

Université de Reims-Champagne Ardenne
UFR Médecine

Année 2004

N°

THESE

Présentée pour l'obtention du

**DIPLOME DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE
DE REIMS-CHAMPAGNE ARDENNE**

**APPORT DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS
L'ETUDE DE LA PHYSIOLOGIE
PLAQUETTAIRE ET DE LA MODULATION
PHARMACOLOGIQUE DES FONCTIONS
PLAQUETTAIRES**

Présentée et soutenue publiquement le 1^{er} décembre 2004

Par

Nathalie HEZARD

Discipline : Hématologie
Spécialité : Biomolécules et Dynamique cellulaire

Membres du jury :

- Docteur C. Gachet (rapporteur)
- Docteur N. Schlegel (rapporteur)
- Professeur A-M. Fischer (assesseur)
- Professeur D. Metz (assesseur)
- Professeur G. Potron (assesseur)
- Professeur P. Nguyen (Directeur)

Sommaire	1
Principales abréviations.....	6
Intitulés des figures	7
Intitulés des tableaux	9
INTRODUCTION GENERALE	10
ETAT DES CONNAISSANCES SUR LE SUJET	13
I. Le complexe GPIb-IX-V.....	14
1. Structure	14
2. Gènes, polymorphismes, et expression	17
3. Ligands	18
3.1. Le facteur Willebrand.....	18
3.2. $\alpha_M\beta_2$	20
3.3. La P-sélectine	21
3.4. La thrombine	22
3.5. Le facteur XI	24
3.6. Le facteur XII et le kininogène de haut poids moléculaire	25
II. $\alpha_{IIb}\beta_3$: β_3 intégrine plaquettaire	26
1. Introduction (rappel sur la famille des intégrines)	26
2. Structure d' $\alpha_{IIb}\beta_3$	27
2.1. La sous-unité α_{IIb} (GPIIb)	29
2.2. La sous-unité β_3 (GPIIIa)	30
2.3. Les sites de fixation des ligands.....	33
3. Gènes, polymorphismes, et expression	34
4. Les ligands.....	35
4.1. Fibrinogène.....	35
4.2. Le facteur Willebrand.....	38
4.3. La prothrombine	38
4.4. ICAM-4	40
5. Signalisation liée à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	41
5.1. Signalisation <i>inside-out</i>	41
5.2. Signalisation <i>outside-in</i>	43

III. Vasodilator-stimulated protein (VASP)	45
1. Introduction	45
2. VASP et plaquettes humaines	46
2.1. Localisation	46
2.2. Structure	47
2.3. La phosphorylation de VASP	47
2.4. Fonctions	51
IV. La formation du thrombus en conditions de flux	52
1. Introduction	52
2. Flux sanguin artériel ou veineux : les contraintes rhéologiques	53
3. Contraintes de cisaillement et tests biologiques	54
EXPOSE DES TRAVAUX	56
I. Etude des fonctions plaquettaires chez l'enfant en cytométrie en flux : mise en évidence de particularités physiologiques dans cette population	57
1. Introduction	57
2. Résultats	58
2.1. Publication :	59
<i>Unexpected persistence of platelet reactivity beyond the neonatal period : a flow cytometric study in neonates, infants and older children. Thromb Haemost 2003; 90: 116-123.</i>	
Principaux résultats	67
2.2. Deuxième partie de l'étude :	68
Evaluation en cytométrie en flux des fonctions plaquettaires chez le prématuré	
2.2.1. But de l'étude	68
2.2.2. Population	68
2.2.3. Méthodes	68
2.2.4. Statistiques	69
2.2.5. Résultats	69
2.2.5.1. Caractéristiques de la population	69
2.2.5.2. Etude en cytométrie en flux de GPIIb/IIIa, GPIb et de la P-sélectine	69

2.2.5.3. Le facteur Willebrand.....	75
3. Discussion	77
II. Modulation pharmacologique de la fonction d'$\alpha_{IIb}\beta_3$: le modèle de la cardiologie interventionnelle	80
1. Introduction	80
2. Résultats	83
2.1. Publication 1 :.....	85
<i>Free and total platelet glycoprotein IIbIIIa measurement in whole blood by quantitative flow cytometry during and after infusion of c7E3 Fab in patients undergoing PTCA. Thromb Haemost 1999; 81: 869-873.</i>	
2.2. Publication 2 :.....	90
<i>Unexpected flow cytometric results with two small GPIIbIIIa blockers : eptifibatide and tirofiban. Thromb Haemost 2001; 85: 561-562.</i>	
Principaux résultats	92
2.3. Publication 3 :.....	93
<i>Use of the PFA-100™ apparatus to assess platelet function in patients undergoing PTCA during and after infusion of c7E3 Fab in the presence of other antiplatelet agents. Thromb Haemost 2000; 83: 540-544.</i>	
Principaux résultats	98
2.4. Publication 4 :.....	99
<i>PFA-100™ and flow cytometry : can they challenge aggregometry to assess antiplatelet agents, other than GPIIbIIIa blockers, in coronary angioplasty ? Thromb Res 2003; 108: 43-47.</i>	
Principaux résultats	104
3. Discussion	105
III. Modulation de la phosphorylation de VASP par les thiénoypyridines	111
1. Introduction	111
2. Matériel et méthodes	112
2.1. Population étudiée	112
2.1.1. Témoins sains	112

2.2.2. Patients traités par thiénoxyridines	113
2.2.3. Patients co-traités par thiénoxyridines et anti-GPIIb/IIIa.....	113
2.2. Méthodes	114
2.2.1. Agrégation plaquettaire	114
2.2.2. Cytométrie en flux (étude de la phosphorylation de VASP sur les sites sérines 157 et 239)	114
2.2.3. Western Blot.....	115
2.2.4. Indice de réponse des récepteurs à l'ADP	116
2.2.5. Statistiques	116
3. Résultats	117
3.1. Témoins sains.....	117
3.1.1. Etude de la phosphorylation de VASP en cytométrie en flux.....	117
3.1.2. Etude de la phosphorylation de VASP en Western Blot (témoins sains).....	123
3.1.2.1. Anticorps anti-VASP total	123
3.1.2.2. Etude de la phosphorylation des sérines 239 et 157 en Western Blot.....	125
3.2. Patients traités par thiénoxyridines	127
3.2.1. Agrégation plaquettaire	127
3.2.2. Phosphorylation de la sérine 239 (VASP 239) : comparaison témoins / patients.....	127
3.2.2.1. Western Blot.....	127
3.2.2.2. Cytométrie en flux.....	129
3.2.3. Phosphorylation de la sérine 157 (VASP 157) : comparaison témoins / patients.....	134
3.2.3.1. Cytométrie en flux.....	134
3.2.3.2. Western Blot.....	136
3.3. Patients co-traités par thiénoxyridines et anti-GPIIb/IIIa (étude de la phosphorylation de VASP 239)	137
3.3.1. Cytométrie en flux.....	137
3.3.2. Western Blot.....	139
5. Discussion	141

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	145
REFERENCES	146
ANNEXE	184

Principales abréviations

GP : glycoprotéine

PAR : *protease activated receptor*

ABP-280 : *actin binding protein 280*

PSGL-1 : *P-selectin glycoprotein ligand 1*

TRAP : *thrombin receptor activating peptide*

PS : phosphatidylsérine

PSI : *plexins semaphorins integrins*

EGF : *epidermal growth factor*

I : *inserted*

MIDAS : *metal ion dependent adhesion site*

DTT : dithiothréitol

PMA : *phorbol myristate acetate*

ADP : adénosine diphosphate

rVIIa : facteur VII activé recombinant

VASP : *vasodilator stimulated phosphoprotein*

PKA : *cAMP induced protein kinase*

PKG : *cGMP induced protein kinase*

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

PDE3 : phosphodiesterase 3

NO : monoxyde d'azote

PRP : plasma riche en plaquettes

PGE1 : prostaglandine E1

SNP : *sodium nitroprusside*

TO : temps d'occlusion

PFA-100™ : *platelet function analyzer*

RIBS : *receptor induced binding site*

LABS : *ligand attenuated binding site*

PPACK : *Phe-Pro-Arg chloromethyl ketone*

Intitulés des figures

1. Le complexe GPIb-IX-V (Lopez, 2002)
2. Structure de GPIb α (extrémité N-terminale)
3. Interactions leucoplaquettaires (Lopez, 2002)
4. Similitudes de structure entre GPIb α et PSGL-1 (Lopez, 2002)
5. La famille des intégrines (Hynes, 2002)
6. Structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Phillips, 2001)
7. Structure extra-cellulaire d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Hato, 2001)
8. Structure des parties intra-cytoplasmiques des sous-unités α_{IIb} et β_3 (Vinogradova, 2002)
9. Interactions α_{IIb} / β_3 (Hato, 2002)
10. Interaction entre la taline et la partie intra-cytoplasmique de β_3 (Vinogradova, 2002)
11. Interactions fibrinogène / plaquettes
12. Interactions facteur Willebrand / plaquettes, en conditions de flux (Ruggeri, 2003)
13. Interactions prothrombine / $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Plow, 2001)
14. Signalisation liée à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Shatill, 2003; Jackson, 2003)
15. Interactions de VASP avec son environnement moléculaire
16. Les sites de phosphorylation de VASP (Smolenski, 1998; Fox, 2001)
17. *Cross-talk* entre les voies PKA et PKG dans les plaquettes humaines (Li, 2003a)
18. Réponse plaquettaire biphasique en réponse au GMPc (Li, 2003a; Li, 2003b)
19. Mécanismes permettant l'agrégation plaquettaire en fonction de la méthodologie utilisée (Kulkarni, 2000).
20. Quantification d' $\alpha_{IIb}\beta_3$, à l'état basal et après activation par le TRAP (CD41a)
21. Quantification d' $\alpha_{IIb}\beta_3$, à l'état basal et après activation par le TRAP (CD61)
22. Liaison du fibrinogène en réponse au TRAP
23. Modification conformationnelle d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (PAC1)
24. Quantification de GPIb, à l'état basal et après activation par le TRAP
25. Quantification de la dégranulation, à l'état basal et après activation par le TRAP (CD62P)
26. Phosphorylation de VASP, histogrammes biparamétriques
27. Phosphorylation de VASP
28. Phosphorylation de VASP chez le volontaire sain (n=28) (cytométrie en flux)
29. Répartition des valeurs obtenues en réponse à PGE1 et à SNP chez le volontaire sain (cytométrie en flux)

30. Phosphorylation des sérines 157 et 239 en réponse au SNP chez le volontaire sain (cytométrie en flux)
31. Phosphorylation de VASP (Western Blot)
32. Phosphorylation de VASP chez le volontaire sain (Western Blot, n=9)
33. Phosphorylation de VASP 239 : comparaison patients (n=12) / volontaires sains (n=9) (Western Blot)
34. Phosphorylation de VASP 239 (cytométrie en flux). Comparaison patients / volontaires sains
35. Phosphorylation de la sérine 239 en réponse à PGE1 et au SNP chez les patients traités par clopidogrel (n=21) (cytométrie en flux)
36. Comparaison entre cytométrie en flux et Western Blot (VASP 239)
37. Phosphorylation de VASP 157 (cytométrie en flux). Comparaison patients (n=21) / volontaires sains (n=28)
38. Phosphorylation de VASP 157 en réponse à PGE1 et au SNP (cytométrie en flux)
39. Phosphorylation de VASP 157 : comparaison patients (n=12) / témoins (n=9) (Western Blot)
40. Phosphorylation de VASP (site sérine 239) chez des patients traités par clopidogrel, avant et après administration parentérale d'anti-GPIIb/IIIa (cytométrie en flux)
41. Phosphorylation de VASP (site sérine 239) chez des patients traités par clopidogrel, avant et après administration parentérale d'anti-GPIIb/IIIa (Western Blot)

Intitulés des tableaux

- I. Protéines associées aux séquences intra-cytoplasmiques d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Hato, 2002)
- II. Interactions récepteurs-ligands en fonction des contraintes rhéologiques (De Groot, 2002)
- III. Les caractéristiques des contraintes de cisaillement dans l'arbre vasculaire (De Groot, 2002)
- IV. Dosage plasmatique du facteur Willebrand
- V. Liaison du facteur Willebrand aux plaquettes en réponse à la ristocétine
- VI. Les molécules anti-GPIIb/IIIa disponibles et leurs indications en 2004
- VII. Les thiéno-pyridines (indications en 2004)
- VIII. Caractéristiques du traitement par clopidogrel chez les patients bénéficiant d'une coprescription d'anti-GPIIb/IIIa
- IX. Indice de réponse des récepteurs à l'ADP chez le volontaire sain (cytométrie en flux)
- X. Indices de réponse des récepteurs à l'ADP (Western Blot)
- XI. Indice de réponse des récepteurs à l'ADP chez les patients traités par clopidogrel (n=21)
- XII. Influence des anti-GPIIb/IIIa sur l'indice de réponse des récepteurs à l'ADP évalué en cytométrie en flux

INTRODUCTION GENERALE

Les plaquettes sont de petits éléments cellulaires de toute première importance dans nombre de processus physiopathologiques, au premier rang desquels figurent l'hémorragie et la thrombose. Depuis leur définition morphologique et la description de leur fonctions d'adhésion et d'agrégation par Bizzozzero en 1881, la connaissance de leur implication en pathologie humaine n'a cessé de progresser. Ont été ainsi décrites les thrombopathies constitutionnelles hémorragipares. Ces pathologies ont permis de décrire et d'attribuer une fonction aux différents constituants de la plaquette. A l'opposé de ces complications hémorragiques, la thrombose artérielle fait jouer un rôle important aux plaquettes, cette fois en terme d'activation plaquettaire. L'enjeu des thérapeutiques anti-plaquettaires reste aujourd'hui l'efficacité et la sécurité, deux aspects indissociables en cours d'investigation par de nombreuses équipes.

Le fait d'être anucléées confère aux plaquettes une caractéristique qui leur est propre : leur réactivité ne peut pas faire appel à une synthèse de novo (elles possèdent en fait cette capacité de synthèse de novo, mais de façon limitée, *via* l'ARN messenger résiduel qu'elles contiennent). Elles possèdent un équipement pré-synthétisé, rapidement mobilisable et fonctionnel, en réponse à différents stimuli. Contrairement à d'autres types cellulaires, la membrane et les protéines membranaires représentent une proportion importante de leur masse cellulaire totale. Elles sont donc capables de modifier leur phénotype, malgré l'absence de noyau, grâce à l'externalisation sur leur membrane de récepteurs stockés dans leurs granules internes.

La principale fonction plaquettaire est l'hémostase. Ainsi, les récepteurs plaquettaires majeurs sont directement impliqués dans l'activation plaquettaire, ou en tant que récepteurs d'adhésion, dans l'interaction plaquette/vaisseau lésé, plaquette/plaquette, plaquette/leucocyte. La frontière entre hémostase physiologique adaptée et thrombose pathologique est étroite, et nécessite un système de rétrocontrôle très finement régulé. L'étude de l'expression membranaire des récepteurs plaquettaires, mais également l'approche de la signalisation intra-cellulaire aboutissant à l'activation de l'intégrine plaquettaire majoritaire ($\alpha_{IIb}\beta_3$), est l'objet de cette thèse.

Nous avons à notre disposition une large palette d'outils techniques permettant l'exploration des plaquettes. Nous avons choisi une approche par la cytométrie en flux, appliquée à l'étude des fonctions plaquettaires. Nous nous sommes consacrés à l'étude de la physiologie plaquettaire en pédiatrie, cette population restant relativement peu explorée à

l'heure actuelle par cette technique. L'autre versant de notre travail concerne la modulation des fonctions plaquettaires, et plus particulièrement de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, par différents schémas thérapeutiques antiplaquettaires, chez le patient insuffisant coronarien.

ETAT DES CONNAISSANCES SUR LE SUJET

I. Le complexe GPIb-IX-V

1. Structure

Le complexe GPIb-IX-V (glycoprotéine Ib-IX-V) contient quatre sous-unités distinctes : les sous-unités GPIb α (CD42b) et GPIb β (CD42c), reliées par un pont disulfure, la sous-unité GPIX (CD42a) et la sous-unité GPV (CD42d). Leurs masses moléculaires sont respectivement de 143 kDa, 24 kDa, 17 kDa et 82 kDa (Wenger 1989, Yagi 1994, Yagi 1995). Ces glycoprotéines sont exprimées au sein du complexe avec un ratio de 2:2:2:1. Une plaquette non activée exprime sur sa membrane environ 25000 copies du complexe GPIb-IX-V. L'activation plaquettaire s'accompagne d'une diminution de l'expression membranaire du complexe. En effet, le complexe GPIb-IX-V est internalisé et redistribué dans la plaquette au niveau du système canaliculaire connecté à la surface. L'internalisation est un phénomène transitoire (Michelson 1996, Hourdillé 1990). La thrombine induit la clairance de GPIb en 2 à 5 minutes, selon le type de récepteur engagé, PAR-1 (*protease-activated receptor-1*) et PAR-4 respectivement. Le retour à l'état basal se fait en 30 à 60 minutes (Han 2003). De plus, la GPV possède un site de protéolyse par la thrombine, ce qui contribue à la diminution de son expression membranaire (Michelson 1996).

L'organisation définitive du complexe n'est pas élucidée, la figure 1 correspond donc à une représentation schématique hypothétique, prenant en compte la stoechiométrie du complexe et l'association préférentielle de GPV à GPIb α (figure 1).

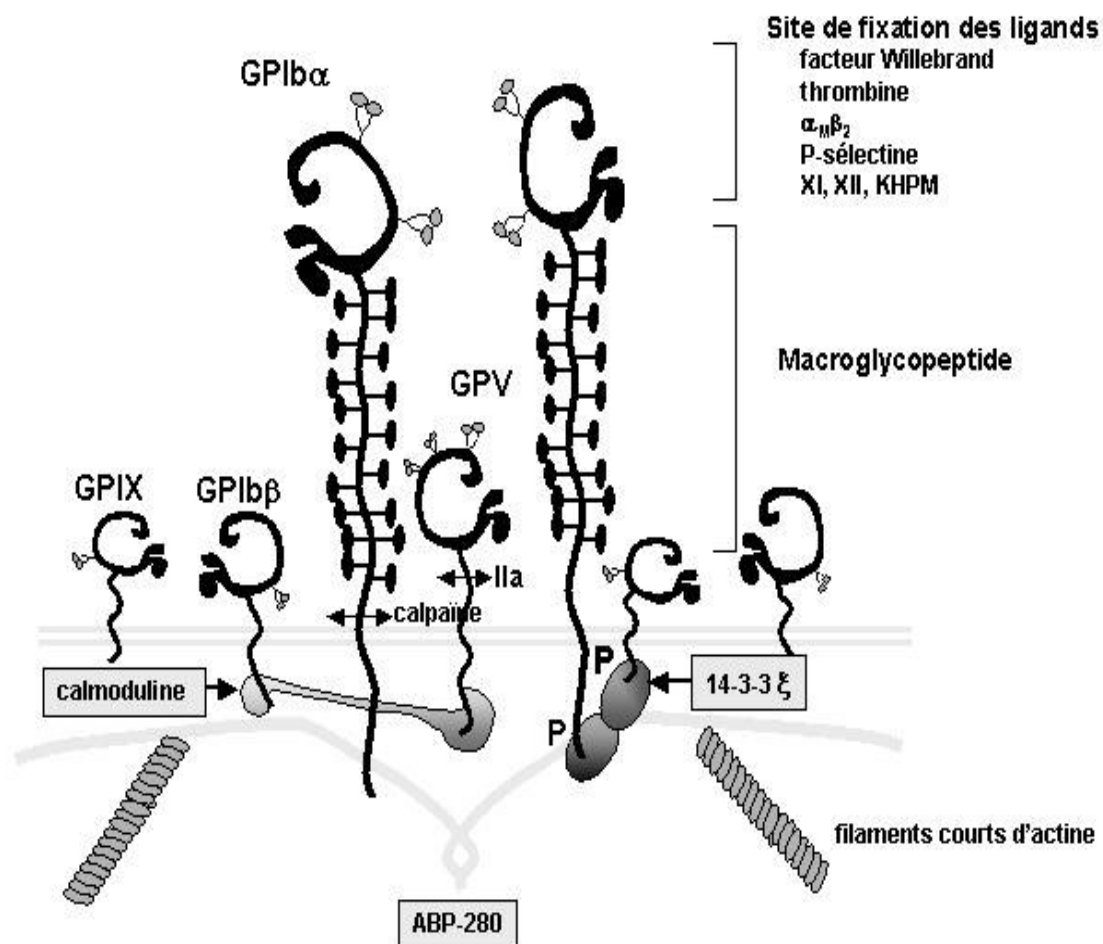


Figure 1 : Le complexe GPIb-IX-V (d'après Lopez 2002)

Chacune des glycoprotéines possède un segment hydrophobe pour l'insertion dans la membrane. La partie intra-cytoplasmique de GPIbα comprend 96 acides aminés (610 acides aminés pour la molécule entière), celle de GPIbβ 34 acides aminés (181 pour la molécule entière) (Lopez 1987, Berndt 1985, Berndt 2001). GPIbβ et GPIX possèdent des points d'ancrage au cytosquelette supplémentaires, *via* la palmitoylation de résidus cystéines. Dans sa partie intra-cytoplasmique, le complexe GPIb-IX-V est associé à différentes protéines intra-cellulaires : l'*actin-binding protein-280* (ABP-280 ou filamine A), la calmoduline et le complexe de signalisation 14-3-3ξ (figure 1). GPIbα possède des sites de liaison pour l'ABP-280 (la région intra-cytoplasmique 557-579) et pour le complexe 14-3-3ξ (les 5 derniers

acides aminés de la partie C-terminale comprenant un site de phosphorylation sur la sérine 609) (Andrews 1992, Du 1996). La liaison GPIb α /ABP-280 est essentielle puisqu'elle supporte l'interaction de GPIb-IX-V avec le cytosquelette plaquettaire (Andrews 1992). L'interaction entre le complexe de signalisation 14-3-3 ξ et la partie intra-cytoplasmique du complexe GPIb-IX-V joue un rôle majeur dans l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ induite par la liaison GPIb α -facteur Willebrand (Wardell 1989, Gu 1999). GPIb β et GPV possèdent également des sites de fixation pour la calmoduline (Andrews 2001).

La majeure partie du complexe GPIb-IX-V est extra-cellulaire. La fonction d'adhésion au sein de ce complexe est totalement assurée par GPIb α . Le clivage de GPIb α par la calpaïne libère un peptide soluble nommé glyocalicine, comprenant l'ensemble de son domaine extra-cellulaire. De nombreuses protéinases, notamment d'origine plaquettaire, sont capables de cliver GPIb et donc de libérer la glyocalicine. *In vivo*, il est possible de mettre en évidence des concentrations plasmatiques de glyocalicine de 1 et 3 $\mu\text{g/mL}$ chez le sujet sain (Coller 1984). La concentration plasmatique en glyocalicine augmente dans les thrombopénies périphériques, elle est normale ou diminuée dans les thrombopénies centrales ou secondaires à une chimiothérapie (Kurata 2001). La digestion de la glyocalicine par la trypsine donne un fragment comprenant l'extrémité N-terminale de GPIb α , de structure globulaire, comprenant le site de fixation des ligands, et un second fragment appelé macroglycopeptide, riche en chaînes oligosaccharidiques terminées par des molécules d'acide sialique responsables de la charge négative de GPIb α (figure 1). Il a été observé chez le fœtus une teneur plus importante en acide sialique, associée à une mobilité électrophorétique de GPIb différente entre les fœtus et leurs mères (Forestier 1991). Les autres sous-unités du complexe, particulièrement GPIb β et GPIX, n'ont pas de rôle direct dans la liaison aux ligands, mais sont indispensables à l'expression de chacune des glycoprotéines sur la membrane plaquettaire (Berndt 2001). En revanche, le rôle de GPV reste à définir : son absence ne diminue pas l'expression membranaire de GPIb-IX, aucun déficit chez l'homme n'a été rapporté à ce jour, et les modèles animaux déficients pour GPV n'acquièrent pas le phénotype plaquettaire observé dans le syndrome de Bernard et Soulier (Kahn 1999).

Chacune des sous-unités du complexe GPIb-IX-V possède au moins une séquence riche en leucine de 24 acides aminés (GPIb β et GPIX), ces séquences pouvant être répétées (7 fois pour GPIb α , 15 fois pour GPV). Les séquences riches en leucine sont situées pour GPIb α dans la région d'interaction avec les ligands (Berndt 2001).

2. Gènes, polymorphismes, et expression

Chaque polypeptide est codé par son gène propre. Comme les différentes sous-unités de GPIb-IX-V, les 4 gènes partagent des similitudes de structure. Bien qu'ils soient très probablement issus d'un même gène ancestral, ils sont dispersés dans le génome. Ainsi, le gène de GPIb α est situé sur le chromosome 17 (17p22) (Wenger 1989), le gène de GPIb β sur le chromosome 22 (22q11.2) (Yagi 1994), et les gènes de GPIX et GPV sur le chromosome 3 (respectivement 3q29 et 3q24) (Yagi 1995). Leur séquence codante est contenue dans un seul exon, à l'exception de GPIb α , et les séquences introniques sont de petite taille, ce qui leur confère une structure compacte. Leur autre particularité concerne les facteurs de transcription, GATA et Ets, restreints aux lignées mégacaryocytaire et érythrocytaire, et essentiels à tous les stades de la différenciation. Quatre mutations de GATA1 (Xp11.23) sont rapportées dans les thrombopénies macrocytaires liées à l'X avec dysérythropoïèse (Nichols 2000, Freson 2001, Mehaffey 2001). Le gène codant pour l'Ets-1 pourrait être impliqué dans la thrombopénie familiale de Paris-Trousseau, due à la délétion 11q23-24 (Favier 2003). Le rôle de GATA-1 dans la maturation mégacaryocytaire a été définitivement démontré chez la souris invalidée pour ce gène, qui présente une thrombopénie associée à des plaquettes de grande taille (Shivdasani 1997).

Différents polymorphismes génétiques sont rapportés pour le gène de GPIb α . L'un de ces polymorphismes modifie la taille de la protéine (610, 623, 636 ou 649 acides aminés), par addition dans le macroglycopeptide d'une séquence de 13 acides aminés. Chacune des tailles est contrôlée par l'un des quatre allèles, respectivement les allèles A, B, C et D de la plus petite à la plus grande taille. Chaque répétition de la séquence de 13 acides aminés allonge le domaine extra-cellulaire de 32 Å (Lopez 1992). Les répercussions fonctionnelles sont importantes : le site de fixation du ligand est situé plus loin de la membrane, et devient donc plus accessible au ligand, notamment en condition de flux élevé. Les variants les plus longs sont associés à une augmentation du risque coronarien (Murata 1997, Gonzalez-Conejero 1998). Un autre polymorphisme, situé dans la zone de fixation du ligand riche en leucine (145Thr $\rightarrow$ Met), est responsable de thrombopénie néo-natale par allo-immunisation foeto-maternelle dans le système HPA-2 (Kuipers 1992). D'autres polymorphismes sont rapportés (Berndt 2001).

Le complexe GPIb-IX-V est majoritairement exprimé par la lignée mégacaryocytaire. Son expression par l'endothélium, expression inductible en réponse aux cytokines, reste controversée (Berndt 2001).

3. Ligands

GPIb α a pour ligands le facteur Willebrand, l'intégrine $\alpha_M\beta_2$, la P-sélectine, et plusieurs facteurs de la coagulation (thrombine, facteur XI, facteur XII, kininogène de haut poids moléculaire). Les sites de liaison pour ces différents ligands sont situés dans le domaine globulaire N-terminal, constitué des 282 premiers acides aminés de la glycoprotéine. Ce domaine comprend 7 séquences riches en leucine et des tyrosines sulfatées, situées entre les séquences riches en leucine et le macroglycopeptide (figure 2).

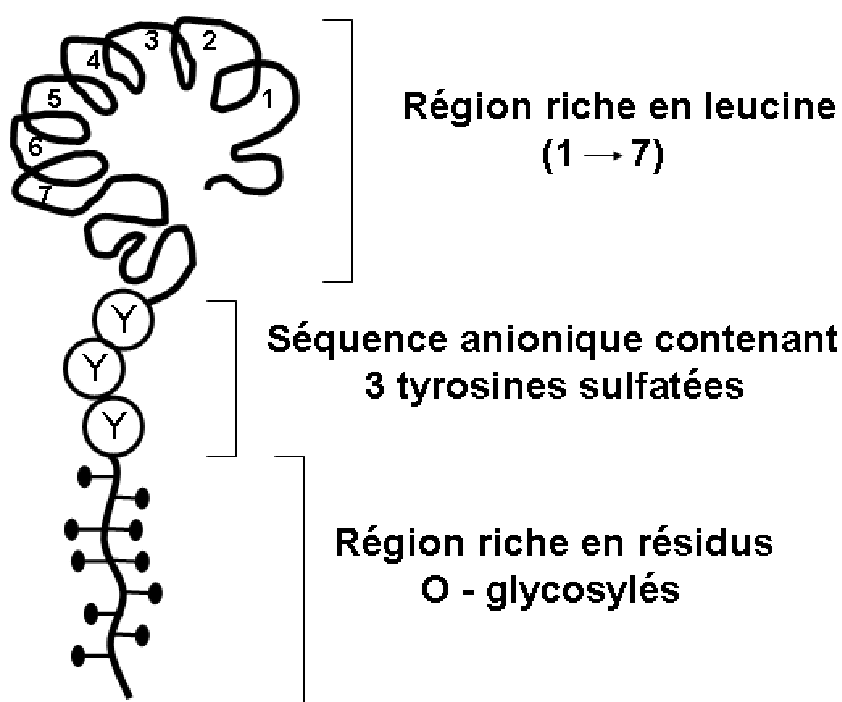


Figure 2. Structure de GPIb α (extrémité N-terminale)

3. 1. Le facteur Willebrand

Le facteur Willebrand mature est une protéine de 2050 acides aminés, dimérisée puis multimérisée dans le réticulum endoplasmique. Sa masse moléculaire finale varie de 500 à

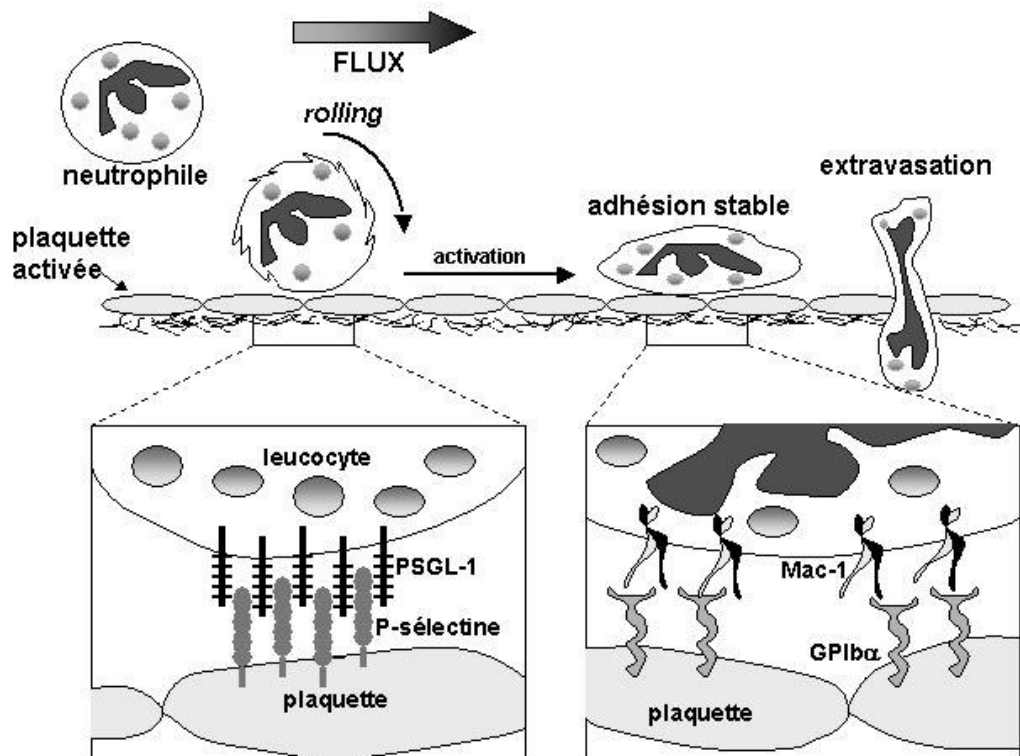
20000 kDa. Sa synthèse est endothéliale et mégacaryocytaire. Il est stocké dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales et dans les granules α des plaquettes, sous forme de multimères de très haut poids moléculaires (ou propeptide), appelés “*ultra-large*” ou “*unusually large*” Willebrand (Ruggeri 2001). Le facteur Willebrand plasmatique est essentiellement d’origine endothéliale. Il subit une protéolyse avant son passage dans le compartiment plasmatique (de Vitt 2001). L’absence de protéolyse par la protéinase du facteur Willebrand, métalloprotéinase appelée ADAMTS 13 (*a disintegrin-like and metalloprotease domain with thrombospondin type I motifs*), congénitale ou acquise, est associée à des formes de très haut poids moléculaire circulantes, responsables de la thrombopénie observée dans les macro-angiopathies thrombotiques (MAT) (Levy 2001, Veyradier 2001). Des déficits ont également été mis en évidence dans d’autres cadres nosologiques : purpura thrombopénique idiopathique, coagulation intra-vasculaire disséminée, lupus, leucémie (Moore 2001). Ces formes “*ultra-large*” sont prothrombotiques. Elles ne sont retrouvées habituellement dans le plasma que de façon très transitoire, après leur sécrétion par les plaquettes et les cellules endothéliales (Ruggieri 2001). Elles sont présentes de manière physiologique chez le nouveau-né, particulièrement chez le prématuré (Katz 1989). En pathologie, il a été démontré qu’elles apparaissent au cours de l’infarctus du myocarde, alors qu’elles ne sont pas retrouvées dans les coronaropathies stabilisées (Sakai 2000). A l’inverse, un déficit des formes de haut poids et/ou de poids moléculaires intermédiaires, normalement présentes chez le sujet sain, définissent certains variants de la maladie de Willebrand (type 2A et 2B).

Chaque polypeptide de la molécule de Willebrand contient des domaines impliqués dans sa liaison au collagène (domaines A1 et A3), à GPIb (domaine A1), à GPIIb/IIIa (séquence RGD du domaine C) (Ruggeri 2001).

L’interaction Willebrand / GPIb-IX-V présente la particularité unique, parmi les interactions dites d’adhésion, d’intervenir en conditions de flux élevé. Ces conditions rhéologiques particulières permettent de modifier la conformation à la fois du domaine A1 du facteur Willebrand et de GPIb, indispensable à leur interaction. Le facteur Willebrand immobilisé sur le site vasculaire lésé est majoritairement d’origine plasmatique, mais il fait intervenir également le facteur Willebrand endogène contenu dans la matrice sous-endothéliale. L’immobilisation sur la paroi vasculaire et les contraintes de cisaillement élevées sont les conditions permettant au facteur Willebrand d’acquies une conformation “*déroulée*” (*uncoiled*), entraînant l’exposition des sites d’adhésion (Ruggeri 2001).

3. 2. $\alpha_M\beta_2$

L'intégrine $\alpha_M\beta_2$ (ou Mac1, ou CD11b/CD18) est impliquée dans l'adhésion stable du leucocyte à la paroi (figure 3). Ses ligands connus sont ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) exprimée par les cellules endothéliales, ICAM-2 exprimée par les plaquettes, le kininogène de haut poids moléculaire, et le fibrinogène lié à $\alpha_{IIb}\beta_3$. Son interaction directe avec GPIb α a été rapportée récemment, dans des modèles permettant d'éliminer les interactions leucoplaquettaires médiées par les ligands déjà décrits (lignées cellulaires exprimant $\alpha_M\beta_2$, polynucléaires de souris invalidées pour $\alpha_M\beta_2$) (Simon 2000). Ce modèle expérimental démontre la similitude d' $\alpha_M\beta_2$ et du facteur Willebrand pour la liaison à GPIb α . En effet, $\alpha_M\beta_2$ possède un domaine I (I pour *Inserted*), très proche dans sa structure du domaine A du facteur Willebrand. Une modification conformationnelle est également indispensable à la liaison à GPIb α (Simon 2000). Les anticorps anti-GPIb α utilisés dans ce travail ont des profils d'inhibition différents sur les interactions leucoplaquettaires et plaquettes-vaisseau. Ceci permet d'envisager des stratégies thérapeutiques ciblant les interactions leucoplaquettaires, largement impliquées en pathologie artérielle dans l'ischémie-reperfusion, sans inhiber l'adhésion des plaquettes à la paroi vasculaire (Simon 2000). La séquence de GPIb α impliquée dans la liaison d' $\alpha_M\beta_2$ reste à identifier.



PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1

*Figure 3. Interactions leucoplaquettaires.
(schéma proposé par Lopez 2002)*

3. 3. P-sélectine

Avant l'étape d'adhésion stable du leucocyte à la paroi, faisant intervenir le récepteur $\alpha_M\beta_2$, le *rolling* du leucocyte sur les plaquettes activées engage la P-sélectine plaquettaire et son récepteur leucocytaire appelé PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) (figure 3). Il existe également un *rolling* plaquettaire sur l'endothélium, mettant en jeu GPIb α et la P-sélectine endothéliale. PSGL-1 et GPIb α partagent des similitudes de structure : toutes deux sont des sialomucines transmembranaires, PSGL-1 possédant l'équivalent du macroglycopeptide de GPIb α et les sites tyrosine sulfatée, sans le domaine globulaire riche en leucine (figure 4). Cette structure proche leur confère également une similitude fonctionnelle : adhérence plaquette-endothélium pour GPIb α , et leucocyte-endothélium pour PSGL-1 (Romo 1999).

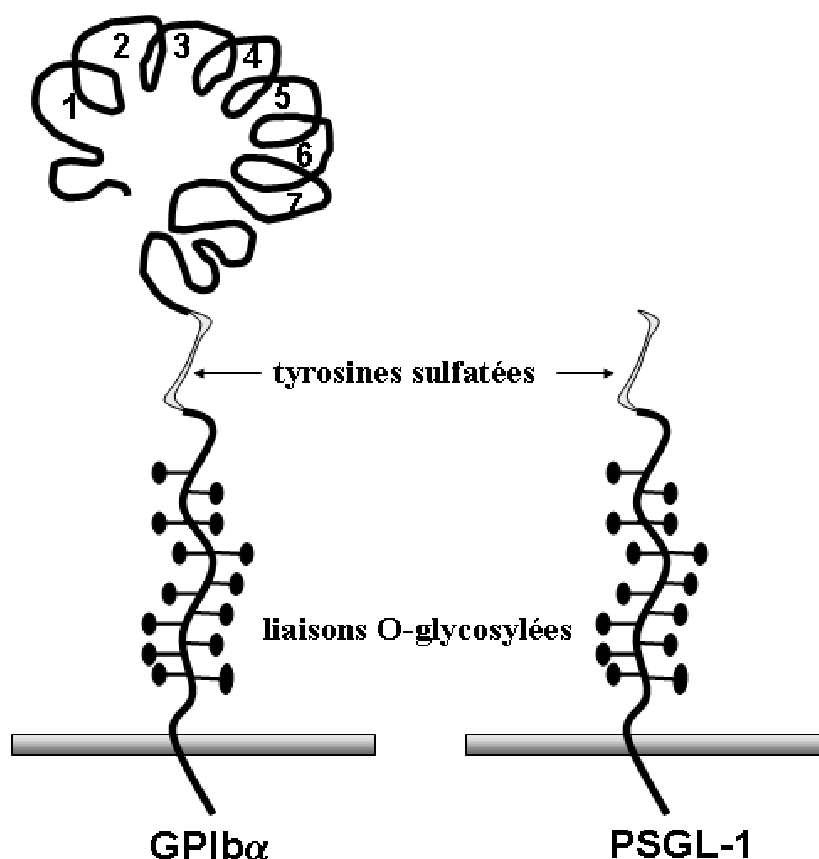


Figure 4. Similitudes de structure entre GPIb α et PSGL-1.

Les deux récepteurs possèdent un macroglycopeptide riche en acides aminés O-glycosylés et une séquence contenant des tyrosines sulfatées. PSGL-1, récepteur d'adhésion leucocytaire, n'a pas de domaine riche en leucine. GPIb α lie la P-sélectine endothéliale, PSGL-1 la P-sélectine plaquettaire.

