

Université de Montréal

**Implication des interactions plaquettes-neutrophiles
dans la sécrétion des métalloprotéinases**

par

Haissam Abou-Saleh

Département de Sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître
en Sciences biomédicales

Avril, 2005

© Haissam Abou-Saleh, 2005



W

4

U58

2005

V.159

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Implication des interactions plaquettes-neutrophiles
dans la sécrétion des métalloprotéinases

présenté par :

Haissam Abou-Saleh

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Eric Thorin, président-rapporteur

Dr. Yahye Merhi, directeur de recherche

Dr. Janos G. Filep, membre du jury

Résumé

Introduction - Les plaquettes et les neutrophiles constituent une grande source de métalloprotéinase-2 (MMP-2) et - 9 (MMP-9) respectivement, et leurs interactions via la P-sélectine et le PSGL-1 sont impliquées dans les réactions thrombo-inflammatoires qui mènent à la thrombose, le remodelage vasculaire et la resténose. Dans cette étude, on a investigué l'impact de la liaison P-sélectine/PSGL-1 sur la sécrétion de la MMP-2 et son rôle dans l'agrégation plaquette-neutrophile.

Méthodes et résultats - La sécrétion de la MMP-2 par les plaquettes humaines, détectée par Zymographie, est significativement augmentée (valeur triplée) après l'activation par la thrombine. Par ailleurs, cette sécrétion est doublée en présence de neutrophiles. Cependant, le surnageant collecté d'une suspension de neutrophiles ne produit pas d'effet significatif sur la sécrétion de la MMP-2 par les plaquettes. Bien qu'aucune trace de MMP-2 fut détectée dans les sécrétions des neutrophiles activés ou au repos, une large quantité de MMP-9 est produite par ces cellules. Néanmoins, cette sécrétion de MMP-9 n'est pas influencée par une stimulation à la thrombine ou par la présence des plaquettes. Quand les plaquettes sont activées, l'expression de la P-sélectine est significativement augmentée et favorise la liaison des plaquettes aux neutrophiles. Cette liaison est complètement inhibée par une forme recombinante et soluble du PSGL-1 (rPSGL-Ig), ou par des anticorps monoclonaux dirigés contre la P-sélectine ou le PSGL-1. D'autre part, l'utilisation des antagonistes de la GPIIb/IIIa comme le Réopro provoque une réduction de 50% de la liaison P-sélectine/PSGL-1. De plus, les antagonistes de la P-sélectine ou du

PSGL-1 abolissent la sécrétion de la MMP-2 par les plaquettes en présence des neutrophiles et réduisent l'agrégation plaquettes-neutrophiles.

Conclusion - L'activation des plaquettes et leurs liaisons aux neutrophiles augmentent la sécrétion de la MMP-2 par les plaquettes via une interaction adhésive entre la P-sélectine et le PSGL-1 qui, d'une façon synergique, contribuent à augmenter l'agrégation plaquettes-neutrophiles.

Mots-clés : Plaquettes, Leucocytes, Molécules d'adhésion cellulaires, Métalloprotéinases.

Abstract

Background - Platelets and neutrophils constitute a high source of metalloproteinase-2 (MMP-2) and-9 (MMP-9), respectively; and their interactions via P-selectin and PSGL-1 are involved in the thrombo-inflammatory reactions that lead to thrombosis, vascular remodeling and restenosis. In this study, we investigated the impact of P-selectin binding to PSGL-1 on platelet MMP-2 secretion and function in platelet and neutrophil aggregation.

Methods and results - The secretion of MMP-2 from human platelets, as detected by zymography, was significantly increased by 3 fold after thrombin activation and further enhanced by 2 fold in the presence of neutrophils. Neutrophil releasate was without any significant effect on platelet MMP-2 secretion. While no MMP-2 was detected in the supernatant of resting and activated neutrophils, high amount of MMP-9 was released by neutrophils, but unchanged by thrombin activation or the presence of platelets. Platelet P-selectin expression increased significantly after activation and triggers platelet binding to neutrophils, which was completely inhibited by a recombinant soluble form of PSGL-1 (rPSGL-Ig) and blocking monoclonal antibodies against P-selectin and PSGL-1, and reduced by 50% in the presence of a GPIIb/IIIa antagonist (Reopro). In addition, P-selectin or PSGL-1 antagonism abolished the enhanced MMP-2 secretion by activated platelets in the presence of neutrophils and reduced platelet-neutrophil aggregation.

Conclusion - Platelet activation and binding to neutrophils enhance the secretion of platelet MMP-2 via an adhesive interaction between P-selectin and PSGL-1, which contribute to increased platelet-neutrophil aggregation.

Key Words : Platelets, Leukocytes, Cell Adhesion Molecules, Metalloproteinases

Table des matières

Résumé		iii-iv
Abstract		v-vi
Table des matières		vii-viii
Liste des tableaux		ix
Liste des figures		x
Liste des abréviations		xi-xii
Remerciements		xiii-xiv
Introduction		1-2
Chapitre 1 : Les plaquettes		
1.1	Composition et fonction du sang	3-5
1.2	Origine et structure des plaquettes	6-8
1.3	Molécules d'adhésion plaquettaire	8-18
	1.3.1 La GPIa/IIa	10-11
	1.3.2 Le GPIb/IX/V	11-13
	1.3.3 La GPIIb/IIIa	13-16
	1.3.4 La P-sélectine	16-18
1.4	Fonction plaquettaire	18-34
	1.4.1 Adhésion plaquettaire à l'endothélium	19-21
	1.4.2 Activation plaquettaire	21-24
	1.4.3 Sécrétion plaquettaire	25-30
	1.4.4 Agrégation plaquettaire	31-34
Chapitre 2 : Les neutrophiles		
2.1	Origine et structure des neutrophiles	35-36
2.2	Molécules d'adhésion neutrophilique	36-44
	2.2.1 Les intégrines	36-40
	2.2.2 La L-sélectine	40-41
	2.2.3 Le PSGL-1	41-44

2.3	Fonction des neutrophiles	44-52
2.3.1	Adhésion neutrophilique à l'endothélium	44-48
2.3.2	Interactions plaquettes-neutrophiles	48-51
2.3.3	Agrégation des neutrophiles	51-52

Chapitre 3 : Les métalloprotéinases

3.1	Structure et fonction des métalloprotéinases	53-58
3.2	Activation des métalloprotéinases	58-63
3.3	La famille des gélatinases	63-65
3.4	Les métalloprotéinases des plaquettes	65-72
3.5	Les métalloprotéinases des neutrophiles	72-73
3.6	Les métalloprotéinases dans la biologie vasculaire	73-84
3.6.1	MMPs dans l'angiogénèse	74-75
3.6.2	MMPs dans l'athérosclérose	75-79
3.6.3	MMPs dans la thrombose	80-81
3.6.4	MMPs dans la resténose	81-84
	Hypothèse et problématique	85-86
	Contribution originale	87-110
	Discussion et conclusion	111-115
	Directions futures	116-117
	Bibliographie	118-157

Liste des tableaux

Tableau I :	Constituants essentiels des granules plaquettaires	26
Tableau II :	Molécules plaquettaires impliquées dans l'exocytose	30
Tableau III :	Substrats des métalloprotéinases	57-58
Tableau IV :	Caractéristiques des TIMPs	62
Tableau V :	Implication des MMPs dans les syndromes cardiovasculaires	77

Liste des figures

x

Figure 1 :	Principales molécules d'adhésion plaquettaire	10
Figure 2 :	Structure de la GPIIb/IIIa	15
Figure 3 :	La famille des sélectines	17
Figure 4 :	Adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale	22
Figure 5 :	Les voies de signalisation activées par la phospholipase C	24
Figure 6 :	Les voies de signalisation activées par l'adénylate cyclase	28
Figure 7 :	Fusion d'une granule plaquettaire	32
Figure 8 :	Adhésion, Activation et agrégation des plaquettes	41
Figure 9 :	Liaison entre la P-sélectine et le PSGL-1	43
Figure 10 :	Recrutement et adhésion des neutrophiles	48
Figure 11 :	Interactions Sélectines-PSGL-1 dans la lésion vasculaire	51
Figure 12 :	Structure des métalloprotéinases	55
Figure 13 :	Schéma d'activation et d'activité des MMPs	61
Figure 14 :	Aperçu des principales réactions plaquettaires et les voies de signalisation dépendantes des MMPs	72

Liste des abréviations

AA :	Acide arachidonique
ADP :	Adénosine diphosphate
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
ATP :	Adénosine triphosphate
bFGF :	Facteur de croissance basique des fibroblastes
CML :	Cellules musculaires lisses
COX :	Cyclo-oxygénase
DAG :	Diacylglycérol
EGF :	Facteur de croissance épidermique
FGF :	Facteur de croissance des fibroblastes
GDP :	Guanosine diphosphate
GMPc :	Guanosine monophosphate cyclique
GTP :	Guanosine triphosphate
ICAM-1 :	Molécule d'adhésion intercellulaire-1
IL :	Interleukine
IP3 :	Inositol triphosphate
LAMP :	Protéine associée à la membrane des lysosomes
LNHEV :	Veinules des nodules lymphatiques à haute teneur en cellules endothéliales
MMPs :	Métalloprotéinases de la matrice

Liste des abréviations (suite)

NGAL :	Lipocaline associée à la gélatinase des neutrophiles
NO :	Monoxide d'azote
NSF :	Facteur sensible au N-éthylmaléimide
OCS :	Système caniculaire ouvert
PAF :	Facteur d'activation plaquettaire
PDGF :	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PF4 :	Facteur plaquettaire 4
PGE ₂ :	Prostaglandine E ₂
PGI ₂ :	Prostacycline
PKC :	Protéine kinase C
PLC :	Phospholipase C
PSGL-1 :	Ligand-1 glycoprotéique de la P-sélectine
SNAP :	Protéine soluble associée au NSF
SNARE :	Récepteurs de SNAP
TGF- β 1 :	Facteur de croissance transformant - β 1
TNF- α :	Facteur de nécrose tumorale α
TXA ₂ :	Thromboxane A ₂
VCAM-1 :	Molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1
VEGF :	Facteur de croissance vasculaire endothéliale
vWf :	Facteur von Willebrand

*À ma chère Rania qui a toujours su
m'aider et m'encourager au fil des années,
merci beaucoup et je t'aime.*

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier sincèrement mon directeur de recherche, Dr. Yahye Merhi, pour m'avoir accordé l'opportunité de faire partie de son équipe de recherche et pour m'avoir consacré temps et attention tout au long de mon projet de maîtrise.

De plus, je désire attribuer un merci particulier à mon collègue de travail, Daniel Yacoub, pour son assistance et sa contribution à la réalisation de multiples expérimentations.

Je désire également exprimer ma sincère gratitude envers toute l'équipe de mon laboratoire, je cite l'assistant de recherche M. Jean-Francois Théorêt et la technicienne Mme. Nathalie-Yamina Jacob.

À vous tous,

Merci.

Introduction

Les plaquettes et les leucocytes contribuent au maintien de l'hémostase vasculaire et sont activement impliqués dans plusieurs réactions thrombo-inflammatoires. Les interactions entre les plaquettes, les leucocytes et les cellules endothéliales sont gouvernées par un ensemble de molécules d'adhésion spécifiques qui induisent des interactions homo- et hétérotypiques entre ces cellules dans le syndrome coronaire aigu (1). Plus spécifiquement, l'agrégation des plaquettes et leurs interactions avec les neutrophiles constituent une partie des réactions qui lient l'hémostase à l'inflammation (2-4). La liaison des plaquettes activées aux neutrophiles est essentiellement médiée par la P-sélectine plaquettaire et son ligand de haute affinité sur les neutrophiles, le ligand-1 glycoprotéique de la P-sélectine (PSGL-1) (5-7). Cette interaction adhésive entre les plaquettes et les neutrophiles peut faciliter la modulation de leurs activités et favoriser la coopération biochimique et la génération mutuelle de signaux qui induisent la sécrétion des substances vasoactives incluant des leukotriènes, des cytokines, des radicaux libres, des facteurs de croissance et de coagulation et des métalloprotéinases (MMPs) (8-16).

Les MMPs constituent une famille polygénique d'endoprotéinases reconnues pour leurs rôles dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques comme la dégradation de la matrice extracellulaire, l'angiogénèse, le développement embryonnaire, l'agrégation plaquettaire, la thrombose, la migration et la prolifération cellulaire, la cicatrisation et la resténose (17-19). Les membres de cette famille sont largement apparentés, possèdent un site catalytique dépendant de l'ion Zn^{2+} et sont sécrétés sous une forme latente qui requiert des processus d'activation complexes (20).

La gélatinase A (MMP-2) et la gélatinase B (MMP-9) appartiennent aux groupe des métalloprotéinases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire et le phénomène de remodelage vasculaire (21, 22). La MMP-2 est uniformément distribuée dans le cytosol des plaquettes non-activées sans aucune association détectable avec les granules cytoplasmiques. Suite à l'activation par les agonistes forts tel que la thrombine et le collagène, la MMP-2 est rapidement translocée vers la surface plaquettaire où elles s'associent avec certains composants de la membrane avant d'être sécrétée dans l'espace extracellulaire (23, 24). La MMP-9 est présente aussi au niveau des plaquettes mais en quantité moindre que la MMP-2 (25). À l'état basal, les plaquettes secrètent la MMP-9 de façon constitutive et cette sécrétion atteint une valeur maximale après stimulation par la thrombine. Dans les neutrophiles, la MMP-9 est stockée dans des granules spécifiques et est sécrétée suite à l'activation par les médiateurs inflammatoires (26).

