que

l'inhibition de PAR-1 par le SCH 530348 fait chuter l'expression de nombreux marqueurs membranaires de l'inflammation. L'observation de ces résultats a été rendue possible par des tests d'immunofluorescence où les niveaux d'expression de MAC-1 et du TF ont été détectés avant et 30 jours après le début de la médication (SCH 530348 ou placebo) sur des leucocytes ou sur des conjugués leucocytes-plaquettes provenant de patients souffrant de maladie coronarienne stable. Le niveau d'expression de MAC-1 à la surface des PMNs et des conjugués PMN-plaquettes est diminué de près de la moitié de sa valeur basale après 30 jours de traitement chez les patients TRAP- suite à une activation par le TRAP-6. Dans ces mêmes conditions, l'expression membranaire de MAC-1 est diminuée de plus du tiers chez les monocytes seuls ou conjugués. Chez ces mêmes patients, la proportion de conjugués monocyte-plaquette et PMN-plaquettes exprimant le facteur tissulaire suite à l'activation par le TRAP-6 est diminué de plus de la moitié après 30 jours de traitement comparativement à base. La formation de conjugués leucocytes-plaquettes a également été examinée et le traitement au SCH530348 semble diminuer de beaucoup leur formation. En effet, la quantité de conjugués plaquette-PMN et plaquette-monocyte est divisé par un facteur 2 suite à une activation par le TRAP-6 30 jours après le début du traitement comparativement à base dans la cohorte de patients TRAP-. Nous avons donc montré que non seulement le SCH 530348 a un effet sur l'activité plaquettaire mais qu'il diminue aussi les marqueurs d'inflammation, suggérant un deuxième mécanisme de protection de cet inhibiteur contre la maladie coronarienne.

4. Conclusion et perspectives

En conclusion, il est possible d'affirmer que nos résultats montrent collectivement plusieurs points en faveur du développement d'inhibiteurs des RCPG tels que les antagonistes de P2Y₁ et de PAR-1.

Les résultats obtenus concernant l'inhibition du récepteur plaquettaire P2Y₁ chez la souris ainsi que chez l'humain vont dans la même direction et montrent des effets favorables à l'inhibition de la thrombose. Cela suggère que le développement de cette famille d'antagonistes chez l'humain est prometteur et pourrait être bénéfique pour contrer l'avènement d'événements thrombotiques.

Il aurait toutefois été intéressant d'employer un inhibiteur de P2Y₁ administré directement au patient plutôt que d'avoir ajouté l'antagoniste au sang de façon *ex vivo* afin d'observer son effet en combinaison avec un anti-P2Y₁₂ dans nos expériences. Or, ceci est à présent impossible étant donné l'absence de cette première classe d'inhibiteurs en thérapeutique.

Le MRS2500, un nouvel antagoniste sélectif du récepteur P2Y₁ qui est de la même famille que le MRS2179, montre une affinité ainsi qu'une stabilité supérieure à ce dernier [148]. Son utilisation a été répertoriée dans des modèles de thrombose *in vivo* chez la souris ainsi que dans des tests d'agrégation *ex vivo* et semble montrer des effets bénéfiques. En effet, le phénomène de thromboembolisme ainsi que la thrombose artérielle localisée sont largement inhibés dans les modèles *in vivo* et l'agrégation plaquettaire varie également dans le même sens. La combinaison du MRS2500 avec le clopidogrel chez la souris montre une réduction marquée de la thrombose comparativement à l'utilisation seule du clopidogrel [148]. De plus,

l'inhibition de P2Y₁ par ce composé ne provoque qu'une augmentation modérée du temps de saignement. Ainsi, il serait intéressant d'observer si ces effets sont similaires avec l'utilisation de plaquettes d'humain grâce à un modèle de chambre de perfusion tel qu'utilisé dans nos expériences. Notre modèle permet non seulement la mesure du recrutement plaquettaire mais également de l'adhésion et permet également l'observation d'une cinétique contrairement à ce qui a été observé précédemment.