(d'après Lopez 2002)

3. 4. La thrombine

Le complexe GPIb-IX-V a été identifié comme le premier récepteur plaquettaire pour la thrombine. GPIb α lie la thrombine au niveau de l'exosite II. Cette liaison est inhibée par les héparines de bas poids moléculaire, qui interagissent avec l'exosite II, et non par l'hirudine, qui se lie à l'exosite I (Li 2001). La liaison GPIb α -IIa protège la thrombine de sa dégradation protéolytique par l'anti-thrombine, et conduit à une modification de son site actif (Li 2001). GPV, substrat de la thrombine, semble nécessaire à GPIb-IX-V dans son rôle de récepteur de haute affinité pour l'enzyme (Dong 1997). L'interaction GPIb α -IIa augmente l'hydrolyse de PAR-1, GPIb α jouant ainsi un rôle de cofacteur de la thrombine elle-même dans l'activation de PAR-1 (De Candia 2001). La thrombine liée à GPIb α est également capable d'induire

l'agrégation plaquettaire et la rétraction du caillot. Il est démontré, après désensibilisation des récepteurs PAR-1 et PAR-4 par le TRAP-1 et le TRAP-4 (*thrombin receptor activating peptide*), que l'agrégation relative à l'interaction de la thrombine avec GPIb est indépendante de l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Dubois 2003). La signalisation déclenchée par la fixation de la thrombine sur GPIb α induit un changement de forme des plaquettes, mais n'entraîne pas, contrairement à la liaison Willebrand-GPIb, l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$. Dans ces conditions expérimentales, l'agrégation plaquettaire fait intervenir la fixation de fibrine polymérisée à l'intégrine, possible sans modification conformationnelle d' $\alpha_{IIb}\beta_3$. L'agrégation et la rétraction du caillot observées sont dépendantes de la fibrine et d' $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ceci a été démontré par l'inhibition d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ par des séquences RGD et par les peptidomimétiques utilisés en thérapeutique humaine, et par l'inhibition de la fibrine par les inhibiteurs de la polymérisation de la fibrine (Dubois 2003). Au total, l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine fait intervenir deux mécanismes différents : 1) l'activation de l'intégrine et sa liaison au fibrinogène, *via* les récepteurs PAR-1 et PAR-4, et 2) l'interaction entre la fibrine polymérisée et l'intégrine sans activation préalable, *via* le complexe GPIb-IX-V. Enfin, la thrombine liée à GPIb α joue un rôle dans l'activité procoagulante des plaquettes indépendamment de PAR-1 et d' $\alpha_{IIb}\beta_3$, acteurs classiques de la génération de thrombine liée aux plaquettes (Dörmann 2000). L'hypothèse est que la liaison de la thrombine à GPIb α est capable d'induire l'expression de la phosphatidylsérine (PS) à la surface des plaquettes. Ceci est confirmée dans un modèle utilisant des plaquettes adhérentes à un réseau de fibrine, soumises à des contraintes rhéologiques différentes (Briedé 2003). A vitesse de cisaillement élevée (1000 s^{-1}), l'arrêt des plaquettes sur la fibrine fait intervenir l'interaction GPIb-facteur Willebrand, permettant une interaction stable entre $\alpha_{IIb}\beta_3$ et la fibrine ou le facteur Willebrand. Les auteurs démontrent que ni ces interactions, ni PAR-1 seul, n'entraînent une augmentation du calcium suffisante pour aboutir au *flip-flop* de la PS. L'activation de ces plaquettes par la thrombine, en revanche, permet d'obtenir une exposition de la PS sur le versant externe de la membrane. A l'inverse, la thrombine est sans effet en flux lent (50 s^{-1}), alors qu'elle permet l'exposition de la PS en présence de facteur Willebrand et de botrocétine. Il existe donc une coopération GPIb-facteur Willebrand-thrombine pour l'exposition optimale de la PS médiée par la thrombine, l'exposition de la PS et l'augmentation du calcium induites par la thrombine étant dépendantes de l'interaction des plaquettes avec le facteur Willebrand (*via* les contraintes de cisaillement ou l'utilisation de la botrocétine) (Briedé 2003). L'activité procoagulante des plaquettes induite par la thrombine, mesurée par un test de génération de

thrombine, est diminuée dans le syndrome de Bernard et Soulier, comparativement à des plaquettes témoins ou de patients porteurs d'une thrombasthénie de Glanzmann (Dicker 2001). Ce travail confirme la faible implication de PAR-1, alors que GPIb, et très probablement la coopération GPIb-GPIIb/IIIa, jouent un rôle fondamental dans le potentiel procoagulant des plaquettes (Dicker 2001). Dans des conditions rhéologiques correspondant à des contraintes de cisaillement faibles ou inexistantes, la fibrine polymérisée semble jouer un rôle important dans la génération de thrombine induite par les plaquettes (Béguin 2004). La fibrine se comporterait comme une "ristocétine naturelle", permettant la modification conformationnelle du facteur Willebrand. Ce travail confirme la diminution de la génération de thrombine dans le syndrome de Bernard et Soulier (Béguin 2004).

3. 5. Le facteur XI

La liaison du facteur XI à la surface des plaquettes activées est de haute affinité, réversible, et implique le domaine N-terminal de GPIb α . Le rôle de GPIb α (en tant que récepteur de haute affinité pour le facteur XI) est démontré chez des patients présentant un syndrome de Bernard et Soulier, et dans des essais de compétition de liaison, utilisant des anticorps anti-GPIb ou un autre ligand de GPIb α , tel le facteur Willebrand (Baglia 2002). La preuve directe de la liaison du facteur XI à la glycosylcaldine est apportée par la même équipe en résonance plasmonique de surface (Baglia 2002). L'interaction du facteur XI avec des plaquettes saines est optimale en présence de kininogène de haut poids moléculaire, et d'ions calcium et zinc. Dans ces conditions, il existe environ 1500 sites de fixation du facteur XI par plaquette. Le kininogène se lie au domaine A1 du facteur XI, ce qui permet une modification allostérique du domaine A3 impliqué dans la liaison du facteur XI aux plaquettes. En l'absence de kininogène de haut poids moléculaire, la liaison du facteur XI aux plaquettes reste possible, mais elle est diminuée de moitié, avec environ 800 sites par plaquette (Baglia 2002). GPIb α permet d'accélérer de 5000 à 10000 fois l'activation du facteur XI en facteur XIa par la thrombine, en colocalisant le facteur XI et la thrombine à la surface des plaquettes activées. Il est surprenant d'observer que le nombre total de GPIb par plaquette (25000) est bien supérieur à la capacité de liaison du facteur XI. Le fait que le facteur XI soit incapable de se lier aux plaquettes à l'état basal apparaît presque comme paradoxal, puisqu'après activation, les plaquettes internalisent environ 40% de leurs complexes GPIb-IX-V. Des éléments de réponse sont apportés par la mise en évidence de l'association de certains complexes GPIb-IX-V aux microdomaines membranaires riches en cholestérol, ou radeaux

lipidiques (Shrimpton 2002). En effet, 8% des complexes GPIb-IX-V (soit environ 2000 par plaquette) sont localisés au niveau de ces radeaux dans les plaquettes au repos, ce pourcentage augmentant après activation plaquettaire (26%, soit environ 6500 par plaquette) (Shrimpton 2002). Le facteur XI se lie à la GPIb présente dans les radeaux *via* son domaine A3. Dans les plaquettes activées par le TRAP, l'interaction avec les radeaux représente 5 à 8% du facteur XI total lié aux plaquettes (Baglia 2003). Les auteurs soulignent l'importance de l'intégrité du contenu lipidique de ces radeaux ; une déplétion en cholestérol inhibe d'environ 85% l'activation du facteur XI par la thrombine (Baglia 2003).

3. 6. Le facteur XII et le kininogène de haut poids moléculaire

Ils inhibent l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine, par un mécanisme de compétition de liaison pour GPIb (Bradford 1997, Bradford 2000). Le facteur XII non activé peut se lier à GPIb, mais seul le facteur XIIa inhibe l'agrégation plaquettaire (Bradford 2000).

II. $\alpha_{IIb}\beta_3$: β_3 intégrine plaquettaire

1. Introduction (rappel sur la famille des intégrines)

La glycoprotéine IIbIIIa (GPIIbIIIa), ou $\alpha_{IIb}\beta_3$, appartient à la famille des intégrines, récepteurs de répartition ubiquitaire dans l'organisme. Les intégrines permettent l'adhésion cellule/cellule et cellule/matrice, et jouent un rôle important dans la migration (Rybarczyk 2003), la prolifération (Rybarczyk 2003), la différenciation (Danen 2003) et la survie cellulaire (Stupack 2003). Elles sont également impliquées dans un certain nombre de pathologies : néoplasies et dissémination métastatique (Jin 2004), dysimmunité (Wehrle 2003), ischémie-reperfusion (Ruegg 2003), hémostasie et thrombose (Jackson 2003).

Les intégrines partagent une structure commune hétérodimérique, formée de deux sous-unités α et β associées de façon non covalente ; 18 sous-unités α et 8 sous-unités β sont décrites à ce jour (Hynes 2002). Leur association correspond à 24 hétérodimères différents, spécifiques d'un type cellulaire et d'un ou plusieurs ligands (figure 5).

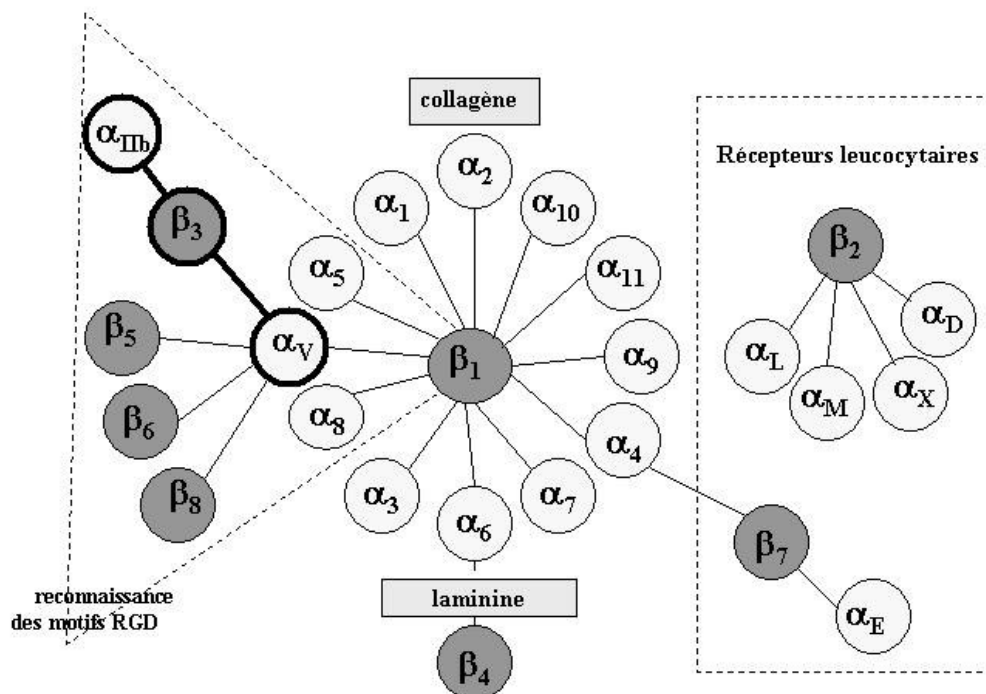


Figure 5. La famille des intégrines (d'après Hynes 2002)

Chaque sous-unité d'intégrines possède une partie intra-cytoplasmique très courte et un seul domaine transmembranaire. Le(s) site(s) de fixation pour le ou les ligands spécifiques et pour les cations divalents sont situés dans leur partie extracellulaire. Les échanges cellule-intégrine-cellule sont complexes. En effet, le rôle de ce type de récepteur ne se limite pas à une simple fonction d'adhésion. Les cellules régulent la liaison du ligand à l'intégrine via un processus appelé *inside-out*, et inversement, les intégrines clustérisées à la membrane et occupées par leur ligand, sont capables de transmettre des informations aux cellules (*outside-in*). Cette signalisation complexe est donc propagée le long de l'intégrine, sa particularité essentielle étant d'être bidirectionnelle (Calvete 1999, Shatill 1998).

Le sous-groupe des β_3 intégrines correspond aux hétérodimères associant une chaîne β_3 à des chaînes α différentes (figure 5). Deux β_3 intégrines sont actuellement décrites, $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$.

2. Structure d' $\alpha_{IIb}\beta_3$

Les plaquettes au repos expriment environ 50000 à 70000 complexes GPIIbIIIa à leur surface, et ont un stock interne localisé dans la membrane des granules α et du système canaliculaire connecté à la surface (30000 à 40000 copies de l'intégrine). L'expression du complexe à la surface des plaquettes est dépendante du calcium. L'hétérodimère est formé de deux chaînes, α_{IIb} et β_3 , associées de façon non covalente, qui comprennent respectivement 1008 et 762 acides aminés. Chacune d'entre elles possède une partie extra-cellulaire, composée de 90 à 95% de la totalité des acides aminés, une partie transmembranaire, et une courte partie intracytoplasmique. La partie extra-cellulaire a une structure globulaire correspondant au site de fixation des ligands (figure 6).

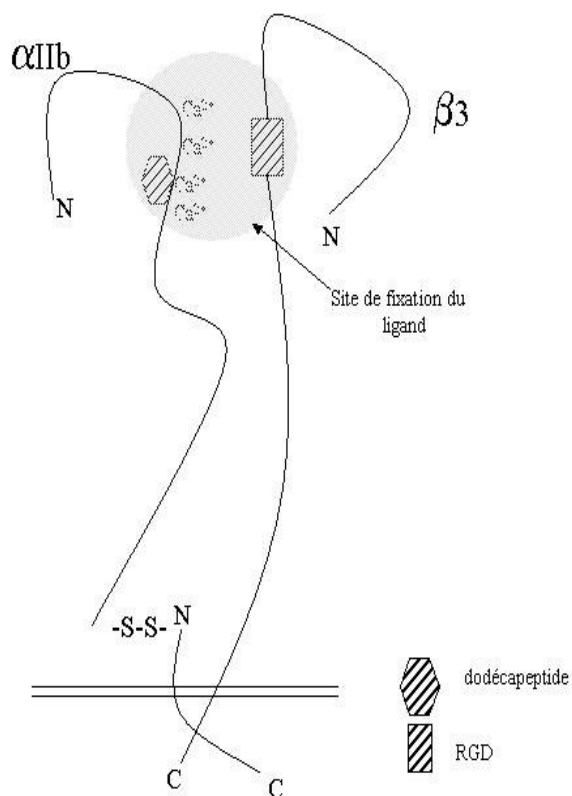


Figure 6. Structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

(d'après Phillips 2001)

Le site de fixation de β_3 pour les ligands (ici schématisé sous forme d'une structure unique), correspond à plusieurs séquences, distinctes et discontinues, de reconnaissance des motifs RGD (D'Souza 1998, Puzon-McLaughlin 2000, Mekrache 2002a)

2.1. La sous-unité α_{IIb} (GPIIb) :

La partie N-terminale (extra-cellulaire) d' α_{IIb} comprend environ 440 acides aminés, organisés en 7 séquences répétées d'une soixantaine d'acides aminés. Contrairement à d'autres chaînes α , α_{IIb} n'a pas de domaine I entre les séquences répétées 2 et 3. Quatre des 7 domaines sont EF-like, ils représentent des sites de liaison pour les cations divalents et pour la séquence dodécapeptide du fibrinogène. Les 7 séquences ont une conformation en hélice β constituée de 7 feuillets β (Hato 2001) (figure 7).

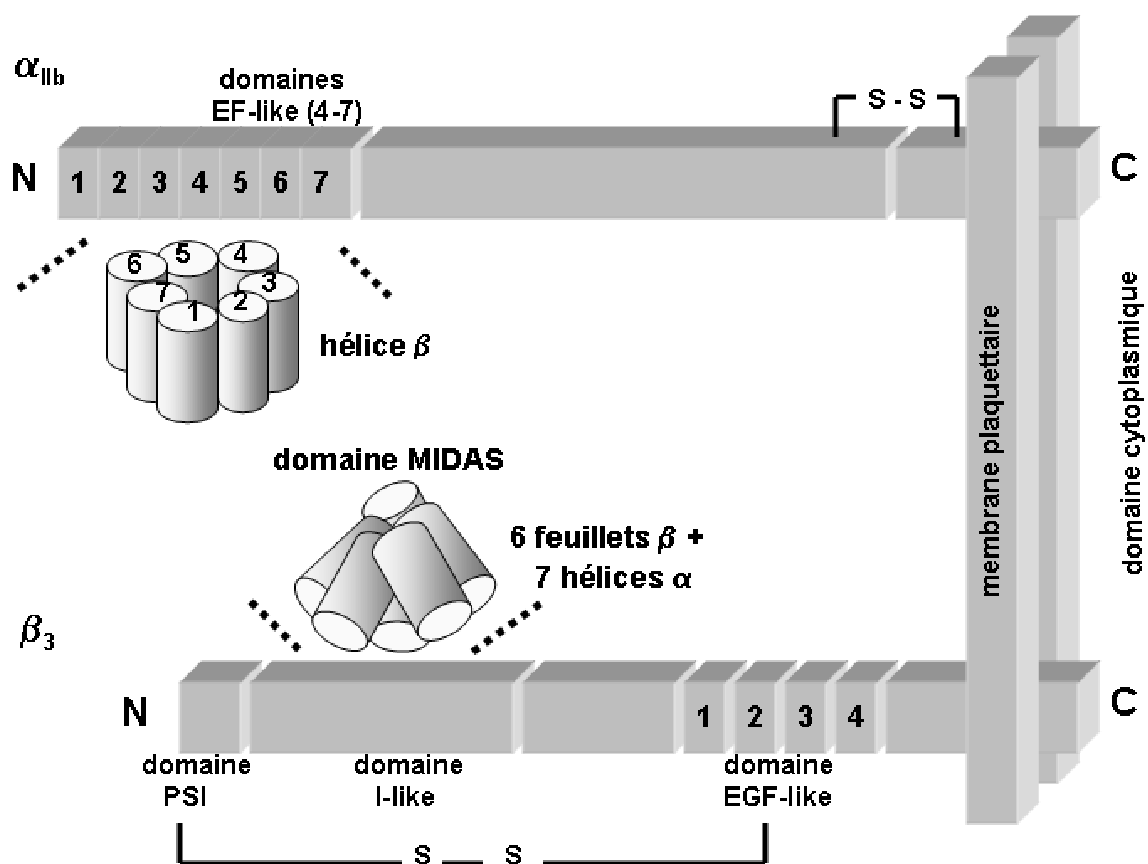


Figure 7. Structure extra-cellulaire d' $\alpha_{IIb}\beta_3$.

(d'après Hato 2002)

La partie intra-cytoplasmique comprend 20 acides aminés. Elle possède en N-terminal une structure en hélice, jusqu'au résidu P999. Le reste de la chaîne forme une boucle, permettant l'interaction entre l'extrémité C-terminale acide et l'extrémité N-terminale chargée

positivement (Vinogradova 2002) (figure 8). Les contacts entre les parties intra-cytoplasmiques d' α_{IIb} et de β_3 sont multiples, de type électrostatique et hydrophobique (Vinogradova 2002). Les résidus impliqués dans l'interaction α_{IIb} - β_3 sont hautement conservés dans les sous-unités α et β . Sur α_{IIb} , la séquence concernée correspond aux résidus 991 à 995 (séquence GFFKR) (figure 9). Les deux sous-unités sont très proches l'une de l'autre lorsque l'intégrine n'est pas activée (Adair 2002). La création de mutations ponctuelles dans la séquence 991-995 supprime les liaisons hydrophobes ou électrostatiques, entraînant la déstabilisation du complexe et un état d'activation permanent de l'intégrine (Vinogradova 2002).

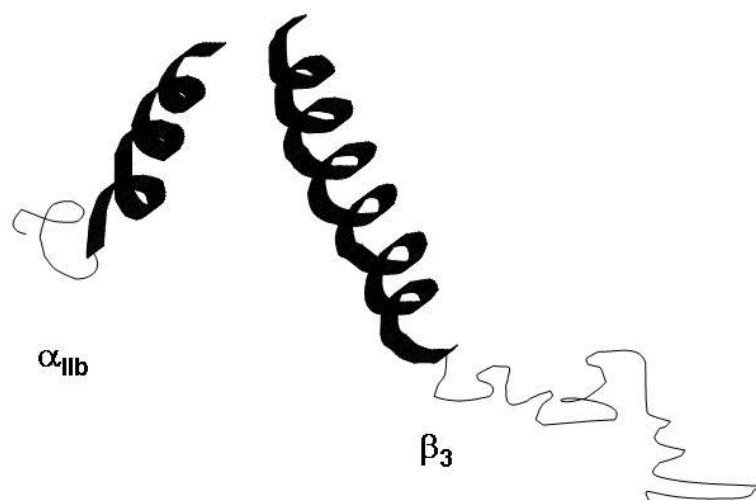


Figure 8. Structure des parties intra-cytoplasmiques des sous-unités α_{IIb} et β_3

Les régions N-terminales ont une conformation en hélice α (trait plein), les régions C-terminales ont une structure moins organisée (trait fin) (Vinogradova 2002)

2.2. La sous-unité β_3 (GPIIIa) :

La partie extra-cellulaire de la sous-unité β_3 comprend trois domaines majeurs : le domaine *PSI* (*plexins, semaphorins, integrins*), le domaine “*I-like*”, et le domaine “*EGF-like*” (*epidermal-growth-factor*) (figure 7).

Le domaine *PSI* comprend environ 90 acides aminés, sa fonction n'est pas totalement élucidée. Il est situé à la partie N-terminale de β_3 , mais il est très proche physiquement de la partie C-terminale du domaine extra-cellulaire, grâce à un pont disulfure reliant les cystéines en positions 5 (dans le domaine *PSI*) et 435 (dans le domaine *EGF-like*). La substitution de l'une ou l'autre de ces cystéines par un résidu alanine n'empêche pas l'association à GPIIb et ne diminue pas l'expression membranaire de l'intégrine. En revanche, la perte de ce pont disulfure entraîne l'activation de l'intégrine et sa liaison au fibrinogène (Sun 2002).

Le domaine "*I-like*" est compris entre les acides aminés 110 et 350. Il est l'équivalent des domaines I (I pour *Inserted*, encore appelé A par analogie au domaine A de liaison du facteur Willebrand au collagène), portés habituellement par les chaînes α . Sa caractérisation en cristallographie a permis de montrer qu'il a une structure organisée en 6 feuillets β , surmontés de 7 hélices α . A son sommet, le domaine "*I-like*" contient un domaine MIDAS (*metal-ion dependent adhesion site*), permettant les liaisons cation/carboxylate, c'est-à-dire entre ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} et les résidus acides (acide aspartique ou acide glutamique) des séquences RGD des ligands (Casadio 2002, Xiong 2001).

Le domaine "*EGF-like*" n'apparaît pas nécessaire à l'expression du complexe, et ne contient pas de site de liaison pour le ligand. Il s'agit très probablement d'une région régulatrice de la liaison aux ligands, puisque des mutations ponctuelles dans cette région, expérimentales ou observées dans des thrombasthénies de Glanzmann, entraînent une activation de l'intégrine (Ruiz 2001, Chen 2001, Kashiwagi 1999). La suppression de ponts disulfures, par délétion expérimentale ou simplement par le DTT (dithiothréitol), entraîne également l'activation permanente de l'intégrine (Butta 2003, Yan 2001).

La partie intra-cytoplasmique de la sous-unité β_3 comprend 47 acides aminés, avec une structure en hélice α en N-terminal (K716-K738), et une structure moins organisée en C-terminal (Vinogradova 2002) (figure 8). Comme pour α_{IIb} , des mutations dans l'hélice N-terminale entraînent un état d'activation permanent de l'intégrine. La séquence LLITIHD (717-723) de β_3 interagit avec la séquence GFFKR d' α_{IIb} par une liaison de type pont salin (appelé "*hinge region*") (figure 9). Cette interaction maintient $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans un état de faible affinité. Il reste à déterminer si physiologiquement, l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ nécessite obligatoirement l'interruption de cette interaction (Hato 2002).

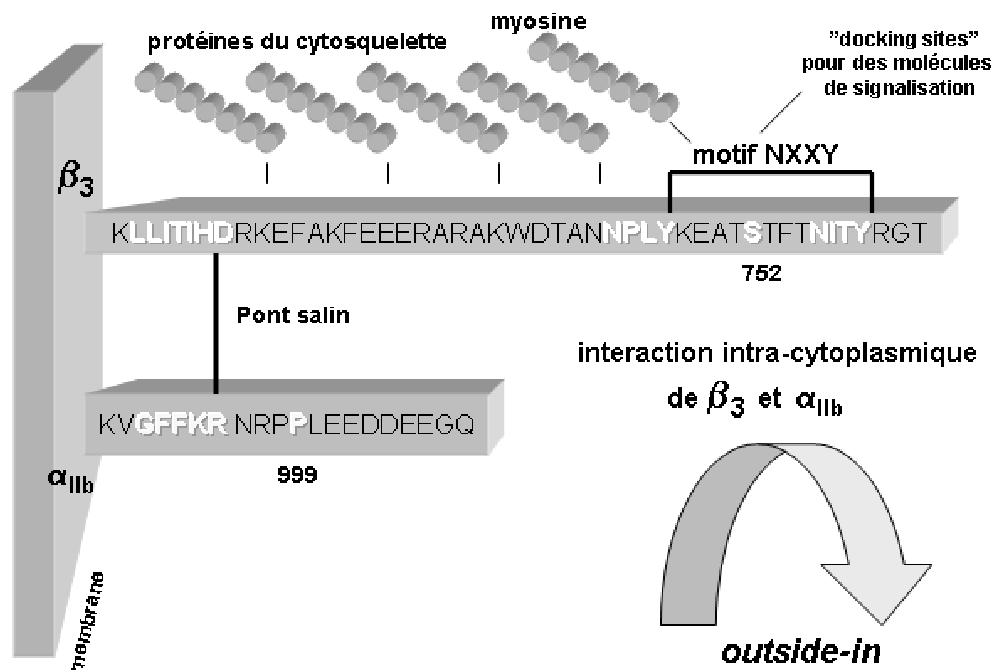


Figure 9. Interactions α_{IIb} / β_3 et molécules de signalisation.

(d'après Hato 2002)

L'étude de la liaison de la taline à l'intégrine suggère fortement que la déstabilisation du complexe est associée à l'activation de $\alpha_{IIb}\beta_3$. En effet, le site de liaison de la taline sur β_3 est très proche de celui impliqué dans l'interaction avec α_{IIb} . La compétition de liaison en faveur de la taline entraîne une suppression de l'interaction $\alpha_{IIb}\beta_3$, permettant la liaison du fibrinogène (Vinogradova 2002) (figure 10). L'interaction de la taline et de la sous-unité β_3 est une étape terminale et obligatoire dans la cascade de la signalisation aboutissant à l'activation de l'intégrine. Ceci est démontré dans un modèle de cellules CHO transfectées : des mutations ponctuelles dans β_3 au niveau des acides aminés impliqués dans l'interaction de la sous-unité avec la taline (Tyr⁷⁴⁷, Trp⁷³⁹, Leu⁷⁴⁶), ou la suppression de l'expression de la taline par ces cellules, inhibent la modification conformationnelle de l'intégrine (Tadokoro 2003). A la partie plus distale de la portion intra-cytoplasmique de β_3 , le résidu sérine en 752 semble jouer un rôle crucial dans la signalisation. Une mutation ponctuelle (Ser → Pro), mise en évidence chez un patient présentant une thrombasthénie de Glanzmann, est associée à un déficit à la fois de l'*inside-out* et de l'*outside-in*. De façon inattendue, la mutation Ser → Ala

est sans effet. Il semble, au vu de ces résultats, que la structure tertiaire soit plus importante que le type d'acide aminé lui-même. Enfin, les motifs NXXY, motifs conservés dans les chaînes β , jouent également un rôle important dans la signalisation bidirectionnelle liée à l'intégrine. Ils génèrent des *docking sites* pour des molécules de signalisation (Hato 2002) (figure 9).

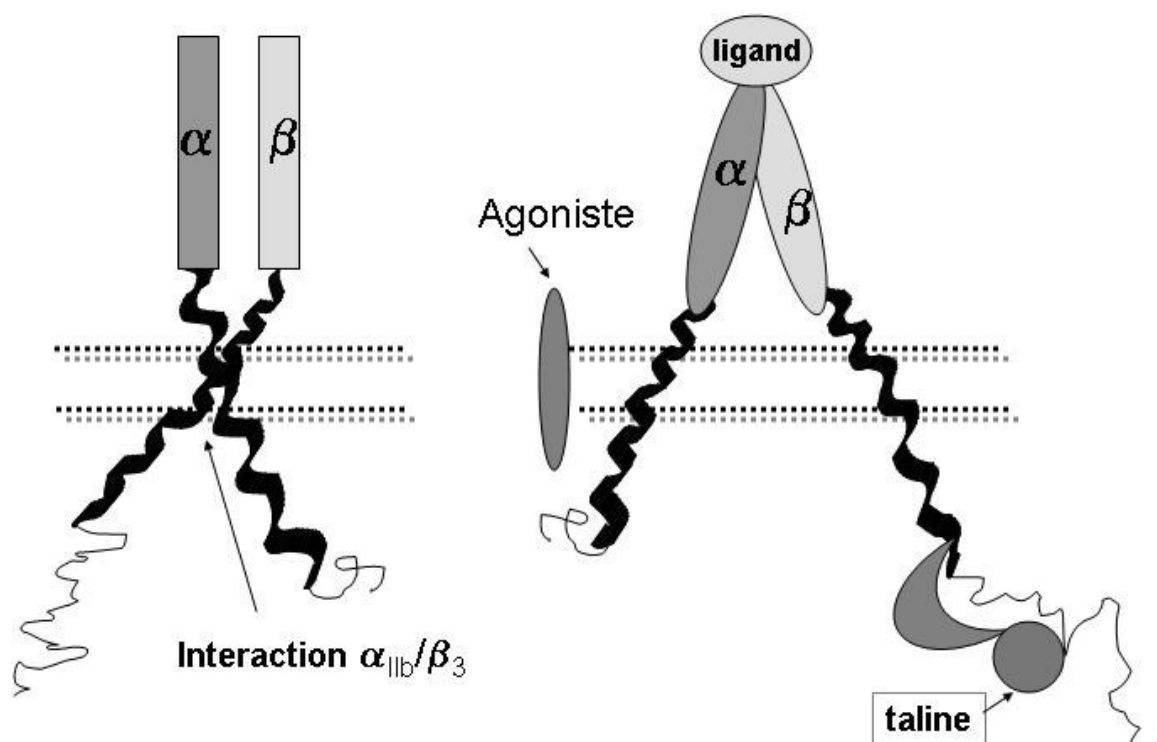


Figure 10. Interaction entre la taline et la partie intra-cytoplasmique de β_3
(Vinogradova 2002)

2.3. Les sites de fixation des ligands :

$\alpha_{IIb}\beta_3$ a pour ligands des macromolécules (fibrinogène, fibrine, facteur Willebrand, fibronectine, vitronectine), et la prothrombine. Tous ont une ou plusieurs séquences RGD, qui représentent le motif de reconnaissance par l'intégrine. Le fibrinogène a pour particularité, outre la présence de deux séquences RGD sur sa chaîne α , de posséder une autre séquence de reconnaissance par l'intégrine (dodécapeptide). Cette séquence est localisée sur la chaîne γ en position C-terminale.

Les sites de liaison d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ reconnaissent deux régions majeures : 1) l'hélice β de la sous-unité α_{IIb} , qui contient 4 sites de fixation pour les cations divalents et un site de reconnaissance pour la séquence dodécapeptide du fibrinogène (Gartner 1993, Farrel 1994, Zaidi 1996), et 2) le domaine “*I-like*” de β_3 possédant des sites de liaison pour les séquences RGD (D'Souza 1998, Puzon-McLaughlin 2000, Mekrache 2002a), et pour la chaîne γ du fibrinogène (Alemany 1996). Le domaine de reconnaissance de l'intégrine pour les séquences RGD des molécules adhésives est discontinu avec des sites de contacts multiples, impliquant sur β_3 les acides aminés 109-171 (D'Souza 1988), 129-134 et 179-183 (Bachelot 1995). Le site de liaison du facteur Willebrand est localisé sur β_3 en 171-174, il est donc proche, mais distinct, des sites impliqués dans la liaison au fibrinogène (Mekrache 2002a). Le fibrinogène se lie à l'intégrine également par sa chaîne γ , impliquant un site spécifique sur β_3 (acides aminés 274-368) (Alemany 1996) et un site sur α_{IIb} (acides aminés 294-314) (D'Souza 1988, D'Souza 1990).

Les cations divalents sont indispensables à la fixation des ligands. Ils sont également impliqués dans le maintien de la structure de l'intégrine. Les mutations des sites de fixation du Ca^{2+} chez des patients présentant une thrombasthénie de Glanzmann montrent leur importance dans le maintien de la conformation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$, requise pour le transport intracellulaire de l'hétérodimère à la membrane (Basani 1996, Poncz 1994).

3. Gènes, polymorphismes et expression

Les gènes codant pour GPIIb et pour GPIIIa sont situés en 17q21-23. La proximité de ces deux gènes contraste avec la dispersion chromosomique des gènes codant les différentes chaînes α (chromosome 2 pour la chaîne α du récepteur à la vitronectine, chromosome 12 pour la chaîne α du récepteur à la fibronectine, chromosome 17 pour α_{IIb}) (Sosnoki 1988).

Les gènes codant pour GPIIbIIIa sont très polymorphes. Ces polymorphismes sont associés à certaines thrombopénies néonatales et/ou purpura post-transfusionnel par allo-immunisation. Quinze systèmes allo-antigéniques, caractérisés en biologie moléculaire (désignés HPA pour *human platelet antigen*) sont décrits, dont 9 exprimés par β_3 (HPA-1, -4, -6, -7, -8, 10, 11, 14, 16) et 2 par α_{IIb} (HPA-3 et 9). Les autres systèmes HPA sont localisés sur α_2 (HPA-5), GPIb α (HPA-2, voir paragraphe GPIb-IX-V) et GPIb β (HPA-12) (Metcalf Vox Sanguinis 2003).

Le polymorphisme PI^{A1}/PI^{A2} (ainsi désigné dans toutes les études conduites en cardiologie, il correspond au système HPA-1a/HPA-1b, c'est-à-dire à la substitution de la leucine 33 par un résidu proline), a été largement étudié en tant que facteur de risque coronarien (Di Castelnuovo 2001).

$\alpha_{IIb}\beta_3$ est un récepteur restreint à la lignée mégacaryocytaire, contrairement à $\alpha_v\beta_3$, de répartition beaucoup plus large, puisqu'exprimée par les plaquettes, les cellules endothéliales et les leucocytes (Nurden 1997, Phillips 1988).

4. Les ligands

4.1. Fibrinogène :

Le fibrinogène est une molécule dimérique, constituée de trois chaînes polypeptidiques, α , β et γ , codées par trois gènes distincts. Les deux séquences RGDS sont localisées sur la chaîne α , en position 95-98 et 572-575, et la séquence dodécapeptide sur la chaîne γ en position 400-411. L'agrégation plaquettaire fait intervenir essentiellement la séquence dodécapeptide, située à l'extrémité C-terminale de la molécule de fibrinogène, contrairement aux deux séquences RGD, situées au centre du dimère. De plus, la séquence 95-98 a une structure fermée en triple hélice, inaccessible à l'anticorps monoclonal 155B16 spécifiquement dirigé contre cette séquence, et donc très probablement inaccessible à l'intégrine (Ugarova 1993). Le fibrinogène plasmatique, outre sa structure $\alpha\beta\gamma/\alpha\beta\gamma$, est également présent sous forme d'un hétérodimère $\alpha\beta\gamma/\alpha\beta\gamma'$, incapable d'interaction avec les plaquettes. La séquence dodécapeptide HHLGGAKQAGDV (chaîne γ) est remplacée par la séquence VRPEHPAETEDSLY (chaîne γ'), l'hétérodimère représentant environ 10% du fibrinogène plasmatique total (Chung 1984). L'utilisation de variants homodimériques $\gamma\gamma'$ et de peptides mimant l'extrémité carboxy-terminale de la chaîne γ ont permis de montrer que la séquence γ 400-411 était essentielle pour l'interaction avec $\alpha_{IIb}\beta_3$, sans que, pour autant, l'on puisse exclure un rôle potentiel pour d'autres séquences (Farrel 1994, Zaidi 1996). Les mutations créées dans les séquences RGD sont sans effet sur l'agrégation plaquettaire (Farrel 1994). La séquence dodécapeptide est capable d'interagir avec $\alpha_{IIb}\beta_3$ sans activation plaquettaire préalable, contrairement aux séquences RGD, à condition que le fibrinogène soit immobilisé sur une surface (Zaidi 1996). Cette capacité d'interaction avec des plaquettes activées et non activées joue probablement un rôle dans la croissance du thrombus, les

plaquettes non activées pouvant interagir avec le fibrinogène lié à la paroi vasculaire lésée ou à d'autres plaquettes. L'interaction fibrinogène- $\alpha_{IIb}\beta_3$ intervient en condition statique ou de flux artériolaire ou veineux ($\sim 800 \text{ s}^{-1}$), alors que des contraintes hémodynamiques plus fortes rompent les liaisons fibrinogène- $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Zaidi 1996).

Le fibrinogène lié à $\alpha_{IIb}\beta_3$, adsorbé sur une surface, ou clivé par la plasmine, modifie sa conformation, permettant l'exposition d'épitopes particuliers, appelés RIBS (*Receptor-Induced-Binding-Site*). Ces épitopes sont localisés dans les segments de connection entre les domaines E et D de la molécule de fibrinogène (figure 11). Ils ne sont pas exprimés à la surface du fibrinogène en solution (Ugarova 1993).

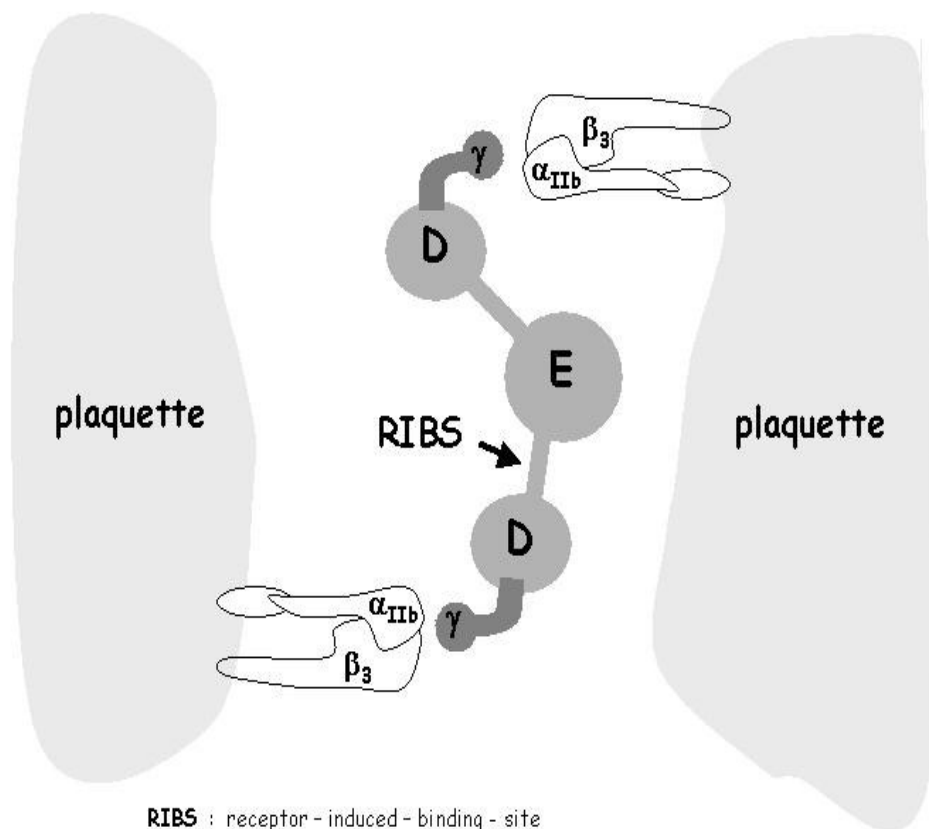


Figure 11. Interaction fibrinogène/plaquettes

Chaque molécule dimérique de fibrinogène ($\alpha\beta\gamma/\alpha\beta\gamma$) contient 6 sites potentiels de reconnaissance pour $\alpha_{IIb}\beta_3$ (une séquence dodécapeptide sur chacune des chaînes γ , et deux séquences RGD sur chacune des chaînes α).

La séquence dodécapeptide est la première impliquée dans la liaison du ligand aux plaquettes.

La liaison du fibrinogène à l'intégrine fait apparaître des sites antigéniques cryptiques sur la molécule de fibrinogène (RIBS pour Receptor-Induced-Binding-Site).

4.2. Le facteur Willebrand

Sa structure a été décrite dans le paragraphe I.3.1. L'interaction $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Willebrand nécessite obligatoirement l'activation de l'intégrine, induite par des agonistes plaquettaires comme la thrombine ou l'ADP, ou par la liaison du facteur Willebrand à GPIb (Ruggeri 2003). Le domaine A1 du facteur Willebrand est impliqué dans l'interaction avec GPIb, et la séquence RGD avec l'intégrine (figure 12). La liaison du facteur Willebrand à $\alpha_{IIb}\beta_3$ est inhibée par le fibrinogène, qui est présent dans le plasma ($\sim 9 \mu\text{M}$) à des concentrations bien supérieures à celles du facteur Willebrand ($\sim 1 \text{ nM}$). La fonction principale du facteur Willebrand est de permettre l'adhésion plaquettaire en conditions de flux rapide (voir chapitre IV "La formation du thrombus en conditions de flux").