On a démontré dans une étude précédente, que l'inhibition de la P-sélectine avec une forme recombinante de PSGL-1 (rPSGL-Ig) inhibe la liaison plaquette-neutrophile induite par les surfaces artérielles endommagées (27), réduit l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles et prévient la resténose post-angioplastie des artères carotides et coronaires de porcs (28,29). En particulier, l'inhibition de la resténose avec l'antagoniste de la P-sélectine a été associée avec un impact positif sur le remodelage vasculaire suggérant que les interactions plaquettes-neutrophiles modulent la sécrétion des MMPs et la réorganisation de la matrice extracellulaire (27).

Le but de cette étude est de démontrer que la liaison des plaquettes aux neutrophiles via la P-sélectine plaquettaire et le PSGL-1 des neutrophiles augmente la sécrétion de la MMP-2 par les plaquettes et favorise l'agrégation plaquettes-neutrophiles.

Chapitre I

Les plaquettes

1.1 Composition et fonction du sang

Le sang est un tissu conjonctif complet qui fait partie du système cardiovasculaire. Il est constitué d'un certain nombre de cellules en suspension dans un milieu liquide, le plasma. Les cellules sanguines, ou éléments figurés du sang, représentent 45% du volume total sanguin, et sont constituées de trois classes fonctionnelles : les globules rouges (érythrocytes ou hématies), les globules blancs (leucocytes), et les plaquettes (thrombocytes).

Le pourcentage des globules rouges dans le sang s'appelle l'hématocrite et sa mesure est un test clinique de routine. Les érythrocytes sont essentiellement impliqués dans le transport d'oxygène et de dioxyde de carbone. Les leucocytes participent à la défense et aux systèmes immunitaires du corps et se subdivisent en deux classes : les granulocytes ou leucocytes polymorphes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et les agranulocytes ou leucocytes mononucléaires (lymphocytes et monocytes). Quant aux plaquettes, c'est un composant indispensable de l'hémostase. Tous ces types cellulaires prennent naissance dans la moelle osseuse au cours d'un processus appelé hématopoïèse.

Le plasma qui représente 55% du volume total sanguin, est une solution aqueuse de sels inorganiques qui est constamment l'objet d'échanges avec le milieu extracellulaire liquide de différents tissus. Le plasma contient des protéines, les trois principales étant les albumines, les globulines et le fibrinogène. Les albumines représentent la majeure partie des protéines plasmatiques. Elles se lient à des métabolites

relativement peu solubles, auxquels elles servent de molécules de transport. Les globulines forment un groupement varié, incluant les anticorps du système immunitaire. Le fibrinogène est une protéine soluble qui se polymérise en une protéine insoluble, la fibrine, lors de la coagulation du sang (30). Le volume de sang circulant représente normalement environ 8% de la masse corporelle, soit 5,6 litres chez un homme de 70 kg. Le pH normal du sang est légèrement alcalin, se situant entre 7,35 et 7,45. Le sang assure trois fonctions principales au sein de l'organisme :

- le transport de nutriments, de gaz respiratoires, d'hormones et de déchets cellulaires
- la régulation de la température corporelle (contenu aqueux), de pH (système tampon) et de l'équilibre hydrominéral
- la protection. Ce dernier rôle, en plus d'englober la prévention de l'infection par les leucocytes spécialisés, consiste également à la prévention de l'hémorragie où, suite à la rupture d'un vaisseau sanguin, les plaquettes et les protéines plasmatiques forment un caillot et arrêtent l'écoulement du sang (31-32).

Les vaisseaux sanguins constituent un système de tubulure chargé de la circulation du sang dans l'ensemble du corps. Les vaisseaux sanguins se partagent en artères qui transportent le sang du cœur aux organes et, après passage dans de petits capillaires, en veines qui le ramènent au cœur. Les parois des vaisseaux sanguins et du cœur (mais non celle des capillaires) possèdent trois enveloppes : la tunique interne ou intima, la tunique moyenne ou média, la tunique externe ou adventice. La composition de

ces trois tuniques diffère d'un type de vaisseau à un autre mais, il demeure une certaine continuité structurale à travers l'arbre vasculaire.

L'intima est essentiellement formée du revêtement endothéliale d'un vaisseau. Un endothélium est un tissu de recouvrement dont la structure est voisine de celle d'un épithélium pavimenteux mais qui possède une origine embryonnaire différente. L'endothélium repose sur une matrice extracellulaire et la lame élastique interne qui lui donnent du support. Cette matrice contient plusieurs protéines adhésives qui permettent l'adhésion des plaquettes dans le cas d'une lésion endothéliale favorisant ainsi le maintien de l'intégrité du vaisseau. Certaines cellules endothéliales ont des pores et d'autres se chevauchent légèrement, ce qui favorise les échanges intercellulaires et transcellulaires (31).

La média est composée principalement de tissu fibreux, de fibroblastes et de cellules musculaires lisses (CML). Le tissu fibreux (collagène I-IV, fibronectine), organisé en matrice et produit par les fibroblastes, confère une élasticité qui joue un rôle important dans la régulation des pressions artérielles élevées (33).

L'adventice, délimitée par la lame élastique externe, est composée de tissu fibroblastique dense et de nerfs. Dans les plus grosses artères, un réseau de petits vaisseaux sanguins, le *vasa vasorum*, parcourt l'adventice avec un réseau lymphatique parallèle. Les branches du *vasa vasorum* s'infiltrant dans la média, et quelques fois jusqu'au dans l'intima, afin de nourrir les cellules de la paroi artérielle (34).

1.2 Origine et structure des plaquettes

Les plaquettes sanguines étaient pour longtemps décrites comme des portions cytoplasmiques anucléés ou plus simplement de la poussière cellulaire. Bien que plusieurs chercheurs prétendent être les premiers à caractériser les plaquettes sanguines (35), les plaquettes doivent leur découverte en 1882 au chercheur italien Giulio Bizzozero qui, non seulement les identifia anatomiquement mais aussi leur attribua un rôle dans l'hémostase et la thrombose (36-37). Depuis ce temps, la perception des plaquettes connaîtra un grand essor, si bien qu'à l'heure actuelle elles attirent l'attention des chercheurs dans maintes disciplines comme l'hématologie, l'oncologie, l'immunologie, la cardiologie, la biochimie, la recherche en biomatériaux et même en psychologie.

Originaires de la moelle osseuse, les plaquettes dérivent de la défragmentation cytoplasmique de cellules géantes nommées les mégacaryocytes issues des cellules souches multipotentes. Suite à leur passage dans la circulation sanguine, les plaquettes acquièrent une forme discoïde ($3 \times 0.5 \mu\text{m}$), comptent entre 250 000 et 400 000 par millimètre cube, et ne survivent qu'entre cinq et neuf jours avant d'être éliminées par les macrophages au niveau du foie et de la rate (32). Un nombre d'entre elles est éliminé par le système réticulo-endothélial indépendamment de leur âge, tandis qu'une faible proportion des plaquettes circulantes est continuellement impliquée dans le maintien de l'intégrité vasculaire. Cependant, les plaquettes ne possèdent pas toutes les caractéristiques propres aux cellules : elles sont des particules anucléés (38).

La structure des plaquettes peut se diviser en trois composantes soit les membranes, le cytosquelette et les granules de sécrétion. Le glycocalyx est la partie protéique et glucidique de la membrane plasmique qui tapisse l'extérieur de la cellule,

participe activement aux interactions cellulaires, aux mécanismes d'activation plaquettaire et possède des propriétés antigéniques (38). La membrane plasmique des plaquettes est lisse, ne présentant que quelques invaginations formant un système de conduits membranaires internes fortement anastomosés, appelé système caniculaire ouvert (Open Canicular System). Le système caniculaire constitue un lieu d'échanges entre les plaquettes et le milieu extérieur, en permettant l'entrée des molécules circulantes dans le milieu environnant et aussi la fusion et la sécrétion de granules plaquettaires qui viennent déverser leur contenu au cours de l'activation plaquettaire. Il existe aussi un système tubulaire dense qui pour sa part est continuellement hermétique, servant à contenir les réserves intracellulaires en calcium et à créer un environnement stable pour certaines enzymes dont la cyclo-oxygénase (COX), enzyme responsable de la conversion de l'acide arachidonique (AA) issu des membranes en endoperoxydes, précurseurs instables de prostaglandines et de thromboxanes (39).

La plus importante structure intracellulaire des plaquettes est le cytosquelette car, il permet d'ancrer différentes glycoprotéines membranaires et est le siège d'une multitude de réactions biochimiques impliquées dans les diverses voies de signalisation plaquettaire (40). Le cytosquelette plaquettaire peut être divisé en trois couches : 1) une couche riche en spectrine qui est en association avec la face interne de la membrane plasmique, 2) un microtubule unique traversant la plaquette dans son axe le plus court, 3) un réseau de filament d'actine parcourant tout le cytoplasme (41-42).

Dépourvues de noyaux, les plaquettes possèdent dans leur cytosol un nombre important de granules d'entreposage renfermant un paquet de molécules et de substances effectrices comme des facteurs de croissance, des protéines coagulantes, des molécules

d'adhésion, des activateurs cellulaires, des cytokines, des intégrines, des molécules inflammatoires, des facteurs angiogéniques, etc (Tableau I, page 26). La sécrétion de ces substances, lors de l'activation plaquettaire, contribue aux diverses interactions entre plaquettes ou entre plaquettes et d'autres cellules. Ces granules intracellulaires sont au nombre de trois; les granules α , les granules denses et les lysosomes. Une description exhaustive des granules plaquettaires et de leur contenu sera envisagée un peu plus loin dans ce chapitre.

Enchâssées dans la membrane plasmique, les différentes glycoprotéines de surface constituent une gamme de récepteurs, régissant les interactions des plaquettes avec les autres cellules, certains agonistes et certaines protéines notamment celle de la matrice sous-endothéliale. Les glycoprotéines membranaires sont responsables de différentes fonctions physiologiques et pathologiques des plaquettes. De l'adhésion à la matrice sous-endothéliale, en passant par l'agrégation plaquettaire et les réactions thrombotiques et inflammatoires, les protéines de surface influencent et dictent les interactions adhésives et cellulaires des plaquettes (38-40, 43-45).

1.3 Molécules d'adhésion plaquettaire

La nomenclature des différentes glycoprotéines (GP) fut initialement effectuée de la manière suivante : la protéine possédant le poids moléculaire le plus important recevait la numérotation romaine I et la plus petite IX (ex : GPI). Par la suite, avec l'avènement de techniques électrophorétiques plus performantes, des lettres fut attribuées aux protéines de taille semblable qui, autrefois, ne pouvaient être séparées (ex. GPIa). L'analyse et l'étude des différentes molécules d'adhésion présentes à la

surface des plaquettes, au repos et après activation, sont fondamentales à la compréhension de la participation des plaquettes dans l'hémostase vasculaire et les désordres thrombotiques (46, 47). D'ailleurs, plusieurs de ces molécules peuvent induire une cascade signalétique suite à l'engagement et /ou à la reconnaissance de son ligand.

L'adhésion plaquettaire est une étape primordiale menant à la formation d'un thrombus hémostatique et est régie par différentes molécules d'adhésion. Ces récepteurs adhésifs (figure 1) peuvent être divisés en deux grandes catégories : 1) les récepteurs d'initiation qui sont responsables des premiers contacts entre les plaquettes et la matrice sous-endothéliale et 2) les récepteurs de stabilisation qui entrent en fonction lorsque les plaquettes sont activées (48).

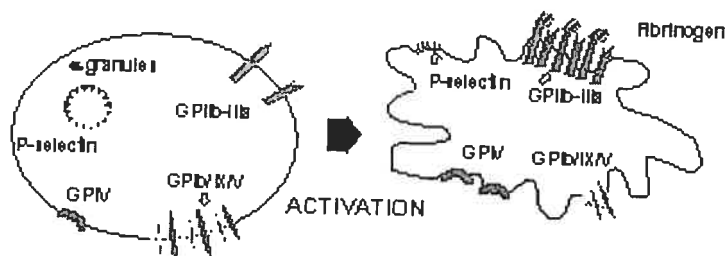
Les récepteurs d'initiation reconnaissent des protéines adhésives insolubles exposées suivant un endommagement ou une activation de l'endothélium. Les principales protéines adhésives retrouvées au niveau de la matrice sous-endothéliale sont les collagènes de différents types, le facteur von Willebrand (vWf), la fibronectine, et d'autres protéines encore mal caractérisées. Au nombre des récepteurs d'initiation nous retrouvons : 1) GPIb/IX/V, un récepteur pour le vWf, 2) l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa), qui reconnaît le collagène, 3) plusieurs autres molécules reconnaissant le collagène (ex : GPIV et GPVI) ainsi que 4) $\alpha_v\beta_3$, un récepteur à la vitronectine. Ces récepteurs de première ligne déclenchent ensuite l'activation plaquettaire (49).

Les récepteurs de stabilisation comprennent : 1) l'intégrine $\alpha_2\beta_3$ (GPIIb/IIIa), le plus abondant récepteur plaquettaire pour le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine, la thrombospondine et le vWf, et qui participe dans l'adhésion ferme, l'étalement et

l'agrégation plaquettaire (50) et 2) la P-sélectine (CD62P, GMP140), exprimée suite à l'activation des plaquettes et impliquée dans la liaison des plaquettes aux neutrophiles et aux monocytes en liant son ligand de haute affinité, le PSGL-1 (51).