Quant à PAR-1, son inhibition par le SCH 530348 semble avoir un impact à la fois sur l'activité hémostatique des plaquettes et sur l'activité inflammatoire systémique, suggérant que la molécule peut inhiber l'athérombose par des mécanismes anti-plaquettaire et anti-inflammatoire complémentaires. Il reste néanmoins plusieurs paramètres inflammatoires qui seront observés sous peu sur une population de patients de taille plus importante afin de pouvoir confirmer nos résultats préliminaires. De plus, il est nécessaire d'attendre la levée de l'aveugle sur l'étude de phase III du SCH 530348 qui vient tout juste de terminer afin de s'assurer du traitement qu'à reçu chaque patient.

Si nos analyses s'avèrent justes une fois l'aveugle levée et que l'analyse des marqueurs inflammatoires qui seront étudiés sous peu varie de la même façon que les résultats actuels, l'effet protecteur de l'antiplaquettaire contre l'avènement de complications cardiovasculaires pourrait donc en partie être attribuable à un effet anti-inflammatoire. Nos recherches auront donc contribué à mieux identifier les mécanismes sous-tendant la protection cardiovasculaire procurée par le SCH 530348.

Il serait également intéressant de déterminer si l'inhibition de PAR-1 par le SCH 530348 inhibe la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, IL-6, l'oncostatin-M et MCP-1 ayant un rôle connu dans les pathologies cardiovasculaire [97].

Pour ce faire, des échantillons de sang de patients souffrant d'angine stable pourraient être recueillis avant et 30 jours après le début d'un traitement au SCH 530348 ou au placebo. Les granulocytes et les monocytes pourraient ensuite être isolés puis stimulés par la thrombine. Une lecture par la technique d'Elisa suite au marquage des cytokines inflammatoires par des anticorps nous informerait ainsi sur le niveau de cytokines sécrétées à base et 30 jours après le début du traitement. Cela nous indiquerait donc l'effet de l'antiplaquettaire sur la sécrétion de ces cytokines par les leucocytes. Un protocole concernant la détection de cytokine suite à l'activation de leucocytes est décrit plus en détails par Gordon J.R. et coll.[151].

Finalement, il est connu que les cellules endothéliales expriment elles aussi le récepteur PAR-1 à leur surface membranaire et que l'activation de ce dernier induit entre autre l'augmentation du niveau d'expression de l'ICAM-1 [152, 153]. ICAM-1 est une molécule d'adhésion qui lie MAC-1 sur le leucocyte permettant l'adhésion ferme de celui-ci à l'endothélium et facilitant la migration transcellulaire du leucocyte de façon à favoriser le développement de l'athérosclérose. ICAM-1 est constitutivement exprimée chez la cellule endothéliale mais l'activation de la cellule par des agonistes tel que la thrombine amène une augmentation de son expression. Ainsi, il serait intéressant de savoir si l'inhibition du récepteur PAR-1 par le SCH 530348 empêche l'augmentation de l'expression d'ICAM-1 suite à une activation par la thrombine. Brièvement, pour se faire, deux cultures de cellules endothéliales de

veine ombilicale humaine (HUVEC) pourraient être effectuées. Dans une des cultures, on ajouterait du SCH 530348 et on incuberait les deux cultures avec de la thrombine. Ensuite, un marquage de l'ICAM-1 par un anticorps couplé à un fluorochrome pourrait être effectué et le niveau d'expression d'ICAM-1 dans les deux échantillons mesuré par cytométrie de flux.