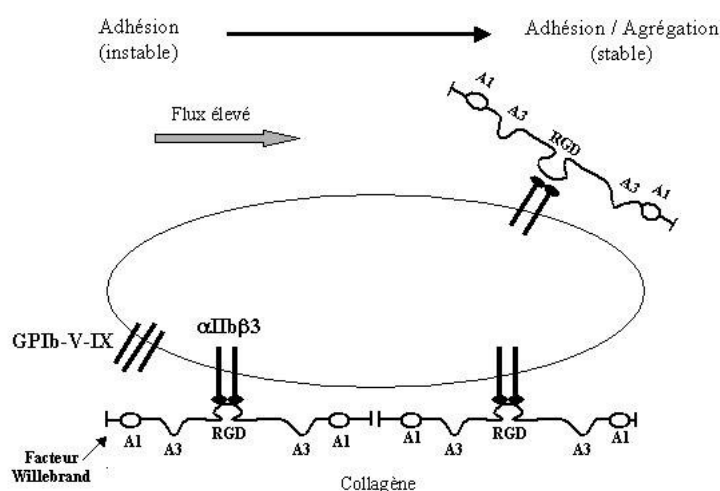
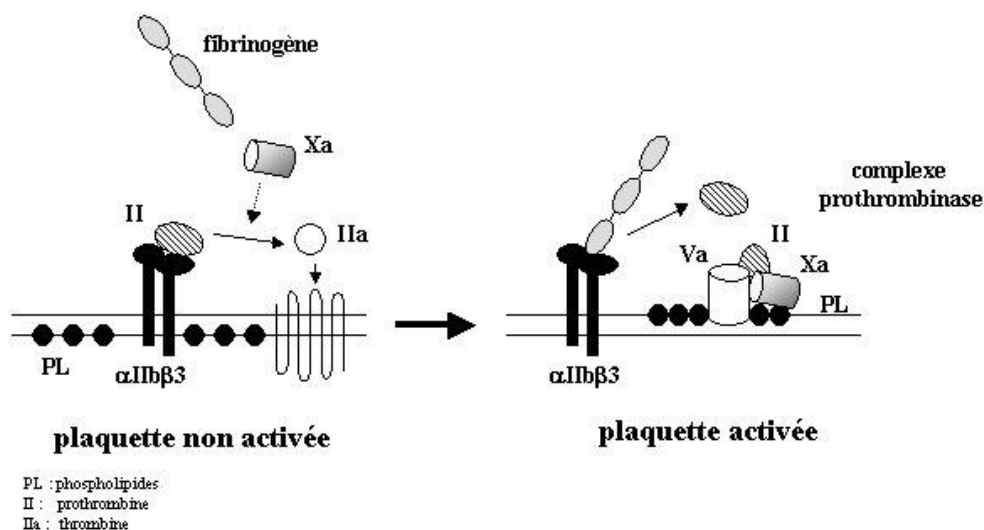


Figure 12. Interactions facteur Willebrand / plaquettes, en conditions de flux
(d'après Ruggeri 2003)

4.3 La prothrombine

L'interaction prothrombine-intégrine catalyse l'activation de la prothrombine en thrombine par le facteur Xa (Byzova 1997). La prothrombine possède une séquence RGD au sein de son domaine catalytique. Elle se lie à $\alpha_{IIb}\beta_3$ de façon spécifique, saturable, et dépendante des cations divalents, que les plaquettes soient activées ou non. Seuls la

prothrombine et certains produits intermédiaires de la conversion de la prothrombine en thrombine se lient à l'intégrine. L'orientation particulière de la séquence RGD à la surface de la thrombine rend cette séquence inaccessible pour la liaison à $\alpha_{IIb}\beta_3$. La thrombine n'est donc pas un ligand de l'intégrine. L'activation plaquettaire par le PMA (*phorbol myristate acetate*) ou l'ADP (adénosine diphosphate) ne majore pas la fixation de la prothrombine, qui est alors en compétition avec le fibrinogène. L'activation plaquettaire entraîne un déplacement de la liaison de la prothrombine en faveur du fibrinogène et du facteur Willebrand, et favorise la formation du complexe prothrombinase à la surface phospholipidique, fournissant un nouveau site d'activation de la prothrombine en thrombine (figure 13). La thrombine formée localement active les plaquettes *via* PAR1 et se lie à d'autres récepteurs plaquettaires (GPV, GPIb). Les traces de thrombine ainsi générées permettent l'engagement des autres ligands d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (fibrinogène et facteur Willebrand), l'exposition de nouveaux sites phospholipidiques, et le recrutement d'autres plaquettes (figure 13) (Byzova 1997, Plow 2001). La génération de thrombine est diminuée dans les thrombasthénies de Glanzmann (Reverter 1996), et pour tous les anti-GPIIbIIIa utilisés en thérapeutique ou en développement (Rao 1999, Keularts 1998, Herault 1998). Le mécanisme d'action du facteur VIIa recombinant (rVIIa), traitement désormais validé dans les thrombasthénies de Glanzmann iso-immunisées, dépend au moins en partie de la restauration de la génération de thrombine à la surface plaquettaire. Le facteur X plasmatique est activé en Xa par le rVIIa lié aux plaquettes, et permet l'activation de la prothrombine en thrombine en présence du Va d'origine plaquettaire. La thrombine se lie à ses récepteurs plaquettaires, PAR1 et GPIb, aboutissant *in fine* à l'augmentation de l'adhésion plaquettaire (Lisman 2003).



*Figure 13. Interactions prothrombine / $\alpha_{IIb}\beta_3$
 (modèle proposé par Plow 2001)*

4. 4. ICAM-4 :

ICAM-4 (CD242) est une molécule d'adhésion érythrocytaire, capable de se lier à la $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans sa conformation activée (Hermand 2003). Cette interaction spécifique de type ligand-récepteur est de description récente (Hermand 2003). ICAM-4 interagit aussi avec d'autres β intégrines. ICAM-4 n'a pas de séquence RGD : l'interaction avec l'intégrine implique ses 2 domaines "Ig-like" (l'un de ces deux domaines possède un motif analogue à la séquence dodécapeptide du fibrinogène). La participation des érythrocytes à la formation du thrombus n'est pas seulement la conséquence d'un "trapping" passif, mais bien le résultat d'une interaction des érythrocytes avec les intégrines leucocytaires, monocytaires, plaquettaires et endothéliales.

5. Signalisation liée à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

La réponse à une agression vasculaire, réponse aboutissant *in fine* à la formation d'un thrombus, se déroule schématiquement en trois étapes :

1. l'adhésion des plaquettes à l'endothélium lésé est initiée par le *rolling* plaquettaire, faisant intervenir la liaison du facteur von Willebrand (vWF) au complexe GPIb-V-IX, indépendamment de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$,
2. l'activation de l'intégrine via *l'inside-out* permet la fixation du ligand, entraînant une stabilisation de l'adhésion initiale et le début de l'agrégation,
3. enfin, l'étalement plaquettaire, l'agrégation stable et la formation du thrombus sont obtenus grâce à *l'outside-in*.

5.1. Signalisation *inside-out*

L'intégrine est maintenue dans un état de faible affinité dans les plaquettes non activées, ce qui leur permet de circuler librement alors qu'elles sont en contact avec des ligands solubles. La modification conformationnelle de l'intégrine est donc indispensable pour la liaison des ligands. Son activation résulte d'un processus dynamique impliquant différents récepteurs et différentes voies de signalisation, impliquées différemment en fonction du stimulus plaquettaire initial.

Les agonistes solubles (thrombine, ADP, épinéphrine, thromboxane A_2) se lient à des récepteurs couplés à des protéines G : PAR-1 et PAR-4 pour la thrombine, récepteurs P2Y1 et P2Y12 pour l'ADP, récepteur α_2 -adrénergique pour l'épinéphrine, récepteur TP α et TP β pour le thromboxane A_2 . L'activation de ces récepteurs entraîne la modulation des taux d'AMPc *via* l'adénylate cyclase, l'augmentation des flux calciques *via* la formation d'inositol phosphate (IP3), et l'activation des PKC *via* la formation de diacylglycerol (DAG) (Hato 2002, Woulfe 2002, Gachet 2001).

La liaison du facteur Willebrand à GPIb-V-IX, du collagène à GPVI et à l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, et d'immunoglobulines agrégées à Fc γ RIIa, activent également l'intégrine (Sims 1991, Hynes 2002). L'agrégation de plaquettes en suspension par du collagène soluble a une phase de latence plus longue que pour les autres agonistes, en raison du temps nécessaire à la polymérisation du collagène et à la clustérisation de GPVI (Woulfe 2002).

Quel que soit le couple agoniste (ou ligand)-récepteur, toutes les voies de signalisation convergent vers les séquences intra-cytoplasmiques d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Woulf 2002). Dans cette cascade

d'évènements, les protéines directement associées dans le cytoplasme à $\alpha_{IIb}\beta_3$ présentent un intérêt tout particulier, en tant que cible(s) thérapeutique(s) potentielle(s). Treize d'entre elles sont identifiées, leurs interactions avec l'intégrine ont été démontrées *in vitro* (tableau I).

Protéines	Intégrine
Molécules de signalisation	
Shc	β_3
FAK	β_3
Paxilline	β_3
ILK	β_3
Protéines du cytosquelette	
Skelémine	β_3
Filamine	α_{IIb} ou β_3
α -actine	β_3
Taline	α_{IIb} et β_3
Myosine	β_3
Autres protéines	
β_3 -endonéxine	β_3
CIB	α_{IIb}
Calreticuline	α_{IIb}
CD98	β_3
CIB calcium and integrin binding protein	

*Tableau I. Protéines associées aux séquences intra-cytoplasmiques d' $\alpha_{IIb}\beta_3$
(Hato 2002)*

La régulation de la liaison du ligand au récepteur fait intervenir des mécanismes 1) de modification structurale, ou *switch* conformationnel, (notion d'affinité, étape réversible de liaison du ligand à l'intégrine), 2) et de redistribution des complexes $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la membrane, ou clustérisation (notion d'avidité, étape irréversible). Il est habituel de distinguer affinité et avidité, même si, en pratique, ces deux composantes sont difficiles à différencier (figure 14). L'affinité correspond à une modification conformationnelle de chacun des récepteurs,

aboutissant *in fine* à l'augmentation de la force et de la durée de chaque liaison récepteur-ligand. L'avidité implique la redistribution des récepteurs au sein de la membrane, permettant d'augmenter l'adhésion cellulaire en augmentant le nombre de liaisons ligand-récepteur (Arya 2003).

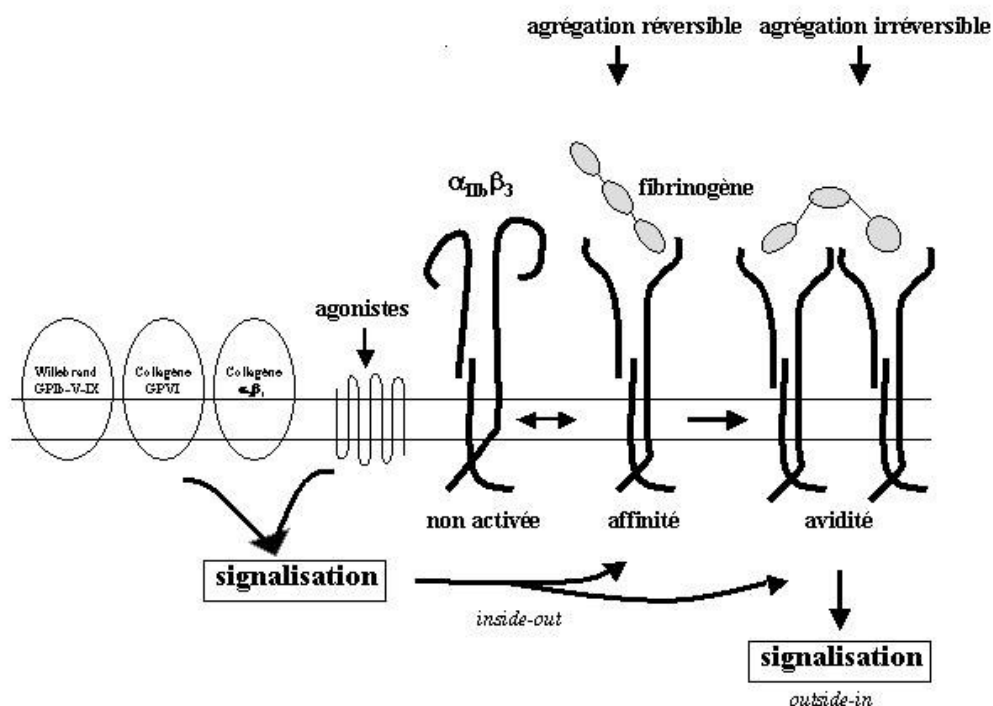


Figure 14. La signalisation liée à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$
(d'après Shattil 1998, Jackson 2003)

L'activation plaquettaire, *via* la signalisation *inside-out*, expose le site de liaison du domaine I, qui devient apte à fixer le ligand. De plus, la modification de l'orientation des deux sous-unités α et β l'une par rapport à l'autre rend accessible le site de liaison d' α_{IIb} , masqué dans les plaquettes au repos par le domaine I (Loftus 1997).

5.2.L'outside-in

Les modifications conformationnelles et le *clustering* des intégrines sont nécessaires pour que la signalisation *outside-in* soit totale, permettant la réorganisation du cytosquelette,

la sécrétion des granules α et des granules denses, la libération de thromboxane A₂, l'étalement plaquettaire, la deuxième phase de l'agrégation plaquettaire, la formation de microparticules procoagulantes, la stabilisation de l'agrégat, et la rétraction du caillot (Shattil 1998, Calvette 1999, Phillips 2001). Les modèles de cellules CHO transfectées en $\alpha_{IIb}\beta_3$ ont permis de mettre en évidence au moins trois voies de signalisation, impliquant l'activation de Syk, l'activation de la protéine p125^{FAK}, et la phosphorylation des tyrosines de la sous-unité β_3 (Hato 2002). Les tyrosines des deux motifs NXXY (Y⁷⁴⁷ et Y⁷⁵⁹) de β_3 sont phosphorylées lors de l'agrégation plaquettaire. Ces motifs génèrent des *dockings sites* pour des molécules de signalisation (figure 9). Ils sont également nécessaires à la rétraction du caillot, en raison de leur interaction avec la myosine (Hato 2002).

Nota bene

Des définitions précises et la modification de certains termes concernant les intégrines ont été proposés récemment et sont rapportées ci-après (nous n'avons pas employé cette terminologie nouvelle dans notre revue de la littérature) (Carman 2003):

- *régulation de l'affinité : modifications de l'affinité monomérique, soit l'affinité intrinsèque de chaque couple récepteur-ligand, liées à une modification de la conformation de l'intégrine ou à une modification de l'équilibre entre les différents états conformationnels de l'intégrine*

- *régulation de la valence (remplaçant le terme avidité, utilisé en immunochimie pour désigner la force d'adhésion totale, c'est-à-dire l'affinité monomérique décrite précédemment et le nombre total de liaisons ligand-récepteur, alors que le terme avidité habituellement utilisé pour les intégrines n'inclut pas l'affinité) : modification de la diffusion du récepteur à la surface cellulaire, ou modification de sa densité locale, ou modification de la géométrie de l'interaction ligand-récepteur, ce qui entraîne une modification du nombre d'interactions ligand-récepteur*

- *priming (remplaçant le terme inside-out signaling) : événements de la régulation qui précèdent la liaison au ligand (ou qui est indépendante), et qui aboutissent à une augmentation de l'efficacité de la liaison*

- *renforcement de l'adhésion (remplaçant le terme clustering) : étape dépendante du ligand, donc post-adhésion, qui permet l'augmentation de la force d'adhésion, soit par accumulation de récepteurs au niveau de la zone de contact avec le ligand, soit par augmentation de l'interaction intégrine-cytosquelette*

- *activation induite par le ligand (remplaçant le terme outside-in signaling) : propagation de la signalisation intra-cellulaire induite par la liaison du ligand.*

III. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)

1. Introduction

La famille Ena/VASP comprend trois protéines retrouvées chez les vertébrés, les protéines Mena (*Mammalian Enabled*), VASP, et EVL (*Ena-VASP-like*), et deux protéines présentes chez les invertébrés, Ena chez la drosophile (*Drosophila Enabled*) et UNC-34 chez *Caenorhabditis elegans* (Kwiatekowski 2003).

Tous les membres de cette famille partagent des structures conservées au niveau de trois domaines majeurs : un domaine central riche en proline, encadré de deux régions distinctes appelées EVH1 et EVH2 (*Ena VASP Homology*). Le domaine EVH1 est impliqué dans la localisation des protéines Ena/VASP dans les plaques d'adhésion focales, *via* l'interaction directe avec un motif consensus, (D/E)-FPPPP-X(D/E)(D/E), présent dans la vinculine, la zyxine et la palladine. Ces protéines étant associées à l'actine, leur liaison au domaine EVH1 permet le recrutement de VASP sur les sites de polymérisation de l'actine (Boukhelifa 2004). Le domaine central riche en proline interagit avec la profiline, et le domaine EVH2 possède des sites de liaison pour l'actine (F et G) (Kwiatekowski 2003).

Les protéines Ena/VASP sont des substrats des PKA et PKG (*cAMP- and cGMP-induced protein kinases*). VASP possède trois sites de phosphorylation situés à proximité de la région riche en proline, les protéines EVL et Mena possédant respectivement un et deux sites de phosphorylation. La phosphorylation module de façon négative les interactions avec l'actine, sans modifier les interactions avec la profiline, la vinculine et la zyxine (Kwiatekowski 2003, Harbeck 2000).

L'ensemble de ces interactions est schématisé dans la figure 15.

Les protéines Ena/VASP sont ubiquitaires et interviennent dans nombre de fonctions biologiques : adhésion cellule-cellule et cellule-matrice, orientation des cellules axonales, fermeture du tube neural, mobilité des fibroblastes, activation des cellules T, phagocytose, inhibition de l'activation plaquettaire (Kwiatekowski 2003).

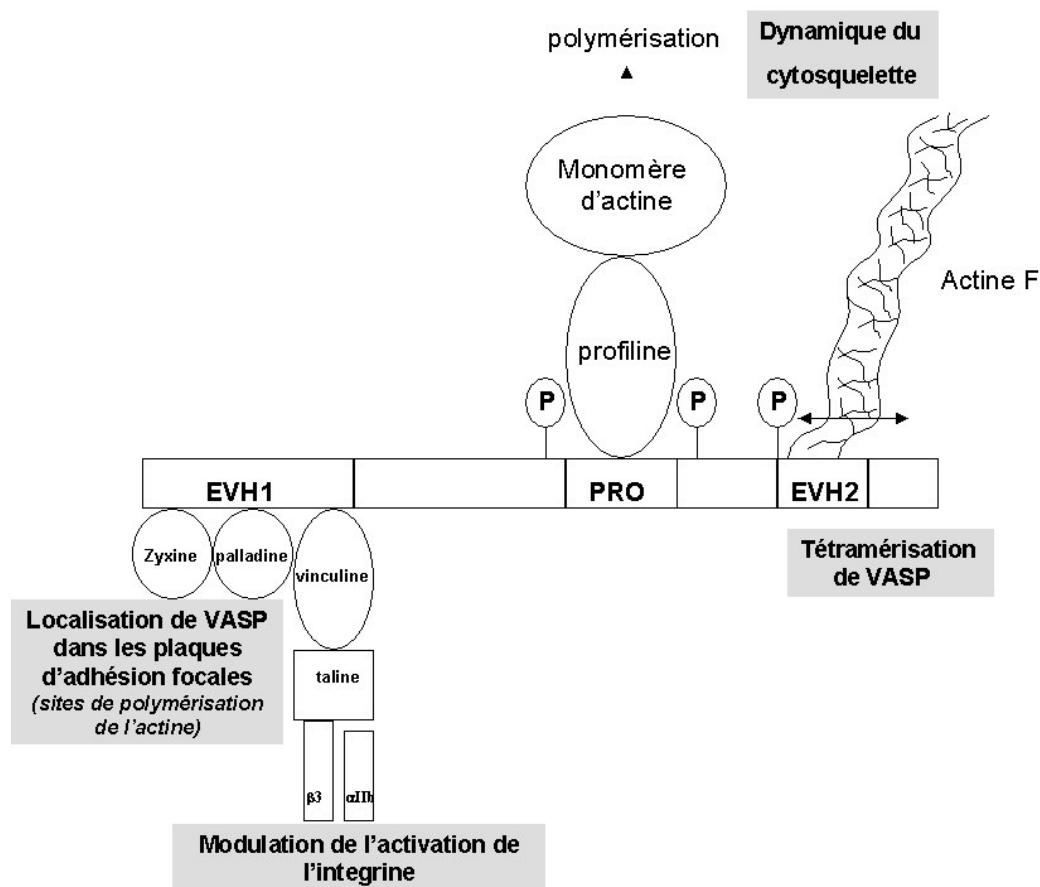


Figure 15. Interactions de VASP avec son environnement moléculaire

La phosphorylation des sites sérines (figurés en P) inhibe l'interaction avec l'actine ($\leftrightarrow$).
Schéma proposé d'après les références suivantes : Boukhelifa 2004, Kwiatkowski 2003, Harbeck 2000, Tadokoro 2003

2. VASP et plaquettes humaines

2. 1. Localisation :

Dans les plaquettes, VASP est présente en concentrations élevées au niveau des zones d'adhésion focales et des fibres de stress (Reinhard 1992). Les plaques d'adhésion focales sont des structures capables de signalisation bidirectionnelle, qui associent les domaines transmembranaires des intégrines, des protéines du cytosquelette (actine, vinculine, zyxine, taline, tensine), et des protéines régulatrices en terme de signalisation (PKC, FAK, c-Src)

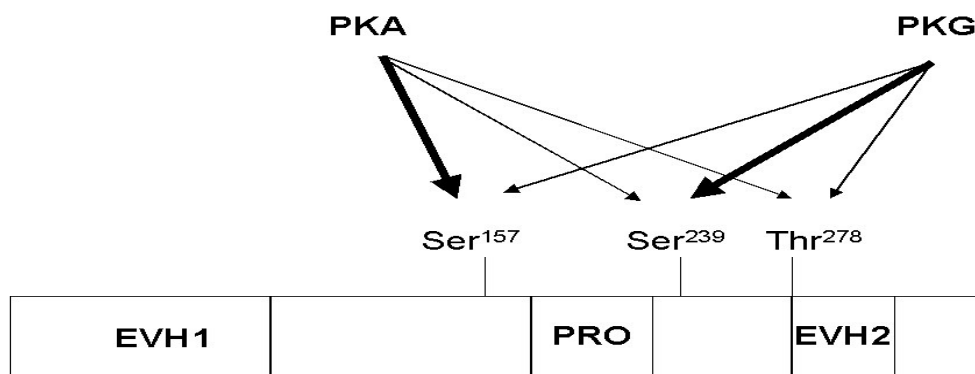
(Haffner 1995). Le nombre de molécules VASP est équivalent à celui de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, soit environ 80 000 sites par plaquette (Smolenski 1998).

2. 2. Structure :

Le domaine EVH1 interagit avec différentes protéines associées à l'actine (palladine, zyxine, vinculine) (figure 15). Ce domaine permet de localiser spécifiquement VASP sur les sites de polymérisation de l'actine au sein des plaques d'adhésion focales. La taline, protéine du cytosquelette décrite précédemment comme jouant un rôle clé en tant qu'étape finale et commune de la signalisation aboutissant à l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (voir paragraphe II.2.2.), se lie à la vinculine et est donc logiquement localisée dans les plaques d'adhésion focales (figure 15) (Gilmore 1993, Nuckolls 1990). La liaison de la profiline au site riche en proline de VASP permet le recrutement des monomères d'actine et leur polymérisation. Enfin, le domaine EVH2 est impliqué dans la liaison à l'actine F (actine polymérisée) et dans la tétramérisation de VASP, les sites critiques étant respectivement 259-276 et 343-380 (Bachmann 1999). La tétramérisation favorise les interactions avec l'actine (Bachmann 1999), qui sont de type électrostatiques (Huttelmaier 1999).

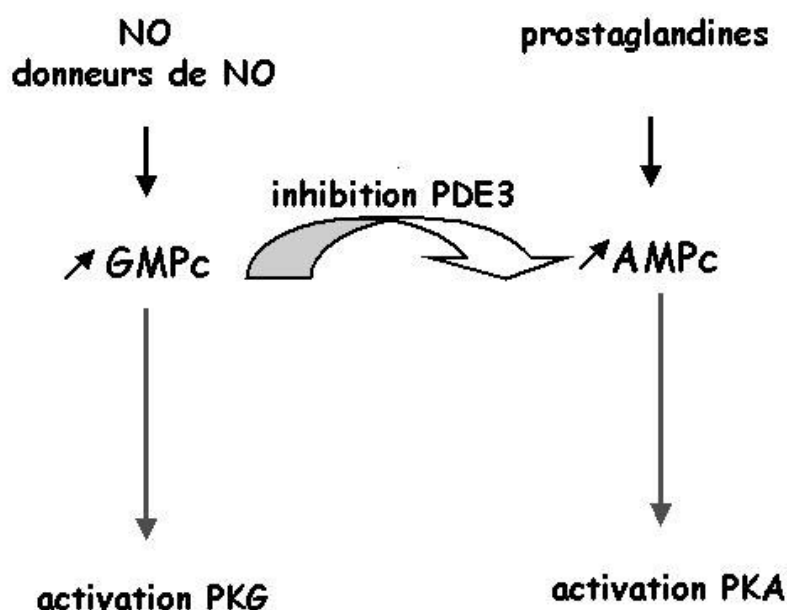
2. 3. La phosphorylation de VASP :

VASP est déphosphorylée dans les plaquettes à l'état basal. Sa phosphorylation est rapide lorsque les PKA et PKG sont activées, et réversible (Smolenski 1998, Horstrup 1994). Les essais en système purifié ont montré que la phosphorylation des deux sérines faisaient intervenir distinctement la PKA pour la sérine 157 (*via* l'augmentation de l'AMPc induite par les prostaglandines), et la PKG pour la sérine 239 (*via* l'augmentation du GMPc induite par le monoxyde d'azote -NO-, ou les donneurs de NO) (figure 16).



*Figure 16. Les sites de phosphorylation de VASP
(d'après Smolenski 1998, Fox 2001)*

Cette dichotomie entre les deux voies n'est pas retrouvée de façon aussi marquée dans les plaquettes humaines (Li 2003a). La phosphorylation de VASP induite par les analogues du GMPc ou les donneurs de NO n'est pas exclusivement médiée par la PKG. Le GMPc entraîne une augmentation des concentrations d'AMPc, par inhibition de la PDE3 (phosphodiesterase 3), enzyme impliquée dans l'hydrolyse de l'AMPc (figure 17) (Li 2003a, Walford 2003). Le *cross-talk* entre les voies des PKG et PKA est également démontré par le fait que seuls les inhibiteurs de PKA sont capables d'inhiber l'action du GMPc (Li 2003a).



NO monoxyde d'azote
PDE3 phosphodiesterase 3

Figure 17. Cross-talk entre les voies PKA et PKG dans les plaquettes humaines (proposé d'après Li 2003a)

*Le GMPc entraîne une augmentation de l'AMPc en inhibant la PDE3.
 L'action du GMPc est inhibée uniquement par les inhibiteurs de PKA.*

Le rôle du GMPc a fait l'objet de controverses dans la littérature. Il est décrit initialement comme inhibant l'activation plaquettaire. Ceci est démontré avec les analogues du GMPc et les donneurs de NO, qui augmentent les concentrations de GMPc. De façon paradoxale, les agonistes plaquettaires (thrombine, ADP, collagène) sont également capables d'induire une augmentation du GMPc. Une explication à ce paradoxe est apportée récemment (Li 2003b). Le GMPc entraîne, en fait, une réponse plaquettaire biphasique : une réponse précoce de type activation plaquettaire, alors que la phosphorylation de VASP et l'inhibition plaquettaire surviennent dans un second temps (figure 18). Ces deux étapes conduisent dans un vaisseau sain à l'initiation de la formation du thrombus, puis à la limitation de sa taille (Li 2003a, Li 2003b).

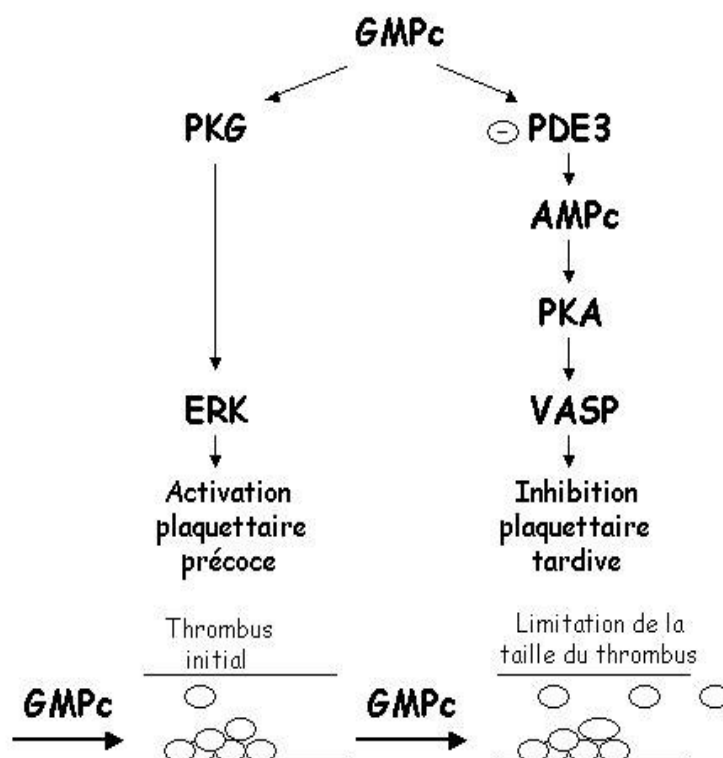


Figure 18. Réponse plaquettaire biphasique en réponse au GMPc
(d'après Li 2003a, Li 2003b)

La première phase de la réponse au GMPc (activation plaquettaire) serait PKG dépendante et ferait intervenir les protéines ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) (figure 18) (Li 2003b). D'après ces auteurs, l'activation plaquettaire initiale ne pouvant être obtenue par la seule augmentation du GMPc, l'exposition des plaquettes à la thrombine et au facteur Willebrand serait indispensable. Il ne serait donc pas improbable que l'augmentation du GMPc joue un rôle important dans l'activation plaquettaire dépendante de GPIb-IX. Ainsi, la signalisation déclenchée par les complexes GPIb-IX-IIa et GPIb-IX-Willebrand pourrait impliquer la voie des PKG (Li 2003b). Ces notions ont fait l'objet d'un débat contradictoire dans la littérature (Du 2004, Senis 2004), puisqu'il est également démontré que l'activation plaquettaire médiée par GPIb ne fait intervenir ni les PKG ni les protéines ERK (Marshall 2004). La deuxième phase de la réponse au GMPc (inhibition plaquettaire) est retardée. Elle nécessite sur le plan expérimental des concentrations élevées de GMPc. Le *cross-talk* entre les

voies des PKA et PKG est probablement un mécanisme majeur permettant la phosphorylation de VASP et l'inhibition plaquettaire (figure 18).

Une autre kinase, la PKC, est également capable de moduler la phosphorylation de VASP sur la sérine 157; ceci est rapporté récemment pour les cellules musculaires lisses (Chitaley 2004).

2. 4. Fonctions :

L'implication réelle de VASP in vivo dans la régulation négative de l'activation plaquettaire n'a été publiée que récemment (Massberg 2004). L'adhésion plaquettaire sur la paroi vasculaire est augmentée chez la souris VASP^{-/-}, à la fois dans des conditions physiologiques et pathologiques (ischémie-reperfusion, athérosclérose et dénudation veineuse). La P-sélectine et GPIIbIIIa sont impliquées dans les interactions plaquettes-cellules endothéliales chez les souris VASP^{-/-}; ces résultats confirment la régulation négative de VASP sur l'expression de la P-sélectine et l'inhibition de l'activation de GPIIbIIIa (Hauser 1999). Dans ce modèle murin, la présence de VASP dans les cellules endothéliales et dans les cellules musculaires lisses est essentielle au contrôle des interactions plaquettes-endothélium en conditions physiologiques, mais n'est pas suffisante pour inhiber l'adhésion plaquettaire en cas de perte de l'intégrité de l'endothélium (dysfonction endothéliale ou dénudation endothéliale) (Massberg 2004).

Il est possible d'inhiber la phosphorylation de VASP induite par les prostaglandines ou les donneurs de NO. Ainsi, l'ADP, la thrombine ou l'épinéphrine, sont capable d'induire la déphosphorylation de VASP. Ceci fait de VASP un outil novateur pour le suivi biologique de certaines thérapies anti-plaquettaires : les antagonistes sélectifs des récepteurs à l'ADP, les inhibiteurs de PDE3, et les médicaments donneurs de NO (Schwartz 1999, Baragan 2003, Sudo 2003, Sims 2004, Aktas 2003, Vilahur 2004, Schäfer 2004).

IV. La formation du thrombus plaquettaire en condition de flux

1. Introduction

L'organisation spatiale et dynamique du thrombus plaquettaire en conditions de flux se déroule schématiquement en deux étapes successives. La phase initiale correspond à l'expansion bidimensionnelle du thrombus à la surface de la lésion vasculaire (adhésion plaquettaire). Le développement tridimensionnel du thrombus en permet sa stabilisation (agrégation plaquettaire). Facteur Willebrand et fibrinogène jouent des rôles distincts, spécifiques, et complémentaires. Le fibrinogène s'accumule à l'intérieur du thrombus, alors que la surface du thrombus, exposée au flux sanguin, est constamment recouverte de facteur Willebrand (Matsui 2002).

Seul le facteur Willebrand permet la croissance bidirectionnelle de l'agrégat. Il est impliqué de façon séquentielle dans la formation de l'agrégat : adhésion instable via l'interaction entre le domaine A1 et GPIb α , puis mise en jeu d'autres couples ligands/récepteurs pour permettre un attachement stable. L'adhésion à GPIb α , même instable et réversible, permet de maintenir les plaquettes en contact suffisamment étroit avec la paroi lésée pour engager les récepteurs au collagène (GPVI, $\alpha_2\beta_1$) et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Ruggeri 2001). Ainsi, le facteur Willebrand immobilisé à la surface du vaisseau permet le contact initial plaquette/sous-endothélium, et le facteur Willebrand d'origine plasmatique, présent sur les plaquettes qui ont adhéré, permet la formation d'un second niveau d'adhésion sur ce thrombus en formation, en faisant intervenir GPIb α et $\alpha_{IIb}\beta_3$. L'intégrine est indispensable pour l'adhésion stable en conditions de flux élevé, indépendamment de GPIb, car le taux de dissociation du complexe GPIb α /Willebrand est élevé (Mekrache 2002b).

La solidité et la croissance tridimensionnelle du thrombus font intervenir obligatoirement le fibrinogène. Les conditions rhéologiques se modifient avec la croissance du thrombus : la diminution de la lumière du vaisseau s'accompagne à la périphérie du thrombus d'une augmentation considérable des contraintes de cisaillement. Le facteur Willebrand ne permet pas une solidité suffisante de l'agrégat vis à vis de telles contraintes rhéologiques. Le fibrinogène, probablement en raison d'un taux de dissociation plus faible

que le facteur Willebrand, joue un rôle essentiel dans l'organisation tridimensionnelle. Initialement localisé dans les zones où les forces de cisaillement sont les plus faibles (au centre du thrombus), il remplace graduellement le facteur Willebrand (Matsui 2002).

2. Flux sanguin artériel ou veineux : les contraintes rhéologiques

Les interactions ligands-récepteurs nécessaires à la formation du thrombus ont été évoquées précédemment. La vitesse du flux dans le vaisseau conditionne très fortement la nature des événements permettant la formation du thrombus : les interactions mises en jeu sont différentes en flux rapide et en flux lent (Jackson 2003). Elles sont répertoriées dans le tableau suivant.

Protéine	Récepteur d'adhésion	Contraintes de cisaillement optimales (s ⁻¹)
fibrinogène	$\alpha_{IIb}\beta_3$	500-1 000
facteur Willebrand	GPIb	> 4 000
fibronectine	$\alpha_2\beta_5$	300
	$\alpha_{IIb}\beta_3$	
collagène de type I	$\alpha_2\beta_1$	>4 000
	GPVI	
collagène de type III	$\alpha_2\beta_1$	> 4 000
	GPVI	
collagène de type IV	$\alpha_2\beta_1$	1 600
laminine	$\alpha_6\beta_1$	800
vitronectine	$\alpha_{IIb}\beta_3$	0

*Tableau II. Interactions récepteurs-ligands en fonction des contraintes rhéologiques
(d'après De Groot 2002)*

A titre d'exemple, les contraintes de cisaillement dans un arbre vasculaire normal sont comprises entre 400 et 4 700 s⁻¹, selon le type de vaisseau (veine, artère, artériole), et sont très fortement augmentées dans un vaisseau sténosé (de 20 000 à 40 000 s⁻¹ dans une sténose coronaire de 90%) (Ruggeri 2003). Le tableau suivant (tableau III) présente les

caractéristiques des flux vasculaires selon le type de vaisseau et sa localisation dans l'arbre vasculaire.

Vaisseau	Diamètre (cm)	Contraintes de cisaillement (s ⁻¹)
aorte ascendante	2,3-4,5	50-300
artère fémorale	0,5	350
artères de petit diamètre	0,03	1 500
capillaires	0,0006	2 000-5 000
grosses veines	0,5-10	200
veine cave inférieure	2,0	50
sténoses artérielles	0,025	40 000

Tableau III. Les caractéristiques des contraintes de cisaillement dans l'arbre vasculaire (d'après De Groot 2002)

3. Contraintes de cisaillement et tests biologiques

Les tests biologiques à notre disposition miment ou non ces conditions de flux. En agrégométrie et en cytométrie en flux, l'activation plaquettaire est déclenchée uniquement par l'utilisation d'agonistes solubles, puisque les plaquettes sont étudiées en conditions statiques (ou avec une agitation simple pour l'agrégométrie). Dans ces conditions, les acteurs impliqués sont l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et le fibrinogène (figure 19) (Kulkarni 2000). L'agrégation plaquettaire est obtenue même en l'absence de facteur Willebrand. En revanche, des contraintes de cisaillement sont appliquées dans les systèmes automatisés comme le Cone and Plate(let) Analyzer (CPA) et le Platelet Function Analyzer (PFA-100™) : 1300 s⁻¹ pour le CPA, 5000-6000 s⁻¹ pour le PFA-100™ (Linder 2002, Kundu 1995). Du collagène recouvrant une plaque (CPA) ou une membrane (PFA-100™) représente la matrice extra-cellulaire. Le PFA-100™ utilise également des agonistes plaquettaires (ADP ou épinéphrine). Dans ces techniques dites en flux, l'adhésion stable des plaquettes implique la liaison du facteur Willebrand à GPIb et à $\alpha_{IIb}\beta_3$, sans participation du fibrinogène (figure 19).