Les ligands pour ces récepteurs de stabilisation sont généralement déjà présents dans la circulation sanguine et l'interaction avec ses ligands est généralement sous le contrôle d'un changement conformationnel et d'affinité (GPIIb/IIIa) ou d'une translocation vers la membrane plasmique (P-sélectine) (52).

Figure I : Principales molécules d'adhésion plaquettaire



Suite à l'activation:

GPIb/IX/V : redistribution membranaire

GPIIb/IIIa: 1) expression membranaire augmentée

2) liaison au fibrinogène

P-sélectine: Translocation à la membrane

1.3.1 La GPIa/IIa

C'est vers la fin des années 1980, qu'un récepteur plaquettaire au collagène fut isolé et caractérisé : la GPIa/IIa qui interagit avec le collagène en présence d'ions magnésium (Mg^{2+}), mais cette interaction peut être inhibée par les ions calcium (Ca^{2+})

(53). La GPIa/IIa est une protéine hétérodimérique de la famille des β_1 intégrines ($\alpha_2\beta_1$). Chez des patients souffrant de problèmes de coagulation et dont les plaquettes ne s'activent pas en présence de collagène, une diminution de 80% de l'expression de la GPIa/IIa fut enregistrée (54). Avec la mise en place de techniques biochimiques plus performantes, il fut démontré que la sous-unité α_2 pourrait lier le collagène (55). La GPIa/IIa fut ensuite désignée le principal récepteur plaquettaire à la plupart des types de collagène sous conditions statique et de flot (56-57). Cependant, plusieurs autres protéines membranaires des plaquettes sont aussi impliquées dans l'adhésion des plaquettes au collagène sous condition statiques ou après une longue période d'exposition à des surfaces de collagène sous conditions de flot (57, 58). De plus, un anticorps dirigé contre la GPIa/IIa ne parvient pas à inhiber l'amplitude de l'agrégation plaquettaire, mais retarde considérablement son initiation (59). Notons enfin que la GPIa/IIa participe activement dans la formation de thrombus artériel à l'interface sang-vaisseau sous condition de flot suite à un endommagement artériel (60).

1.3.2 Le GPIb/IX/V

Sous conditions de flot où les forces de cisaillement sont faibles, l'interaction entre le GPIa/IIa et le collagène est suffisante pour établir l'adhésion des plaquettes. Mais, quand les forces de cisaillements sont élevées, l'adhésion des plaquettes à la matrice sous- endothéliale est sous la dépendance de la liaison du complexe GPIb/IX/V au vWf lié aux protéines de la matrice sous-endothéliale (61). Le vWf est composé de plusieurs sous-unités, son poids moléculaire se situe aux environs de 275 kDa et circule dans le sang sous une forme incapable d'être reconnue par les plaquettes (48). Suite à une

lésion endothéliale qui expose les constituants de la matrice, le vWf se lie rapidement au collagène pour interagir ensuite avec le complexe GPIb/IX/V (voir page 23). Cette interaction entre le vWf et le GPIb/IX/V permet aux plaquettes de s'activer pour adhérer fermement à la matrice sous-endothéliale. Le complexe GPIb/IX/V exerce, entre autres, plusieurs fonctions au niveau de l'hémostase vasculaire, car 1) il peut déclencher des voies de signalisation menant à l'activation de la GPIIb/IIIa, 2) peut lier la thrombine et participer à l'activation plaquettaire par ce puissant agoniste, 3) permet l'adhésion des plaquettes activées à l'endothélium et l'adhésion des plaquettes non activées à l'endothélium activé et 4) entraîne plusieurs changements au niveau intracellulaire et morphologique des plaquettes (changement de forme, étalement, sécrétion et agrégation). De plus, le complexe GPIb/IX/V peut aussi interagir avec une β_2 -intégrine des leucocytes, soit le CD11b/CD18 (MAC-1) et favoriser le recrutement des leucocytes au sein des thrombus et aux sites de lésions vasculaires (47). Ce complexe protéique est unique en son genre à la surface des plaquettes car, sur le plan structural, il n'est pas apparenté à aucune autre molécule d'adhésion. Le complexe GPIb/IX/V est composé de quatre sous-unités transmembranaires : GPIb α , GPIb β , GPIX, et la GPV, chacune étant membre de la famille des protéines riches en leucine (62).

La sous-unité GPIb (170 kDa) consiste en deux chaînes peptidiques liées par des ponts disulfure : 1) la chaîne α (135 kDa) dont le domaine extracellulaire contient sept séquences répétées en tandem riches en leucine et une région appelée macroglycopeptide fortement glycosylée, et 2) la chaîne β (25 kDa) liée de manière covalente à la chaîne α par un pont disulfure situé près de la surface de la membrane plasmique (63). La GPIb est associée de manière non-covalente à la GPIX (22 kDa) dans un rapport stochiométrique

de 1:1. Cette protéine est sensiblement homologue à la GPIIb β , car elle est constituée d'un domaine extracellulaire riche en leucine, mais ayant une séquence cytoplasmique beaucoup plus courte (61). La GPV (82 kDa) est aussi en association avec le complexe et son domaine extracellulaire est composé de 15 séquences répétées en tandem riche en leucine, un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique (64, 65).

Environ 25 000 exemplaires du complexe GPIIb/IX/V se retrouvent à la surface d'une plaquette et il est à noter que la présence de toutes les unités protéiques formant ce complexe est essentielle à l'expression stable de ce récepteur pour le vWf (66). Lorsque les plaquettes ne sont pas activées, le complexe GPIIb/IX/V est ancré au cytosquelette membranaire, qui est composé de courts filaments d'actine adaptatrice, l'ABP (Actin Binding Protein) (67). La liaison de GPIIb/IX/V au vWf dépend, entre autres, de l'association de la GPIIb α avec le cytosquelette membranaire car en absence d'association entre le cytosquelette et la GPIIb α , une plus grande quantité de vWf est liée par les plaquettes. Par conséquent, la proportion de GPIIb α interagissant avec le cytosquelette dicte la capacité de liaison du vWf par les plaquettes : plus de molécules de GPIIb α sont liées au cytosquelette, moins les plaquettes lieront de vWf, ce qui pourrait être un moyen de contrôler la réponse plaquettaire au vWf car, lors de l'activation cellulaire, la GPIIb est redistribuée vers le cytosquelette, diminuant probablement la capacité des plaquettes à être stimulées par le vWf présent dans le milieu (68, 69).

13.3 La GPIIb/IIIa

Une caractéristique importante des plaquettes c'est qu'en quelques secondes suivant leur activation, elles deviennent pro-adhésives et sont capables d'agréger (46).

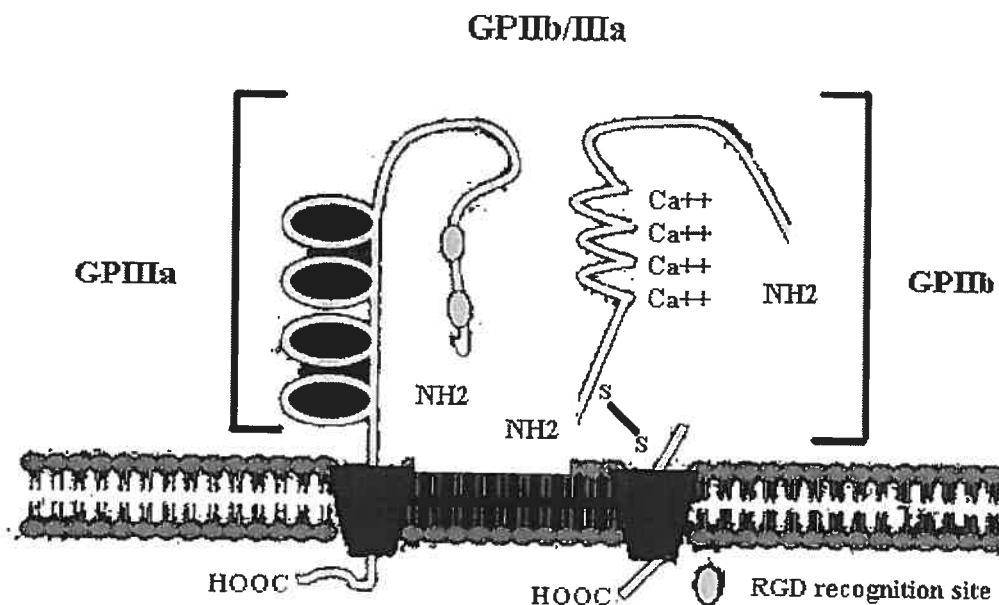
Cette capacité des plaquettes d'agréger est dépendante d'une intégrine de surface exprimée de manière constitutive par les plaquettes : la GPIIb/IIIa ou l'intégrine $\alpha_2\beta_3$. Cette glycoprotéine est la plus abondante molécule d'adhésion à la surface des plaquettes avec 80 000 exemplaires (70), ce qui représente 1 à 3% de la teneur totale en protéines des plaquettes (71,72). Environ 70% de la GPIIb/IIIa est distribué de manière aléatoire à la surface des plaquettes et le 30% restant se trouve au niveau du système caniculaire ouvert (OCS) et dans la membrane des granules α (73).

La β_3 -intégrine est composée d'une chaîne α (GPIIb) de 140 kDa constituée de deux chaînes peptidiques reliées par un pont disulfure; une lourde de 125 kDa et une légère de 25 kDa qui contient le domaine transmembranaire et la courte région cytoplasmique de 26 acides aminés (70, 74). Cette sous-unité α comprend dans son domaine extracellulaire quatre sites de liaison pour des cations divalents qui témoignent de sa dépendance calcique. La chaîne β_3 (GPIIIa) a un poids moléculaire de 105 kDa et est composée de 762 acides aminés dont 692 dans la région extracellulaire, 25 pour le domaine transmembranaire et 45 pour la queue cytoplasmique. L'association entre les deux sous-unités dépend des interactions entre les deux portions NH_2 terminales (75) ainsi que de la présence des ions Ca^{2+} (76, 77) (figure 2). La GPIIb/IIIa partage sa sous-unité β_3 avec le récepteur à la vitronectine, la $\alpha_v\beta_3$ que l'on retrouve à la surface des monocytes, des macrophages, des cellules endothéliales, des CML et des plaquettes (78).

Lorsque les plaquettes ne sont pas stimulées par des agonistes, la GPIIb/IIIa est maintenue dans sa conformation inactive par la phosphorylation du résidu Thr^{753} , car la phosphorylation de ce résidu empêche les plaquettes d'adhérer et de s'étaler sur une surface de fibrinogène (79). Il se pourrait que la phosphorylation de la Thr^{753} empêche

celle de la Ser⁷⁵² qui est indispensable pour l'obtention d'une agrégation maximale et le recrutement des protéines impliquées dans les voies de signalisation induites par la liaison du fibrinogène à la GPIIb/IIIa (80-82).

Figure 2 : Structure de la GPIIb/IIIa



Au cours de l'activation plaquettaire, la sous-unité β_3 subit diverses phosphorylations sur des résidus sérines et thréonines (83) et, même si cette sous-unité exhibe une séquence consensus pour la phosphorylation d'une tyrosine, aucune phosphorylation de résidus tyrosines n'a encore été détectée. Récemment, la phosphorylation de la sous-unité β_3 sur des résidus tyrosine fut observée seulement en réponse à la thrombine et ce suite à la liaison du fibrinogène à la GPIIb/IIIa (82).

Entre 20-30% de la totalité des molécules de GPIIb/IIIa sont associés au cytosquelette membranaire lorsque la plaquette n'est pas activée. Suite à l'activation

plaquettaire, la GPIIb/IIIa s'associe davantage au cytosquelette cytoplasmique dans un processus dépendant de l'agrégation, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter la résistance des agrégats plaquettaires aux forces de cisaillement et aussi de contrôler l'état d'activation de la GPIIb/IIIa (84-85). Cette association de la GPIIb/IIIa avec le cytosquelette est très importante car lorsque la GPIIb/IIIa interagit avec l'un de ses ligands, il y aura formation de domaines membranaires (clusters) et les molécules de GPIIb/IIIa seront dirigées vers le système caniculaire, alors que les GPIIb/IIIa libres resteront distribuées de manière aléatoire sur toute la surface membranaire (86).