5. Bibliographie

1. Buckley, M.F., et al., *A novel approach to the assessment of variations in the human platelet count*. Thromb Haemost, 2000. **83**(3): p. 480-4.
2. Bautista, A.P., et al., *Measurement of platelet life-span in normal subjects and patients with myeloproliferative disease with indium oxine labelled platelets*. Br J Haematol, 1984. **58**(4): p. 679-87.
3. Patel, S.R., J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr., *The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3348-54.
4. Kaushansky, K. and J.G. Drachman, *The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production*. Oncogene, 2002. **21**(21): p. 3359-67.
5. Kaushansky, K., *The molecular mechanisms that control thrombopoiesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3339-47.
6. Battinelli, E.M., J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr., *Delivering new insight into the biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis*. Curr Opin Hematol, 2007. **14**(5): p. 419-26.
7. Long, M.W., *Megakaryocyte differentiation events*. Semin Hematol, 1998. **35**(3): p. 192-9.
8. Branchog, I., et al., *Megakaryocyte quantifications in relation to thrombokinetis in primary thrombocythaemia and allied diseases*. Scand J Haematol, 1975. **15**(5): p. 321-32.
9. White, J.G., *Electron microscopic studies of platelet secretion*. Prog Hemost Thromb, 1974. **2**(0): p. 49-98.
10. Kaser-Glanzmann, R., et al., *Further characterization of calcium-accumulating vesicles from human blood platelets*. Biochim Biophys Acta, 1978. **512**(1): p. 1-12.
11. Rivera, J., et al., *Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation*. Haematologica, 2009. **94**(5): p. 700-11.
12. Ni, H. and J. Freedman, *Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands*. Transfus Apher Sci, 2003. **28**(3): p. 257-64.
13. Cutler, L., G. Rodan, and M.B. Feinstein, *Cytochemical localization of adenylate cyclase and of calcium ion, magnesium ion-activated ATPases in the dense tubular system of human blood platelets*. Biochim Biophys Acta, 1978. **542**(3): p. 357-71.
14. George, J.N., *Platelets*. Lancet, 2000. **355**(9214): p. 1531-9.
15. Weyrich, A.S., et al., *Change in protein phenotype without a nucleus: translational control in platelets*. Semin Thromb Hemost, 2004. **30**(4): p. 491-8.
16. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
17. Savage, B., F. Almus-Jacobs, and Z.M. Ruggeri, *Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow*. Cell, 1998. **94**(5): p. 657-66.

18. Jackson SP, N.W., Kulkarni S, *Signaling event underlying thrombus formation*. Journal of Thrombosis and haemostasis, 2003. **1**: p. 1602-1612.
19. Ruggeri, Z.M., *Structure and function of von Willebrand factor*. Thromb Haemost, 1999. **82**(2): p. 576-84.
20. Ruggeri, Z.M., *The role of von Willebrand factor in thrombus formation*. Thromb Res, 2007. **120 Suppl 1**: p. S5-9.
21. Ruggeri, Z.M., *Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(7): p. 1335-42.
22. Ruggeri, Z.M., *Platelet and von Willebrand factor interactions at the vessel wall*. Hamostaseologie, 2004. **24**(1): p. 1-11.
23. Nieswandt, B. and S.P. Watson, *Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?* Blood, 2003. **102**(2): p. 449-61.
24. Kasirer-Friede, A., et al., *Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors*. Blood, 2004. **103**(9): p. 3403-11.
25. Reed, G.L., *Platelet secretory mechanisms*. Semin Thromb Hemost, 2004. **30**(4): p. 441-50.
26. Gachet, C., *P2 receptors, platelet function and pharmacological implications*. Thromb Haemost, 2008. **99**(3): p. 466-72.
27. Mann, K.G., et al., *Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes*. Blood, 1990. **76**(1): p. 1-16.
28. Jennings, L.K., *Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis*. Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 248-57.
29. Riddel, J.P., Jr., et al., *Theories of blood coagulation*. J Pediatr Oncol Nurs, 2007. **24**(3): p. 123-31.
30. Esmon, C.T., *Inflammation and thrombosis*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(7): p. 1343-8.
31. Butenas, S., T. Orfeo, and K.G. Mann, *Tissue factor in coagulation: Which? Where? When?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(12): p. 1989-96.
32. Lopez-Vilchez, I., et al., *Tissue factor-enriched vesicles are taken up by platelets and induce platelet aggregation in the presence of factor VIIa*. Thromb Haemost, 2007. **97**(2): p. 202-11.
33. Camera, M., et al., *Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(9): p. 1690-6.
34. Breitenstein, A., G.G. Camici, and F.C. Tanner, *Tissue factor: beyond coagulation in the cardiovascular system*. Clin Sci (Lond). **118**(3): p. 159-72.
35. Walport, M.J., *Complement. First of two parts*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1058-66.
36. Huber-Lang, M., et al., *Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway*. Nat Med, 2006. **12**(6): p. 682-7.
37. Lefkovits, J., E.F. Plow, and E.J. Topol, *Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine*. N Engl J Med, 1995. **332**(23): p. 1553-9.
38. Association, A.H., *Know the Facts, Get the Stats 2007*. 2002.
39. Québec, F.d.m.d.c.d. *Statistiques*. 2010.
40. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.