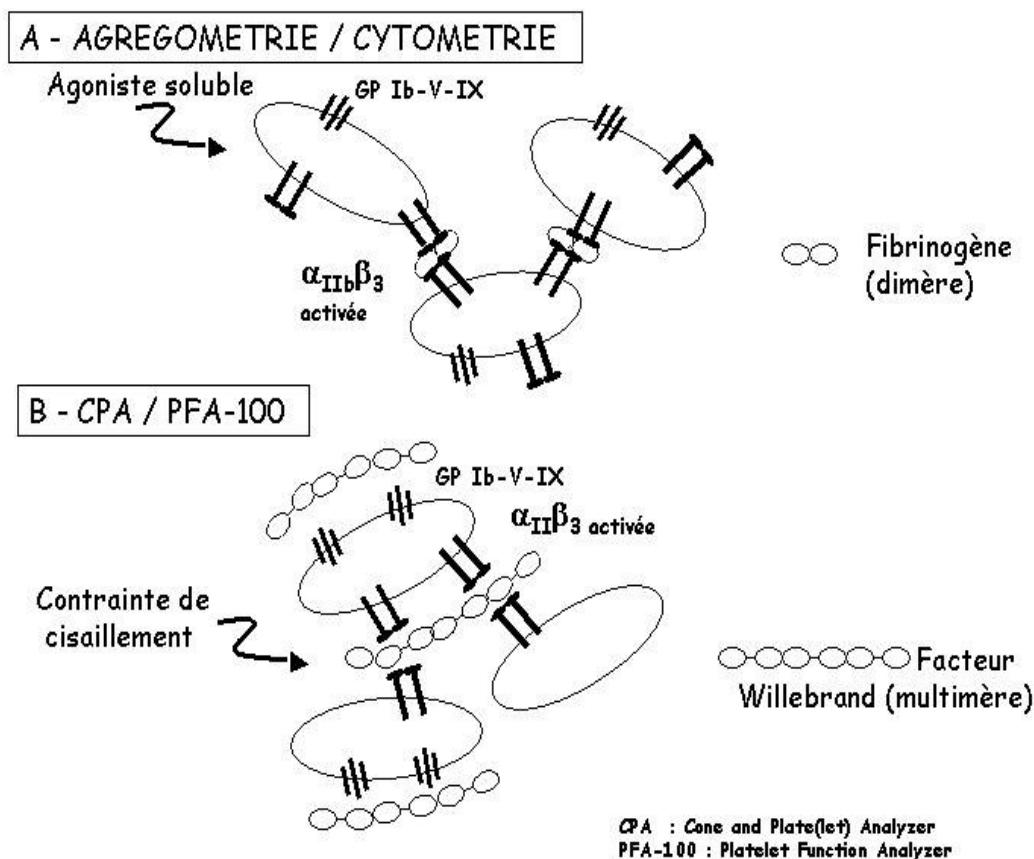


Figure 19. Mécanismes permettant l'agrégation plaquettaire en fonction de la méthodologie utilisée (d'après Kulkarni 2000)

Cytométrie et agrégométrie sont réalisées en conditions statiques (ou sous agitation simple pour l'agrégométrie), alors que PFA-100™ et CPA soumettent l'échantillon à des contraintes de cisaillement élevées ($4000-5000s^{-1}$ et $1300-1800 s^{-1}$ respectivement). Les membranes utilisées dans le PFA-100™ sont recouvertes de collagène de type I et d'ADP ou d'épinéphrine (Francis 2002). Le CPA, utilisant initialement des plaques recouvertes de matrice extra-cellulaire sous endothéliale et des conditions de flux de $1300s^{-1}$, est désormais optimisé pour des plaques de polystyrène non coatées et un flux de $1800s^{-1}$ (Varon 2002).

Les différences dans les méthodologies utilisées expliquent certains résultats de la littérature apparemment discordants, pour preuve les études conduites en pédiatrie ou en cardiologie rapportant des résultats différents selon les systèmes utilisés (ces données seront discutées dans la partie Résultats). *In vivo*, et tout particulièrement en thrombose artérielle, la croissance du thrombus ne correspond probablement pas à ce qui est observé en agrégométrie.

EXPOSE DES TRAVAUX

I. Etude des fonctions plaquettaires chez l'enfant en cytométrie en flux : mise en évidence de particularités physiologiques dans cette population

1. Introduction

L'étude des fonctions plaquettaires, classiquement réalisée en agrégométrie, se heurte en pratique quotidienne chez l'enfant, et *a fortiori* chez le nouveau-né, au volume sanguin nécessaire à la réalisation de ce test, et à la difficulté d'obtenir des prélèvements à jeun chez les bébés. La cytométrie en flux présente comme avantages indiscutables dans cette situation clinique particulière le faible volume échantillon et l'absence d'interférences liées à l'opalescence du plasma. Les demandes de la part des pédiatres, en terme d'exploration des fonctions plaquettaires, sont fréquentes. La cytométrie en flux représente une alternative aux tests actuellement à notre disposition dans les laboratoires d'hémostase. Avant d'utiliser cette technique à but diagnostique, des valeurs normales doivent être établies chez l'enfant. En effet, les résultats rapportés dans la littérature ont montré une hyporéactivité plaquettaire chez le nouveau-né, comparativement à l'adulte. En revanche, nous manquons de données, en cytométrie en flux, chez l'enfant au delà de la période néonatale. Le but de notre travail est d'une part, de pouvoir confirmer la notion d'hyporéactivité plaquettaire observée à la naissance, et d'autre part, d'évaluer les fonctions plaquettaires chez l'enfant plus grand, jusqu'à la puberté.

L'ensemble des enfants inclus dans ce travail correspond à une population saine. Les nouveaux-nés sont prélevés au troisième jour de vie à l'occasion du dépistage obligatoire de la phénylcétonurie, les enfants plus âgés au cours d'une consultation d'anesthésie.

L'étude des fonctions plaquettaires en cytométrie comprend 1) la quantification de GPIIb/IIIa, de GPIb et de la P-sélectine, 2) l'évaluation de l'activation du complexe GPIIb/IIIa (modification conformationnelle de l'intégrine et liaison du ligand fibrinogène), et 3) l'étude de la liaison du facteur Willebrand aux plaquettes dans le groupe des nouveaux-nés prématurés.

2. Résultats

Les résultats sont présentés en deux parties : une première étude, publiée, correspondant à une population large en terme d'âge (de 3 jours de vie à 15 ans), et les résultats d'une deuxième étude s'intéressant cette fois exclusivement aux nouveaux-nés prématurés.

2.1 Publication. "*Unexpected persistence of platelet reactivity beyond the neonatal period : a flow cytometric study in neonates, infants and older children*" Thromb Haemost 2003; 90: 116-123.

2.2. Evaluation en cytométrie en flux des fonctions plaquettaires chez le prématuré.

Principaux résultats

- chez le nouveau-né sain né à terme, l'expression membranaire de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est inférieure à celle de l'adulte, à l'état basal et après activation plaquettaire par le TRAP. L'activation de l'intégrine évaluée, en réponse au TRAP, par sa capacité de liaison au fibrinogène et par sa modification conformationnelle, est significativement plus faible que chez l'adulte. L'internalisation de la GPIb et la dégranulation mesurée par la P-sélectine sont également inférieures à celle de l'adulte,
- les différences observées chez le nouveau-né persistent chez l'enfant plus âgé. La capacité d'activation de l'intégrine augmente avec l'âge, et il existe des différences significatives entre les quatre groupes d'enfants. La liaison du fibrinogène reste inférieure à celle de l'adulte jusqu'à l'âge de 15 ans. La diminution de l'internalisation de la GPIb est également retrouvée chez l'ensemble des enfants, sans évolution, contrairement à $\alpha_{IIb}\beta_3$, en fonction de l'âge. La dégranulation plaquettaire est également inférieure, pendant toute l'enfance, à celle observée chez l'adulte. La capacité de dégranulation, comme pour $\alpha_{IIb}\beta_3$, augmente avec l'âge.

2.2. Deuxième partie de l'étude : évaluation en cytométrie en flux des fonctions plaquettaires chez le prématuré

2.2.1 But de l'étude :

Cette deuxième étude a été envisagée au vu des résultats du travail précédent. Elle a pour objectifs 1) de valider les conditions techniques et la faisabilité de la méthode chez des enfants prématurés, 2) d'affirmer ou d'infirmer la notion rapportée dans la littérature concernant une différence dans la réactivité plaquettaire entre prématurés et bébés nés à terme, 3) d'étudier la liaison du facteur Willebrand aux plaquettes, comparativement à un groupe contrôle adulte, afin d'établir une éventuelle corrélation entre les concentrations de facteur Willebrand plasmatiques et la capacité de liaison du facteur Willebrand aux plaquettes en réponse à la ristocétine.

2.2.2. Population :

La population étudiée est de 31 nouveaux-nés prématurés. La prématurité est définie par un âge gestationnel inférieur à 38 SA. Un micro-tube pédiatrique (citrate 0,105M, 1mL) est prélevé au troisième jour de vie, à l'occasion du prélèvement systématiquement réalisée pour le dépistage de la phénylcétonurie.

Le groupe contrôle adulte correspond à 12 volontaires sains, prélevés également en micro-tube pédiatrique citraté (0,105M).

2.2.3. Méthodes :

La quantification du nombre de GPIIb/IIIa, GPIb, et de la P-sélectine, à l'état basal et après activation par le TRAP, est réalisée grâce à la trousse Platelet GP (BioCytex). L'étude du fibrinogène lié à GPIIb/IIIa et de PAC1 est réalisée selon les conditions opératoires décrites dans le travail précédent (publication 1).

L'étude de la liaison du facteur Willebrand aux plaquettes est réalisée comme suit : 25 μ L de sang total sont incubés avec des concentrations croissantes de ristocétine (0; 0,5; 1; 1,5 et 2 mg/mL) (Sigma) pendant 5 minutes à température ambiante. L'immunomarquage est réalisé avec un anticorps anti-facteur Willebrand couplé à la FITC (anticorps de mouton, Sérotec, 10 μ g/mL final). L'acquisition de la fluorescence est réalisée sur 5000 plaquettes, définies par la région déterminée sur l'histogramme biparamétrique taille/structure.

Le facteur Willebrand plasmatique est dosé en technique immuno-enzymatique ELFA (coffret VIDAS, Biomérieux).

2.2.4. Statistiques :

Le type de distribution des données est analysé par le test de Shapiro-Wilk. Les résultats sont présentés en médiane [interquartiles]. Des tests non paramétriques sont utilisés pour la comparaison des groupes : test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Mann-Whitney-Wilcoxon. Les différences sont considérées comme significatives pour $p < 0.01$.

Le test de Student est utilisé uniquement pour la comparaison prématurés-adultes des dosages plasmatiques du facteur Willebrand, et le test de Pearson pour corrélérer les dosages plasmatiques du facteur Willebrand et sa liaison aux plaquettes.

2.2.5. Résultats :

2.2.5.1. Caractéristiques de la population :

Trente et une inclusions ont été réalisées, correspondant à 17 grands prématurés (âge gestationnel inférieur à 34 SA), et 15 prématurés ayant un âge gestationnel compris entre 34 et 38 SA. Quatre grossesses sont gémellaires.

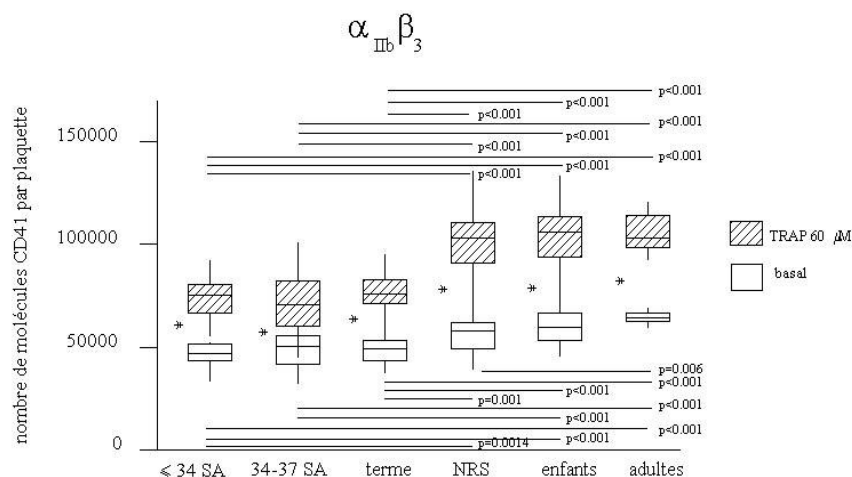
2.2.5.2. Etude en cytométrie en flux de GPIIbIIIa, GPIb et de la P-sélectine :

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les prématurés (définis en deux groupes selon leur âge gestationnel) et les bébés nés à terme. L'expression membranaire de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, à l'état basal et en réponse au TRAP, est identique entre ces groupes, ainsi que la capacité pour l'intégrine de modifier sa conformation et de lier le fibrinogène (figures 20 à 23). Le défaut d'internalisation de GPIb n'est pas plus prononcé chez les prématurés, de même que la diminution de la dégranulation plaquettaire (figures 24 et 25).

La réponse au TRAP doit être interprétée en tenant compte de l'expression à l'état basal du paramètre étudié. Nous avons analysé en terme de pourcentage de modification ($[\text{état basal} - \text{état activé} / \text{état basal}] \times 100$) les marqueurs pour lesquels les valeurs obtenues à l'état basal étaient significativement différentes entre les groupes (CD41a, CD61, CD42b) (figures 20B, 21B, 24B). L'expression membranaire d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ après activation par le TRAP, évaluée avec l'anticorps anti-CD61, est significativement plus faible chez les prématurés et chez les bébés nés à terme, comparativement à l'adulte, alors que la capacité d'externalisation de l'intégrine, mesurée en pourcentage d'augmentation, n'est pas inférieure à celle de l'adulte (figure 21B). A l'inverse, l'expression en réponse au TRAP de la GPIb n'est pas différente entre les deux groupes de prématurés et les adultes, alors que le pourcentage de GPIb

internalisée est significativement plus faible dans ces deux groupes de nouveaux-nés (figure 24B).

A



B

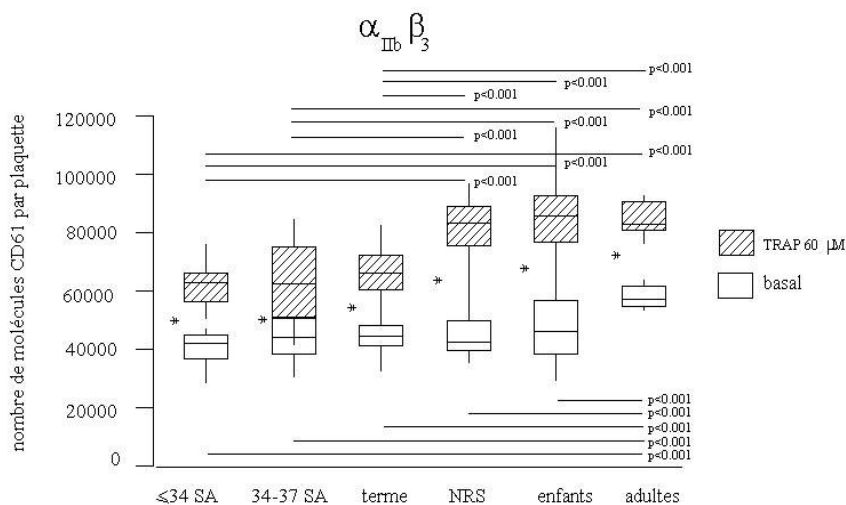
CD41a	TRAP – basal médiane [interquartiles]	% de variation	p < 0,01					
			34-37 SA	terme	NRS	enfants	adultes	
< 34 SA	27 042 [22 466 – 33 067]	+ 56%	NS	NS	*	*	*	
34–37 SA	20 347 [18 328 – 26 993]	+ 40%		NS	*	*	*	
terme	26 836 [22 829 – 29 733]	+ 54%			*	*	*	
NRS	45 178 [36 885 – 51 733]	+ 77%				NS	NS	
enfants	44 649 [37 401 – 52 912]	+ 72%					NS	
adultes	38 547 [33 336 – 45 344]	+ 60%						

Figure 20. Quantification d' $\alpha_{IIB}\beta_3$, à l'état basal et après activation par le TRAP (CD41a)

(A) Les box-plots font figurer la médiane, ou cinquantième percentile (ligne horizontale au centre de la boîte), et les vingt-cinquième et soixante-quinzième percentiles (lignes horizontales bordant la boîte). Les valeurs minimales et maximales sont représentées par les barres verticales. Les valeurs de p sont indiquées uniquement lorsque les différences entre les groupes sont significatives. L'astérisque (*) désigne la différence significative pour chacun des marqueurs entre l'état basal et activé.

(B) Le calcul de la différence entre l'état activé et l'état basal est présenté en valeur absolue et en pourcentage. L'astérisque (*) indique une différence significative ($p < 0.01$). Une valeur de $p > 0.05$ est non significative (NS).

A



B

CD61	TRAP – basal médiane [interquartiles]	% de variation	p < 0,01					
			34-37 SA	terme	NRS	enfants	adultes	
< 34 SA	20 781 [17 920 – 28 118]	+ 50%	NS	NS	*	*	NS	
34-37 SA	15 248 [13 443 – 24 395]	+ 32%		NS	*	*	NS	
terme	21 602 [17 407 – 24 239]	+ 48%			*	*	NS	
NRS	36 352 [25 697 – 46 616]	+ 78%					NS	p=0,023
enfants	38 410 [31 743 – 44 807]	+ 81%						*
adultes	25 327 [21 541 – 30 357]	+ 44%						

Figure 21. Quantification d' $\alpha_{IIb}\beta_3$, à l'état basal et après activation par le TRAP
(CD61)

(voir légende figure 20)

La diminution de l'expression après activation par le TRAP de l'intégrine observée dans les trois groupes de nouveaux-nés, comparativement à l'adulte (A), n'est pas synonyme de défaut d'externalisation lorsque le niveau d'expression membranaire de l'intégrine à l'état basal est pris en compte (B).

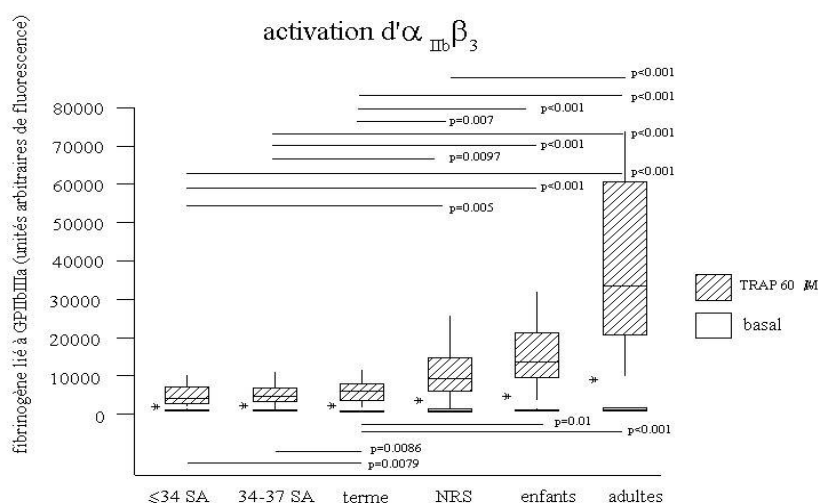


Figure 22. Liaison du fibrinogène en réponse au TRAP
(voir légende (A) figure 20)

La diminution de la liaison du fibrinogène par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ en réponse au TRAP est observée pour tous les groupes d'enfants, comparativement à l'adulte. Il n'existe pas de différence entre les trois groupes de nouveau-nés. Au delà de la période néonatale, l'augmentation de la capacité de liaison augmente avec l'âge.

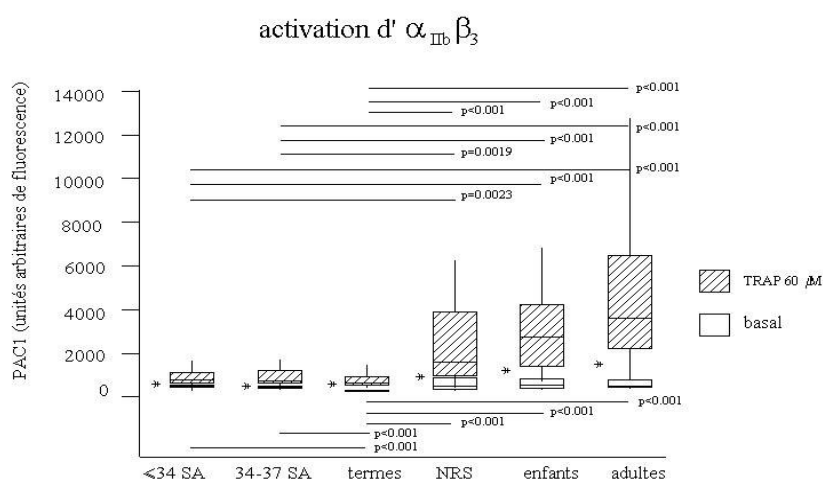
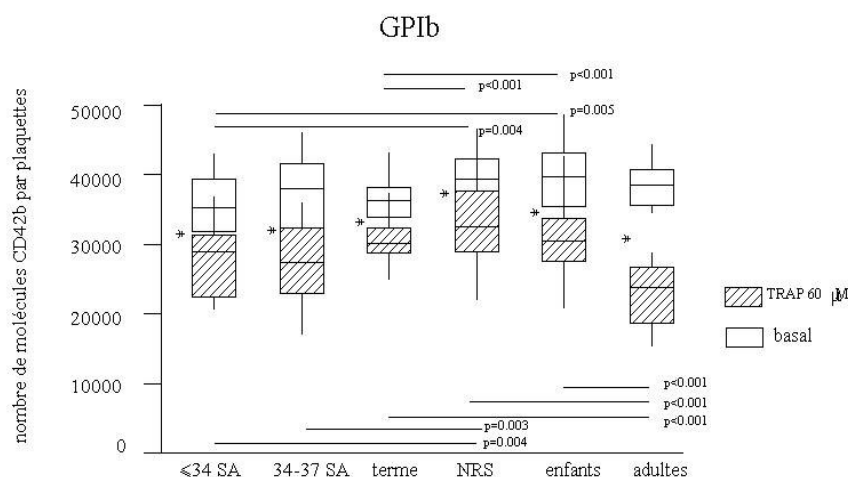


Figure 23. Modification conformationnelle d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (PAC1)
(voir légende (A) figure 20)

L'anticorps PAC1 permet d'évaluer la capacité de l'intégrine à modifier sa conformation en réponse au TRAP. L'activation de l'intégrine est significativement plus basse chez le nouveau-né, quelque soit son âge gestationnel, comparativement aux enfants plus âgés et à l'adulte.

A



B

CD42b	TRAP – basal médiane [interquartiles]	% de variation	p < 0,01					
			34-37 SA	terme	NRS	enfants	adultes	
< 34 SA	- 8 217 [- 11 761 / - 3 247]	- 22%	NS	NS	NS	NS	*	
34-37 SA	- 10 266 [- 12 842 / - 5 863]	- 27%		*	NS	NS	p=0,0119	
terme	- 5 175 [- 7 866 / - 2 623]	- 15%			NS	p=0,0140	*	
NRS	- 6 395 [- 9 789 / - 3 663]	- 16%				NS	*	
enfants	- 7 991 [- 11 813 / - 4 221]	- 21%					*	
adultes	- 15 337 [- 18 297 / - 13 175]	- 39%						

Figure 24. Quantification de GPIb, à l'état basal et après activation par le TRAP
(CD42)

(voir légende figure 20)

La différence, comparativement à l'adulte de l'internalisation de la GPIb en réponse au TRAP, est observée uniquement chez les nouveaux-nés à terme, les nourrissons et les enfants plus âgés. Les valeurs obtenues sont significativement plus basses chez ces enfants. Les prématurés ont une expression membranaire de la GPIb non différente de celle de l'adulte (A), alors que la capacité d'internalisation est statistiquement inférieure (B).

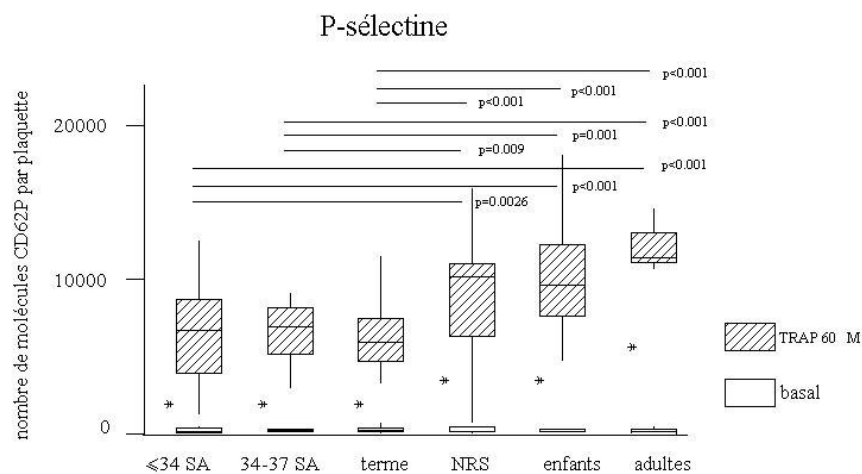


Figure 25. Quantification de la dégranulation, à l'état basal et après activation par le TRAP (CD62P)
(voir légende figure 20)

La dégranulation plaquettaire est significativement plus faible chez les nouveaux-nés, quel que soit leur âge gestationnel. Nous observons des valeurs plus basses chez les nourrissons et les enfants plus grands, mais non statistiquement significatives par rapport à l'adulte.

2.2.5.3. Le facteur Willebrand :

Les résultats des dosages plasmatiques du facteur Willebrand et de sa liaison aux plaquettes en réponse à la ristocétine sont présentés dans les deux tableaux suivants.

Les concentrations plasmatiques de facteur Willebrand sont significativement plus élevées chez les prématurés que chez l'adulte, sans différence au sein de la population des prématurés en fonction de l'âge gestationnel (Tableau IV).

	Prématurés (n=31)	Adultes (n=12)	p
	moyenne ± écart-type [min-max]	moyenne ± écart-type [min-max]	
facteur Willebrand	123% ± 20 [88-161]	103% ± 19 [86-139]	0.007

Tableau IV. Dosage plasmatique du facteur Willebrand

La liaison du facteur Willebrand aux plaquettes en réponse à la ristocétine, évaluée en cytométrie en flux, n'est pas plus élevée chez le prématuré que chez l'adulte (Tableau V).

Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre les taux de facteur Willebrand plasmatique et sa liaison aux plaquettes.

	Prématurés (n=31)	Adultes (n=12)	p
	médiane [interquartiles]	médiane [interquartiles]	
basal	4 928 [4 076-5 904]	7 178 [6 179-8 220]	< 0.0005
ristocétine 0.5 mg/mL	6 194 [5 114-7 733]	8 343 [6 148-9 184]	0.048
ristocétine 1 mg/mL	8 708 [6 661-13 413]	10 704 [8 343-12 002]	NS
ristocétine 1.5 mg/mL	12 752 [8 775-17 337]	15 566 [10 955-18 022]	NS
ristocétine 2 mg/mL	17 384 [9 505-28 066]	23 536 [14 272-27 095]	NS

Tableau V. Liaison du facteur Willebrand aux plaquettes en réponse à la ristocétine (résultats exprimés en milli-équivalents de fluorescence)

3. Discussion

Concernant les nouveaux-nés, nous retrouvons une diminution de la réponse plaquettaire après activation par le TRAP, quel que soit le marqueur utilisé. Cette conclusion est à nuancer en ce qui concerne les résultats obtenus avec les anticorps anti-CD61 et anti-CD42b. Concernant l'anticorps anti-CD61, les différences avec l'adulte sont effectivement significatives lorsque l'on compare les valeurs absolues obtenues après activation par le TRAP (nombre de molécules fixées par plaquette). En revanche, la capacité d'externaliser GPIIb/IIIa après activation, qui correspond au pourcentage d'augmentation par rapport à l'état basal, n'est pas inférieure chez le nouveau-né. Pour GPIb, la quantification par l'anticorps anti-CD42b montre que les résultats ne sont pas significativement différents entre prématurés et adultes, après activation par le TRAP. En revanche, ces mêmes résultats analysés en terme de pourcentage de diminution après activation par le TRAP montrent que la capacité d'internaliser GPIb est significativement plus faible chez le nouveau-né prématuré. Le défaut d'internalisation est en accord avec les résultats présentés en 2001 par l'équipe de N. Schlegel (Hurtaud-Roux 2001).

La diminution de l'activation plaquettaire chez les nouveaux-nés est également rapportée dans la littérature pour l'ADP, l'épinéphrine, ou encore la thrombine (Rajasekhar 1994, Rajasekhar 1997, Michelson 1998, Kühne 1996, Pietrucha 2001). Il est intéressant de noter le peu de résultats non concordants dans les études publiées, alors que les modalités de prélèvement (sang de cordon ou sang veineux périphérique), de méthodes (étude en sang total ou en plaquettes lavées, choix des agonistes plaquettaires), ou encore d'expression des résultats (unités arbitraires par rapport à un contrôle adulte considéré comme référence, équivalent de fluorescence, pourcentage de plaquettes exprimant le marqueur étudié, quantification) sont différentes (références citées ci-dessus).

Nous n'avons pas identifié de profil plaquettaire particulier chez les bébés prématurés, comparativement aux bébés nés à terme. Ceci va à l'encontre de la notion communément admise dans la littérature que la réactivité plaquettaire est d'autant plus diminuée que la prématurité est importante (Israels 2003).

Au delà de la période néonatale, nous observons, de façon inattendue, la persistance d'une réactivité plaquettaire inférieure à celle de l'adulte. Ces résultats ne sont pas concordants avec le caractère "transitoire" habituellement décrit, et expliqué initialement dans la littérature comme une conséquence de l'activation plaquettaire néonatale liée à l'accouchement.

L'hypothèse physiologique était que l'activation de la coagulation observée pendant le travail, conduisant à l'augmentation de la génération de thrombine, pouvait induire un état réfractaire transitoire des plaquettes vis à vis de l'ADP et de l'épinéphrine. Ceci était étayé par l'augmentation de la bêta-thromboglobuline et du facteur 4 plaquettaire (Suarez 1998). Cette hypothèse est désormais clairement réfutée, grâce à différentes études en cytométrie en flux montrant d'une part l'absence d'activation plaquettaire à la naissance, quel que soit le mode de délivrance (comparaison accouchement par voie basse et césarienne) (Irken 1998), et d'autre part une persistance plusieurs jours après la naissance de l'hyporéactivité plaquettaire observée à la naissance (Gatti 1996, Grosshaupt 1997). La seule autre étude ayant inclu non seulement des bébés, mais également des enfants et des adolescents jusqu'à l'âge de 18 ans, retrouve des résultats semblables aux nôtres (Kehrel 2001). L'évolution des différents marqueurs étudiés varient différemment avec la croissance de l'enfant. En effet, l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ et la dégranulation induite par l'activation plaquettaire augmentent graduellement avec l'âge, contrairement au défaut d'internalisation de GPIb, aussi marqué chez l'adolescent et le nourrisson que chez l'enfant nouveau-né. Cette dernière notion est également rapportée par B. Kehrel (Kehrel 2001).

Il est intéressant de noter que l'activation de GPIIbIIIa évaluée par la quantification membranaire de l'intégrine (anticorps anti-CD61 et anti-CD41a) devient identique à celle de l'adulte dès un mois de vie, alors que la liaison du fibrinogène et de PAC1 aux plaquettes restent inférieures à celle de l'adulte pendant toute l'enfance. Ceci suggère que 1) les résultats obtenus avec des anticorps de type anti-fibrinogène et PAC1 ne sont pas le simple reflet du nombre de complexes GPIIbIIIa exprimés à la surface plaquettaire, et que par conséquent 2), ils représentent probablement des outils plus sensibles en terme d'étude des fonctions plaquettaires que la classique externalisation de GPIIbIIIa. Par ailleurs, l'association de la faible internalisation de GPIb à la diminution de l'activation de GPIIbIIIa, pourrait expliquer l'absence de déficit fonctionnel plaquettaire mis en évidence par les tests travaillant en contrainte de cisaillement élevée, avec un complexe GPIb-IX-V restant disponible à la surface des plaquettes pour la liaison à son ligand principal après activation plaquettaire. Il a été démontré que les plaquettes agrègent dès des concentrations de ristocétine de 0.3 à 0.5 mg/mL chez les nouveaux-nés, contre 0.8 à 1 mg/mL chez l'adulte (Kehrel 2001), et que la liaison du facteur Willebrand aux plaquettes est inductible par des agonistes plaquettaires vrais (ADP et TRAP), et corrélée à la dégranulation mesurée par la P-sélectine (Schmugge 2003). Nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation de l'agrégation en réponse à la ristocétine, alors que les taux plasmatiques de facteur Willebrand sont significativement plus élevés chez les

prématurés que chez l'adulte. Nous ne retrouvons pas de corrélation entre le dosage plasmatique du facteur Willebrand et sa liaison aux plaquettes.

La pertinence de la cytométrie en flux en tant que test "fonctionnel" est à discuter à la lumière des résultats obtenus en conditions de flux, c'est-à-dire avec le PFA-100™ (Platelet Function Analyzer) et le CPA (Cone and Plate(let) Analyzer) (Roschitz 2001, Shenkman 1999). L'ensemble des résultats publiés suggèrent que l'agrégométrie et la cytométrie, réalisées en conditions statiques, ne reflètent pas entièrement les capacités d'adhésion et d'agrégation des plaquettes. Les temps d'occlusion mesurés par le PFA-100™ sont significativement plus courts chez le nouveau-né que chez l'adulte (Roschitz 2001, Boudewijns 2003). Les capacités d'adhésion et d'agrégation mesurées par le CPA sont augmentées chez le nouveau-né, comparativement à l'adulte, que les enfants soient nés à terme ou prématurés (Shenkman 1999, Linder 2002). L'ensemble de ces résultats indique que les tests réalisés en conditions statiques et les tests appliquant des contraintes de cisaillement élevées sont complémentaires lorsque l'on explore la fonction plaquettaire chez le nouveau-né.

Les tests appliquant des contraintes de cisaillement élevées démontrent l'importance du facteur Willebrand chez le nouveau-né. Les équipes ayant travaillé avec le PFA-100™ et le CPA montrent que les résultats obtenus ne sont pas liés à l'augmentation chez le nouveau-né de l'hématocrite et/ou des leucocytes, mais probablement au seul facteur Willebrand (Roschitz 2001, Shenkman 1999, Finkenstein 2002). En effet, l'agrégation plaquettaire en réponse à la ristocétine est plus élevée lorsque les plaquettes sont incubées en présence de plasma de nouveau-né (comparativement aux mêmes plaquettes incubées en plasma d'adulte) (Shenkman 1999). Le facteur Willebrand présente par ailleurs des caractéristiques structurales particulières chez le fœtus et le nouveau-né, avec la présence de formes de très hauts poids moléculaires, retrouvées de façon concordante par les différentes équipes ayant rapporté leurs résultats (Mazurier 1992, Katz 1989, Tsai 2003, Schmugge 2004). En revanche, l'hypothèse d'un déficit en ADAMTS 13, responsable de la présence de ces formes avec très hauts poids moléculaires, est moins consensuelle : diminution de l'activité protéinasique (Mannucci Blood 2001), ou activité normale (Tsai 2003, Schmugge 2004).

En conclusion, nous rapportons en cytométrie en flux un profil plaquettaire propre à l'enfant, et ce jusqu'à l'adolescence. Ces résultats montrent que nous ne pouvons pas utiliser cette méthodologie pour le dépistage des thrombopathies chez l'enfant sans définir préalablement des valeurs normales. Elle devront être établies non seulement pour les nouveaux-nés, mais également au delà de la période néonatale, et ajustées sur l'âge.

II. Modulation pharmacologique de la fonction d' $\alpha_{IIb}\beta_3$: le modèle de la cardiologie interventionnelle.

1. Introduction

L'encadrement thérapeutique des angioplasties coronaires percutanées et des syndromes coronariens aigus a considérablement évolué ces dernières années. Après l'aspirine et l'héparine, les thiénoypyridines et les antagonistes de GPIIb/IIIa ont permis de diminuer de façon importante les complications thrombotiques ischémiques, tout particulièrement après mise en place de matériel prothétique endocoronaire. De nouveaux outils biologiques étaient nécessaires, pour répondre à des questions multiples : l'efficacité thérapeutique, l'évaluation du risque hémorragique, une réponse biologique rapide (un laboratoire d'hémostase classique ne répondant pas à cette attente), la possibilité d'évaluer l'effet global des associations thérapeutiques utilisées, ou au contraire l'évaluation spécifique de l'effet d'un anti-plaquettaire au sein d'un cocktail d'anti-thrombotiques. C'est dans cet esprit qu'a débuté la collaboration entre le service de cardiologie et notre laboratoire.

Comme pour l'exploration des fonctions plaquettaires chez l'enfant, la notion de tests réalisés en conditions de *shear stress* élevé nous a semblé une approche complémentaire importante à l'agrégométrie et à la cytométrie en flux, puisque l'adulte insuffisant coronaire présente également des concentrations élevées de facteur Willebrand et des formes de très haut poids moléculaire circulantes. De plus, la cible principale de la modulation pharmacologique par les anti-plaquettaires actuellement utilisés en cardiologie est l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, et l'artère coronaire sténosée est un vaisseau où les contraintes de cisaillement sont particulièrement élevées, conditions dans lesquelles le facteur Willebrand devient le ligand d' $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Nous avons appliqué ce type d'approche à l'exploration de l'inhibition plaquettaire chez des patients traités par anti-GPIIb/IIIa ou thiénoypyridines, traitements associés respectivement à une inhibition totale ou partielle de l'agrégation plaquettaire.

Trois molécules anti-GPIIb/IIIa ont actuellement une AMM (autorisation de mise sur le marché) (tableau VI). L'abcximab correspond au fragment Fab d'un anticorps monoclonal

murin humanisé, dont le site de reconnaissance est localisé sur β_3 . L'eptifibatide est un heptapeptide cyclique de synthèse mimant l'extrémité C-terminale de la chaîne γ du fibrinogène (motif KGD). Le tirofiban est un peptidomimétique de synthèse possédant la séquence RGD, séquence commune aux ligands de l'intégrine, fibrinogène, facteur Willebrand, et autres molécules adhésives (Topol 1999).

DCI	Nom commercial	Date d'obtention de l'AMM	Essais pivots	AMM	
				ATC	angor instable IDM sans onde Q
abciximab (c7E3 Fab)	ReoPro®	1995	EPIC (1) EPILOG (2) CAPTURE (3) EPISTENT (4)	+	-
eptifibatide	Integrilin®	1999	IMPACTII (5) ESPRIT (6) PURSUIT (7)	+	+
tirofiban	Agrastat®	1999	RESTORE (8) PRISM (9) PRISM-plus (10)	-	+

DCI : dénomination commune internationale

ATC : angioplastie transluminale percutanée

IDM : infarctus du myocarde

Tableau VI. Les molécules anti-GPIIb/IIIa disponibles et leurs indications en 2004

(1) *The EPIC Investigators 1994*

(2) *The EPILOG Investigators 1997*

(3) *The CAPTURE Investigators 1997*

(4) *The EPISTENT Investigators 1998*

(5) *The IMPACTII Investigators 1997*

(6) *The ESPRIT Investigators 2000*

(7) *The PURSUIT Trial Investigators 1998*

(8) *The RESTORE Investigators 1997*

(9) *The PRISM Study Investigators 1998*

(10) *The PRISM-PLUS Study Investigators 1998*

(les essais 1-6 et 8 ont été conduits dans l'angioplastie, les essais 7, 9 et 10 dans l'angor instable)

Notre expérience des anti-GPIIb/IIIa concerne tout d'abord le ReoPro®, étudié *in vitro* et chez des patients traités en salle de cathétérisme. Nous avons quantifié, en cytométrie en flux, le nombre de récepteurs GPIIb/IIIa libres et totaux, parallèlement à l'aggrégométrie (publication 1, "*Free and total platelet glycoprotein IIb/IIIa measurement in whole blood by quantitative flow cytometry during and after infusion of c7E3 Fab in patients undergoing PTCA*" Thromb Haemost 1999; 81: 869-873). Notre expérience de l'éptifibatide et du tirofiban est documentée dans la deuxième publication (publication 2 "*Unexpected flow cytometric results with two small GPIIb/IIIa blockers : eptifibatide and tirofiban*", Thromb Haemost 2001; 85: 561-562). Nous rapportons également, chez le même type de patients, le *monitoring* biologique par le PFA-100™ des traitements anti-plaquettaire alloués en salle d'angioplastie (publication 3, "*Use of the PFA-100™ apparatus to assess platelet function in patients undergoing PTCA during and after infusion of c7E3 Fab in the presence of other antiplatelet agents*" Thromb Haemost 2000; 83: 540-544).

Les thiéno-pyridines sont des antagonistes des récepteurs à l'ADP. Elles sont dans certaines situations coprescrites avec les molécules précédentes. Les AMM de la ticlopidine et du clopidogrel sont rapportées dans le tableau suivant (limitées aux indications en cardiologie) (tableau VII).

DCI	Nom commercial	Essais pivots	AMM
ticlopidine	Ticlid®	ISAR (3) FANTASTIC (1) MATTIS (2) STARS (4)	endoprothèse coronaire (stent)
clopidogrel	Plavix®	CAPRIE (5) CURE (6) PCI-CURE (7) CREDO (8)	prévention des récurrences après IDM angor instable IDM sans onde Q

DCI : dénomination commune internationale

IDM : infarctus du myocarde

Tableau VII. Les thiénoxyridines (indications en 2004)

(1-4) : Curtin 2002

(5): CAPRIE Steering Committee 1996

(6): Yusuf 2001

(7): Mehta 2001

(8) : Steinhilber 2002

Nous avons étudié l'inhibition d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ induite par une dose de charge de ticlopidine, administrée en salle de cathétérisme, chez des patients bénéficiant de la mise en place d'une endoprothèse coronaire (publication 4, "*PFA-100™ and flow cytometry : can they challenge aggregometry to assess antiplatelet agents, other than GPIIb/IIIa blockers, in coronary angioplasty?*", Thromb Res 2003; 108: 43-47).

2. Résultats

2.1. Publication 1:

Free and total platelet glycoprotein IIb/IIIa measurement in whole blood by quantitative flow cytometry during and after infusion of c7E3 Fab in patients undergoing PTCA. Thromb Haemost 1999; 81: 869-873.