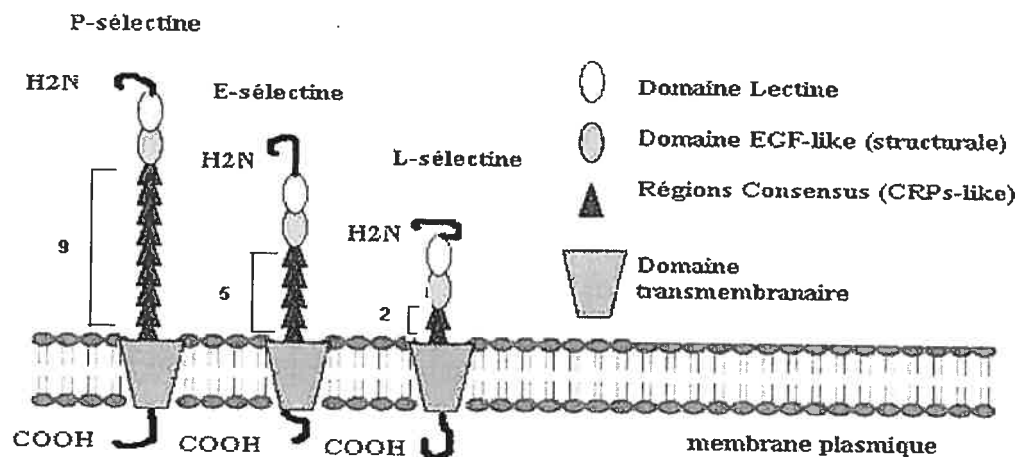
13.4 La P-sélectine

Les sélectines sont des molécules d'adhésion transmembranaires que l'on retrouve chez les leucocytes, les cellules endothéliales et les plaquettes activées. (87). Originaires de gènes situés sur le chromosome 1 humain et murin, les sélectines possèdent une analogie structurale; un domaine lectine sous dépendance calcique en N-terminal, suivi d'un domaine homologue au facteur de croissance épidermique (EGF), un nombre variable de 2 à 9 répétitions de régions consensus, séquences retrouvées aussi dans les protéines régulatrices du complément (Complement Regulatory Proteins, CRP). Chacune des sélectines est insérée dans la membrane par son domaine hydrophobe transmembranaire et comprend une courte queue cytoplasmique (88) (figure 3). Découvertes en 1989, les sélectines furent nommées en fonction des tissus où elles furent tout d'abord observées. : 1) la L-sélectine (C62L) est la plus petite des sélectines et se retrouve exprimée constitutivement à la surface des leucocytes 2) la E-sélectine (C62E) présente à la surface des cellules endothéliales activées par un mécanisme de synthèse *de*

novo, et 3) la P-sélectine (C62P), que l'on retrouve dans les granules α (89) et denses (90, 91) des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales (89).

Suite à l'activation, la P-sélectine est rapidement translocée vers la membrane plasmique des plaquettes et des cellules endothéliales (44, 92-96). Constituée de 789 acides aminés, la P-sélectine se retrouve sous forme monomérique, homodimérique et hétérodimérique en association avec une protéine de 81 kDa encore mal caractérisée (97). À l'état de repos, le niveau de la P-sélectine à la surface des plaquettes se situe entre 500 et 2 400 exemplaires.

Figure 3 : La famille des sélectines



Suite à l'activation plaquettaire à la thrombine, près de 7 500 à 12 200 molécules de P-sélectine se retrouvent à la surface des plaquettes (98-100). Selon une autre étude, on évalue la quantité de la P-sélectine à la surface des plaquettes à 80 000 molécules (101). Ces études démontrent clairement une augmentation de l'ordre de 6 à 7 fois de la

présence de la P-sélectine à la surface des plaquettes après l'activation cellulaire à la thrombine.

Faisant suite à sa redistribution vers la membrane plasmique, la teneur membranaire en P-sélectine diminue, 30 minutes après l'activation cellulaire (102). Les mécanismes engendrant cette baisse de la P-sélectine ne sont pas encore bien connus, bien que certaines hypothèses peuvent être admises : 1) internalisation des molécules de la P-sélectine et acheminement vers des lysosomes pour y être dégradées ou 2) vers des granules de sécrétion en vue d'une nouvelle activation cellulaire (93, 102-105). Toutefois, la théorie de recyclage de la P-sélectine semble être plus appropriée, étant donné qu'à l'origine, les plaquettes possèdent un stock bien limité de P-sélectine et qu'elles sont incapables de répondre à une nouvelle stimulation par une synthèse *de novo*.

1.4 Fonction plaquettaire

La fonction principale des plaquettes est le maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins en empêchant toute fuite vasculaire à travers les parois lésées ou endommagées. Les glycoprotéines à la surface des plaquettes activées ou non, dictent la réponse cellulaire à la présence de divers stimuli. Il s'en suit l'activation des plaquettes qui peuvent ensuite adhérer, sécréter et agréger (106).

Les principales molécules d'adhésion permettant aux plaquettes d'accomplir leurs fonctions sont : 1) le complexe GPIb/IX/V, principal récepteur pour le vWf, 2) la GPIIb/IIIa qui reconnaît le fibrinogène lorsqu'elle est active et 3) la P-sélectine qui, lorsque redistribuée suite à l'activation permet aux plaquettes d'interagir avec différents types cellulaires (50, 61, 107). L'élucidation et la compréhension des mécanismes

régissant les fonctions plaquettaires ont mené au développement de meilleurs traitements thérapeutiques dans la prévention des désordres thrombotiques (108).

1.4.1 Adhésion plaquettaire à l'endothélium

L'adhésion des plaquettes à l'endothélium est la première étape dans l'hémostase et la thrombogénèse. Les plaquettes jouent donc un rôle critique en étant la première ligne de défense du corps quand les vaisseaux sanguins sont endommagés. Dans les conditions physiologiques normales, les plaquettes circulent dans le sang dans un état inactivé et n'adhèrent pas à l'endothélium intact. Cette propriété de thrombo-résistance est liée à la nature de l'endothélium et à sa capacité de sécréter différentes substances inhibitrices de l'activité plaquettaire comme le monoxyde d'azote (NO), le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF), la prostacycline (PGI₂) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) (109). Cependant, lorsque les plaquettes échappent aux mécanismes de régulation, la réaction plaquettaire devient démesurée et il y aura un risque accru d'engendrer une oblitération partielle ou totale (thrombose) dans les vaisseaux sanguins ou les cavités cardiaques.

Roulement des plaquettes sur l'endothélium activé

Les plaquettes possèdent la capacité de rouler sur l'endothélium activé. Ce processus est, en partie, dépendant du complexe GPIIb/IIIa/V. Frenette et coll. ont démontré *in vivo* que les plaquettes pouvaient, à l'image des neutrophiles, rouler et adhérer à l'endothélium activé par des cytokines inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale α (TNF α). Au niveau des artérioles, le mécanisme permettant aux plaquettes de rouler sur l'endothélium repose sur l'expression de la P-sélectine par les

cellules endothéliales (110) et un ligand pour la P-sélectine endothéliale, encore mal identifié, à la surface des plaquettes. Deux protéines sont candidates pour être le ligand de la P-sélectine : le PSGL-1 et le complexe GPIb/IX/V (111, 181, 182). Une étude effectuée sous conditions statiques révèle que les plaquettes activées peuvent adhérer à l'endothélium par l'intermédiaire du GPIIb/IIIa (112).

Adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale

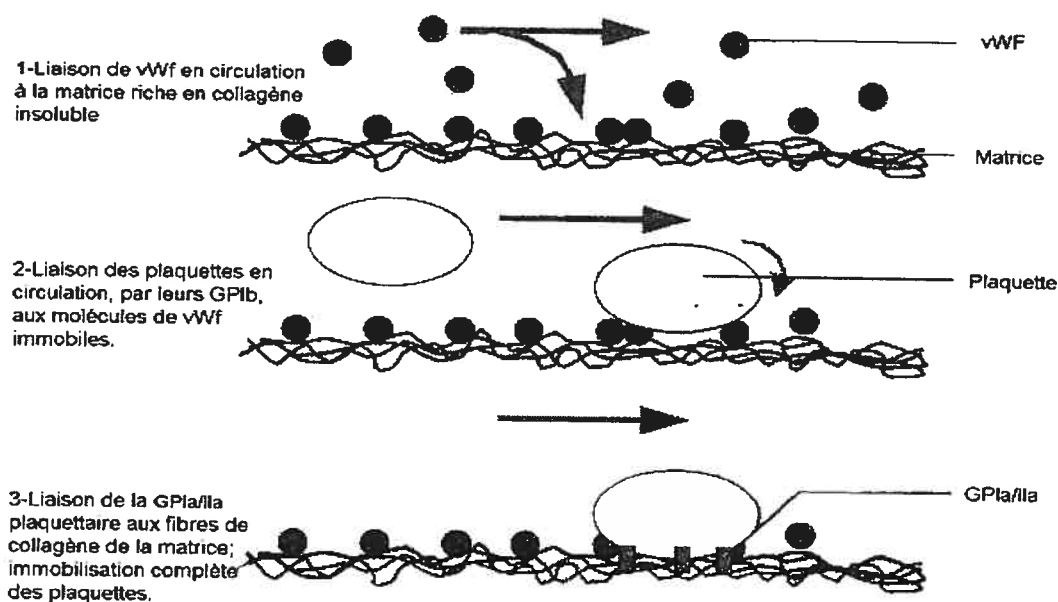
Quelques secondes après la lésion d'un vaisseau sanguin, les parois se contractent (spasme vasculaire) et les plaquettes circulantes interagissent avec les composants maintenant exposés de la matrice endothéliale ou les cellules avoisinantes la plaie par l'intermédiaire de protéines adhésives. De point de vue mécanistique, l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale peut être divisée en 3 étapes : la première étape consiste en la liaison des molécules de vWf libres en circulation au collagène présent à la surface sous-endothéliale. La seconde étape se distingue par l'interaction des plaquettes en circulation, via leur GPIb/IX/V, avec les molécules de vWf immobilisées. Malgré la grande rapidité de cette interaction, la liaison entre la GPIb/IX/V et le vWf demeure de faible affinité, de sorte que les plaquettes conservent toujours une certaine mobilité sur la surface riche en collagène, mais démontrent toutefois une vitesse grandement réduite. La troisième et dernière étape de l'adhésion débute lors de ralentissement des plaquettes, ce qui favorise la liaison entre le collagène matriciel et les molécules d'adhésion GPIa/IIa, GPIV et GPVI. Cet attachement provoque d'ailleurs l'activation des intégrines GPIa/IIa, ceci leur conférant une affinité accrue envers le collagène de la matrice. Dès lors, une quantité supplémentaire de GPIa/IIa s'associe aux fibres de collagène, le tout occasionnant une immobilisation complète des plaquettes sur la surface vasculaire

endommagée (56, 113-115). Une fois les interactions d'initiation sont engagées, la GPIIb/IIIa acquiert sa conformation active, solidifie l'adhésion plaquettaire à la matrice et recrute aussi d'autres plaquettes avec la participation de la P-sélectine (67). Aussitôt que les plaquettes adhèrent fermement à la surface endommagée, elles changent rapidement de forme et s'étalent sur la lésion en émettant des extensions membranaires (lamellopodes, filopodes). Ce changement conformationnel et les filopodes formés facilitent l'arrivée et le recrutement d'autres plaquettes qui s'accumuleront aux sites de lésion et formeront un agrégat ou thrombus. En plus, des leucocytes seront aussi incorporés entre les plaquettes; initiant et propageant la réaction inflammatoire. Ce processus est modulé par les glycoprotéines plaquettaires, par la nature de la surface exposée, par les facteurs hémodynamiques locaux et par une variété de facteurs vasoactifs. (116). La figure 4 schématise les étapes de l'adhésion plaquettaire à la matrice sous-endothéliale.

1.4.2 Activation plaquettaire

L'activation plaquettaire est une propriété intrinsèque des plaquettes en réponse à la stimulation. Ce phénomène peut être perçu par microscopie électronique sous forme d'un étalement ou d'un étirement plaquettaire (117, 118). Avant d'être sollicitées pour exercer leurs fonctions hémostatiques, les plaquettes circulent dans le sang sous forme discoïde. Au cours de leur activation, elles acquièrent une forme plus globulaire et forment des filopodes. Ces changements structuraux mettent à grande contribution le cytosquelette plaquettaire riche en actine.

Figure 4 : Adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale



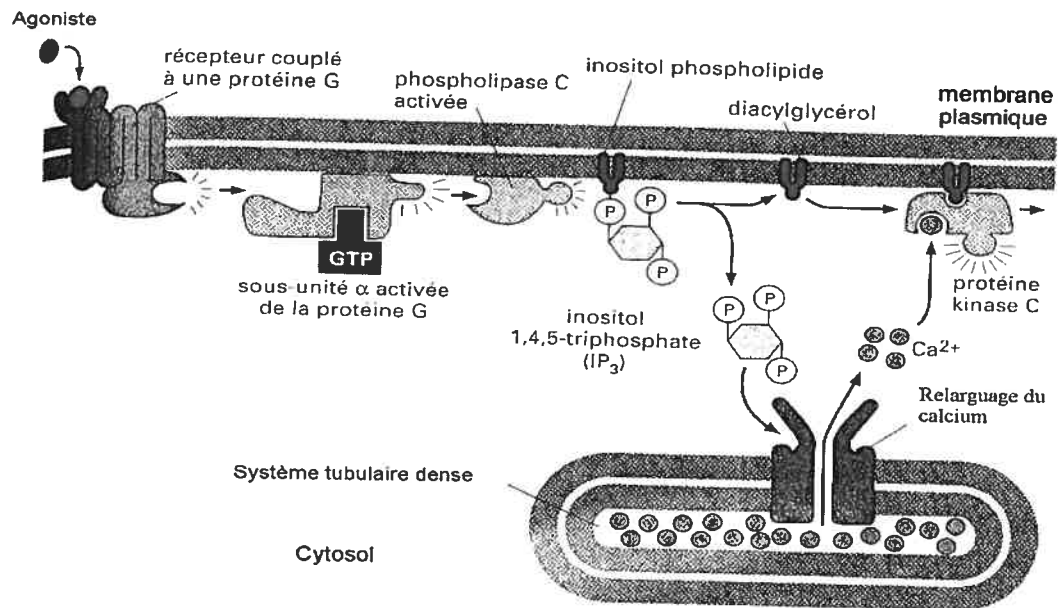
Que ce soit par une altération au niveau des forces de cisaillement, par un endommagement/dysfonction endothélial ou par la présence d'agonistes, l'activation plaquettaire déclenche la triade de réponses suivantes : adhésion, sécrétion et agrégation (109). Ces différentes conséquences de l'activation plaquettaire dépendent d'une série de signaux intracellulaires, qui interprètent les stimuli extracellulaires détectés par une panoplie de récepteurs membranaires (119, 120).