41. Assmann, G., et al., *Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(8): p. 1819-24.
42. Goldbourt, U. and H.N. Neufeld, *Genetic aspects of arteriosclerosis. Arteriosclerosis*, 1986. **6**(4): p. 357-77.
43. Gimbrone, M.A., Jr., *Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. Am J Pathol*, 1999. **155**(1): p. 1-5.
44. Woollard, K.J. and F. Geissmann, *Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. Nat Rev Cardiol*. **7**(2): p. 77-86.
45. Falk, E., *Coronary thrombosis: pathogenesis and clinical manifestations. Am J Cardiol*, 1991. **68**(7): p. 28B-35B.
46. Corti, R., et al., *Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. J Thromb Thrombolysis*, 2004. **17**(1): p. 35-44.
47. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. J Clin Invest*, 1994. **94**(6): p. 2493-503.
48. Libby, P. and P. Theroux, *Pathophysiology of coronary artery disease. Circulation*, 2005. **111**(25): p. 3481-8.
49. Jawad, E. and R. Arora, *Chronic stable angina pectoris. Dis Mon*, 2008. **54**(9): p. 671-89.
50. Davies, S.W., *Clinical presentation and diagnosis of coronary artery disease: stable angina. Br Med Bull*, 2001. **59**: p. 17-27.
51. Paoletti, R., A.M. Gotto, Jr., and D.P. Hajjar, *Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. Circulation*, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III20-6.
52. Fuster, V., et al., *Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. J Am Coll Cardiol*, 2005. **46**(6): p. 937-54.
53. Steinhubl, S.R. and D.J. Moliterno, *The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis. Am J Cardiovasc Drugs*, 2005. **5**(6): p. 399-408.
54. Kou, V. and D. Nassisi, *Unstable angina and non-ST-segment myocardial infarction: an evidence-based approach to management. Mt Sinai J Med*, 2006. **73**(1): p. 449-68.
55. Braunwald, E., et al., *ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. 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). J Am Coll Cardiol*, 2000. **36**(3): p. 970-1062.
56. McEver, R.P., *Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. Thromb Haemost*, 2001. **86**(3): p. 746-56.
57. Laffon, A., et al., *Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis. J Clin Invest*, 1991. **88**(2): p. 546-52.
58. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. Lab Invest*, 2002. **82**(5): p. 521-33.

59. McGregor, L., J. Martin, and J.L. McGregor, *Platelet-leukocyte aggregates and derived microparticles in inflammation, vascular remodelling and thrombosis*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 830-7.
60. Seizer, P., M. Gawaz, and A.E. May, *Platelet-monocyte interactions--a dangerous liaison linking thrombosis, inflammation and atherosclerosis*. Curr Med Chem, 2008. **15**(20): p. 1976-80.
61. Merten, M. and P. Thiagarajan, *P-selectin in arterial thrombosis*. Z Kardiol, 2004. **93**(11): p. 855-63.
62. Simon, D.I., et al., *Platelet glycoprotein I α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 193-204.
63. Zirlik, A., et al., *CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1*. Circulation, 2007. **115**(12): p. 1571-80.
64. Weber, C. and T.A. Springer, *Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to α IIb β 3 and stimulated by platelet-activating factor*. J Clin Invest, 1997. **100**(8): p. 2085-93.
65. Diacovo, T.G., et al., *A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 1243-51.
66. Diacovo, T.G., et al., *Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the β 2-integrin CD11b/CD18*. Blood, 1996. **88**(1): p. 146-57.
67. de Fougerolles, A.R., M.S. Diamond, and T.A. Springer, *Heterogeneous glycosylation of ICAM-3 and lack of interaction with Mac-1 and p150,95*. Eur J Immunol, 1995. **25**(4): p. 1008-12.
68. Weber, K.S., R. Alon, and L.B. Klickstein, *Sialylation of ICAM-2 on platelets impairs adhesion of leukocytes via LFA-1 and DC-SIGN*. Inflammation, 2004. **28**(4): p. 177-88.
69. Sengelov, H., et al., *Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (α M β 2) in human neutrophils*. J Clin Invest, 1993. **92**(3): p. 1467-76.
70. Shimaoka, M., J. Takagi, and T.A. Springer, *Conformational regulation of integrin structure and function*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2002. **31**: p. 485-516.
71. Ma, Y.Q., E.F. Plow, and J.G. Geng, *P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 induces an intermediate state of α M β 2 activation and acts cooperatively with extracellular stimuli to support maximal adhesion of human neutrophils*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2549-56.
72. Evangelista, V., et al., *Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule*. Blood, 1999. **93**(3): p. 876-85.
73. Kuijper, P.H., et al., *Platelet associated fibrinogen and ICAM-2 induce firm adhesion of neutrophils under flow conditions*. Thromb Haemost, 1998. **80**(3): p. 443-8.
74. Weyrich, A.S., et al., *Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes*. J Clin Invest, 1996. **97**(6): p. 1525-34.