2.2. Publication 2:

Unexpected flow cytometric results with two small GPIIb/IIIa blockers : eptifibatide and tirofiban. Thromb Haemost 2001; 85: 561-562.

2.3. Publication 3:

Use of the PFA-100™ apparatus to assess platelet function in patients undergoing PTCA during and after infusion of c7E3 Fab in the presence of other antiplatelet agents. Thromb Haemost 2000; 83: 540-544.

2.4. Publication 4:

PFA-100™ and flow cytometry : can they challenge aggregometry to assess antiplatelet agents, other than GPIIb/IIIa blockers, in coronary angioplasty ? Thromb Res 2003; 108: 43-47.

Principaux résultats

- la trousse GPIIbIIIa Occupancy® (BioCytex) permet de déterminer le pourcentage de récepteurs GPIIbIIIa occupés par l'abciximab, grâce à deux anticorps monoclonaux, l'un compétitif de l'abciximab (Mab1 ou PY18), l'autre non compétitif (Mab2 ou 4F8),
- l'occupation des récepteurs et l'inhibition plaquettaire évaluée en agrégométrie persiste plusieurs jours après l'arrêt de la perfusion,
- l'abciximab induit une augmentation de la fixation de Mab2 chez les patients. Ce résultat est confirmé *in vitro*. Il suggère une activation plaquettaire induite par le médicament,
- la trousse GPIIbIIIa Occupancy® (BioCytex) ne permet pas de déterminer le pourcentage de récepteurs GPIIbIIIa occupés par l'eptifibatide ou par le tirofiban,
- l'anticorps Mab1 (PY18) n'est pas compétitif de la liaison de l'eptifibatide. La compétition est partielle vis à vis du tirofiban,
- la liaison de l'anticorps Mab2 (4F8) est diminuée en présence d'eptifibatide et de tirofiban.

Principaux résultats

- les temps d'occlusion du PFA-100™ mesurés par la cartouche collagène-ADP sont, dans ce contexte, spécifiques de l'abciximab, puisqu'ils ne détectent pas la prise d'acide acétyl salicylique ou de thiéno pyridines,
- l'allongement des temps d'occlusion (cartouche collagène-ADP) est observé à partir d'un pourcentage d'occupation de GPIIb/IIIa par l'abciximab de 60%. Les temps d'occlusion sont toujours allongés au delà de 75% d'occupation des récepteurs,
- l'agrégométrie et le PFA-100™ (cartouche collagène-épinéphrine) montrent que 50% des patients ont des fonctions plaquettaires non inhibées par l'acide acétyl salicylique, sur le prélèvement réalisé avant l'injection d'abciximab.

Principaux résultats

- en fonction de la méthodologie utilisée (agrégométrie ADP 6 et 4 μ M, PFA-100™), 19% à 52% des patients traités au long cours par acide acétyl salicylique sont "mauvais répondeurs",
- la concordance entre agrégométrie et PFA-100™, pour le dépistage des "mauvais" répondeurs, est presque nulle,
- l'augmentation de la posologie d'acide acétyl salicylique, administré sous la forme d'un bolus parentéral de 500 mg chez des patients traités au long cours par voie orale, ne modifie pas les fonctions plaquettaires,
- l'effet biologique des thiénoxyridines est observé moins de 24 heures après l'administration d'une dose de charge,
- le PFA-100™ ne détecte pas la prise de thiénoxyridines,
- agrégométrie et cytométrie en flux (évaluation de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$) identifient la prise de thiénoxyridines.

3. Discussion

Nous avons validé en pratique clinique la quantification en cytométrie en flux du nombre d'intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ occupées par le ReoPro®. La liaison du ReoPro® est rapide et majeure (93% de sites occupés 10 minutes après le début de la perfusion), et prolongée. La cinétique de l'inhibition des fonctions plaquettaires, évaluée en agrégométrie, est parallèle à celle de la liaison de l'abciximab aux plaquettes mesurée en cytométrie en flux. Nous n'avons pas observé de variation interindividuelle importante dans la réponse au traitement.

L'ensemble de ces résultats est confirmé l'année suivante, par une étude au *design* identique en terme de population (patients insuffisants coronariens bénéficiant d'une angioplastie, avec une prise en charge médicamenteuse par du ReoPro® selon le même schéma thérapeutique que dans notre étude, en association avec les traitements anti-plaquettaires conventionnels). L'étude est réalisée en cytométrie en flux, avec un anticorps anti-Ig de souris, se fixant directement sur le ReoPro® (Peter 2000).

En revanche, la faible variabilité interindividuelle dans la réponse au traitement, mise en évidence dans l'étude de Peter et la nôtre, n'est pas confirmée par les tests évaluant les fonctions plaquettaires (Steinhubl 2001, Ray 2004).

L'aspect unimodal des histogrammes de fluorescence évoque une liaison homogène du médicament sur toute la population plaquettaire. Cet aspect persiste au cours du temps, suggérant une redistribution du ReoPro® d'une plaquette à l'autre, notamment aux plaquettes nouvellement formées (Peter 2000). Le ReoPro® est de plus internalisé très rapidement dans les granules α , *via* le système canaliculaire connecté à la surface. Cette diffusion accompagne le *trafficking* bidirectionnel naturel d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Nurden 1999, Quinn 2001). La redistribution plaquettaire observée pour l'abciximab est probablement liée au caractère monovalent de la molécule (fragment Fab), puisqu'elle n'est pas retrouvée pour l'immunoglobuline entière (7E3 IgG) (Sassoli 2001).

Nous avons observé en présence de ReoPro®, une augmentation de la fixation de l'anticorps Mab2 (anticorps dont la liaison n'est pas inhibée par l'abciximab), à la fois chez les patients traités et dans les tests réalisés *in vitro*. A noter qu'il n'en a pas été fait mention dans l'étude de Quinn *et al*, alors que la méthodologie était identique (Quinn 1999). L'augmentation du nombre de GPIIbIIIa à la surface plaquettaire, mesurée par l'anticorps Mab2, pourrait être la conséquence de l'activation de l'intégrine par le ReoPro®. L'utilisation des anticorps anti-CD62P et anti-CD63 en cytométrie ne nous avait pas permis de valider

cette hypothèse (résultats non présentés). Il a depuis été démontré que les anti-GPIIb/IIIa utilisés en thérapeutique induisent une activation spécifique d' $\alpha_{IIb}\beta_3$, qui ne s'accompagne pas obligatoirement d'une augmentation d'expression de la P-sélectine (Schwartz 2004). Le ReoPro® induit une augmentation de la fixation du fibrinogène sur GPIIb/IIIa pour des concentrations 1 à 10 $\mu\text{g/mL}$ (Peter 1998); ceci est concordant avec nos résultats, puisque nous avons observé une augmentation de Mab2 pour toutes les concentrations testées (de 0,5 à 2,5 $\mu\text{g/mL}$). Le ReoPro® bloque l'agrégation plaquettaire aux concentrations thérapeutiques, mais a un effet proagrégant lorsqu'il est utilisé *in vitro* à faible concentration (0,1 $\mu\text{g/mL}$) (Peter 1998). Les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase, dont l'acide acétyl salicylique, inhibent cet effet proagrégant (Peter 1998). Nous avons observé une augmentation significative de Mab2 chez les patients malgré un traitement au long cours par aspirine. Ces résultats ne sont pas *a priori* contradictoires si l'on évoque la notion de "mauvais" répondeurs à l'aspirine, comme nous l'avons documenté dans les publications 3 et 4.

L'activation de l'intégrine a été mise en évidence pour les trois anti-GPIIb/IIIa utilisés en thérapeutique, avec des profils différents selon les molécules (Jennings 2000, Schwartz 2004). Cette activation a également été démontrée avec des cellules CHO transfectées en GPIIb/IIIa, ce qui permet d'éliminer un mécanisme d'activation plaquettaire global, lié, par exemple, aux conditions de préparation des échantillons, et de conclure à un effet propre sur l'intégrine (Schwartz 2004). La redistribution rapide des anti-GPIIb/IIIa à l'ensemble d'une population cellulaire est également démontrée par l'étude de l'activation de l'intégrine avec un anticorps anti-LIBS. Les deux pics de fluorescence initiaux, correspondant pour l'un aux cellules non incubées et pour l'autre aux plaquettes incubées en présence d'anti-GPIIb/IIIa, se modifient au cours de la coincubation des deux préparations cellulaires, pour aboutir à un pic unique. Ceci démontre que l'activation plaquettaire induite par les anti-GPIIb/IIIa est transférable de plaquette à plaquette, et de plaquettes à des cellules CHO exprimant GPIIb/IIIa (Schwartz 2004). Les mécanismes de l'activation de l'intégrine par ces médicaments ne sont pas élucidés. Ils sont probablement différents pour les peptides ou peptidomimétiques, et pour l'anticorps c7E3 Fab. L'activation induite par l'abciximab est Fc γ RII indépendante, puisque l'abciximab correspond au seul fragment Fab de l'immunoglobuline. Les anticorps anti-GPIIb/IIIa de type Fab sont capables d'activer l'intégrine; ceci a été démontré avec certains anticorps anti-LIBS (Frelinger 1991). Leur liaison à l'intégrine entraîne une agrégation plaquettaire, *via* l'augmentation de la liaison du fibrinogène et/ou de la fibronectine à GPIIb/IIIa (Frelinger 1991).

L'ensemble de ces observations font que l'anticorps à usage thérapeutique anti-GPIIb/IIIa "idéal" serait un anticorps compétitif de la liaison du ligand, non activateur d' $\alpha_{IIb}\beta_3$, et ne se fixant que sur les intégrines activées, pour permettre l'adhésion plaquettaire sur le fibrinogène immobilisé et minimiser ainsi le risque hémorragique (Peter 1998).

La cytométrie en flux nous a permis de déterminer, de façon quantitative et spécifique, le nombre de récepteurs bloqués. En revanche, elle ne permettait pas d'avoir directement accès à la notion d'inhibition plaquettaire.

Au début de l'utilisation en cardiologie de cette nouvelle classe thérapeutique, le *challenge* était de développer de nouveaux outils de surveillance biologique. Il faut se souvenir que très rapidement après la validation de l'administration parentérale en situation aiguë, de nouveaux schémas thérapeutiques ont été évalués. La logique était de pouvoir faire bénéficier aux patients des résultats spectaculaires obtenus par les molécules administrées par voie parentérale. De nouvelles modalités d'administration étaient donc envisagées (voie orale, transdermique, intranasale), pour des traitements au long cours. Il était indispensable de pouvoir surveiller ces nouveaux traitements, l'idée étant, sur le même principe que la surveillance des AVK par l'INR (*international standardized ratio*), de définir une zone cible d'efficacité thérapeutique. Les seuls tests biologiques utilisés dans les premiers essais cliniques étaient le temps de saignement et l'agrégation plaquettaire. Aucun de ces deux tests ne pouvait être retenu pour un suivi biologique en pratique clinique, pour des raisons de faisabilité et de défaut de pertinence clinique.

C'est dans ce contexte que nous avons évalué le PFA-100™, qui présentait l'avantage d'être un test simple, standardisé, et potentiellement accessible à tous les laboratoires. De plus, son principe est totalement différent de celui de l'agrégométrie ou de la cytométrie, puisqu'il évalue l'hémostase primaire en conditions de flux élevées. Il est plus proche de la physiologie, les flux dans une artère de petit calibre comme une artère coronaire, *a fortiori* sténosée, étant extrêmement élevés. Il est dans ces conditions sensible à l'interaction du facteur Willebrand et de l'intégrine, ce qui est pertinent chez ces patients qui ont un taux de facteur Willebrand élevé, et chez lesquels les molécules anti-GPIIb/IIIa inhibent l'interaction de l'intégrine avec tous les ligands ayant une séquence RGD.

Les patients que nous avons étudiés sont tous traités au long cours par aspirine. Ils reçoivent un traitement par ReoPro® avant l'angioplastie, associé à un traitement par ticlopidine administrée sous forme d'une dose de charge dans le cas de la mise en place d'un stent. Cette étude nous a montré que le PFA-100™ est spécifique des traitements anti-

GPIIb/IIIa grâce à la cartouche collagène-ADP. Les temps d'occlusion (TO) mesurés avec cette cartouche sont indépendants de la prise d'aspirine et de ticlopidine. La comparaison avec le nombre de récepteurs GPIIb/IIIa occupés, mesuré en cytométrie en flux, montre que les TO sont modifiés dans une fourchette étroite, puisqu'ils sont normaux en dessous de 60% d'occupation des récepteurs, et allongés au delà de 80%. Le PFA-100™ permet de répondre de façon simple et spécifique à l'objectif retenu en terme d'efficacité par les essais cliniques, soit 80% de sites occupés (Tcheng 1994, Collier 1997). Ce même seuil de 80% est la valeur ciblée par un autre test dit "*bedside*", utilisant comme principe l'agglutination de billes de latex recouvertes de fibrinogène (Smith 1999). La détermination d'une zone cible par le PFA-100™ est donc facilement envisageable. Son intérêt n'est pour l'instant plus que théorique dans le contexte précis des anti-GPIIb/IIIa oraux, aucune de ces molécules n'ayant d'AMM puisque l'ensemble des essais cliniques a conclu à la fois à une moins bonne efficacité et à un sur-risque hémorragique (Cannon 1998, Cannon 2000, Kereiakes 1998).

Le test de cytométrie en flux, optimisé pour la quantification du nombre de récepteurs occupés par le ReoPro®, n'est pas transposable directement à l'étude des autres anti-GPIIb/IIIa. L'anticorps Mab1 (LYP18), compétitif du ReoPro®, est indifférent à la fixation de l'Integrilin®. En revanche, sa liaison à GPIIb/IIIa est partiellement diminuée en présence d'Agrastat®, rendant impossible le calcul du pourcentage de sites occupés. Quant à l'anticorps Mab2 (4F8), il ne se fixe pas sur l'intégrine en présence d'Integrilin® ou d'Agrastat®, à l'inverse de ce que nous avons observé pour le ReoPro®. Les résultats concernant l'Integrilin® sont en accord avec la littérature (Quinn 1999). En revanche, nous ne disposons pas d'autres données publiées pour l'Agrastat®.

La différence de comportement des anticorps Mab1 et Mab2 en réponse à l'abciximab et aux petites molécules RGD a été considérée dans la littérature comme un avantage. L'utilisation de Mab1 et Mab2 permet de différencier la liaison du ReoPro® de celle des autres anti-GPIIb/IIIa, ces traitements pouvant être administrés chez certains patients de façon séquentielle (Quinn 1999, Lev 2000). A cela des limites potentielles, avec tout d'abord l'augmentation significative de la fixation de l'anticorps Mab2 en présence de ReoPro®, augmentation persistant après la fin de la perfusion (publication 1), et pouvant donc modifier le calcul du nombre de sites occupés par l'Integrilin®, et par ailleurs la surestimation du nombre de sites occupés par l'Integrilin® lorsque les échantillons sanguins sont prélevés sur citrate (Phillips 1997), ce qui est le cas des études citées précédemment et de la nôtre, et qui

implique de valider ces résultats avec des échantillons sanguins prélevés sur héparine, hirudine ou PPACK (Phe-Pro-Arg chloromethyl ketone).

L'inhibition de la fixation de Mab2 ne serait pas liée à un phénomène de compétition, mais à une modification conformationnelle de l'intégrine induite par les deux peptidomimétiques étudiés. Ainsi, un épitope présent sur $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans sa conformation non activée pourrait être perdu après activation de l'intégrine, l'anticorps Mab2 (4F8) pouvant alors être considéré comme un anticorps anti-LABS (*ligand-attenuated binding site*) (Quinn 2002).

Par ailleurs, nous n'avons pas mis en évidence avec Mab1 d'augmentation du nombre total de récepteurs GPIIb/IIIa. Des résultats identiques sont retrouvés pour le xemilofiban, antiGPIIb/IIIa administré par voie orale (Quinn 2000). L'éptifibatide et le tirofiban pourraient, comme le xemilofiban, induire une activation conformationnelle de l'intégrine limitée à la perte d'un épitope (LABS), sans induire ni augmentation de l'agrégation plaquettaire à faible concentration d'anti-GPIIb/IIIa, ni augmentation du nombre total d'intégrines exprimées à la surface plaquettaire (Quinn 2000).

Nous avons constaté dans l'étude chez les patients traités par ReoPro® (publication 3), qu'agrégométrie et temps d'occlusion mesurés par la cartouche collagène-épinéphrine étaient normaux dans plus de la moitié des cas, malgré un traitement au long cours par de l'aspirine. Nous avons, à la suite de ces résultats, conçu un projet retenu dans le cadre d'un Projet Hospitalier de Recherche Clinique National ("Etude en cytométrie en flux de l'effet d'une dose de charge d'acétylsalicylique au cours des angioplasties coronaires sur l'activation plaquettaire chez des patients traités au long cours par aspirine PO ou dérivés"). Nous avons confirmé la notion de "mauvais répondeurs" à l'aspirine, et observé que l'augmentation de la posologie d'aspirine sous forme d'un bolus ne modifiait pas ce statut de "mauvais répondeurs". En revanche, nous avons clairement observé l'inhibition par le clopidogrel de l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ en réponse à l'ADP, par un test de cytométrie en flux utilisant un anticorps anti-RIBS et PAC1. Les résultats de cytométrie étaient concordants avec l'agrégométrie. L'inhibition plaquettaire était significative moins de 24 heures après la prise initiale de clopidogrel sous forme d'une dose de charge. Nous avons également utilisé le PFA-100™, qui, de façon surprenante, ne s'est pas avéré sensible au clopidogrel avec la cartouche collagène-ADP. Ces données sont confirmées dans la littérature, dans ce même contexte clinique d'angioplastie (Madan 2002, Van der Planken 2003). Le PFA-100™ pourrait en revanche être sensible aux thiénopyridines dans les traitements au long cours, avec des TO à la limite supérieure de la

normale après trois mois de traitement, et s'allongeant franchement après six mois de traitement (Ziegler 2002). Une cartouche collagène-ADP modifiée, avec des concentrations d'ADP plus faible, pourrait améliorer la sensibilité du test vis à vis des thiénoypyridines (Kottke-Marchant 1995).

III. Modulation de la phosphorylation de VASP par les thiénopyridines

1. Introduction

L'étude de la modulation de la phosphorylation de VASP, par une technique de réalisation simple et rapide (cytométrie en flux), a été proposée pour la première fois comme *monitoring* biologique possible des traitements par thiénopyridines par Schwartz *et al* (Schwartz 1999). La protéine VASP est phosphorylée par PGE1 (prostaglandine E1), cette phosphorylation est inhibée par l'ADP. Le principe du test repose sur la mise en évidence de l'inhibition par les thiénopyridines de l'effet de l'ADP sur la phosphorylation de VASP. Ceci permet de détecter spécifiquement la prise de thiénopyridines, chez des patients traités par des associations d'anti-plaquettaires. Nous ne disposons à l'heure actuelle d'aucun autre test d'exploration des fonctions plaquettaires, qui soit spécifique des thiénopyridines. A ce jour, seule l'équipe de Baragan, en collaboration avec l'équipe allemande précédemment citée, a rapporté l'application de cette méthodologie en contexte d'angioplastie (Baragan 2003). Les résultats de cette étude montrent que les thromboses subaiguës compliquant la mise en place d'un stent chez des patients traités par ticlopidine ou clopidogrel sont associées à un "pourcentage de réactivité plaquettaire" élevé (63%), alors que les angioplasties sans complications ischémiques ont un "pourcentage de réactivité plaquettaire" significativement plus bas (40%) (Baragan 2003). Ce pourcentage correspond à la capacité d'inhibition par l'ADP de la phosphorylation de la sérine 239 induite par PGE1. Ces résultats confirment la notion de variabilité interindividuelle dans la réponse aux thiénopyridines, évoquée essentiellement pour le clopidogrel, et mise en évidence non seulement chez les patients, mais aussi chez des témoins sains sous clopidogrel (Schrör 2004, Gurbel 2003, Müller 2003, Taubert 2004, Schwartz 1999). Différents mécanismes sont évoqués pour expliquer cette variabilité (voire résistance) : variabilité de l'absorption digestive, variabilité de la métabolisation hépatique de la prodrogue en son métabolite actif, polymorphisme des récepteurs P2Y₁₂ (Taubert 2004, Lau 2004, Fontana 2004). Quelles qu'en soient les explications physiopathologiques, l'augmentation de la posologie de clopidogrel pourrait être proposée chez certains patients, dans le but de lever cette résistance (Taubert 2004, Seyfart 2002).

La possibilité d'identifier les patients résistants au clopidogrel pourrait permettre une prise en charge individuelle en terme de traitement anti-plaquettaire.

C'est pourquoi nous avons développé une technique de cytométrie en flux pour l'étude de la phosphorylation de VASP en position 239, nous permettant de calculer, sur le principe proposé par Schwartz et Baragan, un indice de réactivité des récepteurs à l'ADP. Il s'agit d'une technique d'immunofluorescence directe (contrairement aux études précédemment citées). Nous rapportons nos résultats chez le témoin sain (sans clopidogrel) et chez des patients en salle d'angioplastie, traités par l'association aspirine-clopidogrel. Nous avons comparé les résultats obtenus en cytométrie en flux à la technique du Western Blot. A ce jour dans la littérature, la réalisation en parallèle de ces deux techniques est rapportée uniquement par Schwartz et al, chez 5 témoins sains traités par clopidogrel. En revanche, il n'existe aucune donnée quant à la comparaison cytométrie en flux / Western Blot chez le patient insuffisant coronarien traité par clopidogrel.

Parallèlement à la phosphorylation de VASP 239, il nous semblait important d'étudier également la phosphorylation de la sérine 157, site préférentiellement impliqué lors de l'augmentation des concentrations d'AMPc (Horstrup 1994). Nous avons également mis au point l'étude de la phosphorylation de ces deux sites sérine en réponse au SNP (*sodium nitroprusside*), donneur de NO (monoxyde d'azote) impliquant préférentiellement la voie des PKG, *via* l'augmentation du GMPc (Smolenski 1998). Nous avons fait le choix de tester ce large panel de conditions expérimentales, afin d'identifier, en fonction des voies de signalisation impliquées, des profils de phosphorylation de VASP. L'étude en Western Blot a également été réalisée dans ces conditions expérimentales.

2. Matériel et méthodes

2.1. Population étudiée

2.1.1. Témoins sains

Vingt huit volontaires sains (13 hommes et 15 femmes) ont été prélevés sur tube citraté 0,129 M pour réalisation des analyses en cytométrie en flux et Western Blot, et sur tube EDTA pour hémogramme.

L'absence de tout traitement interférant avec les fonctions plaquettaires dans les 10 jours précédents le prélèvement est précisé à l'interrogatoire.

2.1.2. Patients traités par thiénoypyridines

Vingt et un patients ont été inclus (15 hommes et 6 femmes). Le clopidogrel est administré sous forme d'une dose de charge (300 mg en une prise) moins de 72 heures avant le prélèvement et poursuivi à la posologie de 75 mg/jour (n=13), ou à la posologie de 75 mg/jour sans dose de charge initiale, depuis au moins 3 mois (n=8). Tous sont traités par aspirine au long cours (160 mg/jour).

Les prélèvements ont été réalisés en salle d'angioplastie, en début de procédure et avant l'administration du bolus d'héparine. Ils sont réalisés sur tube citraté 0,129 M (Vacutainer®, Becton Dickinson) pour les tests de cytométrie en flux, d'agrégation plaquettaire et de Western Blot, et sur EDTA (Vacutainer®, Becton Dickinson) pour réalisation de la numération plaquettaire.

2.1.3. Patients co-traités par thiénoypyridines et anti-GPIIb/IIIa

Six patients ayant bénéficié d'une prescription de tirofiban (n=2) ou d'eptifibatide (n=4) ont été étudiés avant et 30 minutes après le début du traitement par anti-GPIIb/IIIa. Ils sont tous sous aspirine au long cours. Les modalités de leur traitement par clopidogrel sont listées dans le tableau suivant (tableau VIII):

	clopidogrel "dose de charge"	clopidogrel "long cours"	clopidogrel autre*
tirofiban	n=1		n=1
eptifibatide	n=2	n=2	

* : clopidogrel 75 mg/j depuis 4 jours

Tableau VIII. Caractéristiques du traitement par clopidogrel chez les patients bénéficiant d'une coprescription d'anti-GPIIb/IIIa

2.2. Méthodes

2.2.1. Agrégation plaquettaire en PRP

L'agrégation plaquettaire est réalisée sur PRP, obtenu après une centrifugation à 200 g pendant 20 minutes. Les numérations des PRP sont comprises entre 300 et $600 \cdot 10^9$ plaquettes/L. L'agrégation est réalisée sur l'agrégomètre Chronolog (Coultronic), en réponse à l'ADP ($10 \mu\text{M}$). L'enregistrement est réalisé pendant 20 minutes. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'agrégation.

2.2.2. Cytométrie en flux (étude de la phosphorylation de VASP sur les sites sérines 157 et 239)

La phosphorylation de VASP est étudiée en réponse à deux inducteurs de la phosphorylation, PGE1 et SNP, qui impliquent préférentiellement la voie de l'AMPc ou du GMPc, respectivement. En raison du choix de ces deux inducteurs de phosphorylation, il était impératif de travailler à partir de PRP. En effet, l'hémoglobine inhibe le monoxyde d'azote, VASP n'étant plus phosphorylée dans ces conditions en réponse au SNP (Schwartz 1999). Nous avons également étudié la capacité d'inhibition par l'ADP de la phosphorylation induite par PGE1 et SNP.

Nos conditions opératoires sont définies comme suit :

- 50 μL de PRP, obtenu après centrifugation de 200g pendant 20 minutes, sont incubés pendant 5 minutes à température ambiante en présence de 50 μL de PBS, d'ADP (20 μM final), de PGE1 (10 μM final), d'une solution d'ADP (20 μM final) et de PGE1 (10 μM final), de SNP (0,1 mM final), ou d'une solution d'ADP (20 μM final) et de SNP (0,1 mM final),
- la perméation plaquettaire est réalisée avec les réactifs 1 et 2 de la trousse commerciale Leucoperm™, selon les recommandations du fabricant (Serotec). 10 μL de la suspension plaquettaire sont incubés avec 25 μL du réactif 1 (15 minutes à température ambiante, puis lavés (4 mL de PBS, centrifugation à 2500 g pendant 5 minutes). Le culot plaquettaire est incubé en présence du réactif 2 (25 μL) et des anticorps anti-VASP 157-FITC (5C6, concentration finale à 2.5 μM) et anti-VASP 239-FITC (16C2, concentration finale à 20 μM) (Nanotools) pendant 30 minutes, à température ambiante et dans l'obscurité, puis lavé (4 mL de PBS, centrifugation à 2500 g pendant 5 minutes),

- l'analyse cytométrique est effectuée immédiatement, 5000 évènements sont analysés dans la région déterminée sur l'histogramme biparamétrique taille/structure (cytomètre Epics, Logiciel XL2, Coulter). Sur l'histogramme de fluorescence, le curseur est positionné sur l'ensemble des canaux. Les résultats sont exprimés en intensité moyenne de fluorescence (moyenne géométrique ou MnX).

2.2.3. Western Blot

L'analyse par Western Blot est réalisée à partir des mêmes préparations plaquettaires (PRP incubé en présence de PBS, ADP, PGE1, SNP, ADP+PGE1, ADP+SNP) que les échantillons préparés pour l'analyse en cytométrie en flux. Après cette étape d'incubation, les plaquettes sont centrifugées pendant 1 minute à 12000 g. Les culots plaquettaires sont lysés en tampon Laemmli 1X (0,06 M Tris pH 6,8, 2% SDS (m/v), 10% glycérol (p/v)), et en présence de bleu de bromophénol (0,005%) et d'anti-protéinases (Protease Inhibitors Cocktail Complete®, Mini, Roche). Les lysats sont congelés à -20°C.

L'électrophorèse est réalisée en gel de polyacrylamide (gel de séparation à 11%, gel de concentration à 4%) contenant 0.1% de SDS. Les échantillons, correspondant à 10⁶ plaquettes/puits, sont déposés après dénaturation par la chaleur (4 minutes à 100°C) et réduction par le 2-mercapto-éthanol (5%). Après la migration (2 heures à 15 mA), les protéines sont transférées sur membrane PVDF (Polyvinylidene Difluoride) (Biorad) pendant 1 heure à 100 volts, à +4°C. La membrane est saturée pendant 1 heure 30 à température ambiante en agitation dans du tampon TBS (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl) contenant du lait écrémé à 5%, puis lavée en tampon TBST (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20 (m/v)).

La membrane est incubée dans une solution de TBST contenant l'anticorps primaire, anti-VASP total (dilution 1/1000) (Becton Dickinson), anti-VASP 157-5C6 (dilution au 1:1000), et anti-VASP 239-16C2 (dilution au 1:400) (Nanotools), pendant une nuit à +4°C. Après trois lavages de 10 minutes dans le tampon TBST, la membrane est mise en présence de l'anticorps secondaire, anticorps polyclonal de chèvre anti-Ig de souris, couplé HRP (*horseradish peroxydase*) (dilution 1:20000) (Sigma), pendant 1 heure, à température ambiante. Les anticorps sont dilués dans le tampon TBS lait écrémé à 5%. La membrane est à nouveau lavée trois fois dans le tampon TBST, puis 1 fois en tampon TBS, avant d'être révélée en chimioluminescence (kit ECL Plus, Amersham).

Un standard de masse moléculaire (Euromedex) est déposé simultanément aux échantillons lors de l'électrophorèse.

L'intensité des bandes obtenues est quantifiée par analyse d'image (Fluor-S™ MultiImager, logiciel QuantityOne-4.1.1, Biorad). Les résultats obtenus sont exprimés en unités d'intensité par mm² (ODu/mm², ou uncalibrated optical density/mm²).

2.2.4. Indice de réponse des récepteurs à l'ADP

Cet indice évalue la capacité d'inhibition par l'ADP de la phosphorylation de VASP induite par PGE1.

Nous proposons les modalités suivantes de calcul de cet indice :

- en cytométrie en flux

$$\frac{(\text{MnX}_{\text{PGE1}} - \text{MnX}_{\text{basal}}) - (\text{MnX}_{\text{PGE1+ADP}} - \text{MnX}_{\text{ADP}}) \times 100}{(\text{MnX}_{\text{PGE1}} - \text{MnX}_{\text{basal}})}$$

Pour des raisons explicitées dans la partie résultats, nous rapporterons des indices obtenus avec d'autres modalités de calcul.

- en Western Blot

$$\frac{(\text{OD}_{\text{PGE1}}) - (\text{OD}_{\text{PGE1+ADP}}) \times 100}{(\text{OD}_{\text{PGE1}})}$$

2.2.5. Statistiques

Le type de distribution des données est analysé par le test de Shapiro-Wilk. Les résultats sont présentés en moyenne ± écart-type ou en médiane [interquartiles]. L'analyse statistique est réalisée avec le test de Wilcoxon (comparaison de données paires). Les différences sont considérées comme significatives pour $p < 0.05$.

3. Résultats

3.1. Témoins sains

3.1.1. Etude de la phosphorylation de VASP en cytométrie en flux

Les résultats obtenus en cytométrie en flux sont illustrés dans les figures 26 (histogrammes biparamétriques) et 27 (histogrammes monoparamétriques). Ces figures correspondent à l'étude de la phosphorylation de VASP à partir d'un échantillon prélevé chez un témoin sain. Les plaquettes sont perméabilisées par les réactifs Leucoperm™, après incubation du PRP (PBS, ADP, PGE1, PGE1+ADP, SNP, SNP+ADP), l'immunomarquage est réalisé par les anticorps anti-VASP 157-FITC et anti-VASP 239-FITC.

Les plaquettes sont déphosphorylées à l'état basal (figure 27). PGE1 induit une phosphorylation des deux sites sérines, 239 et 157. Cette phosphorylation induite par PGE1 est totalement inhibée par l'ADP pour la sérine 239, et partiellement pour la sérine 157 (figure 27). Dans cet exemple, la phosphorylation induite par SNP sur les deux sites sérines est comparable à celle induite par PGE1. L'inhibition par l'ADP de la phosphorylation induite par SNP est partielle pour la sérine 157. L'ADP n'inhibe pas la phosphorylation induite par SNP du site sérine 239 (figure 27).

Nous observons une augmentation du signal de fluorescence, en présence d'ADP, d'environ 50% comparativement à l'état basal. Ceci est observé pour les deux sites sérines (figure 27). Cette augmentation du signal de fluorescence est associée à des modifications du nuage plaquettaire sur les histogrammes biparamétriques taille/structure, et à une augmentation des temps d'acquisition (figure 26).

Taille/Structure

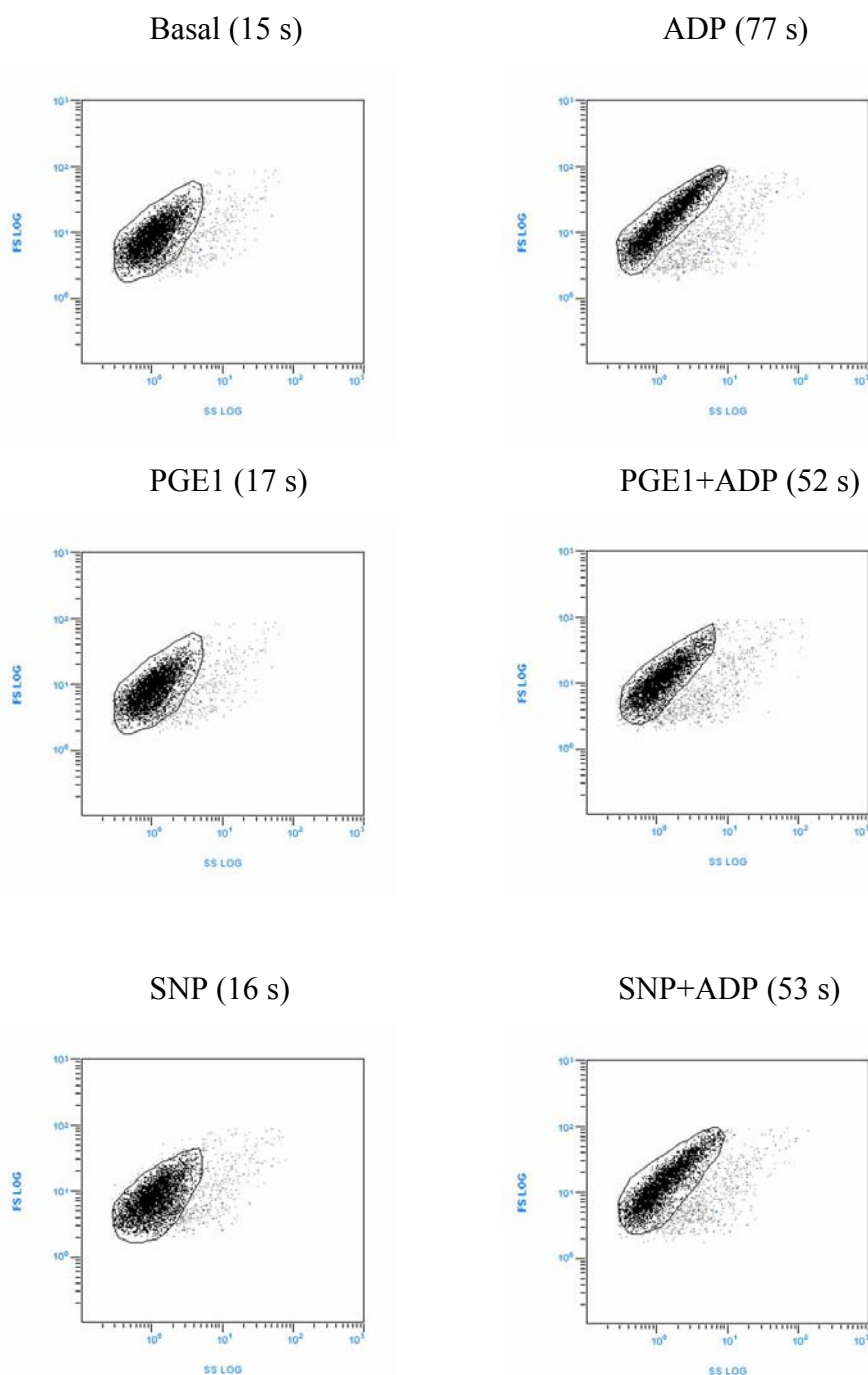


Figure 26. Phosphorylation de VASP, histogrammes biparamétriques

Perméation à partir de PRP par les réactifs Leucoperm™, immunomarquage intraplaquettaire par l'anticorps anti-VASP 157-FITC. Sont indiqués pour chaque histogramme les temps en secondes nécessaires à l'acquisition de 5000 événements. La modification de l'aspect du nuage plaquettaire observée en présence d'ADP (histogrammes de droite) est également retrouvée pour l'anticorps anti-VASP 239-FITC (histogrammes non présentés). Les histogrammes de fluorescence correspondant sont présentés dans la figure 27.

Histogrammes de fluorescence

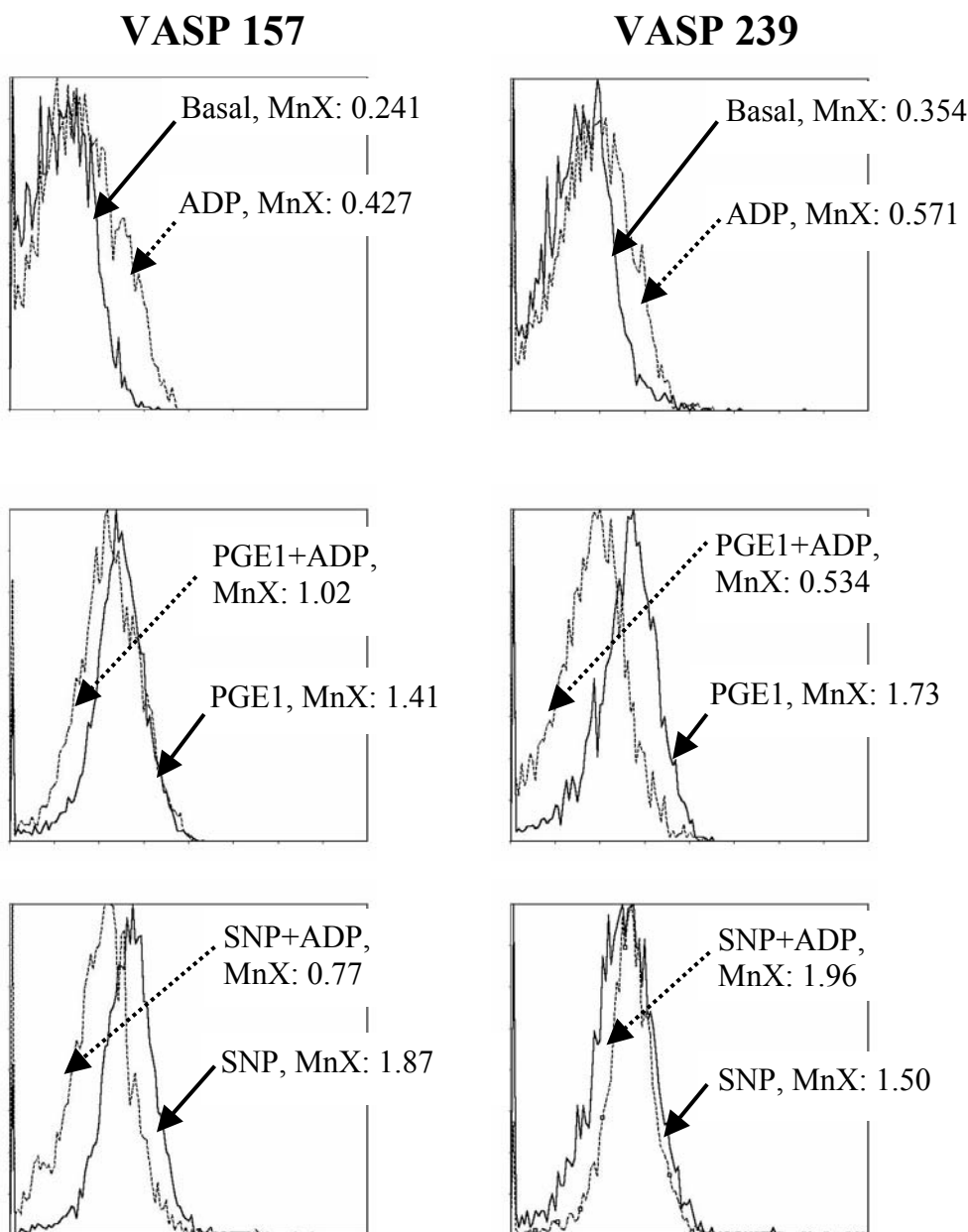


Figure 27. Phosphorylation de VASP

Les histogrammes monoparamétriques correspondent à l'anticorps anti-VASP 157-FITC (colonne de gauche), et anti-VASP 239-FITC (colonne de droite). Cet exemple (témoin sain) illustre l'augmentation du signal de fluorescence en réponse à l'ADP comparativement à l'état basal, la phosphorylation induite par PGE1 sur les deux sites sérine, la réversion par l'ADP de la phosphorylation induite par PGE1 (totale pour la sérine 239, partielle pour la sérine 157), la phosphorylation en réponse au SNP, et l'inhibition partielle de cette phosphorylation par l'ADP sur la sérine 157. L'indice de réponse des récepteurs à l'ADP, calculé pour VASP 239, est de 102%.