L'intégration des différents signaux perçus par les récepteurs membranaires se traduit par la génération de seconds messagers. L'une des voies générales consiste en une hydrolyse enzymatique des phospholipides membranaires par la phospholipase C (PLC) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG) (figure 5). À l'opposé, l'activation plaquettaire peut être limitée par d'autres voies de signalisation comme celles issues de l'élévation de la concentration intracellulaire en adénosine monophosphate

cyclique (AMPc) ou en guanosine monophosphate cyclique (GMPc) par l'action de l'adénylate cyclase (figure 6) et de la guanylate cyclase, respectivement (43, 47). Ces 2 voies métaboliques (inhibitrices ou activatrices) dépendent de l'activation des récepteurs membranaires généralement couplés à des protéines G effectrices (121).

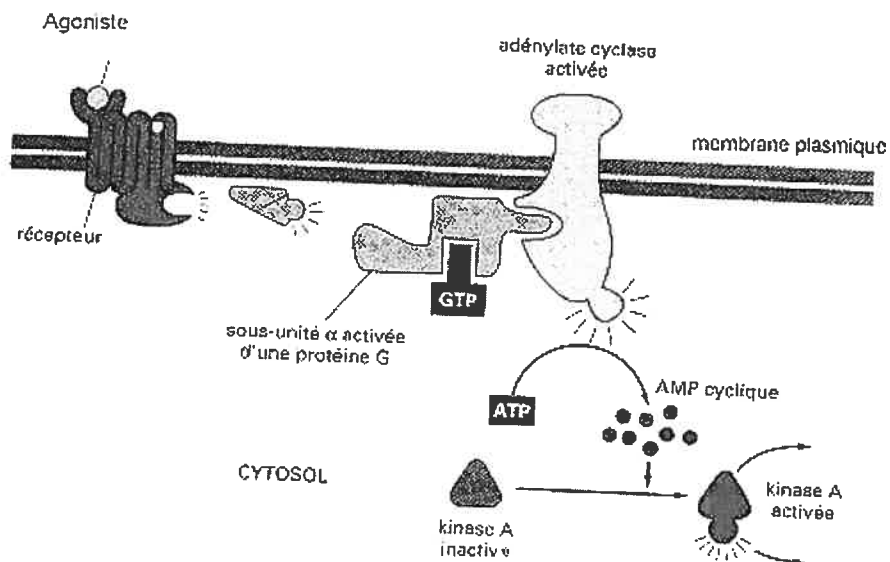
Les seconds messagers formés par des réactions intracellulaires poursuivent le cheminement menant à l'activation complète des plaquettes. L'IP₃, issu de l'action de la PLC sur les phospholipides membranaires, entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺, ce qui a pour effet d'activer des enzymes à dépendance calcique. Le DAG favorise l'activation de la PKC, l'AMPc celle de la PKA (Protéine Kinase dépendante de l'AMPc) et le GMPc celle de la PKG (Protéine Kinase dépendante du GMPc) (46). De plus, les plaquettes peuvent synthétiser des prostaglandines à partir de l'AA suite à l'action de la phospholipase A₂ sur les phospholipides membranaires. L'AA est transformé en prostaglandines endoperoxydes (PGG₂ et PH₂) sous l'action de la cyclooxygénase (COX). Ces derniers sont transformés en thromboxane A₂ (TXA₂) sous l'action de la thromboxane synthétase. Le TXA₂ est un puissant vasoconstricteur et stimulateur des plaquettes, il inhibe l'activité de l'adénylate cyclase; ce qui entraîne une chute du taux d'AMPc plaquettaire, l'augmentation du calcium et par conséquent l'activation plaquettaire (122).

Figure 5 : Les voies de signalisation activées par la phospholipase C



Adapté de Alberts, Bray, Johnson et al. *L'essentiel de la biologie cellulaire. Médecine-Sciences Flammarion. Paris; 1999 : 500-501.*

Figure 6 : Les voies de signalisation activées par l'adénylate cyclase.



Adapté de Alberts, Bray, Johnson et al. *L'essentiel de la biologie cellulaire. Médecine-Sciences Flammarion. Paris; 1999 : 500-501.*

1.4.3 Sécrétion plaquettaire

Les plaquettes sont des cellules sécrétrices spécialisées qui déversent le contenu de leurs granules cytoplasmiques suite à l'activation cellulaire. Différents types de granules se retrouvent dans les plaquettes. 1) les granules α sont les plus volumineux et les plus nombreux (environ 80 granules α /plaquette) ; ils contiennent des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion et les protéines de coagulation, 2) les granules denses qui sont 10 fois moins nombreux, et contiennent des molécules solubles et des cations divalents impliqués dans la potentialisation de l'activation des plaquettes et de leurs propriétés pro-coagulantes et 3) les lysosomes dans lesquels se trouvent des enzymes permettant la dégradation de différentes protéines (123, 124).

La sécrétion des différentes substances contenues dans les granules plaquettaires joue un rôle clé dans l'hémostase normale ainsi que dans des processus pathologiques tels que l'occlusion vasculaire thrombotique, l'athérosclérose et le remodelage vasculaire. Ces molécules sont synthétisées dans les mégacaryocytes ou dans d'autres cellules et empaquetées dans les granules par des processus de transport vésiculaire. Des études récentes ont montré que la sécrétion plaquettaire ou l'exocytose est médiée par une machinerie moléculaire homologue à celle utilisée par les cellules sécrétrices hautement spécialisées comme les neurones, mais chez les plaquettes cette machinerie moléculaire semble être couplée uniquement à l'activation cellulaire par des séquences de signalisation intracellulaire (52). Le tableau I résume les constituants essentiels des différents granules plaquettaires.

Tableau I : Constituants essentiels des granules plaquettaires

Granules α	Granules denses	Lysosomes
P-sélectine	GPIb	CD107a (LAMP-1)
GPIb-IX-V	GPIIb/IIIa	CD107b (LAMP-2)
GPIIb/IIIa	P-sélectine	CD63 (LAMP-3)
GPIV	CD107a (LAMP-1)	Carboxypeptidase
PECAM-1	CD107b (LAMP-2)	Phosphatase acide
Stomatin	CD63 (LAMP-3)	Cathepsin D et E
TLT-1	Sérotonine, Histamine	Métalloprotéinases ?
PDGF, VEGF, EGF	ATP, ADP, GTP, GDP	
Facteur V, Facteur VIII	Calcium, Magnésium	
Fibronectine, PF4		
Vitronectine, vWf		
Thrombospondine		
Fibrinogène		
Immunoglobulines (IgG, IgA, IgM)		

Les plaquettes peuvent être activées par des agents physiologiques comme la thrombine, l'ADP (adénosine diphosphate), le collagène, la TXA₂, l'épinéphrine et le PAF (Facteur d'activation plaquettaire). Ces agents interagissent avec des récepteurs membranaires spécifiques couplés à une protéine G ou par d'autres mécanismes pour induire des cascades de signalisation intracellulaire (125, 126).

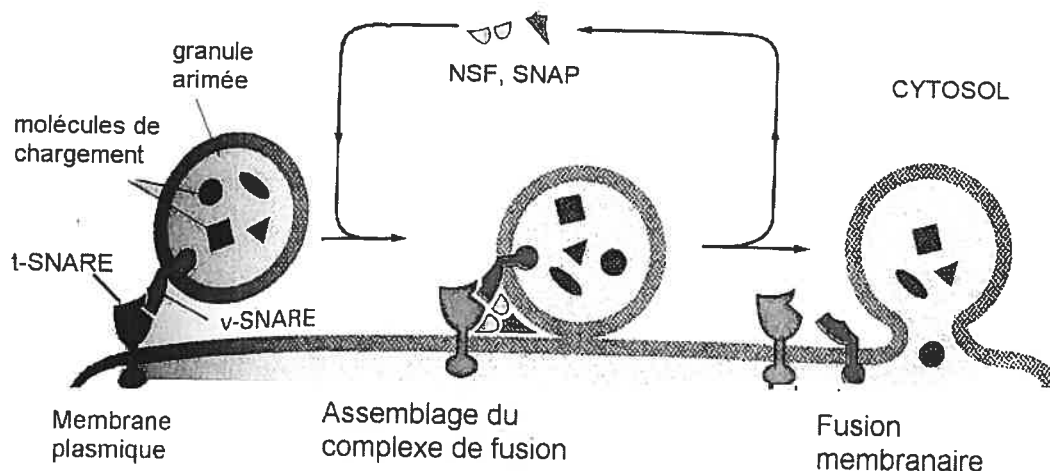
Bien que plusieurs agonistes sont capables d'induire la sécrétion des granules α et des granules denses, la sécrétion des lysosomes nécessitent des agonistes forts comme la thrombine. Quand les cellules sont activées, l' IP_3 et le DAG sont générés ; L' IP_3 provoque un relargage des ions Ca^{2+} du système tubulaire dense et la concentration intracellulaire en calcium augmente de ~ 100 nM jusqu'à $1-2 \mu M$ (127-129). Les plaquettes contiennent plusieurs isoformes de la PKC (α , β_1 , β_{11} , δ , ζ , η , θ) qui peuvent être activés par le DAG et/ou le Ca^{2+} (130). Une fois activées, les PKC peuvent ensuite phosphoryler un ensemble de protéines intracellulaires impliquées dans le transport et la sécrétion des granules plaquettaires (131-135).

Mécanisme de la sécrétion plaquettaire

Quand une granule de sécrétion atteint la membrane plasmique, elle doit le reconnaître et s'y arrimer. C'est seulement alors que la granule peut fusionner avec la portion cible de la membrane et décharger son contenu. L'impressionnante spécificité du transport granulaire suggère que tous les types de granules dans la cellule portent à leur surface des marqueurs moléculaires qui donnent à la granule son identité selon son origine et son chargement. Ces marqueurs doivent être reconnus par des récepteurs complémentaires de la portion cible de la membrane plasmique. Une famille de protéines apparentées appelées SNARE est responsable de la reconnaissance et de la fusion des granules : les SNARE sur les granules (appelées v-SNARE : v pour *vésicule*) sont spécifiquement reconnues par des SNARE complémentaires de la face cytosolique de la membrane cible (appelées t-SNARE : t pour *target*). Le complexe formé par les SNARE nécessite la présence d'un complexe de protéines de fusion membranaire qui s'assemble

au site d'arrimage et catalyse la fusion de la granule et de la membrane plasmique (134, 136-139 et figure 7).

Figure 7 : Fusion d'une granule plaquettaire



Adapté de Alberts, Bray, Johnson et al. L'essentiel de la biologie cellulaire. Médecine-Sciences Flammarion. Paris; 1999 : 466-467.

La translocation de la P-sélectine serait sous la dépendance de différents isoformes de la protéine kinase C ($PKC\alpha$, ϵ , η et ζ) et d'un phosphoinositide ($P_i(4,5)P_2$), mais ne nécessiterait pas l'activité de la phosphoinositide 3-kinase (P_i3K) et ne serait pas dépendante de la capacité des filaments d'actine à se polymériser (162-168). Au contraire, le cytosquelette plaquettaire semble exercer une certaine contrainte au niveau de la fusion des granules (169).

Les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) sont des enzymes reconnues pour leur implication dans la dégradation des composantes de la matrice extracellulaire. De plus, ces enzymes jouent un rôle crucial dans la biologie vasculaire et contrôlent certaines

fonctions plaquettaires. Les plaquettes humaines contiennent des MMPs qui les secrètent de façon constitutive et/ou suivant leur activation (170). Au cours de l'activation plaquettaire, des agrégats de MMP-2 (gélatinase A) ont été détectés dans le cytosol des plaquettes. Bien que la nature de ces structures demeure inconnue, elles ressemblent à des endosomes dans leur taille et leur localisation, ce qui suggère que la MMP-2 soit sécrétée par extrusion du système caniculaire. En utilisant la microscopie électronique (immunogold electron microscopy) et la cytométrie de flux, Radomski et coll. ont pu détecter la présence des agrégats de MMP-2 fortement associés avec la surface membranaire des plaquettes durant l'agrégation. L'étape finale de translocation de la MMP-2 correspond à une agrégation maximale et se termine par une sécrétion de MMP-2 dans le microenvironnement des plaquettes. Ceci a été confirmé par la présence d'une activité gélatinolytique dans les sécrétions plaquettaires (23). Ces observations amènent donc à conclure que la translocation de la MMP-2 à la surface membranaire joue un rôle important dans l'agrégation plaquettaire médiée par cette enzyme. Dans cette perspective, la MMP-2 peut être assimilée aux récepteurs plaquettaires adhésifs comme la GPIb et la P-sélectine qui sont translocées du cytosol à la surface cellulaire au cours de l'activation plaquettaire (171). Le tableau II regroupe les principales molécules plaquettaires impliquées dans l'exocytose.