75. Celi, A., et al., *P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 8767-71.
76. Fan, S.T. and T.S. Edgington, *Coupling of the adhesive receptor CD11b/CD18 to functional enhancement of effector macrophage tissue factor response*. J Clin Invest, 1991. **87**(1): p. 50-7.
77. Neumann, F.J., et al., *Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty*. J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(4): p. 819-24.
78. Furman, M.I., et al., *Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(2): p. 352-8.
79. Ott, I., et al., *Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina*. Circulation, 1996. **94**(6): p. 1239-46.
80. Michelson, A.D., et al., *Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction*. Circulation, 2001. **104**(13): p. 1533-7.
81. Baurand, A., et al., *Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist*. Eur J Pharmacol, 2001. **412**(3): p. 213-21.
82. Hechler, B., et al., *The P2Y1 receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel*. Br J Haematol, 1998. **103**(3): p. 858-66.
83. Offermanns, S., *Activation of platelet function through G protein-coupled receptors*. Circ Res, 2006. **99**(12): p. 1293-304.
84. Guidetti, G.F., et al., *The Gi-coupled P2Y12 receptor regulates diacylglycerol-mediated signaling in human platelets*. J Biol Chem, 2008. **283**(43): p. 28795-805.
85. Lova, P., et al., *A Gi-dependent pathway is required for activation of the small GTPase Rap1B in human platelets*. J Biol Chem, 2002. **277**(14): p. 12009-15.
86. Woulfe, D., et al., *Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23382-90.
87. Traynelis, S.F. and J. Trejo, *Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms*. Curr Opin Hematol, 2007. **14**(3): p. 230-5.
88. O'Brien, P.J., et al., *Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1*. J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13502-9.
89. Junge, C.E., et al., *Protease-activated receptor-1 in human brain: localization and functional expression in astrocytes*. Exp Neurol, 2004. **188**(1): p. 94-103.
90. Vu, T.K., et al., *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation*. Cell, 1991. **64**(6): p. 1057-68.
91. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 258-64.
92. Xu, W.F., et al., *Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6642-6.