Les résultats obtenus chez les 28 volontaires sains montrent que PGE1 induit chez tous les témoins une forte phosphorylation de VASP sur les deux sites sérine étudiés (figure 28). Cette phosphorylation est inhibée totalement par l'ADP pour la sérine 239, et partiellement pour la sérine 157 (figure 28). L'inhibition totale par l'ADP de la phosphorylation de VASP 239 induite par PGE1 permet le calcul d'un indice évaluant la fonctionnalité des récepteurs à l'ADP. Il est présenté dans le tableau IX. La réversion partielle observée pour la sérine 157 explique que cet indice soit différent de 100% chez le sujet sain ($54\% \pm 17$), rendant inappropriée la notion de réactivité des récepteurs à l'ADP dans ce cas.

La phosphorylation de VASP en réponse au SNP présente une variabilité interindividuelle importante, allant d'une absence de réponse, à une phosphorylation comparable à celle induite par PGE1 (figure 29). L'absence de phosphorylation en réponse au SNP concerne 50% des témoins; elle est observée simultanément pour les deux sites sérine (figure 30). Il existe une inhibition partielle par l'ADP de la phosphorylation de VASP 157 induite par SNP (figure 28). En revanche, l'ADP ne diminue pas la phosphorylation du site sérine 239 (figure 28).

L'intensité de fluorescence est augmentée en réponse à l'ADP, comparativement à l'état basal, pour les deux sérines (figure 28). Nous présentons dans le tableau IX trois modalités de calcul de l'indice de réponse des récepteurs à l'ADP, prenant en compte ou non le bruit de fond généré par les agrégats plaquettaires observés en présence d'ADP. Les indices diminuent lorsque le bruit de fond lié à la formation d'agrégats n'est pas pris en compte. Ces résultats montrent que les indices de réponse des récepteurs à l'ADP, qui ne sont qu'un simple calcul à partir des moyennes de fluorescence, sont dépendants des contraintes liées à la technique de cytométrie en flux (tableau IX)..

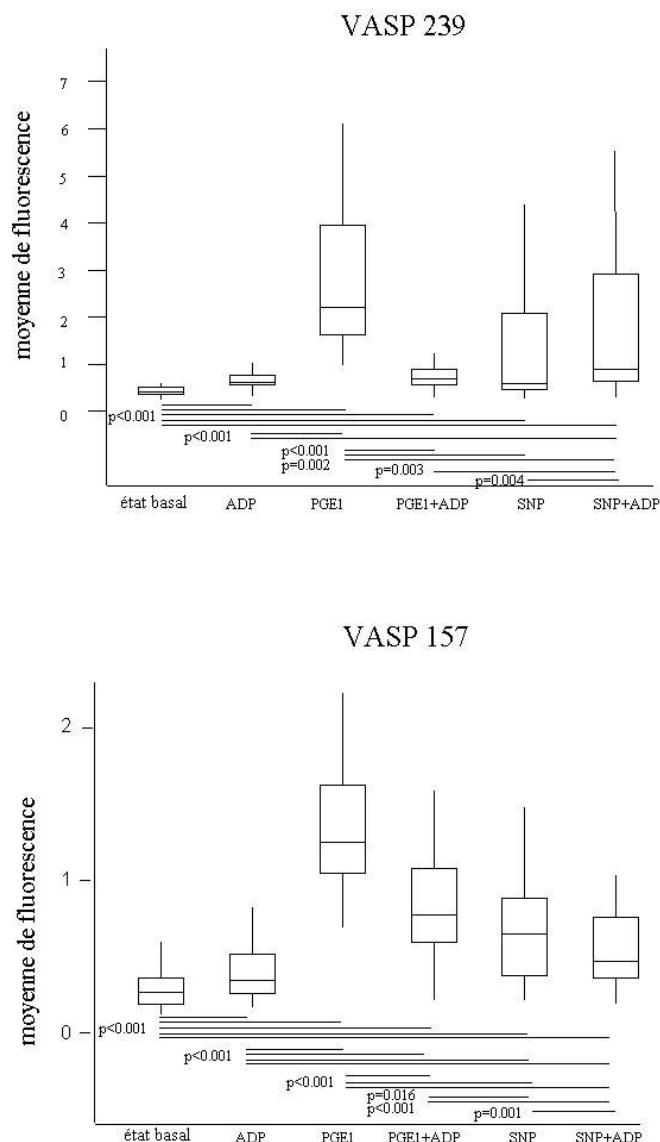


Figure 28. Phosphorylation de VASP chez le volontaire sain (n=28)
(cytométrie en flux)

Les valeurs moyennes de fluorescence (MnX) sont rapportées sous forme de médiane [interquartiles]. La phosphorylation de la sérine 239 induite par PGE1, est totalement inhibée par l'ADP, alors que l'ADP n'inhibe pas la phosphorylation induite par SNP. La phosphorylation de la sérine 157 par l'ADP est partiellement inhibée, quel que soit l'inducteur de phosphorylation utilisé (PGE1 ou SNP). L'ADP entraîne avec les deux anticorps utilisés (anti-VASP 239 et anti-VASP 157) une augmentation significative du signal de fluorescence.

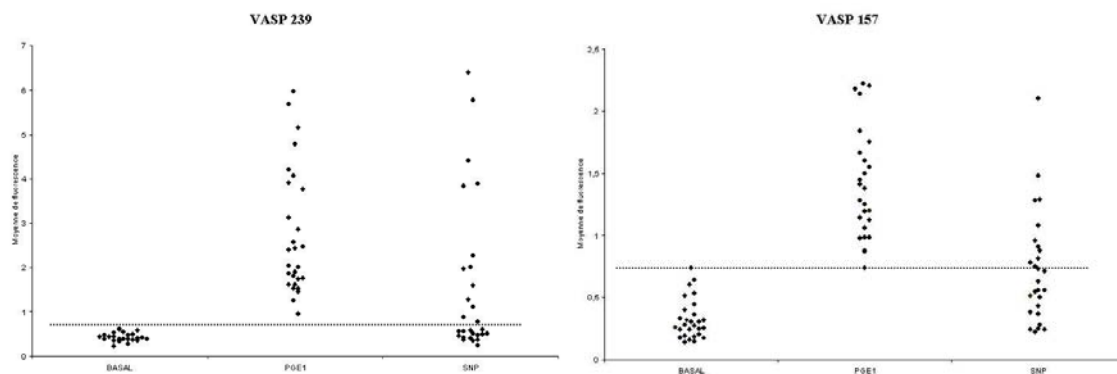


Figure 29. Répartition des valeurs obtenues en réponse à PGE1 et à SNP chez le volontaire sain (cytométrie en flux)

La réponse au SNP présente une variabilité importante. L'absence de phosphorylation en réponse au SNP (figurée par la ligne pointillée) est observée chez 52% des témoins pour la sérine 239 et pour 55% d'entre eux pour la sérine 157. L'absence de phosphorylation en réponse à PGE1, quelle que soit la sérine étudiée, n'a jamais été observée.

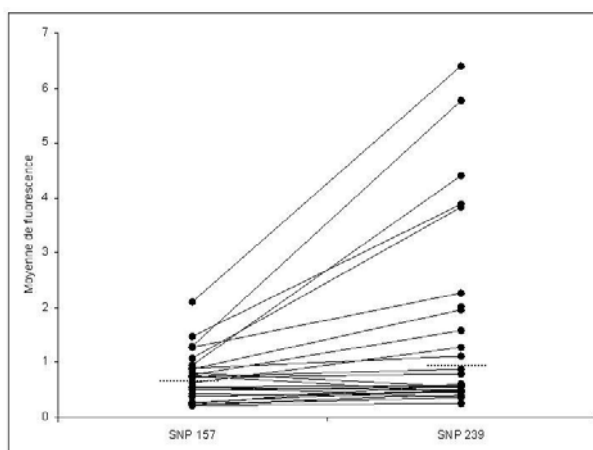


Figure 30. Phosphorylation des sérines 157 et 239 en réponse au SNP chez le volontaire sain (cytométrie en flux)

L'absence de phosphorylation des sites sérines 157 (à gauche) et 239 (à droite) en réponse au SNP est mise en évidence chez les mêmes témoins; il n'existe pas de profil de réponse spécifique d'un site sérine particulier en réponse au SNP.

Indice de réponse des récepteurs à l'ADP	VASP 239
$\frac{(\text{MnX}_{\text{PGE1}} - \text{MnX}_{\text{basal}}) - (\text{MnX}_{\text{PGE1+ADP}} - \text{MnX}_{\text{ADP}})}{(\text{MnX}_{\text{PGE1}} - \text{MnX}_{\text{basal}})} \times 100$	99% ± 10
$\frac{(\text{MnX}_{\text{PGE1}} - \text{MnX}_{\text{basal}}) - (\text{MnX}_{\text{PGE1+ADP}} - \text{MnX}_{\text{basal}})}{(\text{MnX}_{\text{PGE1}} - \text{MnX}_{\text{basal}})} \times 100$	87% ± 9
$\frac{(\text{MnX}_{\text{PGE1}}) - (\text{MnX}_{\text{PGE1+ADP}})}{(\text{MnX}_{\text{PGE1}})} \times 100$	71% ± 10%

*Tableau IX. Indice de réponse des récepteurs à l'ADP chez le volontaire sain
(cytométrie en flux)*

Le premier indice présenté est calculé tel que défini dans le paragraphe 2.2.4. Il prend en compte le bruit de fond observé à l'état basal et en présence d'ADP. D'autres modalités de calcul peuvent être utilisées, prenant en compte uniquement le bruit de fond à l'état basal (2^e indice), ou ne prenant pas en compte ce bruit de fond (3^e indice). Les résultats obtenus varient en fonction du mode de calcul utilisé.

3.1.2. Etude de la phosphorylation de VASP en Western Blot (témoins sains)

3.1.2.1. Anticorps anti-VASP total

Nous obtenons avec l'anticorps pan-VASP un signal pour toutes les conditions expérimentales testées, permettant l'interprétation de l'absence de signal observée pour les deux anticorps spécifiques de la phosphorylation des sérines 239 et 157, à l'état basal et en réponse à l'ADP (figure 31). VASP dans sa forme non phosphorylée a une masse moléculaire de 46 kDa. La phosphorylation de la protéine s'accompagne d'une modification de sa masse moléculaire apparente (46 → 50 kDa). La phosphorylation induite par PGE1 entraîne une modification complète de la masse moléculaire apparente (signal observé à 50 kDa). La modification de la masse moléculaire apparente est partielle en réponse au SNP, conditions dans lesquelles nous détectons deux bandes, à 46 et à 50 kDa.

Une modification complète de la masse moléculaire apparente est toujours observée avec l'anticorps anti-VASP 157, quel que soit l'inducteur de phosphorylation utilisé. La phosphorylation sur le site sérine 239 (anticorps anti-VASP 239), s'accompagne d'une modification totale en réponse à PGE1, et partielle en réponse au SNP (figure 31).

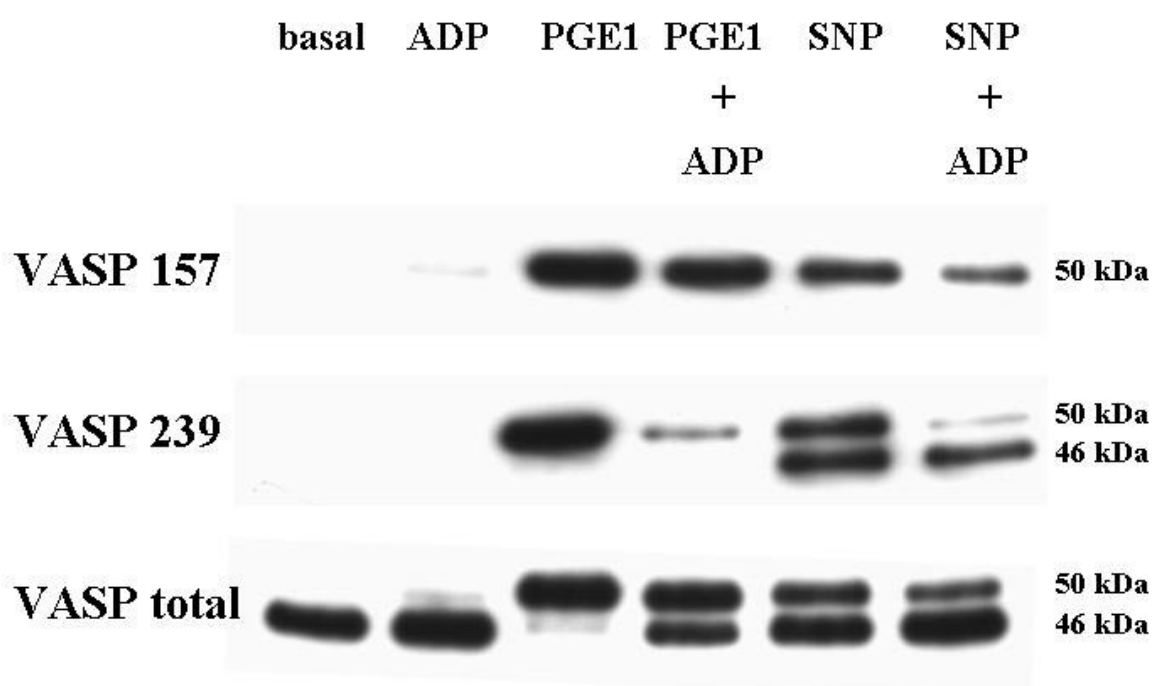


Figure 31. Phosphorylation de VASP (Western Blot).

Différents profils de phosphorylation sont observés. La phosphorylation de la sérine 157 s'accompagne d'une modification complète de la masse moléculaire apparente de la protéine (signal détecté à 50 kDa), quel que soit l'inducteur de phosphorylation utilisé. La phosphorylation de la sérine 239 entraîne une modification complète de la masse moléculaire apparente en réponse à PGE1 (50 kDa), partielle en réponse au SNP (46 et 50 kDa). L'anticorps anti-VASP total reconnaît la protéine indépendamment de sa phosphorylation.

3.1.2.2. Etude de la phosphorylation des sérines 239 et 157 en Western

Blot (témoins sains)

Les Western Blots ont été réalisés pour 9 témoins.

La phosphorylation de la sérine 239 est toujours observée en réponse à PGE1; cette phosphorylation est inhibée par l'ADP, permettant le calcul de l'indice de réponse des récepteurs à l'ADP ($91\% \pm 8$). La phosphorylation de la sérine 239 en réponse au SNP est variable d'un témoin à l'autre. Elle n'est pas inhibée par l'ADP.

La phosphorylation du site sérine 157 est également toujours observée en réponse à PGE1, et comme pour VASP 239, la réponse au SNP est variable. L'ADP inhibe partiellement la phosphorylation de la sérine 157, quel que soit l'inducteur de phosphorylation utilisé (PGE1 ou SNP).

Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus en cytométrie en flux.

Nous n'observons pas en Western Blot d'augmentation du signal en réponse à l'ADP, comparativement à l'état basal.

Ces résultats sont présentés dans la figure 32.

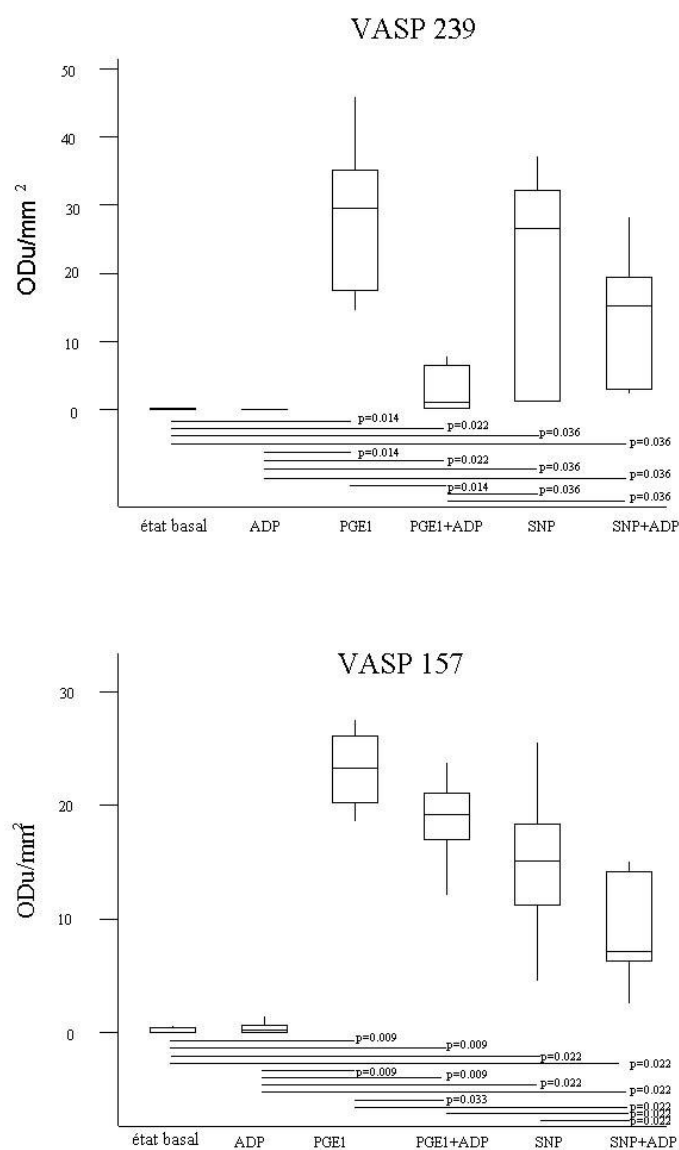


Figure 32. Phosphorylation de VASP chez le volontaire sain
(Western Blot, n=9)

PGE1 et SNP induisent la phosphorylation de VASP sur les deux sites sérine étudiés, avec une variabilité interindividuelle importante pour la réponse au SNP. L'inhibition par l'ADP de la phosphorylation induite par PGE1 est totale pour VASP 239, partielle pour VASP 157. L'ADP inhibe partiellement la phosphorylation induite par SNP, uniquement sur le site sérine 157.

3.2. Patients traités par thiénopyridines

3.2.1. Agrégation plaquettaire

Le clopidogrel inhibe l'agrégation induite par l'ADP ($51\% \pm 12$ chez les patients, 100% chez les témoins).

3.2.2. Phosphorylation de la sérine 239 (VASP 239) : comparaison témoins/patients

3.2.2.1. Western Blot

Nous observons une absence de signal à l'état basal et en réponse à l'ADP. La phosphorylation induite par PGE1 est toujours observée. La réponse au SNP est variable selon les patients, allant de l'absence de phosphorylation à une phosphorylation d'intensité comparable à celle induite par PGE1.

L'inhibition par le clopidogrel de l'inhibition par l'ADP de la phosphorylation induite par PGE1 est détectée chez les patients. Cette modulation par le clopidogrel est variable d'un patient à l'autre, avec des indices de réponse des récepteurs à l'ADP compris entre 0 et 80%. La répartition des valeurs obtenues est rapportée dans la figure 33, et la comparaison des indices de réponse des récepteurs à l'ADP entre patients et témoins dans le tableau X.

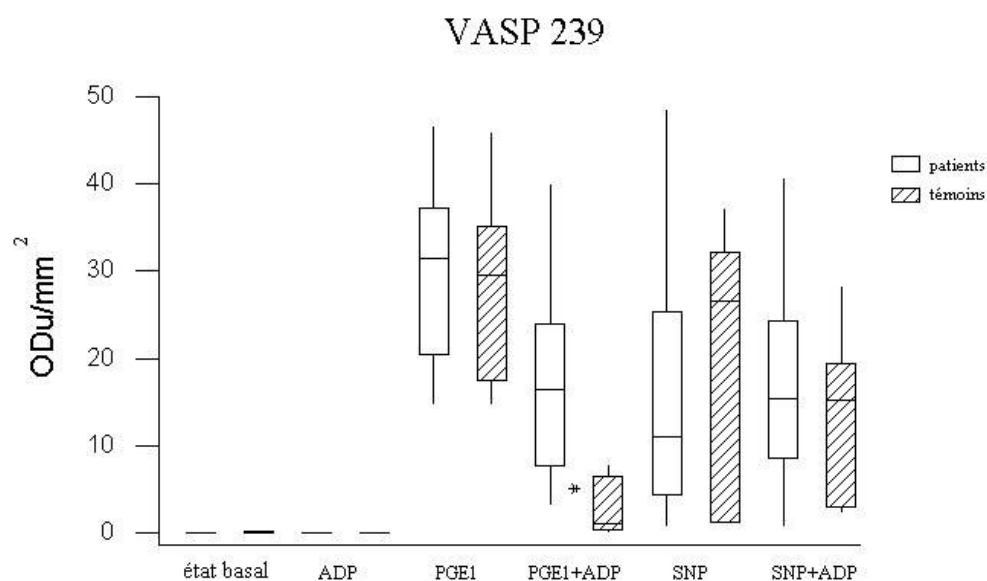


Figure 33. Phosphorylation de VASP 239 : comparaison patients (n=12) / volontaires sains (n=9) (Western Blot)

La seule différence statistique (astérisque) entre les deux groupes concerne la modulation par l'ADP de la phosphorylation induite par PGE1 (condition PGE1+ADP). La répartition des valeurs est également différente, avec une dispersion importante pour le groupe-patient, évoquant une variabilité interindividuelle importante dans la réponse au clopidogrel.

Au sein du groupe-patient, il existe une différence significative entre les conditions PGE1 et PGE1+ADP ($p=0.003$) (non figurée sur le box plot).

La réponse au SNP est variable dans les deux groupes, allant de l'absence de phosphorylation à une phosphorylation d'intensité comparable à celle obtenue en réponse à PGE1. L'ADP ne modifie pas la phosphorylation induite par SNP.

	témoins n=9	patients n=12	p
indice de réponse des récepteurs à l'ADP			
moyenne $\pm$ écart-type	91% $\pm$ 8	37% $\pm$ 25	<0.5
[min-max]	[76-127]	[0-80]	

Tableau X. Indices de réponse des récepteurs à l'ADP (Western Blot)

Un seul indice a été déterminé en Western Blot, puisque nous n'avons pas obtenu de signal, ni à l'état basal, ni en réponse à l'ADP (et notamment pas de surestimation du signal en présence d'ADP).

3.2.2.2 Cytométrie en flux

La seule différence significative entre les groupes patients et témoins, concerne l'inhibition par l'ADP de la phosphorylation induite par PGE1 (figure 34). En dépit de cette différence significative, les indices de réactivité des récepteurs à l'ADP sont comparables entre patients (91% $\pm$ 16) et témoins (99% $\pm$ 10). Nous n'avons pas observé de différences significatives entre patients et témoins pour les autres conditions testées (basal, ADP, PGE1, SNP, SNP+ADP).

Nous observons chez les patients :

- l'absence d'inhibition par l'ADP de la phosphorylation de VASP 239 en réponse au SNP (figure 34),
- une augmentation significative du signal de fluorescence en réponse à l'ADP (augmentation d'environ 50%)
- une variabilité interindividuelle de la phosphorylation de VASP 239 en réponse au SNP, avec une absence de phosphorylation chez 10 patients (48%) (figure 35).

Nous présentons dans le tableau XI les indices de réponse des récepteurs à l'ADP. Ces indices, comme précédemment rapporté pour les témoins, varient selon le mode de calcul utilisé. Si l'on ne prend pas en compte la notion de bruit de fond liée à la présence d'agrégats plaquettaires, l'indice de réponse des récepteurs à l'ADP est sous-estimé, pouvant faire conclure à une inhibition par le clopidogrel (tableau XI).

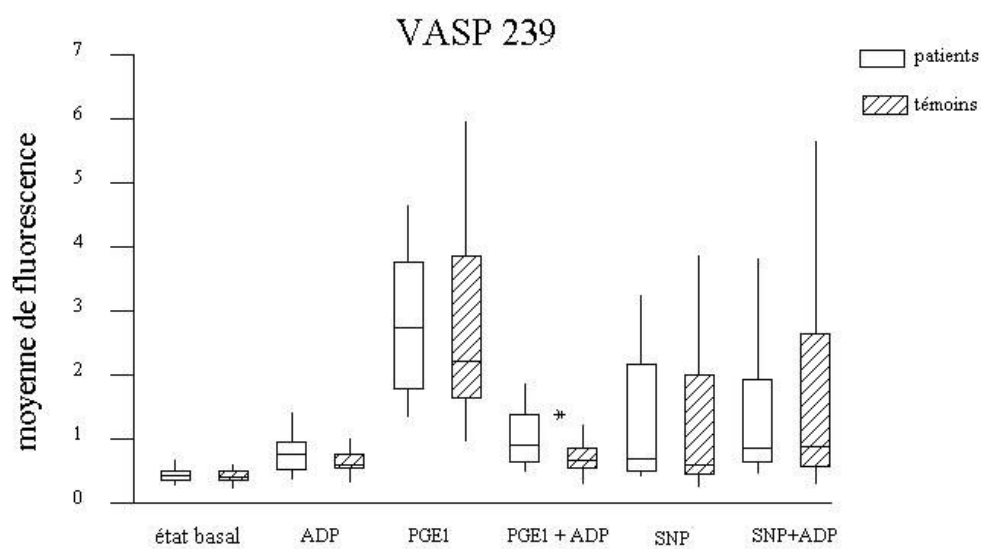


Figure 34. Phosphorylation de VASP 239 (cytométrie en flux).

Comparaison patients / volontaires sains.

La seule différence significative concerne l'inhibition par l'ADP de la phosphorylation induite par PGE1 ($p=0.01$) (astérisque). Bien que cette différence soit significative, le clopidogrel ne permet pas d'inhiber l'effet de l'ADP sur la phosphorylation induite par PGE1.

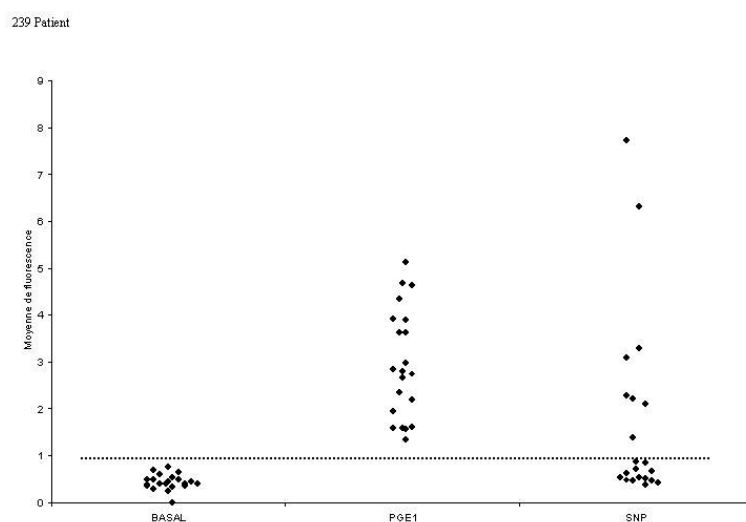


Figure 35. Phosphorylation de la sérine 239 en réponse à PGE1 et au SNP chez les patients traités par clopidogrel (n=21) (cytométrie en flux)

La phosphorylation induite par SNP présente une variabilité importante, avec une absence de phosphorylation dans 48% des cas. L'absence de phosphorylation en réponse à PGE1 n'est jamais observée.

VASP 239	
Indice de réponse des récepteurs à l'ADP	moyenne ± écart-type [min-max]
$\frac{(\text{MnX}_{\text{PGE1}} - \text{MnX}_{\text{basal}}) - (\text{MnX}_{\text{PGE1+ADP}} - \text{MnX}_{\text{ADP}})}{(\text{MnX}_{\text{PGE1}} - \text{MnX}_{\text{basal}})} \times 100$	91% ± 17 [76-127]
$\frac{(\text{MnX}_{\text{PGE1}} - \text{MnX}_{\text{basal}}) - (\text{MnX}_{\text{PGE1+ADP}} - \text{MnX}_{\text{basal}})}{(\text{MnX}_{\text{PGE1}} - \text{MnX}_{\text{basal}})} \times 100$	76% ± 13 [49-96]
$\frac{(\text{MnX}_{\text{PGE1}}) - (\text{MnX}_{\text{PGE1+ADP}})}{(\text{MnX}_{\text{PGE1}})} \times 100$	63% ± 13% [35-84]

Tableau XI. Indice de réponse des récepteurs à l'ADP chez les patients traités par clopidogrel (n=21)

Le premier indice présenté prend en compte le bruit de fond spécifique à chaque condition expérimentale, notamment celui lié à la présence d'agrégats plaquettaires induits par l'ADP. La cytométrie n'apparaît pas sensible à la prise de thiénopyridines.

Cet indice diminue pour les deux autres modalités de calcul. Les valeurs les plus basses sont obtenues pour le dernier indice présenté dans le tableau, avec des valeurs pour certains patients pouvant évoquer une inhibition des récepteurs à l'ADP (indice < 50% pour 4 patients).

Nous avons donc obtenu en Western Blot les résultats attendus, à savoir une inhibition par le clopidogrel de l'effet de l'ADP sur la phosphorylation de VASP 239 induite par PGE1. La cytométrie en flux en revanche n'a pas permis de détecter la prise de clopidogrel. Les différences observées entre les deux techniques sont illustrées dans la figure 36, représentative de l'ensemble des résultats obtenus chez les patients.

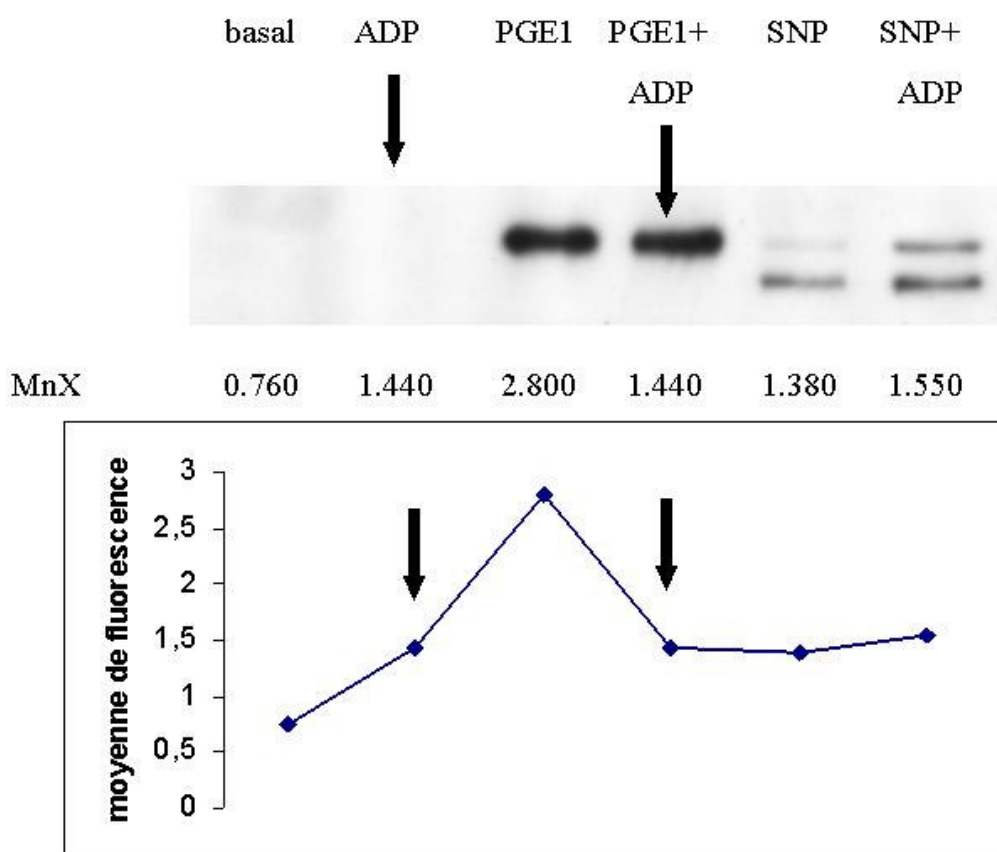


Figure 36. Comparaison cytométrie en flux et Western Blot (VASP 239)

L'indice de réactivité des récepteurs à l'ADP est égal à 100% en cytométrie en flux. Il est de 0% en Western Blot, chez le même patient, traité depuis 72 heures par clopidogrel (75 mg/jour après une dose de charge initiale de 300 mg).

Cet exemple illustre l'inhibition totale par l'ADP de la phosphorylation de VASP 239 induite par PGE1, observée en cytométrie en flux, malgré le clopidogrel, et l'absence d'inhibition mise en évidence par le Western Blot.

Nous observons pour des valeurs de MnX identiques en cytométrie en flux (ADP et ADP+PGE1), des intensités de signaux en Western Blot très différentes. Les discordances sont indiquées par les flèches.

L'augmentation du signal de fluorescence obtenu en cytométrie en flux en présence d'ADP comparativement à l'état basal n'est pas mis en évidence en Western Blot.

Cet exemple est représentatif de l'ensemble des résultats obtenus chez les patients.

3.2.3. Phosphorylation de la sérine 157 (VASP 157) : comparaison témoins/patients

3.2.3.1. Cytométrie en flux

Nous n'avons observé aucune différence significative entre les patients et les témoins sains, quelles que soient les conditions de préparation des échantillons (basal, ADP, PGE1, PEG1+ADP, SNP, SNP+ADP) (figure 37).

L'inhibition par l'ADP de la phosphorylation induite par PGE1 est partielle, comme chez les témoins (figure 37).

La phosphorylation induite par SNP est variable d'un patient à l'autre. Une absence de phosphorylation est observée dans 47% des cas (10/21) (figure 38). L'inhibition par l'ADP de la phosphorylation induite par SNP est à la limite de la significativité ($p=0.51$).

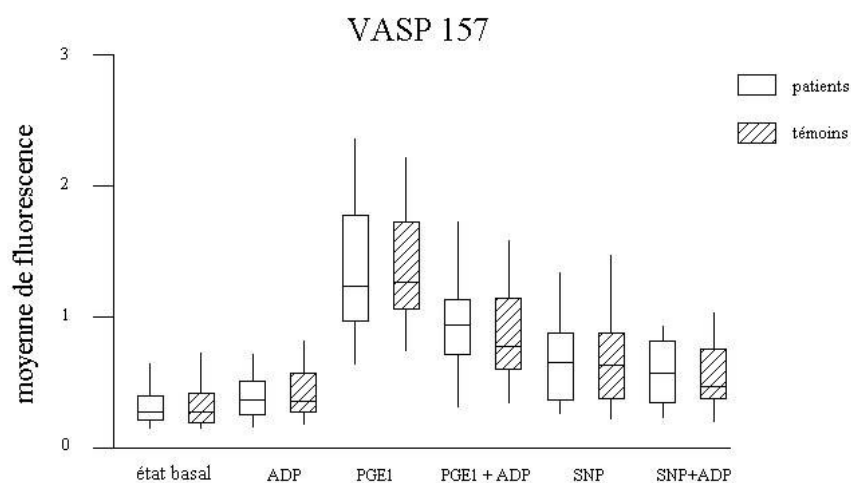


Figure 37. Phosphorylation de VASP 157 (cytométrie en flux).

Comparaison patients (n=21) / volontaires sains (n=28)

Il n'existe pas de différence significative entre patients traités par clopidogrel et volontaires sains. L'inhibition partielle par l'ADP de la phosphorylation induite par PGE1 est identique entre les deux groupes, indiquant que, par cette technique, nous ne mettons pas en évidence de modulation des profils de phosphorylation par le clopidogrel.

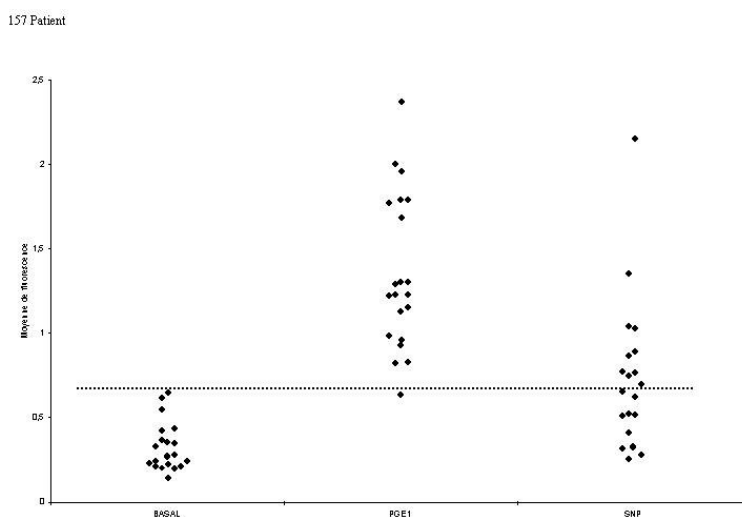


Figure 38. Phosphorylation de VASP 157 en réponse à PGE1 et au SNP
(cytométrie en flux)

L'absence de phosphorylation en réponse au SNP est observée chez 10 des 21 patients (47%).

3.2.3.2. Western Blot

Le Western Blot permet d'identifier la prise de clopidogrel (figure 39). Le clopidogrel inhibe l'effet de l'ADP sur la phosphorylation induite par PGE1 et SNP : il n'existe pas de différence significative chez les patients entre les conditions PGE1 et PGE1+ADP, et SNP et SNP+ADP (alors que l'ADP inhibe de façon partielle cette phosphorylation chez les témoins non traités). Ces résultats ne sont pas en accord avec la cytométrie en flux (figure 41). La variabilité interindividuelle dans la réponse au SNP est retrouvée pour les deux groupes (figure 39).

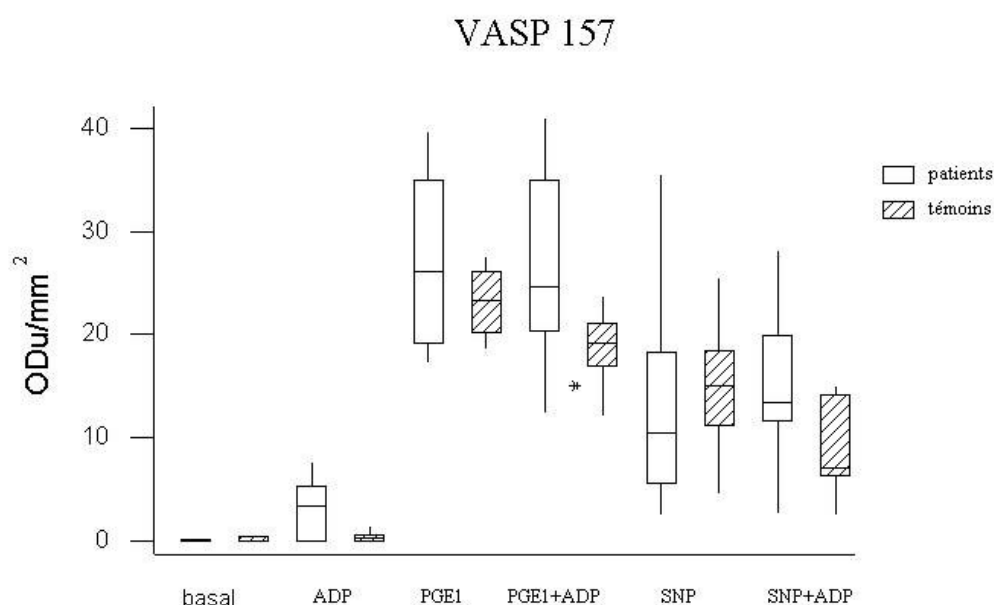


Figure 39. Phosphorylation de VASP 157 : comparaison patients (n=12) / témoins (n=9)
(Western Blot)

La phosphorylation de VASP 157 est significativement différente entre les deux groupes pour les conditions PGE1+ADP. Cette différence est liée à l'inhibition par l'ADP de la phosphorylation induite par PGE1 chez les témoins (inhibition partielle mais significative), alors que le clopidogrel (groupe patients) inhibe totalement l'effet de l'ADP.

3.3. Patients co-traités par thiénopyridines et anti-GPIIb/IIIa (étude de la phosphorylation de VASP 239)

L'étude de patients bénéficiant d'une coprescription de clopidogrel et d'anti-GPIIb/IIIa a pour but d'évaluer l'indice de réponse des récepteurs à l'ADP en tant que surveillance spécifique des thiénopyridines, dans un contexte d'association d'antiplaquettaires. Nous avons comparé les profils de phosphorylation de la sérine 239 en réponse à PGE1 avant et après administration parentérale d'éptifibatide ou de tirofiban.