En conclusion, les mécanismes plaquettaires menant à la sécrétion des granules et par le fait même à la translocation de la P-sélectine et de la MMP-2 sont complexes et encore incompris. Une multitude de protéines doivent interagir entre elles et ce de façon concertée et contrôlée par plusieurs enzymes et seconds messagers. L'étude plus

approfondie des voies impliquées dans le processus de sécrétion nous permettra certainement de mieux comprendre la biologie cellulaire des plaquettes.

Tableau II : Molécules plaquettaires impliquées dans l'exocytose (134, 136, 137, 139, 140-159).

Molécule	Classe	Interaction moléculaire	Rôle fonctionnel dans l'exocytose
Syntaxine-4 [#]	t-SNARE	Formation du complexe SNARE	Exocytose des granules α *
Syntaxine-2 [#]	t-SNARE	Formation du complexe SNARE	Exocytose des granules α et des granules denses
SNAP-23 [§]	t-SNARE	Formation du complexe SNARE	Exocytose des granules α , des granules denses et des lysosomes
NSF	ATPase	Dissociation du complexe SNARE	Exocytose des granules α , des granules denses et des lysosomes
Rab 4	Petite GTPase	Non établie dans les plaquettes	Exocytose des granules α
Rab-GDI	Rab	Livraison membranaire des molécules Rabs liées à GDP	Exocytose des granules α
Munc 18a	Sec 1	Association avec syntaxine-2	Exocytose des granules α
Munc 18b	Sec 1	Association avec SNAP-23	?
Munc 18c	Sec 1	Association avec syntaxine-2 et SNAP-23	Exocytose de toutes les granules plaquettaires

NSF indique N-ethylmaleimide, Sensitive Factor ; SNAP, Soluble NSF-Associated Protein ; SNARE, SNAP-Receptors; Rab-GDI, Rab-GDP Dissociation Inhibitor.

La Syntaxine-4 toute seule ou avec la Syntaxine 2 semblent médier l'exocytose des granules α , et la Syntaxine -2 celle des granules denses en présence de la thrombine (134, 136, 139).

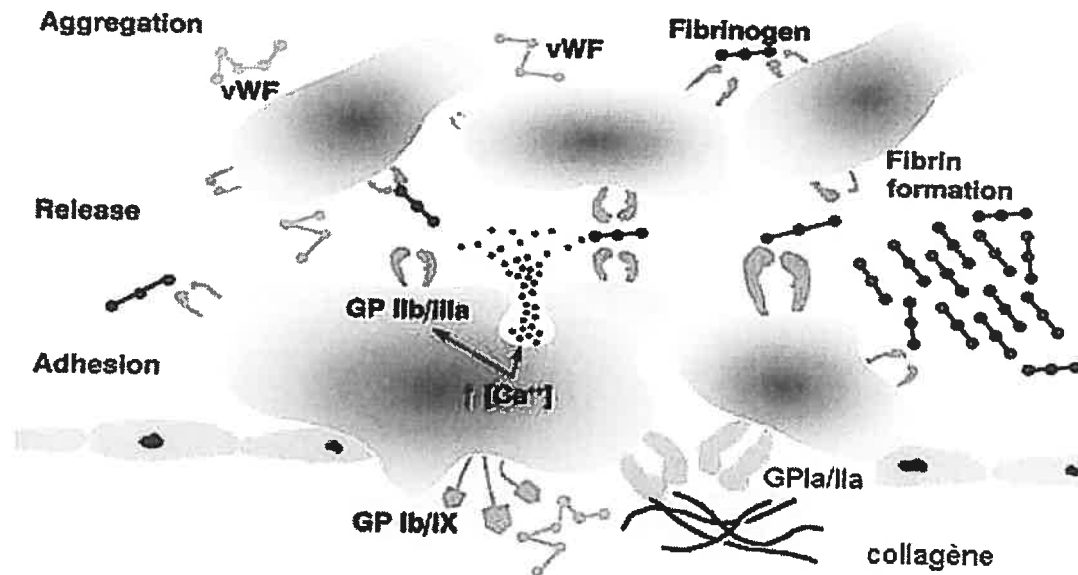
§ Lorsque les plaquettes sont activées à la thrombine, SNAP-23 est phosphorylée sur des résidus Ser²³ et Ser¹⁶¹ ou la Thr²⁴ par la PKC α , γ et δ , une phosphorylation qui favorise son association avec la Syntaxine 4 (159).

* Au sein des granules α , il y a TLT-1 (TREM-like transcript-1), une molécule comprenant un domaine ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif). TLT-1 jouerait possiblement un rôle surtout au niveau du contrôle de la sécrétion granulaire. Cependant, son rôle au cours de l'activation plaquettaire et de la fonction des plaquettes reste encore à clarifier (160, 161).

1.4.4 Agrégation plaquettaire

Tel que discuté auparavant, l'adhésion des plaquettes sur une surface artérielle thrombogène induit une signalisation et une activation des plaquettes. Alors qu'une monocouche de plaquettes activées recouvre la matrice sous- endothéliale, la réponse hémostatique s'engagera alors dans une nouvelle direction, à savoir l'amplification de la réponse par le recrutement d'autres plaquettes pouvant s'associer à celles de la monocouche, déclenchant ainsi l'agrégation plaquettaire. L'exocytose du contenu granulaire des plaquettes ayant adhérees à la matrice joue un rôle-clé à ce niveau en favorisant la sécrétion de divers agonistes tel que l'ADP, la sérotonine, le TXA₂ et le Ca²⁺ qui potentialisent la réponse plaquettaire. De plus, l'enclenchement du processus de coagulation, que ce soit par la voie intrinsèque ou extrinsèque, engendre la conversion de la prothrombine en thrombine, enzyme reconnue comme étant l'un des agonistes les plus puissants quant au recrutement et à l'agrégation plaquettaire (51). L'étape déterminante qui mène à l'agrégation plaquettaire est le changement conformationnel de la GPIIb/IIIa induit par l'activation cellulaire, la rendant ainsi apte à lier le fibrinogène soluble. Le fibrinogène lié par une GPIIb/IIIa à la surface d'une plaquette activée sera aussi lié par une autre GPIIb/IIIa sur une autre plaquette activée, formant ainsi un pont de fibrinogène entre deux plaquettes (figure 8). Ce lien formé entre deux plaquettes par l'intermédiaire du fibrinogène et de la GPIIb/IIIa constitue l'étape finale de l'agrégation plaquettaire régie par des mécanismes intracellulaires dépendants de l'agoniste utilisé (119, 172).

Figure 8 : Adhésion, activation et agrégation des plaquettes



Source : Dr Pierre Théroux, ICM.

Les voies intracellulaires aboutissant à l'activation de la GPIIb/IIIa et à sa capacité d'interagir avec le fibrinogène et le vWf solubles (43) sont qualifiées de signalisation « intérieur-extérieur » (inside-out) (78). Cette signalisation semble impliquer des changements au niveau des séquences cytoplasmiques des deux sous-unités de la GPIIb/IIIa. En réponse à la thrombine, des récepteurs couplés aux protéines G sont stimulés et permettent l'activation de la PKC qui influence l'affinité de sites de liaisons extracellulaires en phosphorylant certains résidus sérines et thréonines dans la sous-unité β (173, 174). Les queues cytoplasmiques des deux sous-unités s'associent entre elles et aussi avec d'autres protéines dont la présence influence grandement le maintien de l'état d'activation de la GPIIb/IIIa et son recrutement aux sites d'adhésion focaux. Au sein de la séquence cytoplasmique des sous-unités α , un motif semble étroitement conservé soit

la séquence GFFKR. Cependant, les séquences retrouvées dans la queue cytoplasmique des sous-unités β sont très variables suggérant que la composition d'hétérodimères des intégrines influence la nature des associations entre leurs domaines intracellulaires (175).

Faisant suite à la signalisation « intérieur extérieur » (inside-out), la GPIIb/IIIa, une fois active et en liant le fibrinogène, transmet des signaux vers l'intérieur de la plaquette. Ce type de signalisation est nommé « extérieur- intérieur » (outside-in). La liaison du fibrinogène à la GPIIb/IIIa induit l'apparition de sites de liaison dépendants de la présence du ligand (Ligand-Induced Binding Sites, LIBS). La nature de signaux transmis par la liaison du fibrinogène à la GPIIb/IIIa consiste en : 1) des cascades de phosphorylations des résidus tyrosines, 2) un réarrangement au niveau cytosquelettique, 3) une élévation en calcium intracellulaire, 4) une alcalinisation du cytoplasme, 5) l'hydrolyse de certains lipides membranaires, 6) une influence sur le métabolisme de phosphoinositides et 7) la stimulation des kinases de résidus sérines et thréonines comme la PKC (176). Ces signaux induits par la GPIIb/IIIa jouent un rôle important dans la sécrétion, l'activité pro-coagulante, la réorganisation du cytosquelette, la rétraction des caillots de fibrine et dans le processus d'agrégation irréversible (51).

Un domaine de grand intérêt est le développement d'antagonistes de la GPIIb/IIIa à des fins thérapeutiques et anti-thrombotiques (122). Au nombre de substances/médicaments développés, nous retrouvons un anticorps monoclonal murin bloquant la liaison du fibrinogène à la GPIIb/IIIa (Abciximab, Réopro), des peptides se basant sur la séquence RGDS comme l'Eptifibatide (Integrilin) et le tirofiban (Aggrastat) qui sont reconnus par la GPIIb/IIIa dans la séquence de son ligand (50). Ces antagonistes

sont présentement utilisés cliniquement chez les patients subissant des procédures de revascularisation par angioplastie ou l'implantation de stents endovasculaires (177, 178).

Récemment, deux études pointent l'importance de la P-sélectine dans le processus de l'agrégation plaquettaire. En effet, ces études démontrent que la P-sélectine permettra d'augmenter la stabilité des agrégats plaquettaires et par le fait même mener à des agrégats plaquettaires plus importants sous conditions de flot (179, 180). Cette participation de la P-sélectine sous-entend la présence d'un ligand pour cette dernière à la surface des plaquettes, ligand qui pourrait être le complexe GPIb-IX-V (181) ou encore le PSGL-1 (182). Les neutrophiles participent aussi à l'augmentation de la réponse des plaquettes lors de l'agrégation car la liaison de la P-sélectine au PSGL-1 accroît la sécrétion de la TXA₂ (183). Par ailleurs, la découverte des microparticules (MP) dérivées des plaquettes (174, 184-186) apportera un nouveau contributeur dans le phénomène de l'agrégation plaquettaire. Ces microparticules, ne mesurant guère plus de 0.1µm de diamètre, sont des fragments de membranes des plaquettes qui contiennent les récepteurs adhésifs GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V et P-sélectine. La production locale de microparticules par les plaquettes lors de l'agrégation peut renforcer la stabilité du thrombus formé.

Finalement, il faut mentionner que certaines MMPs exercent des effets directs sur l'agrégation plaquettaire. Ces effets se résument principalement par des effets pro- et anti-agrégants. L'étude des rôles et des effets des MMPs sur l'agrégation plaquettaire sera détaillée dans le chapitre 3.

Chapitre II

Les neutrophiles

2.1 Origine et structure des neutrophiles

Dérivant des lignées myéloïdes, les neutrophiles sont des leucocytes polymorphonucléaires représentant entre 60% et 70% des globules blancs totaux (soit environ 2500 à 7500 cellules par millimètre cube). Les neutrophiles possèdent un diamètre allant de 10 à 14 μm et une durée de vie d'environ six heures (en circulation) à quelques jours (dans les tissus) (187).

Les neutrophiles se définissent comme étant des cellules ne se divisant plus et résultantes de la différenciation terminale leucocytaire. Les neutrophiles comportent de nombreux granules jouant un rôle essentiel dans la destruction et la dégradation des microorganismes cibles. Ces granules sont catégorisés en trois groupes, soient les granules azurophiles, les granules spécifiques et les granules tertiaires. Les granules azurophiles contiennent des hydrolases à pouvoir antibactérien, des défensines, des peptides microbicides, des myéloperoxidases et des enzymes oxydatives. Les granules spécifiques, quant à eux, comportent entre autres, de l'apolactoferrine, des collagénases et une enzyme inconnue clivant la protéine du complément C5 (relâchant ainsi le C5a), alors que leur membrane recèle de protéines de la matrice extracellulaire ainsi que du cytochrome b_{558} . Enfin, les granules tertiaires renferment du gélatinase B, et leur membrane comporte le complexe CD11/CD18 essentiel à l'adhésion cellulaire (188).

Les neutrophiles possèdent un noyau de structure vestigiale ne pouvant plus répliquer son ADN. Leur membrane plasmique contient des molécules complexes reliées

à la destruction des microorganismes, des senseurs localisant ces microorganismes et auxquels les neutrophiles répondent, ainsi que des molécules d'adhésion. Le cytosquelette des neutrophiles consiste en un système complexe de microfilaments et de microtubules (189) lequel étant responsable du mouvement ordonné des neutrophiles et faisant de ce type cellulaire l'un des plus mobiles chez les mammifères (190).