93. Coughlin, S.R., *Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1800-14.
94. Martorell, L., et al., *Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis*. Thromb Haemost, 2008. **99**(2): p. 305-15.
95. Covic, L., A.L. Gresser, and A. Kuliopulos, *Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets*. Biochemistry, 2000. **39**(18): p. 5458-67.
96. Covic, L., et al., *Role of the PAR4 thrombin receptor in stabilizing platelet-platelet aggregates as revealed by a patient with Hermansky-Pudlak syndrome*. Thromb Haemost, 2002. **87**(4): p. 722-7.
97. Kastl, S.P., et al., *Thrombin induces the expression of oncostatin M via AP-1 activation in human macrophages: a link between coagulation and inflammation*. Blood, 2009. **114**(13): p. 2812-8.
98. Cottrell, G.S., et al., *Protease-activated receptor 2: activation, signalling and function*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1191-7.
99. Alshurafa, H.N., et al., *A protease activated receptor-2 (PAR-2) activating peptide, tc-LIGRLO-NH₂, induces protease release from mast cells: role in TNF degradation*. BMC Pharmacol, 2004. **4**: p. 12.
100. Fiorucci, S., et al., *Proteinase-activated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13936-41.
101. Vergnolle, N., *Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo*. J Immunol, 1999. **163**(9): p. 5064-9.
102. Lindner, J.R., et al., *Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6504-10.
103. Sandberg, W.J., et al., *Inflammatory interaction between LIGHT and proteinase-activated receptor-2 in endothelial cells: potential role in atherogenesis*. Circ Res, 2009. **104**(1): p. 60-8.
104. Ishihara, H., et al., *Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 502-6.
105. D'Andrea, M.R., et al., *Expression of protease-activated receptor-1, -2, -3, and -4 in control and experimentally inflamed mouse bladder*. Am J Pathol, 2003. **162**(3): p. 907-23.
106. McLaughlin, J.N., M.M. Patterson, and A.B. Malik, *Protease-activated receptor-3 (PAR3) regulates PAR1 signaling by receptor dimerization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(13): p. 5662-7.
107. Ostrowska, E. and G. Reiser, *The protease-activated receptor-3 (PAR-3) can signal autonomously to induce interleukin-8 release*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(6): p. 970-81.
108. Anderson, J.L., et al., *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, 2007. 50(7): p. e1-e157.*
109. Hankey, G.J. and J.W. Eikelboom, *Aspirin resistance*. Lancet, 2006. **367**(9510): p. 606-17.
 110. Roth, G.J. and D.C. Calverley, *Aspirin, platelets, and thrombosis: theory and practice*. Blood, 1994. **83**(4): p. 885-98.
 111. Tantry, U.S., E. Mahla, and P.A. Gurbel, *Aspirin resistance*. Prog Cardiovasc Dis, 2009. **52**(2): p. 141-52.
 112. Tan, J.W. and K.W. Guo, *Management of antiplatelet therapy during acute percutaneous coronary intervention: new strategies and therapeutics*. Ann Acad Med Singapore. **39**(3): p. 221-9.
 113. McQuaid, K.R. and L. Laine, *Systematic review and meta-analysis of adverse events of low-dose aspirin and clopidogrel in randomized controlled trials*. Am J Med, 2006. **119**(8): p. 624-38.
 114. Gurbel, P.A. and U.S. Tantry, *Combination antithrombotic therapies*. Circulation. **121**(4): p. 569-83.
 115. Michelson, A.D., *New P2Y12 antagonists*. Curr Opin Hematol, 2009. **16**(5): p. 371-7.
 116. Badimon, L. and G. Vilahur, *Coronary atherothrombotic disease: progress in antiplatelet therapy*. Rev Esp Cardiol, 2008. **61**(5): p. 501-13.
 117. Cattaneo, M., *New P2Y12 blockers*. J Thromb Haemost, 2009. **7 Suppl 1**: p. 262-5.
 118. Nguyen, T.A., J.G. Diodati, and C. Pharand, *Resistance to clopidogrel: a review of the evidence*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(8): p. 1157-64.
 119. Wang, Z.J., et al., *Impact of clopidogrel resistance on thrombotic events after percutaneous coronary intervention with drug-eluting stent*. Thromb Res, 2009. **124**(1): p. 46-51.
 120. Feher, G., et al., *Clopidogrel resistance: role of body mass and concomitant medications*. Int J Cardiol, 2007. **120**(2): p. 188-92.
 121. Cattaneo, M., *Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(11): p. 1980-7.
 122. Mega, J.L., et al., *Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel*. N Engl J Med, 2009. **360**(4): p. 354-62.
 123. Gurbel, P.A., et al., *Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity*. Circulation, 2003. **107**(23): p. 2908-13.
 124. Taubert, D., et al., *Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose*. Thromb Haemost, 2004. **92**(2): p. 311-6.
 125. Gilchrist, I.C., *Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in percutaneous coronary intervention: focus on the pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of eptifibatide*. Clin Pharmacokinet, 2003. **42**(8): p. 703-20.
 126. Popma, J.J., et al., *Antithrombotic therapy during percutaneous coronary intervention: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy*. Chest, 2004. **126**(3 Suppl): p. 576S-599S.