3.3.1. Cytométrie en flux

L'aspect en taille structure en présence d'ADP est évocateur d'agrégats plaquettaires pour cinq des six patients (avant l'administration du traitement anti-GPIIb/IIIa), associé à une augmentation significative des moyennes de fluorescence en ADP comparativement à l'état basal. Trente minutes après le début de la perfusion d'éptifibatide ou de tirofiban, nous n'observons plus d'aspect d'agrégats plaquettaires en réponse à l'ADP. Ceci est associé à une diminution significative des moyennes de fluorescence (figure 40). Le tirofiban et l'éptifibatide ne modifient pas la réponse à PGE1. L'inhibition de la phosphorylation par l'ADP est plus élevée après la perfusion, mais est non significative ($p=0.06$) (figure 40). Le calcul de l'indice de réponse des récepteurs à l'ADP n'est pas statistiquement modifié par les antagonistes des récepteurs GPIIb/IIIa ($95\% \pm 16$ avant anti-GPIIb/IIIa, $86\% \pm 7$ après). En revanche, lorsque cet indice est calculé sans soustraction du bruit de fond, il devient statistiquement plus élevé après la perfusion d'anti-GPIIb/IIIa (tableau XII). La comparaison de ces deux indices montre que les agrégats plaquettaires, par la surestimation du signal qu'ils entraînent, représentent un biais selon le mode de calcul utilisé.

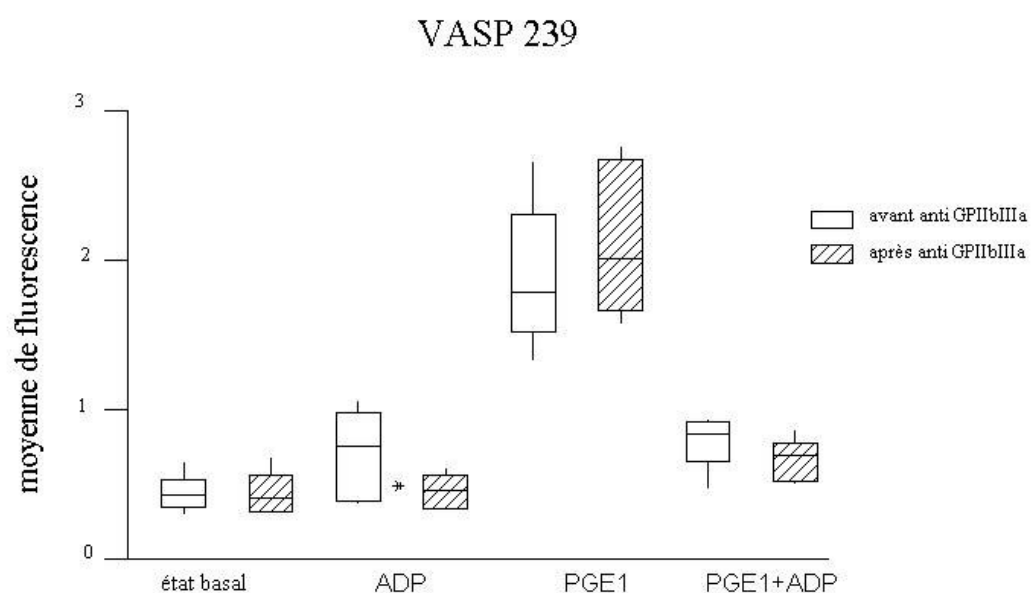


Figure 40. Phosphorylation de VASP (site sérine 239) chez des patients traités par clopidogrel, avant et après administration parentérale d'anti-GPIIb/IIIa (cytométrie en flux)

La seule différence significative observée concerne le signal de fluorescence en réponse à l'ADP (indiquée par l'astérisque).

La diminution du signal en réponse à PGE1+ADP après l'initiation du traitement par anti-GPIIb/IIIa est à la limite de la significativité ($p=0.06$).

	avant	après	<i>p</i>
$\frac{(\text{MnX}_{\text{PGE1}} - \text{MnX}_{\text{basal}}) - (\text{MnX}_{\text{PGE1+ADP}} - \text{MnX}_{\text{ADP}})}{(\text{MnX}_{\text{PGE1}} - \text{MnX}_{\text{basal}})} \times 100$	95%±16	86%±7	0.295
$\frac{(\text{MnX}_{\text{PGE1}}) - (\text{MnX}_{\text{PGE1+ADP}})}{(\text{MnX}_{\text{PGE1}})} \times 100$	56%±14	64%±10	0.036

Tableau XII. Influence des anti-GPIIb/IIIa sur l'indice de réponse des récepteurs à l'ADP évalué en cytométrie en flux

Le calcul tel que nous l'avons retenu (1^{er} indice présenté) n'est pas modifié par le traitement anti-GPIIb/IIIa, ce calcul prenant en compte la présence des agrégats plaquettaires induits par l'ADP.

En revanche, le 2^e indice est significativement augmenté après l'administration d'anti-GPIIb/IIIa (en raison de la disparition des agrégats plaquettaires).

3.3.2. Western Blot

Les anti-GPIIb/IIIa ne modifient ni la phosphorylation de VASP 239 induite par PGE1, ni l'inhibition de cette phosphorylation par l'ADP (figure 41). Les indices de réactivité des récepteurs à l'ADP ne sont pas significativement différents avant le traitement par anti-GPIIb/IIIa (40% ± 20) et après (31% ± 25).

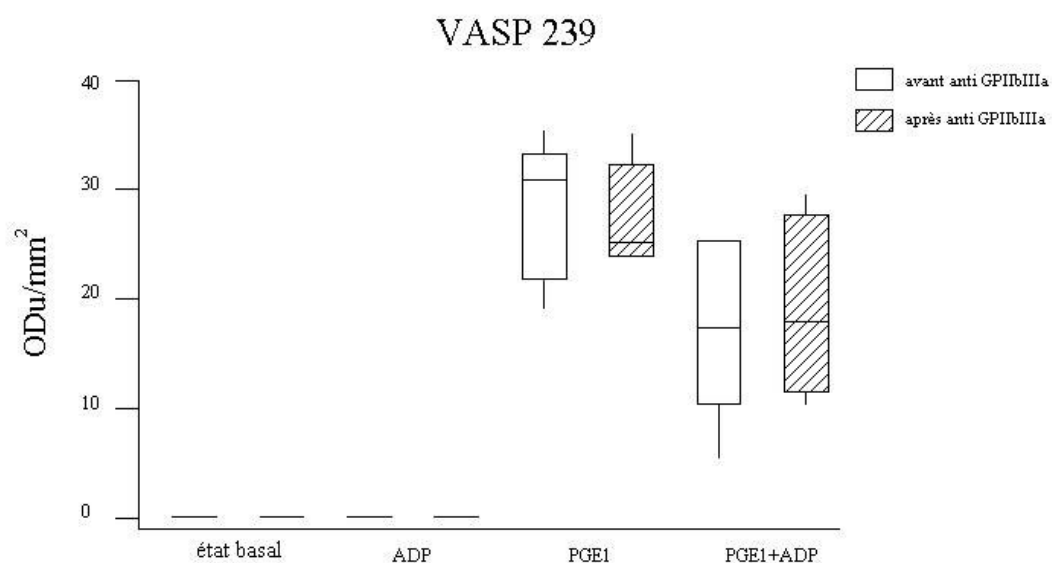


Figure 41. Phosphorylation de VASP (site sérine 239) chez des patients traités par clopidogrel, avant et après administration parentérale d'anti-GPIIb/IIIa.

(Western Blot)

La coprescription d'anti-GPIIb/IIIa ne modifie pas les profils de phosphorylation de la sérine 239.

5. Discussion

Il est nécessaire de développer un test permettant d'évaluer spécifiquement l'effet des thiénoypyridines, chez des patients traités simultanément par d'autres antiplaquettaires, ce test devant être de réalisation simple et rapide, et potentiellement standardisable. Nous avons développé un test de cytométrie en flux pour l'étude de la phosphorylation de VASP en intra-plaquettaire. Dans ce contexte précis d'évaluation du traitement par clopidogrel, le principe du test repose sur la capacité du médicament à inhiber ou diminuer l'effet de l'ADP, *via* l'inhibition du récepteur P2Y₁₂, sur la phosphorylation de VASP 239 induite par PGE1 (Schwartz 1999, Baragan 2003). Les résultats sont exprimés sous forme d'un indice de réponse des récepteurs à l'ADP, calculé à partir des moyennes de fluorescence. Nous avons comparé les résultats obtenus en cytométrie en flux à ceux obtenus en Western Blot. Un indice de réponse a également été calculé à partir des résultats du Western Blot, après quantification de l'intensité des signaux obtenus. Les conditions de préparation des échantillons (incubation des plaquettes en présence de PGE1 et d'ADP+PGE1), et les anticorps monoclonaux utilisés, sont identiques pour les deux techniques.

La cytométrie en flux ne nous a pas permis de détecter la prise de clopidogrel. L'inhibition par l'ADP de la phosphorylation de VASP 239 induite par PGE1 est identique dans les groupes témoins et patients, et donc non modulée par le clopidogrel. Les indices de réponse des récepteurs à l'ADP ne sont pas différents entre patients et témoins ($91\% \pm 17$ chez les patients, $99\% \pm 10$ chez les témoins). Ces résultats ne confirment pas ceux de la seule étude rapportée dans la littérature, qui décrit la cytométrie en flux comme un test sensible aux thiénoypyridines, permettant de classer les patients en mauvais et bons répondeurs (Baragan 2003). Des différences de méthodologie peuvent expliquer ces résultats discordants, Baragan *et al* utilisant un test en sang total, une perméation par le triton, un marquage indirect, et des modalités de calcul de l'indice de réponse plaquettaire probablement différentes. Nous nous sommes heurtés en cytométrie en flux à la surestimation artéfactuelle du signal de fluorescence en présence d'ADP, liée à la présence d'agrégats plaquettaires. Cette surestimation modifie les indices de réponse des récepteurs à l'ADP selon le mode de calcul utilisé, et donc l'interprétation finale en terme d'inhibition des récepteurs à l'ADP. Il nous semble important de définir précisément les modalités de calcul de cet indice; le bruit de fond lié à l'autofluorescence des plaquettes et surtout la sommation des signaux de fluorescence en cas d'agrégats plaquettaires doivent être pris en compte. L'étude de patients traités par clopidogrel et anti-GPIIb/IIIa nous a montré une modification de l'indice de réponse des

récepteurs à l'ADP lorsque le calcul ne prend pas en compte l'augmentation du signal liée à l'ADP. Par ailleurs, nous avons observé, lors de l'optimisation de l'étape de perméation, que le pourcentage de plaquettes dans la fenêtre définie sur l'histogramme taille-structure (événements CD41a positifs), pouvait varier de 25 à 85%, en sang total, en fonction de la technique de perméation (cf annexe). L'utilisation de ce test en sang total nécessite un double marquage.

La comparaison Western Blot / cytométrie en flux met en évidence l'absence de concordance entre les deux méthodes. Bien qu'étant une méthode semi-quantitative, le Western Blot permet d'identifier clairement la prise de thiénoxydines, puisque les indices de réactivité sont de $37\% \pm 25$ chez les patients, et de $91\% \pm 8$ chez les témoins. La cytométrie en flux ne nous semble pas applicable à l'heure actuelle en tant que test de surveillance des traitements par thiénoxydines. Dans ces conditions, seuls les résultats obtenus en Western Blot peuvent être discutés. Ils montrent une variabilité inter-patients dans la réponse au traitement, en accord avec les données de la littérature concernant des critères de jugement cliniques ou biologiques (agrégométrie, expression de la P-sélectine) (Gurbel 2003, Müller 2003). Les profils de phosphorylation obtenus chez les patients testés indiquent que l'inhibition du récepteur P2Y₁₂ est absente (indice de réactivité de 80%) à totale (indice de réactivité de 0%). La coprescription d'anti-GPIIb/IIIa ne modifie pas les résultats, ce qui permet une utilisation du test chez des patients bénéficiant de ce type d'association d'anti-plaquettaires. L'évaluation d'un indice de réactivité des récepteurs à l'ADP n'aura de pertinence clinique qu'avec la détermination d'un seuil permettant de classer les patients en mauvais ou bons répondeurs, avec idéalement des critères d'évaluation clinique. Le Western Blot dans ce contexte est une technique présentant un certain nombre de limites. Il ne peut pas être envisagé comme un test de réalisation simple, et son utilisation restera limitée à des études cliniques spécifiques.

En complément de ce travail, nous avons étudié la phosphorylation de VASP 239 *via* la voie du GMPc, et la phosphorylation de la sérine 157. La phosphorylation de VASP sur ses sites sérine fait intervenir deux voies différentes, initialement décrites comme spécifiques de certains sites sérine (la voie de l'AMPc pour la sérine 157, la voie du GMPc pour la sérine 239) (Horstrup 1994, Smolenski 1998).

Nos résultats montrent que la phosphorylation de la sérine 239 en réponse au SNP : 1) présente une variabilité interindividuelle importante dans notre population témoin, 2) cette variabilité est retrouvée chez les patients, 3) la phosphorylation induite par SNP n'est pas inhibée par l'ADP, et 4) n'est pas modulée par le clopidogrel.

La sérine 157 présente des profils de phosphorylation particuliers. Chez les témoins sans traitement, l'inhibition par l'ADP de la phosphorylation induite par PGE1 ou SNP est partielle (partielle par opposition à l'inhibition totale par l'ADP de la phosphorylation induite par PGE1, observée pour la sérine 239). Cet effet partiel de l'ADP sur la sérine 157 est un résultat inattendu, dans le sens où la phosphorylation de la sérine 157 est rapportée comme principalement liée aux concentrations d'AMPc (Horstrup 1994). Il n'existe pas à ce jour de données dans la littérature concernant VASP 157 et le rôle de l'ADP sur l'inhibition de sa phosphorylation. En revanche, le clopidogrel module, de façon attendue, l'inhibition par l'ADP de la phosphorylation en 157 induite par PGE1 ou SNP. L'effet du clopidogrel sur la phosphorylation de la sérine 157 n'est pas décrit dans la littérature.

L'étude de la phosphorylation de VASP en réponse au SNP, c'est-à-dire en réponse à l'augmentation des taux de GMPc, nous semblait importante en raison de la notion de *cross-talk* rapportée récemment dans la littérature (Li 2003a). Les résultats que nous avons obtenus en réponse à PGE1 et SNP sont compatibles avec cette notion de *cross-talk*, puisque VASP est phosphorylée sur les deux sites sérines étudiés quel que soit l'inducteur de phosphorylation utilisé : l'élévation des concentrations d'AMPc ou de GMPc permet d'aboutir indifféremment à la phosphorylation de la sérine 239 ou de la sérine 157. La réponse au SNP nous a montré des profils de phosphorylation très différents entre individus, avec une absence de phosphorylation dans 50% des cas, aussi bien chez les témoins que chez les patients (en cas de non réponse au SNP, l'absence de phosphorylation concerne les deux sites sérine). Cette notion n'est pas rapportée dans la littérature. Cette importante variabilité interindividuelle soulève l'hypothèse d'un éventuel polymorphisme génétique des PKG. Par ailleurs, la protéine VASP a d'autres fonctions que l'inhibition plaquettaire, puisqu'elle joue un rôle important sur la relaxation vasculaire. Cette fonction est décrite comme principalement liée au NO, et donc GMPc dépendante (Walford 2003, Vilahur 2004), même si la notion de *cross-talk* est également évoquée (Schäfer 2002). La variabilité que nous avons observée en réponse au SNP pourrait jouer un rôle dans la réponse aux vasodilatateurs utilisés en thérapeutique humaine (dérivés nitrés essentiellement). En effet, le principe actif de ces médicaments est un apport exogène de NO, qui permet l'augmentation des concentrations de GMPc *via* la restauration de l'activation de la guanylate cyclase, inhibée chez l'insuffisant coronarien (Vilahur 2004).

La participation de VASP dans l'inhibition plaquettaire est complexe. Nous ne pouvons à l'heure actuelle n'explorer que deux sites de phosphorylation sur les trois décrits. A notre connaissance, aucun anticorps reconnaissant la thréonine 278 dans sa forme phosphorylée

n'est disponible. En raison des différences observées dans les profils de phosphorylation des sites 157 et 239, il nous semble indispensable de pouvoir apprécier de façon complète la phosphorylation de cette protéine. Le choix du seul site sérine 239 comme outil de surveillance des traitements par antagonistes des récepteurs à l'ADP, comme rapporté dans la littérature, doit probablement être ré-évalué.

En conclusion, la cytométrie en flux ne permet pas, à l'heure actuelle, d'identifier des profils de phosphorylation spécifique des thiénoxydines. Le Western Blot nous a permis d'identifier une variabilité interindividuelle dans la réponse aux thiénoxydines, et une absence de phosphorylation en réponse au NO chez 50% des individus. Ce dernier point nous semble à prendre en considération dans le cadre des traitements par nitrovasodilatateurs.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La cytométrie en flux nous a permis, d'une part, d'appréhender les fonctions plaquettaires sur le plan de la physiologie plaquettaire, et d'autre part, d'évaluer l'effet sur les plaquettes de différentes thérapeutiques anti-plaquettaires. Cette technique représente une approche différente de l'aggrégométrie, puisqu'elle permet une quantification des récepteurs, et une évaluation de la fixation de ligands sur ces récepteurs, en réponse à des agonistes plaquettaires. Elle est standardisable, réalisable en sang total, et ne nécessite que des microprélèvements.

Nos travaux en pédiatrie ont montré, par rapport à l'adulte, une diminution de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, un défaut d'internalisation de GPIb en réponse au TRAP, et une réponse identique en terme de liaison du facteur Willebrand à GPIb en réponse à la ristocétine. Ce travail sera poursuivi par l'étude de la capacité de fixation de la prothrombine sur l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Cette analyse, en cytométrie en flux, sera comparée à une méthode d'analyse, en fluorimétrie, de la génération de thrombine en PRP.

L'ensemble de nos études nous a montré que la cytométrie en flux permet de quantifier les glycoprotéines membranaires, et également d'évaluer l'interaction de ces récepteurs avec leurs ligands, et ce dans différentes conditions d'activation plaquettaire. La cytométrie en flux nous semble donc occuper une place privilégiée dans l'arsenal des méthodes d'exploration de la fonction plaquettaire. Nos études, comparant une méthode fonctionnelle réalisée en conditions de contraintes de cisaillement élevées (PFA-100™) et la cytométrie en flux, nous ont montré l'intérêt de disposer d'une méthode analytique.

La cytométrie en flux permet également d'évaluer la signalisation intra-plaquettaire. Notre étude concernant VASP dans le cadre de la surveillance d'un traitement par thiéno-pyridines nous a montré les limites de cette technique. Nous souhaitons poursuivre ce travail en étudiant *in vitro* la modulation de la phosphorylation de VASP par des antagonistes solubles des récepteurs à l'ADP. Lors de ce travail, les concentrations d'AMPc et de GMPc seront mesurées, et nous évaluerons l'inhibition de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

La cytométrie en flux nous a permis d'identifier une variabilité de réponse dans la réponse au SNP, mise en évidence sur la phosphorylation de VASP. Cette variabilité pourrait rendre compte d'un polymorphisme des PKG, lequel pourrait conditionner la réponse aux dérivés nitrés. Nous avons également identifié une variabilité dans la réponse aux thiéno-pyridines. Cette variabilité pourrait être en relation avec le polymorphisme des récepteurs P2Y₁₂. Ce travail sera poursuivi.

Enfin, nous poursuivrons l'étude de l'effet des anti-GPIIb/IIIa sur la phosphorylation de VASP en réponse au SNP. En effet, s'il s'avérait que les anti-GPIIb/IIIa modulent la phosphorylation de VASP par le SNP, cela indiquerait un rôle de VASP non seulement dans un processus de signalisation *inside-out*, mais également dans une régulation de type *outside-in*.

REFERENCES

ADAIR BD, YEAGER M.

Three-dimensional model of the human platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ based on electron microscopy and X-ray cristallography.

Proc Natl Acad Sci 2002; 99(22): 14059-14064.

AKTAS B, UTZ A, HOENIG-LIEDL P, WALTER U, GEIGER J.

Dipyridamole enhances NO/cGMP-mediated vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and signaling in human platelets. In vitro and in vivo/ex vivo studies.

Stroke 2003; 34(3): 764-769.

ALEMANY M, CONCORD E, GARIN J, VINÇON M, GILES A, MARGUERIE G, GULINO D.

Sequence 274-368 in the β_3 -subunit of the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ provides a ligand recognition and binding domain for the γ -chain of fibrinogen that is independent of platelet activation.

Blood 1996; 87(2): 592-601.

ANDREWS RK, FOX JEB.

Identification of a region in the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex that binds to purified actin-binding protein.

J Biol Chem 1992; 267(26): 18605-18611.

ANDREWS RK, MUNDAY AD, MITCHELL CA, BERNDT MC.

Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex.

Blood 2001; 98(3): 681-687.

ARYA M, LOPEZ JA, ROMO GM, CRUZ MA, KASIRER-FRIEDE A, SHATTIL SJ, ANVARI B.

Glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$: effect of receptor clustering and von Willebrand factor adhesion.

J Thromb Haemost 2003; 1(6): 1150-1157.

BACHELOT C, RENDU F, GULINO D.

Anti-GPIIb/IIIa antibodies : powerful tools to investigate function and regulation of an integrin.

Semin Thromb Hemost 1995; 21(1): 23-36.

BACHMANN C, FISCHER L, WALTER U, REIHARD M.

The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation.

J Biol Chem 1999; 274(33): 23549-23557.

BAGLIA FA, BADELLINO KO, LI CQ, LOPEZ JA, WALSH PN.

Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI activation by thrombin.

J Biol Chem 2002; 277(3): 1662-1668.

BAGLIA FA, SHRIMPTON CN, LOPEZ JA, WALSH PN.

The glycoprotein Ib-IX-V complex mediates localization of factor XI to lipid rafts on the platelet membrane.

J Biol Chem 2003; 278(24): 21744-21750.

BARRAGAN P, BOUVIER JL, ROQUEBERT PO, MACALUSO G, COMMEAU B, COMET B, et al.

Resistance to thienopyridines : clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation.

Catheter Cardiovasc Intervent 2003; 59(3): 295-302.

BASANI RB, VILAIRE G, SHATTIL SJ, KOLODZIEJ MA, PONCZ M.

Glanzmann thrombasthenia due to a two-amino acid deletion in the fourth calcium-binding domain of α_{IIb} : demonstration of the importance of calcium-binding domains in the conformation of $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Blood 1996; 88(1): 167-173.

BÉGUIN S, KEULARTS I, AL DIERI R, BELLUCCI S, CAEN J, HEMKER HC.

Fibrin polymerisation is crucial for thrombin generation in platelet-rich plasma in a VWF-GPIIb-dependent process, defective in Bernard-Soulier syndrome.

J Thromb Haemost 2004; 2(1): 170-176.

BERNDT MC, GREGORY C, KABRAL A, ZOLA H, FOURNIER D, CASTALDI PA.

Purification and preliminary characterization of the glycoprotein Ib complex in the human platelet membrane.

Eur J Biochem 1985; 151(3) : 637-649.

BERNDT MC, LOPEZ JA.

Platelet glycoprotein Ib-IX-V complex and platelet adhesion.

In :

Hemostasis and Thrombosis. Basic principles & clinical practice. 4th ed.

Ed Colmans RW, Marder VJ, George JN, Hirsh J, Clowes AW.

Philadelphia (PA) : Lippincott Williams & Wilkins; 2001: 493-504.

BERNDT MC, SHEN Y, DOPHEIDE SM, GARDINER EE, ANDREWS RK.

The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex.

Thromb Haemost 2001; 86(1): 178-188.

BOUDEWIJNS M, RAES M, PEETERS V, MEWIS A, CARTUYVELS R, MAGERMAN K, et al.

Evaluation of platelet function on cord blood in 80 healthy term neonates using the Platelet Function Analyzer (PFA-100); shorter in vitro bleeding times in neonates than in adults.

Eur J Pediatr 2003; 162(3): 212-213.

BOUKHELIFA M, PARAST MM, BEAR JE, GERTLER FB, OTEY CA.

Palladin is a novel binding partner for Ena/VASP family members.

Cell Motil Cytoskeleton 2004; 58(1): 17-29.

BRADFORD HN, DELA CADENA RA, KUNAPULI SP, DONG JF, LOPEZ JA, COLMAN RW.

Human kininogens regulate thrombin binding to platelets through the glycoprotein Ib-IX-V complex.

Blood 1997; 90(4): 1508-1515.

BRADFORD HN, PIXLEY RA, COLMAN RW.

Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex thrombin-induced platelet aggregation.

J Biol Chem 2000; 275(30): 22756-22763.

BRIEDÉ JJ, WIELDERS SJH, HEEMSKERK JWM, BARUCH D, HEMKER HC, LINDHOUT T.

Von Willebrand factor stimulates thrombin-induced exposure of procoagulant phospholipids on the surface of fibrin-adherent platelets.

J Thromb Haemost 2003; 1(3): 559-565.

BUTTA N, ARIAS-SALGADO EG, GONZALES-MANCHON C, FERRER M, LARRUCEA S, AYUSO MS, et al.

Disruption of the β_3 663-687 disulfide bridge confers constitutive activity to β_3 integrins.

Blood 2003; 102(7): 2491-2497.

BYZOVA TV, PLOW EF.

Networking in the hemostatic system. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ binds prothrombin and influence its activation.

J Biol Chem 1997; 272(43): 27183-27188.

CALVETE JJ.

Platelet integrin GPIIb/IIIa : structure-function correlations. An update and lessons from other integrins.

Proc Soc Exp Biol Med 1999; 222(1): 29-38.

CANNON C, Mc CABE C, WILCOX R, BORZAC S, HENRY T, TISCHLER M, et al.

Randomized trial of an oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist, sibrافiban, in patients after an acute coronary syndrome; results of the TIMI 12 trial.

Circulation 1998; 97(4): 340-349.

CANNON C, Mc CABE C, WILCOX R, LANGER A, CASPI A, BERINK P, et al.

Oral glycoprotein IIb/IIIa inhibition with orbofiban in patients with unstable coronary syndromes (OPUS-TIMI 16) trial.

Circulation 2000; 102(2): 149-156.

CAPRIE STEERING COMMITTEE.

A randomized, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE).

Lancet 1996; 348(9038): 1329-1339.

CARMAN CV, SPRINGER TA.

Integrin avidity regulation : are changes in affinity and conformation underemphasized ?

Curr Opin Cell Biol 2003; 15(5): 547-556.

CASADIO R, COMPIANI M, FACCHIANO A, FARISELLI P, MARTELLI P, JACOBINI I, et al.

Protein structure prediction and biomolecular recognition : from protein sequence to peptidomimetic design with the human β_3 integrin.

SAR QSAR Environ Res 2002; 13(3-4): 473-486.

CHEN P, MELCHIOR C, BRONS NHC, SCHLEGEL N, CAEN J, KIEFFER N.
Probing conformational changes in the I-like domain and the cysteine-rich repeat of human β_3 integrins following disulfide bond disruption by cysteine mutation. Identification of cysteine 598 involved in $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation.

J Biol Chem 2001; 276(42): 38628-38635.

CHITALEY K, CHEN L, GALLER A, WALTER U, DAUM G, CLOWES AW.
Vasodilator-stimulated phosphoprotein is a substrate for protein kinase C.

FEBS Lett 2004; 556(1-3): 211-215.

CHUNG DW, DAVIE EW.

γ and γ' chains of human fibrinogen are produced by alternative mRNA processing. Biochemistry 1984; 23(18): 4232- 4236.

COLLER BS, KALOMIRIS E, STEINBERG M, SCUDDER LE.

Evidence that glyocalicin circulates in normal plasma.

J Clin Invest 1984; 73(3): 794-799.

COLLER BS, LANG D, SCUDDER LE.

Rapid and simple platelet function assay to assess glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade.

Circulation 1997; 95(4): 860-867.

CURTIN R, COX D, FITZGERALD D.

Clopidogrel and ticlopidine.

In :

Platelets.

Ed. Alan D. Michelson.

San Diego: Academic press; Elsevier Sciences USA ; 2002 : 787-801.

DANEN EH, SONNENEGER A.

Integrins in regulation of tissue development and function.

J Pathol 2003; 200(4): 471-480.

DE CANDIA E, HALL SW, RUTELLA S, LANDOLFI R, ANDREWS RK, DE CRISTAFORO R.

Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of PAR-1 on intact platelets.

J Biol Chem 2001; 276(7): 4692-4698.

DE GROOT PG, SIXMA JJ.

Perfusion chambers.

In :

Platelets.

Ed. Alan D. Michelson.

San Diego: Academic press; 2002: 347-355.

DE WIT TR, VAN MOURIK JA.

Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor : biological implications.

Best Pract Res Clin Haematol; 2001: 241-255.

DI CASTELNUOVO A, DE GAETANO G, DONATI MB, IACOVIELLO L.

Platelet glycoprotein receptor IIIa polymorphism PI^{A1}/PI^{A2} and coronary risk : a meta-analysis.

Thromb Haemost 2001; 85(4): 626-633.

DICKER IB, PEDICORD DL, SEIFFERT DA, JAMIESON GA, GRECO NJ.

Both the high affinity thrombin receptor (GPIb-IX-V) and GPIIb/IIIa are implicated in expression of thrombin-induced platelet procoagulant activity.

Thromb Haemost 2001; 86(4): 1065-1069.

DONG JF, SAE-TUNG G, LOPEZ JA.

Role of glycoprotein V in the formation of the platelet high-affinity thrombin-binding site.

Blood 1997; 89(12): 4355-4363.

DÖRMANN D, CLEMESTON KJ, KEHREL BE.

The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity.

Blood 2000; 96(7): 2469-2478.

D'SOUZA SE, GINSBERG MH, BURKE TA, LAM SCT, PLOW EF.

Localization of an Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor. Science 1988; 242(4875): 91-93.

D'SOUZA SE, GINSBERG MH, BURKE TA, PLOW EF.

The ligand binding site of the platelet integrin receptor GPIIb/IIIa is proximal to the second calcium binding domain of its α -subunit.

J Biol Chem 1990; 265(6): 11729-11733.

DU X, FOX JE, PEI S.

Identification of a binding sequence for the 14-3-3 protein within the cytoplasmic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein Ib α .

J Biol Chem 1996; 271(13): 7362-7367.

DU X, MARJANOVIC JA, LI Z.

On the roles of cGMP and glycoprotein Ib in platelet activation.

Blood 2004; 103(11): 4371-4372.

DUBOIS C, STEINER B, KIEFFER N, MEYER REIGNER SC.

Thrombin binding to GPIb α induces platelet aggregation and fibrin clot retraction supported by resting $\alpha_{IIb}\beta_3$ interaction with polymerized fibrin.

Thromb Haemost 2003; 89(5): 853-865.

FARREL DH, THIAGARAJAN P.

Binding of recombinant fibrinogen mutants to platelets.

J Biol Chem 1994; 269(1): 226-231.

FAVIER R, JONDEAU K, BOUTARD P, GROSSFELD P, REINERT P, JONES C, et al.

Paris-Trousseau syndrome : clinical, hematological, molecular data of ten new cases.

Thromb Haemost 2003; 90(5): 896-897.

FINKENSTEIN Y, SHENKMAN B, SIROTA L, VISHNE TH, DARDIK R, VARON D, et al.

Whole blood platelet deposition on extracellular matrix under flow conditions in preterm neonatal sepsis.

Eur J Pediatr 2002; 161(5): 270-274.

FONTANA P, DUPONT A, GANDRILLE S, BACHELOT-LOZA C, RENY JL, AIACH M, et al.

Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects.

Circulation 2003; 108(8): 989-995.

FORESTIER F, DAFFOS F, SOLÉ Y, CATHERINE N, CHAMPEIX P, KAPLAN C.

Fetal primary hemostasis.

In :

Platelet immunology : fundamental and clinical aspects.

Ed Kaplan-Gouet C, Schlegel N, Salmon C, McGregor J.

Paris: Editions INSERM; 1991; (colloque INSERM 206): 257-266.

FOX JEB.

Cytoskeletal proteins and platelet signaling.

Thromb Haemost 2001; 86(1): 198-213.

FRANCIS JL.

Platelet Function Analyzer (PFA)-100.

In : Platelets

Ed. Alan D. Micheleson.

San Diego: Academic press; 2002: 325-335.

FRELINGER AL, DU X, PLOW EF, GINSBERG MH.

Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity, and fonction.

J Biol Chem 1991; 266(26): 17106-17111.

FRESON K, DEVRIENDT K, MATTHIJS G, VAN HOOF A, DE VOS R, THYS C, et al.

Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel GATA1 mutation.

Blood 2001; 98(1): 85-92.

GACHET C.

ADP receptors of platelets and their inhibition.

Thromb Haemost 2001; 86(1): 222-232.

GARTNER TK, AMRANI DL, DERRICK JM, KIRSCHBAUM NE, MATSUEDA GR, et al.

Characterization of adhesion of "resting" and stimulated platelets to fibrinogen and its fragments.

Thromb Res 1993; 71(1): 47-60.

GATTI L, GUARNERI D, CACCAMO ML, GIANOTTI GA, MARINI A.

Platelet activation in newborns detected by flow cytometry.

Biol Neonat 1996 ; 70(6): 322-327.

GILMORE AP, WOOD C, OHONIAN V, JACKSON P, PATEL B, REES DJ, et al.

The cytoskeletal protein talin contains at least two distinct vinculin binding domains.

J Cell Biol 1993; 122(2): 337-347.

GONZALEZ-CONEJERO R, LOZANO ML, RIVERA J, CORRAL J, INIESTA JA, MORALEDA JM, et al.

Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib α associated with arterial thrombotic disease.

Blood 1998; 92(8): 2771-2776.

GROOSHAUPT B, MUNTEAN W, SEDLMAYR P.

Hyporeactivity of neonatal platelets is not caused by preactivation during birth.

Eur J Pediatr 1997 ; 156(12) : 944-948.

GU M, XI X, ENGLUND GD, BERNDT MC, DU X.

Analysis of the roles of 14-3-3 in the platelet glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin $\alpha_{Ib}\beta_3$ using a reconstituted mammalian cell expression model.

J Cell Biol 1999; 147(5): 1085-1096.

HAFFNER C, JARCHAU T, REINHARD M, HOPPE J, LOHMANN SM, WALTER U.

Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP.

EMBO J 1995; 14(1): 19-27.

HAN Y, NURDEN A, COMBRIE R, PASQUET JM.

Redistribution of glycoprotein Ib within platelets in response to protease-activated receptors 1 and 4 : roles of cytoskeleton and calcium.

J Thromb Haemost 2003; 1(10): 2206-2215.

HARBECK B, HUTTELMAIER S, SCHLUTER K, JOCKUSH BM, ILLENBERG S.

Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin.

J Biol Chem 2000; 275(40): 3081-3025.

HATO T, GINSBERG MH, SHATTIL SJ.

Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.

In :

Platelets

Ed. Alan D. Michelson.

San Diego : Academic press; 2002: 105-116.

HAUSER W, KNOBELOCH K-P, EIGENTHALER M, GAMBARYAN S, KRENN V, GEIGER J, et al.

Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice.

Proc Natl Acad Sci 1999; 96(14): 8120-8125.

HERAULT JP, PEYROU V, SAVI B, BERNAT A, HERBERT JM.

Effect of SR121566A, a potent GPIIb-IIIa antagonist on platelet-mediated thrombin generation in vitro and in vivo.

Thromb Haemost 1998; 79(2): 383-388.

HERMAND P, GANE P, HUET M, JALLU V, KAPLAN C, SONNEBORN HH, et al.

Red cell ICAM-4 is a novel ligand for platelet-activated $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin.

J Biol Chem 2003; 278(7): 4892-4898.

HORSTRUP K, JABLONKA B, HÖNIG-LIEDL P, JUST M, KOCHSIEK K, WALTER U.

Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition.

Eur J Biochem 1994; 225(1): 21-27.

HOURLILLÉ P, HEILMANN E, COMBRIÉ R, WINCKLER J, CLEMETSON KJ, NURDEN AT.

Thrombin induces a rapid redistribution of glycoprotein Ib-IX complexes within the membrane systems of activated human platelets.

Blood 1990; 76(8): 1503-1513.

HURTAUD-ROUX MF, HEZARD N, LEFRANC V, FOU CART C, DESANGES C, AUJARD Y, et al.

Quantification of the major integrins and P-selectin in neonatal platelets by flow cytometry. A bicentric study.

Thromb Haemost 2001; 86(suppl): 248 (abstract).

HUTTELMAIER S, HARBECK B, STEFFENS O, MESSERSCHMIDT T, ILLENBERGER S, JOCKUSCH BM.

Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP.

FEBS Lett 1999; 451(1): 68-74.

HYNES RO.

Integrins : bidirectional, allosteric signaling machines.

Cell 2002; 110(6): 673-687.

IRKEN G, MUTAFOGLU UYSAL K, OLGUN N, UN DAR B, AKKOC N, OZKAN H, et al.

Platelet activation during the early neonatal period.

Biol Neonate 1998; 73(3): 166-171.

ISRAELS SJ, RAND ML, MICHELSON AD.

Neonatal platelet function.

Semin Thromb Hemost 2003; 29(4): 363-371.

JACKSON SP, BESBITT WS, KULKARNI S.

Signaling events underlying thrombus formation.

J Thromb Haemost 2003; 1(7): 1602-1612.

JENNINGS LK, HAGA JH, SLACK SM.

Differential expression of a ligand induced binding site (LIBS) by GPIIb-IIIa ligand recognition peptides and parenteral antagonists.

Thromb Haemost 2000; 84(6): 1095-1102.

JIN H, VARNER J.

Integrins : roles in cancer development and as treatment targets.

Br J Cancer 2004; 90(3): 561-565.

KAHN ML, DIACOVO TG, BAINTON DF, LANZA F, TREJO J, COUGHLIN SR.
Glycoprotein V-deficient platelets have undiminished thrombin responsiveness and do not exhibit a Bernard-Soulier phenotype.

Blood 1999; 94(12): 4112-4121.

KASHIWAGI H, TOMIYAMA Y, TADOKORO S, HONDA S, SHIRAGA M, MIZUTANI H, et al.

A mutation in the extracellular cysteine-rich repeat region of the β_3 subunit activates integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ and $\alpha_v\beta_3$.

Blood 1999; 93(8): 2559-2568.

KATZ JA, MOAKE JL, MCPHERSON PD, WEINSTEIN MJ, MOISE KJ, CARPENTER RJ, et al.

Relationship between human development and disappearance of unusually large von Willebrand factor multimers from plasma.

Blood 1989; 73(7): 1851-1858.

KEHREL BE, GLAUNER M, ROBERTS S, TRENKMANN K, CLEMTSON KJ, NOWAK-GOETTL U.

Platelet functions in children from different ages.

Blood 2001; 98 : 251a (abstract).

KEREIAKES D, KLEIMAN N, FERGUSON J, MASUD A, BRODERICK A, ABBOTTSMITH C, et al.

Pharmacodynamic efficacy, clinical safety, and outcomes after prolonged platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade with oral xemilofiban: results of a multicenter, placebo-controlled, randomized trial.

Circulation 1998; 98(13): 1268-1278.

KEULARTS IMLW, BÉGUIN S, DE ZWAAN C, HEMKER HC.

Treatment with a GPIIb/IIIa antagonist inhibits thrombin generation in platelet rich plasma from patients.

Thromb Haemost 1998; 80(3): 370-371.

KOTTKE-MARCHANT K, POWERS JB, BROOKS L, KUNDU S, CHRISTIE DJ.

The effect of antiplatelet drugs, heparin, and preanalytical variables on platelet function detected by the Platelet Function Analyzer (PFA-100™).

Clin Appl Thromb Hemost 1995; 5: 122-130.

KUHNE T, RYAN G, BLANCHETTE V, SEMPLE JW, HORNSTEIN A, MODY M, et al.

Platelet-surface glycoproteins in healthy and preeclamptic mothers and their newborn infants.

Pediatr Res 1996; 40(6): 876-880.

KUIJPERS RWAM, FABER NM, CUYPERS HTM, OUWEHAND WH, VON DEM BORNE AEGK.

NH₂-terminal globular domain of human platelet glycoprotein Ib α has a Methionine¹⁴⁵/Threonine¹⁴⁵ amino acid polymorphism, which is associated with the HPA-2 (Ko) alloantigens.

J Clin Invest 1992; 89(2): 381-384.

KULKARNI S, DOPHEIDE SM, YAP CL, RAVANAT C, FREUND M, MANGIN P, et al.

A revised model of platelet aggregation.

J Clin Invest 2000; 105(6): 783-791.

KUNDU SK, HEILMANN EJ, SIO R, GARCIA C, DAVIDSON RM, OSTGAARD RA.

Description of an in vitro platelet function analyzer-PFA-100™.

Semin Thromb Haemost 1995; 21(2): 106-112.

KURATA Y, HAYASHI S, KIYOI T, KOSUGI T, KASHIWAGI H, HONDA S, et al.
Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycofibrin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia.

Am J Clin Pathol 2001; 115(5): 656-664.

KWIATKOWSKI AV, GERTLER FB, LOUREIRO JJ.

Function and regulation of Ena/VASP proteins.

TRENDS Cell Biol 2003; 13(7): 386-392.

LAU WC, GURBEL PA, WATKINS PB, NEER CJ, HOPP AS, CARVILLE DGM, et al.

Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance.