2.2 Molécules d'adhésion neutrophilique

2.2.1 Les intégrines

La famille des intégrines leucocytaires comprend trois glycoprotéines hétérodimériques α/β partageant une sous-unité β_2 commune nommée CD18. Exprimées exclusivement à la surface des leucocytes, ces trois β_2 -intégrines diffèrent structurellement l'une de l'autre par leur sous-unité α (CD11), les classifiant ainsi sous l'appellation $\alpha_L\beta_2$ (également connu sous les noms LFA-1 ou CD11a/CD18), $\alpha_M\beta_2$ (aussi nommé MAC-1, CR3 ou CD11b/CD18) et $\alpha_X\beta_2$ (p150/95 ou CD11c/CD18). Étant toutes indépendantes de la présence de la séquence aminée RGD, les trois molécules d'adhésion du complexe CD11/CD18 s'associent cependant à des ligands différents, bien que certains leurs soient communs malgré tout (191, 192). Les ligands des β_2 -intégrines incluent les protéines de la famille des immunoglobulines ICAM (molécules d'adhésion intracellulaire) exprimées par les cellules endothéliales (ICAM-1 pour CD11a/CD18 et CD11b/CD18; ICAM-2 pour CD11a/CD18; et ICAM-3 pour CD11a/CD18) aussi bien que les protéines solubles. L'adhésion des neutrophiles à l'endothélium dépend principalement des intégrines CD11a/CD18 et CD11b/CD18 alors que CD11c/CD18 n'a qu'un rôle mineur (193-198). Le ligand ICAM-1 est bien caractérisé mais très peu est

connu sur ICAM-2 et ICAM-3, les deux autres ligands de CD11a. Toutefois, il a été affirmé que ICAM-2 agit comme ligand pour les cellules non stimulées alors que ICAM-1 prédomine après l'activation, amenant une interaction de plus grande avidité (199).

L'intégrine CD11a/CD18 est exprimée de façon constitutive et se retrouve globalement sur tous les types leucocytaires, faisant de cette dernière la plus uniformément répandue du complexe CD11/CD18. Reconnaisant principalement des molécules d'adhésion ICAM-1 et ICAM-2, le CD11a/CD18 acquiert une forme active pouvant lier ses ligands uniquement suite à la phosphorylation de sa sous-unité β , phénomène contrôlé par le domaine cytoplasmique de cette même sous-unité et ne se produisant que lors de l'activation des neutrophiles (191, 192).

Le complexe CD11b/CD18, quant à lui, dénote une présence leucocytaire beaucoup moins générale que le CD11a/CD18; il n'est exprimé que par les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les cellules NK (191). Participant actif aux divers phénomènes biologiques leucocytaires tels que l'adhésion et la transmigration à travers l'endothélium, le chimiotactisme, l'agrégation, l'adhésion et la phagocytose des cellules opsonisées, le CD11b/CD18 est exprimé constitutivement sous une forme inactive à la surface des neutrophiles en circulation. Suite à l'activation cellulaire sous l'effet de différents agonistes, cette molécule d'adhésion subit un changement conformationnel lui permettant de jouer un rôle primordial dans le recrutement et l'extravasation des neutrophiles vers les sites inflammatoires puisqu'elle est responsable de l'adhésion ferme des neutrophiles aux surfaces endothéliales après le roulement (193, 200). Cette interaction se produit principalement via l'immunoglobuline ICAM-1 exprimée sur la surface des cellules endothéliales en réponse aux cytokines pro-inflammatoires (201).

Cependant, le complexe CD11b/CD18 peut également lier le fibrinogène, le facteur de coagulation Xa, l'opsonine majeure du sérum nommée iC3b. Ces liaisons activent la cascade de coagulation et favorise la déposition de fibrine aux sites de lésions endothéliales, le recrutement, l'activation et l'extravasation des leucocytes vers des sites inflammatoires ainsi que le rejet des greffes (200-204). La liaison du CD11b/CD18 à ICAM-1 semble être distincte du site de liaison de CD11a/CD18. En effet, le CD11b/CD18 se lie au troisième domaine Ig d'ICAM-1 par une liaison de moindre affinité que celle du CD11a/CD18. La liaison CD11b/CD18 à ICAM-1 peut cependant être modulée in vivo par la glycosylation du récepteur (194). Le complexe CD11b/CD18 peut également être activé par d'autres médiateurs. En effet, une régulation à la hausse de ce complexe sans changement de densité de surface a été observée lors de l'activation cellulaire par l'ADP et l'ATP (205), le PAF, le roulement sur la E-sélectine d'un endothélium activé (206) et le leukotriène B4 (LTB4) (207). Un mécanisme commun à ces agonistes pourrait être l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. La liaison d'un cation divalent (Ca^{2+} , Mg^{2+}) à un domaine Ig du récepteur pourrait également induire le changement de conformation impliqué dans l'activation du CD11b/CD18 (208).

Le complexe CD11b/CD18 peut également se lier au fibrinogène via le site protéolytique D de ce dernier. Ce fragment ne contient pas la séquence RGD qui est nécessaire à la liaison du fibrinogène avec le GPIIb/IIIa. Cette interaction pourrait être importante lors de l'adhésion ferme des leucocytes aux plaquettes ou au fibrinogène inclus dans un thrombus et contribuer à sa formation (209). Des réserves intracellulaires de CD11b/CD18 sont également disponibles chez les granulocytes au sein de leurs granules spécifiques et tertiaires et dans les vésicules intracellulaires des monocytes. Ces

granules sont rapidement translocées et se retrouvent sous une conformation active à la surface membranaire suivant l'activation cellulaire (177, 191, 192). Néanmoins, une augmentation de l'expression en surface de CD11b/CD18 n'est pas nécessaire pour l'adhérence des neutrophiles stimulés à l'endothélium in vitro (210). Toutefois, des études ont montré que les récepteurs CD11b/CD18 nouvellement immobilisés jouent un rôle important dans les fonctions subséquentes dépendantes de l'adhérence (211).

À l'instar de CD11b/CD18, le CD11c/CD18 est exprimé également par les monocytes et par les cellules dérivant de lignées myéloïdes, mais démontre une abondance accrue au niveau des macrophages présents dans les tissus (191). S'associant principalement avec le fibrinogène, son ligand principal, l'intégrine CD11c/CD18 possède également une affinité particulière pour la molécule du complément iC3b (191).

Les changements qualitatifs dans l'affinité des récepteurs d'adhésion jouent un rôle critique dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium ou aux composantes des matrices (193). Les récepteurs d'intégrines sur les leucocytes circulants sont normalement dans un état inactif ou de faible affinité soit qu'ils ne se lient pas ou presque à leurs ligands endothéliaux. Avec une activation appropriée des leucocytes, les récepteurs d'intégrines sont transformés en un état actif, lequel permet leur liaison avec grande affinité à un ligand en surface. Des études ont montré que la modulation de l'affinité des récepteurs des leucocytes peut être déclenchée par une variété de mécanismes en partant de liaison des ligands aux récepteurs de la membrane jusqu'aux liaisons croisées d'autres molécules de surface. La capacité du récepteur intégrine de passer rapidement d'un état de basse affinité à un état de haute affinité permet aux leucocytes de circuler librement, mais par la suite ils adhèrent fermement aux sites

d'inflammation. De plus, il est tout aussi important pour les leucocytes de moduler les récepteurs intégrines de l'état de basse à haute affinité que de "geler" les récepteurs dans un état de haute affinité ce qui prévient la migration (74, 102).

2.2.2 La L-sélectine

La L-sélectine, la première sélectine à être étudiée, fut découverte à l'aide d'un anticorps (MEL-14) dirigé contre un lymphome murin (218). Contrairement aux deux autres sélectines (P- et E-sélectine), La L-sélectine est exprimée de manière constitutive à la surface de neutrophiles, les monocytes, les cellules NK, ainsi que sur la plupart de lymphocytes B et T. Sur le plan structural, la L-sélectine est constituée de 385 acides aminés et de mêmes domaines que la P-sélectine, mais ne possède que deux répétitions de régions consensus de courte longueur (Short Consensus Regions, SCR), faisant de la L-sélectine la plus courte de sélectines. Son poids moléculaire diffère d'une population leucocytaire à l'autre : 75 kDa pour les lymphocytes, 95 kDa pour les lymphocytes, 95 à 105 kDa pour les neutrophiles et 110 kDa pour les monocytes. Ces différences seraient dues à des modifications post-transcriptionnelles de glycosylations spécifiques aux lignées leucocytaires (5).

Suite à une stimulation par différents agonistes (cytokines, phorbol ester, fMLP, C5a et autres), la teneur membranaire en L-sélectine chute rapidement (« shedding ») (219, 220). Cette baisse ou régulation inverse, s'explique par le clivage de la L-sélectine par une protéase en un site localisé juste au-delà de la membrane dans le domaine extracellulaire. L'intérêt physiologique de ce phénomène inverse demeure encore aujourd'hui inconnu, mais suggère cependant que l'activité de cette sélectine semble être

contrôlée principalement par la régulation de son apparition et de sa disparition de la surface cellulaire. De là, il est possible d'associer à ce mécanisme physiologique, un rôle de régulation inverse de l'adhésion suivant un attachement leucocytaire ferme à l'endothélium. En plus de clivage membranaire, des changements conformationnels pourraient également aider à la régulation de diverses fonctions de la L-sélectine. Des études ont d'ailleurs démontré que l'activation des neutrophiles et des lymphocytes résulte directement en un accroissement rapide et momentané de l'activité de la L-sélectine, le tout ayant lieu quelques minutes avant le clivage (5, 191,192, 218-221).

Principalement responsable des liaisons leucocytaires au niveau des veinules de nodules lymphatiques à haute teneur en cellules endothéliales (LNHEV) et des cellules endothéliales activées, la L-sélectine possède une affinité pour de nombreux ligands, dont la nature d'une grande majorité d'entre eux demeure encore indéterminée. Ainsi, les ligands connus de la L-sélectine sont : GlyCAM-1, une molécule sécrétée par les cellules LNHEV; une glycoprotéine s'appartenant au CD34 et exprimée, chez l'humain, autant par les cellules LNHEV que par les cellules endothéliales; la P- et E-sélectine; le PSGL-1 et finalement, des protéines O-glycosylées différentes de PSGL-1 (5).

2.2.3 Le PSGL-1

Le PSGL-1 est le ligand de haute affinité pour la P-sélectine et se retrouve exprimé constitutivement par les leucocytes. Son nombre est évalué entre 10 et 20 milles molécules de PSGL-1 par neutrophile, ce qui représente une infime portion du contenu protéique de la membrane plasmique, soit moins de 0.01% du total des protéines neutrophiliques (216-218). Cette glycoprotéine homodimérique de la famille des

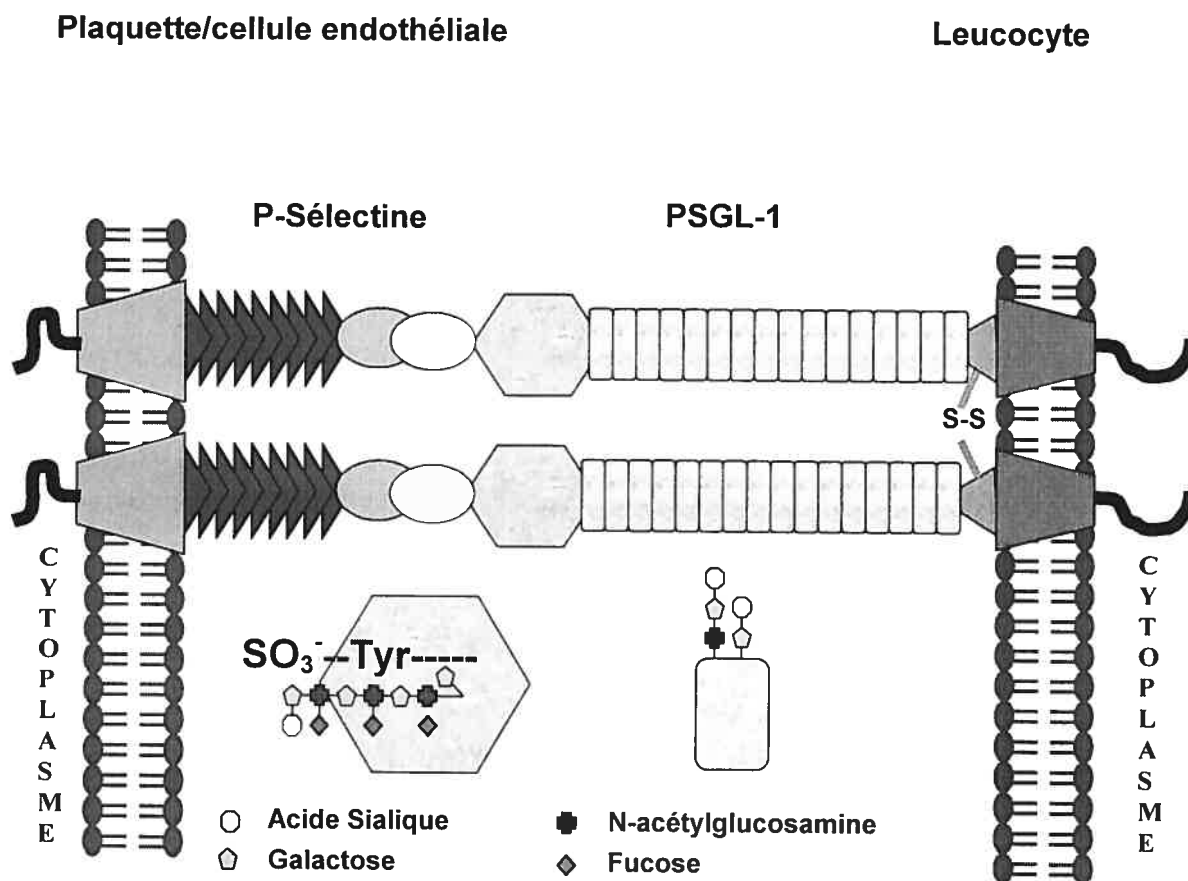
sialomucines est constituée de deux chaînes de 120 kDa reliées de manière covalente par un pont disulfure entre les Cys³²⁰ (figure 9) (197, 200-202).