127. Tcheng, J.E., et al., *Pharmacodynamics of chimeric glycoprotein IIb/IIIa integrin antiplatelet antibody Fab 7E3 in high-risk coronary angioplasty*. *Circulation*, 1994. **90**(4): p. 1757-64.
128. Mascelli, M.A., et al., *Pharmacodynamic profile of short-term abciximab treatment demonstrates prolonged platelet inhibition with gradual recovery from GP IIb/IIIa receptor blockade*. *Circulation*, 1998. **97**(17): p. 1680-8.
129. Tamhane, U.U. and H.S. Gurm, *The chimeric monoclonal antibody abciximab: a systematic review of its safety in contemporary practice*. *Expert Opin Drug Saf*, 2008. **7**(6): p. 809-19.
130. Scarborough, R.M., N.S. Kleiman, and D.R. Phillips, *Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists. What are the relevant issues concerning their pharmacology and clinical use?* *Circulation*, 1999. **100**(4): p. 437-44.
131. Peerlinck, K., et al., *MK-383 (L-700,462), a selective nonpeptide platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist, is active in man*. *Circulation*, 1993. **88**(4 Pt 1): p. 1512-7.
132. Scarborough, R.M., et al., *Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri**. *J Biol Chem*, 1991. **266**(15): p. 9359-62.
133. Schror, K. and A.A. Weber, *Comparative pharmacology of GP IIb/IIIa antagonists*. *J Thromb Thrombolysis*, 2003. **15**(2): p. 71-80.
134. Meyer, D., *Antiplatelets and stroke outcomes: state of the science*. *Crit Care Nurs Clin North Am*, 2009. **21**(4): p. 517-28.
135. Patrono, C. and B. Rocca, *The future of antiplatelet therapy in cardiovascular disease*. *Annu Rev Med*. **61**: p. 49-61.
136. Patrono, C., et al., *Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)*. *Chest*, 2008. **133**(6 Suppl): p. 199S-233S.
137. Angiolillo, D.J., D. Capodanno, and S. Goto, *Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis*. *Eur Heart J*, 2009.
138. Chackalamannil, S., et al., *Discovery of a novel, orally active himbacine-based thrombin receptor antagonist (SCH 530348) with potent antiplatelet activity*. *J Med Chem*, 2008. **51**(11): p. 3061-4.
139. Becker, R.C., 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. **373**(9667): p. 919-28.
140. Pfefferkorn, J.A., et al., *P2Y1 receptor antagonists as novel antithrombotic agents*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008. **18**(11): p. 3338-43.
141. Fabre, J.E., et al., *Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice*. *Nat Med*, 1999. **5**(10): p. 1199-202.
142. Leon, C., et al., *Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(12): p. 1731-7.
143. Murugappa, S. and S.P. Kunapuli, *The role of ADP receptors in platelet function*. *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 1977-86.

144. Lenain, N., et al., *Inhibition of localized thrombosis in P2Y1-deficient mice and rodents treated with MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(6): p. 1144-9.
145. Remijn, J.A., et al., *Role of ADP receptor P2Y(12) in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(4): p. 686-91.
146. Turner, N.A., J.L. Moake, and L.V. McIntire, *Blockade of adenosine diphosphate receptors P2Y(12) and P2Y(1) is required to inhibit platelet aggregation in whole blood under flow*. Blood, 2001. **98**(12): p. 3340-5.
147. Andre, P., et al., *Anticoagulants (thrombin inhibitors) and aspirin synergize with P2Y12 receptor antagonism in thrombosis*. Circulation, 2003. **108**(21): p. 2697-703.
148. Hechler, B., et al., *MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **316**(2): p. 556-63.
149. Reyderman L, K.T., Kasserra C et al., *Lack of ethnic differences in the pharmacodynamics (PD) and pharmacokinetics (PK) of SCH 530348, a novel oral antiplatelet agent, in Japanese and Caucasian subjects*. Clin Pharmacol Ther, 2009. **85**((Suppl 1): S21): p. PI-41.
150. Shinohara Y, G.S., Shimizu K et al., *A phase II safety study of novel antiplatelet agent, SCH 530348, in Japanese patients with prior ischemic stroke*. Int J Stroke, 2008. **3**((Suppl 1): 139): p. PO101-193.
151. Gordon, J.R., et al., *Thrombin induces IL-6 but not TNFalpha secretion by mouse mast cells: threshold-level thrombin receptor and very low level FcepsilonRI signaling synergistically enhance IL-6 secretion*. Cell Immunol, 2000. **205**(2): p. 128-35.
152. Rahman, A., et al., *Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream NF-kappa B site of the promoter mediates endothelial ICAM-1 expression and neutrophil adhesion*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5466-76.
153. Smith, C.W., et al., *Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro*. J Clin Invest, 1989. **83**(6): p. 2008-17.