Circulation 2004; 109(2): 166-171.

LEV EI, OSENDE JI, RICHARD MF, DELFIN JA, ROBBINS JA, RODRIGUEZ O, et al.

Administration of abciximab immediately following tirofiban or eptifibatide. Effect on platelet function.

In:

Platelets 2000 Symposium,

Document procuré par the Israeli Society of Thrombosis and Haemostasis, 2000 : 121 (abstract).

LEVY GG, NICHOLS WC, LIAN EC, FOROUD T, McCLINTICK JN, McGEE BM, et al.

Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura.

Nature 2001; 413(6855): 488-494.

LI Z, ADJIC J, EINGHALTER M, DU X.

A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans.

Blood 2003a; 101(11): 4423-4429.

LI CQ, VINDIGNI A, SADLER JE, WARDELL MR.

Platelet glycoprotein Ib α binds to thrombin anion-binding exosite II inducing allosteric changes in the activity of thrombin.

J Biol Chem 2001; 276(9): 6161-6168.

LI Z, XI X, GU M, FEIL R, YE RD, EINGENHALTER M, et al.

A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation.

Cell 2003b; 112(1): 77-86.

LINDER N, SHENKMAN B, LEVIN E, SIROTA L, VISHNE TH, TAMARIN I, et al.

Deposition of whole blood platelets on extracellular matrix under flow conditions in preterm infants.

Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2002; 86(2): 127-130.

LISMAN T, MOSCHATSIS S, ADELMEIJER J, NIEUWENHUIS HK, DE GROOT PG.

Recombinant factor VIIa enhances deposition of platelets with congenital or acquired $\alpha_{IIb}\beta_3$ deficiency to endothelial cell matrix and collagen under conditions of flow via tissue factor-independent thrombin generation.

Blood 2003; 101(5): 1864-1870.

LOFTUS JC, LIDDINGTON RC.

New insights into integrin-ligand interaction.

J Clin Invest 1997; 99(10): 2302-2306.

LOPEZ JA, BERNDT MC.

The GPIb-IX-V complex.

In :

Platelets

Ed. Alan D. Michelson.

San Diego: Academic press; 2002: 85-104.

LOPEZ JA, CHUNG DW, FUJIKAWA K, HAGEN FS, PAPAYANNOPOULOU T, ROTH GJ.

Cloning of the α chain of human platelet glycoprotein Ib : a transmembrane protein with homology to leucine-rich α_2 -glycoprotein.

Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84(16): 5615-5619.

LOPEZ JA, LUDWIG EH, McCARTHY BJ.

Polymorphism of human glycoprotein Ib α results from a variable number of tandem repeats of a 13-amino acid sequence in the mucin-like macroglycopeptide region. Structure / function implications.

J Biol Chem 1992(14); 267: 10005-10061.

MADAN M, BERKOWITZ SD, CHRISTIE DJ, SMIT AC, SIGMON KN, TCHENG JE.

Determination of platelet aggregation inhibition during percutaneous coronary intervention with the platelet function analyzer PFA-100.

Am Heart J 2002; 144(1): 151-158.

MANNUCCI PM, CANCELANI MT, FORZA I, LUSSANA F, LATTUADA A, ROSSI E.

Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. Blood 2001; 98(9): 2730-2735.

MANNS JM, BRENNAN KJ, COLMAN RW, SHETH SB.

Differential regulation of human platelet responses by cGMP inhibited and stimulated cAMP phosphodiesterases.

Thromb Haemost 2002; 87(5): 873-879.

MARSHALL SJ, SENIS YA, AUGER JM, FEIL R, HOFMANN F, SALMON G, et al.

GPIIb-dependent platelet activation is dependent on Src kinases but not MAP kinases or cGMP-dependent kinases.

Blood 2004; 103(11): 2601-2609.

MASSBERG S, GRÜNER S, KONRAD I, GARCIA ARGUINZONIS MI, EIGENTHALER M, et al.

Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice.

Blood 2004; 103(1): 136-142.

MATSUI H, SUGIMOTO M, MIZUNO T, TSUJI S, MIYATA S, MATSUDA M, YOSHIOKA A.

Distinct and concerted functions of von Willebrand factor and fibrinogen in mural thrombus growth under high shear flow.

Blood 2002; 100(10): 3604-3610.

MAZURIER C, DAFFOS F, FORESTIER F.

Electrophoretic and functional characteristics of the von Willebrand factor in human fetal plasma.

B J Haematol 1992; 81(2): 263-270.

MEHAFFEY MG, NEWTON AL, GANDHI MJ, CROSSLEY M, DRACHMAN JG.

X-linked thrombocytopenia caused by a novel mutation of GATA1.

Blood 2001; 98(9): 2681-2688.

MEHTA SR, YUSUF S, PETERS RJ, BERTARBD ME, LEWIS BS, NATARAJAN MK, et al.

Clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent events trial (CURE) investigators.
Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention : the PCI-CURE study.
Lancet 2001; 358(9281): 527-533.

MEKRACHE M, KIEFFER N, BARUCH D.

Activation of recombinant $\alpha_{IIb}\beta_3$ expressed in Chinese hamster ovary cells exposes different binding sites for fibrinogen or von Willebrand factor : evidence using monoclonal antibodies to $\alpha_{IIb}\beta_3$.
Br J Haematol 2002a; 116(3): 636-644.

MEKRACHE M, LEGENDRE P, KIEFFER N, BARUCH D.

Activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ expressed in Chinese hamster ovary cells is required for interaction with solid-phase von Willebrand factor.
Br J Haematol 2002b; 119(4): 1024-1032.

METCALFE P, WATKINS NA, OUWEHAND WH, KAPLAN C, NEWMAN P, KEKOMAKI R, et al.

Nomenclature of human platelet antigens.
Vox Sang 2003; 85(3): 240-245.

MICHELSON AD.

Platelet function in the newborn.
Semin Thromb Hemost 1998; 24(6): 507-512.

MICHELSON AD, BENOIT SE, FURMAN MI, BARNARD MR, NURDEN P, NURDEN AT.

The platelet surface expression of glycoprotein V is regulated by two independent mechanisms : proteolysis and a reversible cytoskeletal-mediated redistribution to the surface-connected canalicular system.
Blood 1996; 87(4): 1396-1408.

MOORE JC, HAYWARD CPM, WARKENTIN TE, KELTON JG.

Decreased von Willebrand factor protease activity associated with thrombocytopenic disorders.

Blood 2001; 98(6): 1842-1846.

MULLER I, BESTA F, SCHULZ C, MASSBERG S, SCHOMIG A, GAWAZ M.

Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement.

Thromb Haemost 2003; 89(5): 783-787.

MURATA M, MATSUBARA Y, KAWANO K, ZAMA T, AOKI N, YOSHINO H, WATANABE G, ISHIKAWA K, IKEDA Y.

Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress-dependent platelet activation.

Circulation 1997; 96(10): 3281-3286.

NICHOLS KE, CRISPINO JD, PONCZ M, WHITE JG, ORKIN SH, MARIS JM, WEISS MJ.

Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1.

Nat Genet 2000; 24(3): 266-270.

NUCKOLLS GH, TURNER CE, BURRIDGE K.

Functional studies of the domains of talin.

J Cell Biol 1990; 100(5): 1635-1644.

NURDEN P.

Bidirectional trafficking of membrane glycoproteins following platelet activation in suspension.

Thromb Haemost 1997; 78(5): 1305-1315.

NURDEN P, POUJOL C, DURRIEU-JAIS C, WINKLER J, COMBRIE R, MACCHI L, et al.

Labeling of the internal pool of GPIIb-IIIa in platelets by c7E3 Fab fragments (abciximab) : flow and endocytic mechanisms contribute to the transport.

Blood 1999; 93(5): 1622-1633.

PETER K, KOHLER B, STRAUB A, RUEF J, MOSER M, NORDT T, et al.

Flow cytometric monitoring of glycoprotein IIb/IIIa blockade and platelet function in patients with acute myocardial infarction receiving reteplase, abciximab, and ticlopidine. Continuous platelet inhibition by the combination of abciximab and ticlopidine.

Circulation 2000; 102(13): 1490-1496.

PETER K, SCHWARTZ M, YLANNE J, KOHLER M, MOSER M, NORDT T, et al.

Induction of fibrinogen binding and platelet aggregation as a potential intrinsic property of various glycoprotein IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) inhibitors.

Blood 1998; 92(9): 3240-3249.

PHILLIPS DR, CHARO IF, PARISE LV, FITZGERALD LA.

The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex.

Blood 1988; 71(4): 831-843.

PHILLIPS DR, NANNIZZI-ALAIMO L, SRINIVASA PRASAD KS.

β_3 tyrosine phosphorylation in $\alpha_{IIb}\beta_3$ (platelet membrane GPIIb-IIIa) outside-in integrin signaling.

Thromb Haemost 2001; 86(1): 246-258.

PHILLIPS DR, TENG W, ARFSEN A, NANNIZZI-ALAIMO L, WHITE MM, LONGHURST C, et al.

Effects of Ca^{2+} on GPIIb/IIIa interactions with integrilin. Enhanced GPIIb-IIIa binding and inhibition of platelet aggregation by reductions in the concentration of ionized calcium in plasma anticoagulated with citrate.

Circulation 1997; 96(5): 1488-1494.

PIETRUCHA T, WOJCIECHOWSKI T, GREGER J, JEDRZEJEWSKA E, NOWAK S, CHRUL S, et al.

Differentiated reactivity of whole blood neonatal platelets to various agonists.
Platelets 2001; 12(2): 99-107.

PLOW EF, CIERNIEWSKI CS, XIAO Z, HAAS TA, BYZOVA TV.

$\alpha_{IIb}\beta_3$ and its antagonism at the new millennium.
Thromb Haemost 2001; 86(1): 34-40.

PONCZ M, RIFAT S, COLLIER BS, NEWMAN PJ, SHATTIL SJ, PARELLA T, et al.

Glanzmann thrombasthenia secondary to a Gly $\rightarrow$ Asp mutation adjacent to the first calcium-binding domain of platelet glycoprotein IIb.
J Clin Invest 1994; 93(1): 172-179.

PUZON-MCLAUGHLIN W, KAMATA T, TAKADA Y.

Multiple discontinuous ligand-mimetic antibody binding sites define a ligand binding pocket in integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.
J Biol Chem 2000; 275(11): 7795-7802.

QUINN MJ, COX D, FOLEY JB, FITZGERALD DJ.

Glycoprotein IIb/IIIa receptor number and occupancy during and chronic administration of an oral antagonist.
J Pharmacol Exp Therapeutics 2000; 295(2): 670-676.

QUINN M, DEERING A, STEWART M, COX D, FOLEY JB, FITZGERALD D.

Quantifying GPIIb/IIIa receptor binding using 2 monoclonal antibodies. Discriminating abciximab and small molecular weight antagonists.
Circulation 1999; 99(17): 2231-2238.

QUINN MJ, FULLARD J, KERRIGAN P, HARRIOT P, COX D, FITZGERALD DJ.

Characterization of a ligand-attenuated binding site on glycoprotein IIb/IIIa.
Thromb Haemost 2002; 88(5): 811-816.

QUINN MJ, MURPHY RT, DOOLEY M, FOLEY JB, FITZGERALD DJ.

Occupancy of the internal and external pools of glycoprotein IIb/IIIa following abciximab bolus and infusion.

J Pharmacol Exp Ther 2001; 297(2): 496-500.

RAJASEHKAR D, BARNARD MR, BEDNAREK FJ, MICHELSON AD.

Platelet hyporeactivity in very low birth weight neonates.

Thromb Haemost 1997; 77(5): 1002-1007.

RAJASEHKAR D, KESTIN AS, BEDNAREK FJ, ELLIS PA, BARNARD MR, MICHELSON AD.

Neonatal platelets are less reactive than adults platelets to physiological agonists in whole blood.

Thromb Haemost 1994; 72(6): 957-963.

RAO AK, SUN L, HIRAMATSU Y, GORMAN JH, EDMUNDS LH.

Glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist tirofiban inhibits thrombin generation during cardiopulmonary bypass in baboons.

Thromb Haemost 1999; 82(1): 140-144.

RAY MJ, WALTERS DL, BETT N, CAMERON J, WOOD P, ARONEY C.

Point-of-care testing shows clinically relevant variation in the degree of inhibition of platelets by standard-dose abciximab therapy during percutaneous coronary intervention.

Catheter Cardiovasc Interv 2004; 62(2): 150-154.

REINHARD M, HALBRUGGE M, SCHEER U, WIEGAND C, JOCKUSCH BM, WALTER U.

The 46/50 phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts.

EMBO J 1992; 11(6): 2063-2070.

REVERTER JC, BEGUIN S, KESSELS H, KUMAR R, HEMKER HC, COLLIER BS.
Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and “clinical restenosis”.

J Clin Invest 1996; 98(3): 863-874.

ROMO GM, DONG JF, SCHADE AJ, GARDINER EE, KANSAS GS, LI CQ, et al.
The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin.

J Exp Med 1999; 190(6): 803-813.

ROSCHITZ B, SUDI K, KOSTENBERGER M, MUNTEAN W.

Shorter PFA-100TM closure times in neonates than in adults : role of red cells, white cells, platelets and von Willebrand factor.

Acta Paediatr 2001; 90(6): 664-670.

RUEGG C, MARIOTTI A.

Vascular integrins : pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis.

Cell Mol Life Sci 2003; 60(6): 1135-1157.

RUGGERI ZM.

Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation.

Best Pract Res Clin Haematol 2001; 14(2): 257-279.

RUGGERI ZM.

Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions.

J Thromb Haemost 2003; 1(7): 1335-1342.

RUIZ C, LIU CY, SUN QH, SIGAUD-FIKS M, FRESSINAUD E, MULLER JY, et al

A point mutation in the cysteine-rich domain of glycoprotein (GP) IIIa results in the expression of a GPIIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) integrin receptor locked in a high-affinity state and a Glanzmann thrombasthenia-like phenotype.

Blood 2001; 98(8): 2432-2441.

RYBARCZYK BJ, LAWRENCE SO, SIMPSON-HAIDARIS PJ.

Matrix-fibrinogen enhances wound closure by increasing both cell proliferation and migration.

Blood 2003; 102(12): 4035-4043.

SAKAI H, GOTO S, KIM JY, AOKI N, ABE S, ICHIKAWA N, et al

Plasma concentration of von Willebrand factor in acute myocardial infarction.

Thromb Haemost 2000; 84(2): 204-209.

SASSOLI PM, EMMEL EL, TAM SH, TRIKHA M, ZHOU Z, JORDAN RE, et al

7E3 F(ab')₂, an effective antagonist of rat $\alpha_{IIb}\beta_3$ and $\alpha_v\beta_3$, blocks in vivo thrombus formation and in vitro angiogenesis.

Thromb Haemost 2001; 85(5): 896-902.

SCHAFER A, BURKHARDT M, VOLLKOMMER T, BAUERSACHS J, MUNZEL T
WALTER U, et al.

Endothelium-dependent and -independent relaxation and VASP serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta.

Biochem Pharmacol 2003; 65(3): 397-405.

SCHAFER A, WIESMANN F, NEUBAUER S, EIGENTHALTER M, BAUERSACHS
J, CHANNON KM.

Rapid regulation of platelet activation in vivo by nitric oxide.

Circulation 2004; 109(15): 1819-1822.

SCHMUGGE M, RAND ML, BANG KWA, MODY M, DUNN MS, AMANKWAH
KS, et al

The relationship of von Willebrand factor binding to activated platelets from healthy neonates and adults.

Pediatr Res 2003; 54(4): 474-479.

SCHMUGGE M, DUNN MS, AMANKWAH KS, BLANCHETTE VS, FREEDMAN J, RAND ML.

The activity of the von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS-13 in newborn infants.

J Thromb Haemost 2004; 2(2): 228-233.

SCHROR K, ARON WEBER A, HOHLFELD T.

Clopidogrel "resistance".

Thromb Haemost 2004; 92(2): 229-231.

SCHWARTZ UR, GEIGER J, WALTER U, EIGNETHALTER M.

Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets. Definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects.

Thromb Haemost 1999; 82(3): 1145-1152.

SCHWARTZ M, KATAGIRI Y, KOTANI M, BASSLER N, LOEFFLER C, BODE C, et al.

Reversibility versus persistence of GPIIb/IIIa blocker-induced conformational change of GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$, CD41/CD61).

J Pharmacol Exp Therapeutics 2004; 308(3): 1002-1011.

SENIS Y, MARSHALL S, WATSON S.

On the role of cGMP and glycoprotein Ib in platelet activation : a response.

Blood 2004; 103(11): 4372-4373.

SEYFARTH HJ, KOKSCH M, ROETHIG G, ROTHER T, NEUGEBAUER A, KLEIN N, et al

Effect of 300- and 450-mg clopidogrel loading doses on membrane and soluble P-selectin in patients undergoing coronary stent implantation.

Am Heart J 2002; 143(1): 118-123.

SHATTIL SJ, KASHIWAGI H, PAMPORI N.

Integrin signaling : the platelet paradigm.

Blood 1998; 91(8): 2645-2657.

SHENKMAN B, LINDER S, SAVION N, SAVION N, TAMARIN I, DARDIK R, et al.

Increased neonatal platelet deposition on subendothelium under flow conditions : the role of plasma von Willebrand factor.

Pediatr Res 1999; 45(2): 270-275.

SHIVDASANI RA, FUJIWARA Y, McDEVITT MA, ORKIN SH.

A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megacaryocyte growth and platelet development.

EMBO J 1997; 16(13): 3965-3973.

SHRIMPTON CN, BORTHAKUR G, LARRUCEA S, CRUZ MA, DONG JF, LOPEZ JA.

Localization of the adhesion receptor glycoprotein Ib-IX-V complex to lipid rafts is required for platelet adhesion and activation.

J Exp Med 2002; 196(8): 1057-1066.

SIMON DI, CHEN Z, XU H, LI CQ, DONG JF, McINTIRE LV, et al.

Platelet glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leucocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18).

J Exp Med 2000; 192(2): 193-204.

SIM DS, MERRILL-SKOLOFF G, FURIE BC, FURIE B, FLAUMENHAFT R.

Initial accumulation of platelets during arterial thrombus formation in vivo is inhibited by elevation of basal cAMP levels.

Blood 2004; 103(6): 2127-2134.

SIMS PJ, GINSBERG MH, PLOW EF, SHATTIL SJ.

Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex.

J Biol Chem 1991; 266(12): 7345-7352.

SMITH JW, STEINHUBL SR, LINCOFF M, COLEMAN JC, LEE TT, HILLMAN RS, et al.

Rapid platelet-function assay. An automated and quantitative cartridge-based method. Circulation 1999; 99(5): 620-625.

SMOLENSKI A, BACHMANN C, REINHARD K, HÖNIG-LIEDL P, JARCHAU T, HOSCHUETZKY H, et al.

Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation *in vitro* and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody.

J Biol Chem 1998; 273(32): 20029-20035.

SOSNOKI DM, EMANUEL BS, HAWKINS AL, VAN TUINEN P, LEDBETTER DH, NUSSBAUM RL, et al.

Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors α subunits and the platelet glycoproteins IIb and IIIa.

J Clin Invest 1988; 81(6): 1993-1998.

SUAREZ CR, GONZALEZ J, MENEDEZ C, FAREED J, FRESCO R, WALENGA J.

Neonatal and maternal platelets : activation at time of birth.

Am J Hematol 1988; 29(1): 18-21.

STEINHUBL SR, BERGER PB, MANN JT, FRY ET, DELAGO A, WILMER C, et al.

Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention : a randomised controlled trial.

JAMA 2002; 288(19): 2411-2420.

STEINHUBL SR, TALLEY JD, BRADEN GA, TCHENG JE, CASTERELLA PJ, MOLITERNO DJ, et al.

Point-of-care measured platelet inhibition correlates with a reduced risk of an adverse cardiac event after percutaneous coronary intervention. Results of the GOLD (AU-assessing Ultegra) multicenter study.

Circulation 2001; 103(21): 2572-2578.

STUPACK DG, CHERESH DA.

Apoptotic cues from the extracellular matrix : regulators of angiogenesis.

Oncogene 2003; 22(56): 9022-9029.

SUDO T, ITO H, KIMURA Y.

Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) by the anti-platelet drug, cilostazol, in platelets.

Platelets 2003; 14(6): 381-390.

SUN QH, LIU CY, WANG R, PADDOCK C, NEWMAN PJ.

Disruption of the long-range GPIIIa Cys₅-Cys₄₃₅ disulfide bond results in the production of constitutively active GPIIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) integrin complexes.

Blood 2002; 100(6): 2094-2101.

TADOKORO S, SHATILL SJ, TAI V, LIDDINGTON RC, DE PEREDA JM, GINSBERG MH, et al.

Talin binding to integrin beta tails : a final common step in integrin activation.

Science 2003; 302 (5642): 103-106.

TAUBERT D, KASTRATI A, HARLFINGER S, GORCHAKOVA O, LAZAR A, VON BECKETERATH N, et al.

Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose.

Thromb Haemost 2004; 92(2): 311-316.

TCHENG JE, ELLIS SG, GEORGES BS, KEREIKES DJ, KLEIMAN NS, TALLEY JD, et al.

Pharmacodynamics of chimeric glycoprotein IIb/IIIa integrin antiplatelet antibody Fab 7E3 in high-risk coronary angioplasty.

Circulation 1994; 90(4): 1757-1764.

THE CAPTURE INVESTIGATORS.

Randomised placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina : the CAPTURE study.

Lancet 1997; 349(9063): 1429-1435.

THE EPIC INVESTIGATORS.

Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty.

N Engl J Med 1994; 330(14): 956-961.

THE EPILOG INVESTIGATORS.

Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization.

N Engl J Med 1997; 336(24): 1689-1696.

THE EPISTENT INVESTIGATORS.

Randomized placebo-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of coronary stenting with use of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade.

Lancet 1998; 352(9122): 87-92.

THE ESPRIT INVESTIGATORS.

Novel dosing regimen of eptifibatide in planned coronary stent implantation (ESPRIT) : a randomised, placebo-controlled trial.

Lancet 2000; 356(9247): 2037-2044.

THE IMPACTII INVESTIGATORS.

Randomized placebo-controlled trial of effect of eptifibatide on complications of percutaneous coronary intervention : IMPACTII. Integrilin to minimise platelet aggregation and coronary thrombosis-II.

Lancet 1997; 349(9063): 1422-1428.

THE PRISM STUDY INVESTIGATORS.

A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina.

N Engl J Med 1998; 338(21): 1498-1505.

THE PRISM-PLUS STUDY INVESTIGATORS.

Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non Q-wave myocardial infarction. Platelet receptor inhibition in ischemic syndrome management in patients limited by unstable signs and symptoms.

N Engl J Med 1998; 338(21): 1488-1497.

THE PURSUIT TRIAL INVESTIGATORS.

Inhibition of platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatide in patients with acute coronary syndromes.

N Engl J Med 1998; 339(7): 436-443.

THE RESTORE INVESTIGATORS.

Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty.

Circulation 1997; 96(5): 1445-1456.

TOPOL E, BYZOVA T, PLOW EF.

Platelet GPIIb/IIIa blockers.

Lancet 1999; 353(9192): 227-231.

TSAI H-M, SARODE R, DOWNES KA.

Ultralarge von Willebrand factor multimers and normal ADAMTS13 activity in the umbilical cord blood.

Thromb Res 2003; 108(2): 121-125.

UGAROVA TP, BUDZYNSKI AZ, SHATTIL SJ, RUGGERI ZM, GINSBERG MH, PLOW EF.

Conformational changes in fibrinogen elicited by its interaction with platelet membrane glycoprotein GPIIb/IIIa.

J Biol Chem 1993; 268(28): 21060-21087.

VARON D, SAVION N.

Cone and Plate(let) Analyzer.

In :

Platelets

Ed. Alan D. Michelson A.

San Diego: Academic press; 2002: 337-345.

VAN DER PLANKEN MG, CLAEYS MJ, VERTESEN FJ, DILLING D, BOSMANS JM, BERNEMAN ZN, et al.

Comparison of turbidimetric aggregation and in vitro bleeding time (PFA-100) for monitoring the platelet inhibitory profile of antiplatelet agents in patients undergoing stent implantation.

Thromb Res 2003; 111(3): 159-164.

VEYRADIER A, OBERT B, HOULLIER A, MEYER D, GIMMA JP.

Specific von Willebrand factor-binding protease in thrombotic microangiopathies : a study of 111 cases.

Blood 2001; 98(6): 1765-1772.

VILAHUR G, SEGALES E, CASANI L, BADIMON L.

A novel anti-ischemic nitric oxide donor inhibits thrombosis without modifying haemodynamic parameters.

Thromb Haemost 2004; 91(5): 1035-1043.

VINIGRADOVA O, VELYVIS A, VELVYVIENNE A, HU B, HAAS TA, PLOW EF, et al.

A structural mechanism of integrin $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$ “inside-out” activation as regulated by its cytoplasmic face.

Cell 2002; 110(5): 587-597.

WALFORD G, LOSCALZO J.

Nitric oxide in vascular biology.

J Thromb Haemost 2003; 1(10): 2112-2118.

WARDELL MR, REYNOLDS CC, BERNDT MC, WALLACE RW, FOX JEB.

Platelet glycoprotein Ib β is phosphorylated on serine 166 by cyclic AMP-dependent protein kinase.

J Biol Chem 1989; 264(26): 15656-15661.

WENGER RH, WICKI AN, KIEFFER N, ADOLPH S, HAMEISTER H, CLEMETSON KJ.

The 5' flanking region and chromosomal localization of the gene encoding human platelet membrane glycoprotein Ib α .

Gene 1989; 85(2): 517-524.

WEHRLE-HALLER B, IMHOF BA.

Integrin-dependent pathologies.

J Pathol 2003; 200(4): 481-487.

WOULFE D, YANG J, PREVOST N, O'BRIEN PJ, BRASS LF.

Signal transduction during the initiation, extension, and perpetuation of platelet plug formation.

In :

Platelets

Ed. Alan D. Michelson A.

San Diego; Academic press; 2002: 197-213.

XIONG JP, STEHLE T, DIEFENBACH B, ZHANG R, DUNKER R, SCOTT DL, et al.
Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$.
Science 2001; 294(5541): 339-345.

YAGI M, EDELHOFF S, DISTECHE CM, ROTH GJ.
Structural characterization and chromosomal location of the gene encoding human platelet glycoprotein Ib β .
J Biol Chem 1994; 269(26): 17424-17427.

YAGI M, EDELHOFF S, DISTECHE CM, ROTH GJ.
Human platelet glycoproteins V and IX : mapping of two leucine-rich glycoprotein genes to chromosome 3 and analysis of structures.
Biochemistry 1995; 34(49): 16132-16137.

YAN B, SMITH JW.
Mechanism of integrin activation by disulfide bond reduction.
Biochemistry 2001; 40(30): 8861-8867.

YUSUF S, ZHAO F, MEHTA SR, CHROLAVICIUS S, TOGNONI G, FOX KK.
Clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent events trial investigators.
N Engl J Med 2001; 345(7): 494-502.

ZAIDI TN, MCINTIRE LV, FARREL DH, THIAGARAJAN P.
Adhesion of platelets to surface-bound fibrinogen under flow.
Blood 1996; 88(8): 2967-2972.

ZIEGLER S, MACA T, ALT E, SPEISER W, SCHNEIDER B, MINAR E.
Monitoring of antiplatelet therapy with the PFA-100TM in peripheral angioplasty patients.
Platelets 2002; 13(8): 493-497.

ANNEXE

CHOIX DE LA PERMEATION PLAQUETTAIRE

Nous avons testé comparativement quatre méthodologies différentes : une technique de fixation/perméation utilisant des solutions de paraformaldéhyde (PFA) et de triton préparées au laboratoire, d'après la méthodologie rapportée par Schwartz *et al* (Schwartz 1999), et trois réactifs prêts à l'emploi (IntraPrep™ Permeabilizing Solution, Beckman Coulter; FACS™ Permeabilizing Solution, Becton Dickinson; Leucoperm™, Serotec) (Tableau).

Les échantillons sont préparés de la façon suivante : 1) incubation de 50µL de PRP (obtenu après centrifugation d'un échantillon de sang total, 200 g pendant 20 minutes) en présence de 25 µL de PBS (état basal) ou de 25µL d'une solution de PGE1 à 10 µM final (Sigma), pendant 5 min à température ambiante, 2) 20 µL des suspensions précédentes sont incubées avec 20 µL de l'anticorps CD41a couplé à la phycoérythrine (CD41a-PE) (Immunotech Coulter), 3) les étapes de fixation/perméation sont effectuées selon les recommandations de Schwartz *et al* (Schwartz Thromb Haemost 1999) et des constructeurs (tableau annexe I).

L'analyse cytométrique est réalisée sur un cytomètre Epics® (Coulter) avec le logiciel System II (Coulter). Sont analysés 5000 évènements dans la fenêtre déterminée sur l'histogramme biparamétrique taille/structure.

	PFA-triton	IntraPrep™	FACS Permeabilizing™	Leucoperm™
CD41a-PE	10 min	10 min	10 min	10 min
fixation	paraformaldéhyde 3% 5 min	réactif 1 (formaldéhyde 5.5%) 15 min	réactif unique <15% formaldéhyde <50% diéthylène glycol perméabilisant? 10 min	réactif 1 (?) 15 min
perméabilisation	triton 0.2% 10 min	réactif 2 (saponine et lyse) 5 min		réactif 2 (?)
Anti-VASP- FITC	30 min	30 min	30 min	30 min

Tableau annexe I. Description des étapes de fixation et de de perméation cellulaire, en fonction des différentes techniques testées

Les étapes de fixation et perméation sont simultanées pour le FACS Permeabilizing™, de même que les étapes de perméabilisation et immunomarquage i ntra-plaquettaire pour le Leucoperm™

Nous avons analysé les performances de chaque technique de perméation en fonction de deux critères :

- le rendement plaquettaire après perméation, que nous avons évalué sur le temps d'acquisition de fluorescence (5000 évènements dans la fenêtre définie sur l'histogramme biparamétrique taille/structure, la vitesse de passage a été prédéfinie en mode "low"),

- la possibilité de travailler en sang total, prenant en compte l'aspect du nuage plaquettaire en taille/structure et le pourcentage d'évènements CD41a positifs dans la fenêtre "plaquettes".

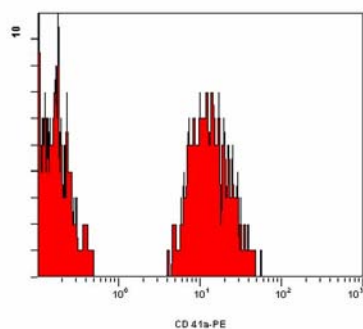
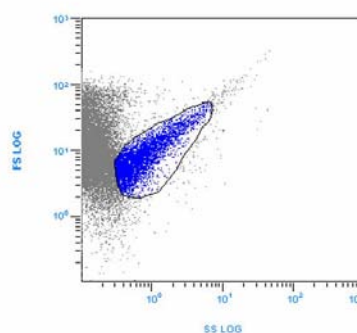
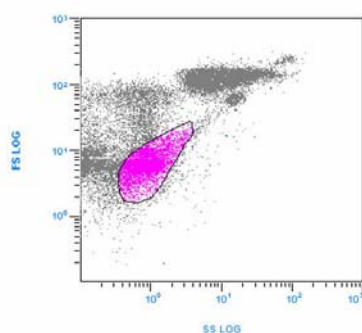
Les résultats sont présentés dans les figures suivantes (histogrammes bi et monoparamétriques), les temps d'acquisition et le pourcentage d'évènements CD41a positifs, correspondant à ces figures, sont rapportées dans le tableau annexe II. Ces résultats montrent une perte importante de plaquettes après perméation par le triton et par les réactifs FACS Permeabilizing™. L'aspect en taille-structure obtenu en sang total après perméation par les réactifs IntraPrep™ montre de nombreux débris cellulaires. En sang total, le pourcentage de plaquettes (CD41a) dans la fenêtre "plaquettes" est faible pour le triton et les réactifs IntraPrep™.

Nous avons fait le choix de la trousse Leucoperm™, ce réactif répondant à nos deux critères de choix : perméation sans perte plaquettaire importante, et pourcentage élevé d'évènements CD41a dans la fenêtre "plaquettes".

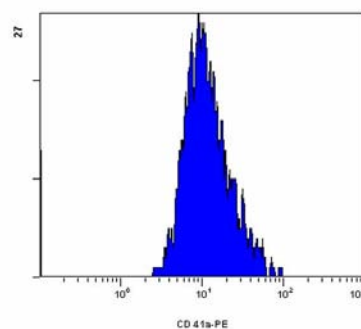
Perméation plaquettaire (triton 0.2%)

Sang total

PRP



CD41a-PE



CD41a-PE

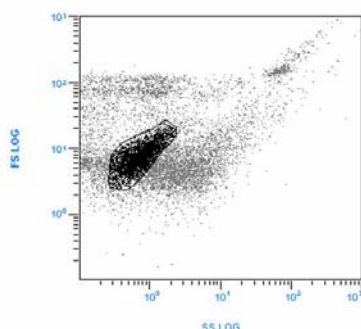
Figure annexe 1. Perméation plaquettaire par le triton (0.2%).

L'acquisition est réalisée sur 5000 événements dans la fenêtre déterminée sur l'histogramme biparamétrique taille-structure.

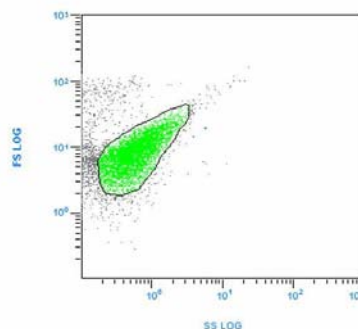
Les temps d'acquisition et le pourcentage d'événements positifs en CD41a sont indiqués dans le tableau annexe II

Perméation plaquettaire (IntraPrep™ Permeabilizing Solution)

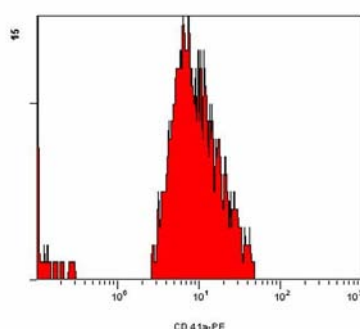
Sang total



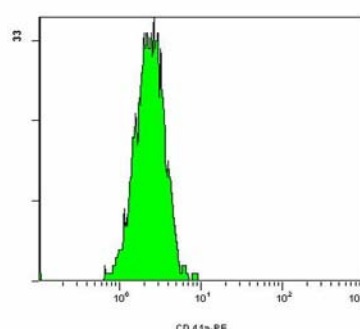
PRP



CD41a-PE



CD41a-PE



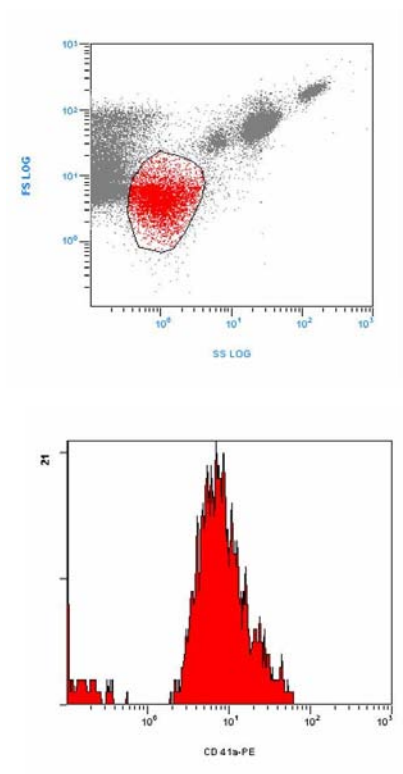
*Figure annexe 2. Perméation plaquettaire réalisée avec les réactifs IntraPrep™
Permeabilizing Solution (Beckman Coulter).*

L'acquisition est réalisée sur 5000 évènements dans la fenêtre dessinée sur l'histogramme biparamétrique taille-structure.

Les temps d'acquisition et le pourcentage d'évènements positifs en CD41a sont indiqués dans le tableau annexe II.

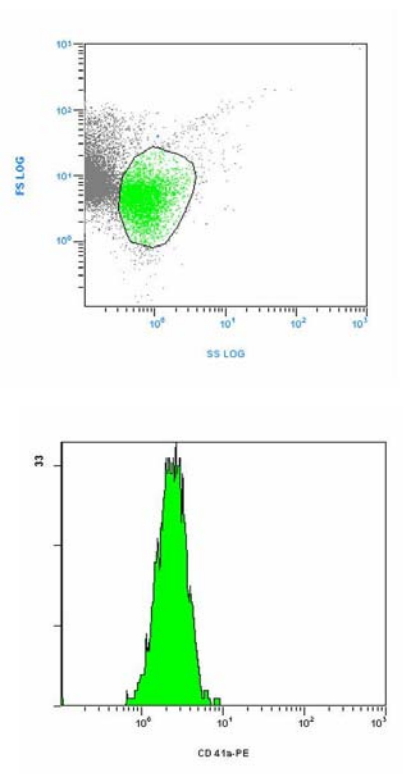
Perméation plaquettaire (FACS™ Permeabilizing Solution)

Sang total



CD41a-PE

PRP



CD41a-PE

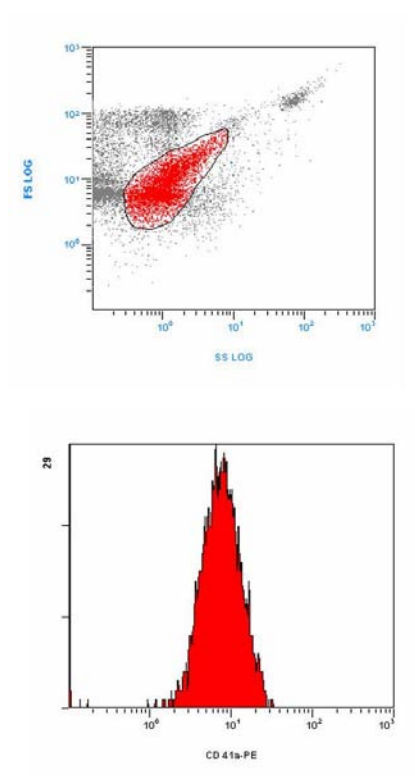
Figure annexe 3. Perméation plaquettaire réalisée avec les réactifs FACS™ Permeabilizing Solution (Becton Dickinson).

L'acquisition est réalisée sur 5000 évènements dans la fenêtre dessinée sur l'histogramme biparamétrique taille-structure.

Les temps d'acquisition et le pourcentage d'évènements positifs en CD41a sont indiqués dans le tableau annexe II.

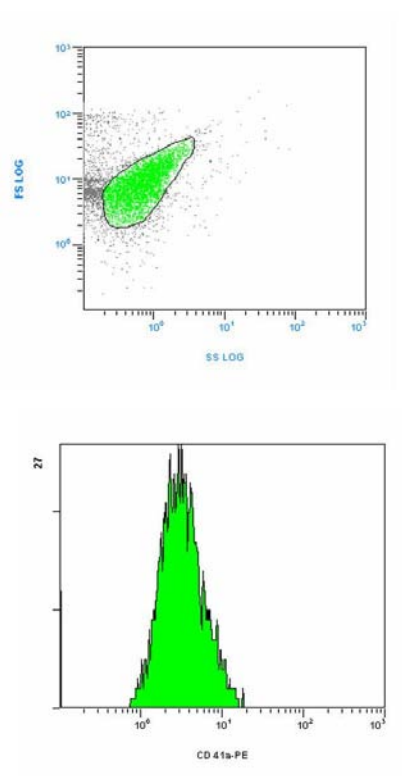
Perméation plaquettaire (Leucoperm™)

Sang total



CD41a-PE

PRP



CD41a-PE

Figure annexe 4. Perméation plaquettaire réalisée avec les réactifs Leucoperm™ (Serotec).

L'acquisition est réalisée sur 5000 évènements dans la fenêtre dessinée sur l'histogramme biparamétrique taille-structure.

Les temps d'acquisition et le pourcentage d'évènements positifs en CD41a sont indiqués dans le tableau annexe II.

	sang total		PRP	
	temps	%	temps	%
triton 0.2%				
basal	30 s	26%	250 s	80%
PGE1	27 s	34%	151 s	96%
IntraPrep™				
basal	79 s	65%	8 s	97%
PGE1	75 s	76%	7 s	97%
FACS Permabilizing™				
basal	87 s	87%	55 s	85%
PGE1	153 s	75%	33 s	97%
Leucoperm™				
basal	28 s	69%	10 s	98%
PGE1	15 s	73%	8 s	98%

Tableau annexe II. Comparaison des quatres techniques de perméation, appliquées à la perméation plaquettaire.

Sont rapportés dans ce tableau les temps en secondes nécessaires à l'acquisition de 5000 évènements (colonnes temps), et le pourcentage de plaquettes (évènements CD41a positifs) dans la fenêtre "plaquettes" définie sur l'histogramme biparamétrique (colonnes %).