L'interaction avec la P-sélectine ne nécessite pas nécessairement la dimérisation du PSGL-1 (228) car même sous forme monomérique, le PSGL-1 est en mesure d'interagir avec la P-sélectine. Cependant, la forme dimérique du PSGL-1 permet de stabiliser les interactions avec la P-sélectine sous conditions de flot (229). Le PSGL-1 est fortement O-glycosylé et doit subir deux modifications post-traductionnelles afin de pouvoir être reconnu par la P-sélectine : 1) des $\alpha(1,3)$ fucosylations et 2) des $\alpha(2,3)$ sialylations.

Le gène encodant le PSGL-1 est localisé sur le chromosome 12 en q24 et c'est l'exon 2 qui est traduit en protéine. Le PSGL-1 humain présente une structure primaire de 412 acides aminés riche en résidus prolines, sérines et thréonines (230). Il possède 3 sites de N-glycosylation dans son domaine extracellulaire et comprend 15 séquences consensus répétées lui permettant de faire saillie à la surface de la cellule. Aux nombreuses sérines et thréonines retrouvées des régions consensus, se trouvent des branches de polylactosamine contenant du fucose et des acides sialiques dont la majorité présente un groupement sialyl Lewis X (sLe^X) à leur extrémité (226, 231, 232). Concernant les modifications biochimiques subies par le PSGL-1 et le rendant apte à lier la P-sélectine, il apparaît que la sulfatation des résidus tyrosine augmente l'affinité du PSGL-1 pour la P-sélectine (233-236). Les trois sites potentiels de sulfatation de tyrosine (résidus 46, 48, 51) se trouvent proches de l'extrémité NH₂-terminale du domaine extracellulaire. Le PSGL-1 est la cible de deux protéases : 1) BACE1 qui clive le PSGL-1

dans un lien Leu-Ser au niveau du domaine juxtamembranaire (237) et PACE qui reconnaît la séquence Arg-Asp-Arg-Arg (238).

Figure 9 : Liaison entre la P-sélectine et le PSGL-1



En plus de son rôle de premier ordre au niveau de la liaison des plaquettes aux neutrophiles, le PSGL-1 assure également une fonction de signalisation intracellulaire. Ainsi, suite à son association à la P-sélectine, diverses voies de signalisation intracellulaires s'enclenchent au sein du cytoplasme des neutrophiles, ceci menant, entre autres, à l'activation cellulaire ainsi qu'à la redistribution du PSGL-1 à la surface membranaire sous forme de groupements concentrés (PSGL-1 clustering). Ce

regroupement en amas de PSGL-1, imputable à la cascade des MAP kinases et à l'action des GTPases RAS, entraîne rapidement une diminution de son affinité pour la P-sélectine exprimée par les plaquettes activées et donc, servira en quelque sorte de mécanisme de régulation négative (188, 230).

2.3 Fonction des neutrophiles

Les granulocytes neutrophiles sont des cellules spécialisées dans la défense de l'organisme contre les agressions extérieures. Ils ont un grand pouvoir de phagocytose et englobent des microorganismes, des débris cellulaires et des particules de façon non spécifique et cette activité peut être accrue et dirigée par des phénomènes de réponse immunitaire. En plus de leur fonction immunitaire comme première ligne de défense de l'organisme, les neutrophiles sont les principales cellules impliquées dans l'inflammation aiguë et chronique lors d'une atteinte tissulaire; ils sont très mobiles et migrent hors des petits vaisseaux vers les foyers inflammatoires où ils accomplissent de manière active la phagocytose. Par ailleurs, les neutrophiles en association avec d'autres cellules de la lignée hématopoïétique, en particulier les plaquettes, participent activement dans la pathologie de certains désordres vasculaires, une coopération qui intrigue de partout la communauté scientifique.

2.3.1 Adhésion neutrophilique à l'endothélium

Les neutrophiles peuvent être recrutés aux sites d'inflammation selon des mécanismes médiés essentiellement par leurs récepteurs adhésifs. En effet, les cellules endothéliales intactes et activées expriment à leur surface des ligands pour les leucocytes.

Étant donné que les neutrophiles sont des cellules non ciliées, ils ne peuvent pas « nager » jusqu'à la paroi du vaisseau sanguin en réponse à des stimuli chimiotactiques extravasculaires. Le contact initial avec la paroi du vaisseau est donc largement un phénomène du hasard, probablement augmenté par des altérations locales dans les caractéristiques du flux sanguin. Après le contact initial, certains leucocytes particulièrement des neutrophiles, « roulent » le long de la paroi du vaisseau adjacent. Ce phénomène de roulement leucocytaire « rolling » peut être défini comme une interaction adhésive de faible affinité entre les leucocytes et l'endothélium où la force du flux sanguin agit sur les leucocytes pour induire un mouvement rationnel (239).

Le phénomène de « rolling » constitue la première étape de l'adhésion neutrophilique à l'endothélium, suivie par la transmigration ou diapédèse. Il met à large contribution les sélectines et leurs ligands. Outre les composés sialylés, se rajoutent la P- et la E-sélectine après stimulation de l'endothélium (240-251).

L'implication de la L-sélectine fut démontrée par plusieurs traitements affectant soit la fonction adhésive, soit la teneur membranaire de la L-sélectine. Les observations dénotent une diminution de l'adhésion des neutrophiles et des monocytes à un endothélium activé par les cytokines (241-246). D'autres études sont conduites avec des anticorps monoclonaux bloquant les interactions P-sélectine et E-sélectine avec leurs ligands. Les résultats qui en découlent démontrent que la P-sélectine supporte le roulement des neutrophiles en liant son récepteur, le PSGL-1 à la surface des neutrophiles (240) tandis que la E-sélectine ne semble pas être impliquée au niveau de la phase première de capture des neutrophiles (« rolling »), mais reste importante quant au processus tardif de recrutement des neutrophiles aux sites d'inflammation (250).

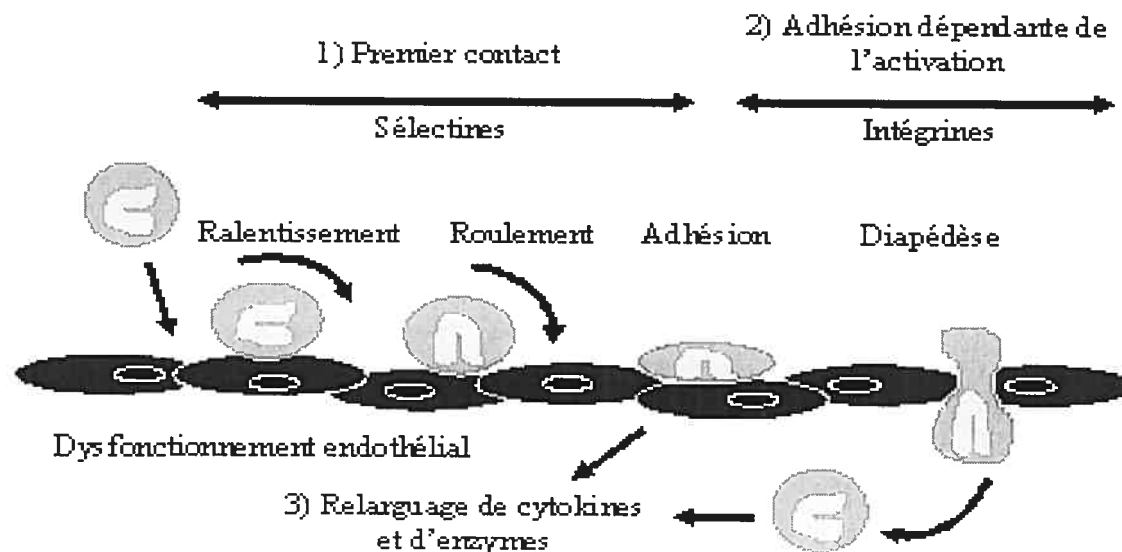
La première étape du recrutement des neutrophiles est suivie d'une seconde étape soit l'adhésion ferme, qui est médiée par les intégrines et mène à la diapédèse ou extravasation. Alors que la L-sélectine est engagée dans le processus de roulement, les neutrophiles seront activés de différentes façons ce qui entraînera une activation des complexes CD11/CD18 par un changement de conformation et une augmentation de la concentration membranaire de ces complexes. Les cellules endothéliales en présence de cytokines, vont sécréter plusieurs substances chimiotactiques pour les neutrophiles (IL-8, PAF) qui peuvent restées liées à la membrane des cellules endothéliales (252). L'IL-8 et le PAF, une fois attachés à la membrane des cellules endothéliales, vont être rapidement liés par les neutrophiles en phase de roulement (247,248) et entraîner l'activation des β_2 -intégrines qui interagissent avec les immunoglobulines à la surface des cellules endothéliales pour transformer la phase de roulement en adhésion ferme (252,255). Cette interaction des CD11b/CD18 avec ICAM-1 pourrait engendrer une rétroaction positive et favoriser davantage l'adhésion des neutrophiles. Plusieurs études ont mis en évidence la participation de la L-sélectine dans le processus d'activation des neutrophiles et son implication directe dans l'adhésion via les complexes CD11/CD18 (256-259). Ceci marque l'importance de la synergie qui existe entre l'engagement de la L-sélectine et ses propriétés adhésives avec l'activation des β_2 -intégrines et l'adhésion ferme des neutrophiles menant à la diapédèse (260). Par ailleurs, il fut démontré dans des études fonctionnelles avec des lignées cellulaires lymphatiques l'existence d'un mécanisme d'adhésion leucocytaire à l'endothélium qui est indépendante de la voie des β_2 -intégrines et de l'ICAM-1 (212). Ce mécanisme met en jeu l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ de la famille des β_1 -intégrines. Ces molécules font partie d'un groupe nommé VLA (antigènes exprimés

tardivement ou very late antigens) (213). Parmi celles-ci, seule l' $\alpha_4\beta_1$ est exprimée de façon importante sur les cellules de la lignée hématopoïétique. Quoiqu'elle ne soit pas présente sur les neutrophiles, l' $\alpha_4\beta_1$ permet des interactions entre les autres leucocytes (lymphocytes B et T, éosinophiles, macrophages) et la matrice extracellulaire. Elle permet aussi d'autres interactions cellulaires (214). En effet, il semblerait que le rôle principal de l' $\alpha_4\beta_1$ est la migration des cellules T vers les sites inflammatoires. L'expression de la sous-unité α_4 à la surface de ces cellules lors de leur activation est fortement augmentée et promeut l'extravasation α (215). Le rôle de cette molécule a également été décrit dans la recirculation des cellules T (216). Les interactions qui entrent en jeu lors de ces processus sont des liaisons avec la molécule d'adhésion endothéliale VCAM-1 (molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1) et avec une protéine de la matrice sous-endothéliale, la fibronectine. Le VCAM-1 est une molécule du type immunoglobuline et la liaison avec l' $\alpha_4\beta_1$ se fait suite à son activation par IL-2, TNF- α , ou IL-4 (217).

Les neutrophiles sont aussi en mesure d'adhérer fermement à des plaquettes aux sites vasculaires endommagés. Cette interaction des neutrophiles circulants avec des plaquettes immobilisées repose sur les sélectines pour la phase de roulement, mais ce sont les intégrines qui stabilisent ces interactions. Ceci est possible parce que le CD11b/CD18 subit une série d'activation et de désactivation (changements de conformation) qui permettent aux neutrophiles de rouler sur les plaquettes pendant que des nouvelles molécules de CD11b/CD18 sont dirigées vers la surface. Les complexes CD11b/CD18 présents à la surface sont responsables de la transition du roulement à l'adhésion, tandis

que les complexes issus des réserves intracellulaires ou de synthèse *de novo*, participent à la stabilisation de l'adhésion (261).

Figure 10 : Recrutement et adhésion des neutrophiles



2.3.2 Interactions plaquettes- neutrophiles

Bien que la liaison des plaquettes aux neutrophiles fut observée depuis bien longtemps (262), l'adhésion et la coopération entre ces deux types cellulaires demeurent un important champ d'investigations. Cependant, plusieurs études soulignent l'importance des interactions plaquettes-neutrophiles dans les processus thrombo-inflammatoires. La détection de plaquettes liées aux neutrophiles et aux monocytes circulants, phénomène appelé communément formation de conjugués, rosette ou encore satellitisme, fut mise en évidence suite à la procédure d'angioplastie (263). On a

remarqué également que les patients souffrant d'athérosclérose coronarienne ont des agrégats plaquettes-leucocytes circulants (264). L'importance de ces interactions a également été démontrée lors de la thrombose (2, 265), de l'ischémie-reperfusion au cours de l'angine instable et des maladies coronariennes stables, dans la thrombocytopenie, de même que lors de l'hémodialyse (264, 266-272). Aussi, diverses autres études ont démontré que les plaquettes attirent les leucocytes au site endothélial endommagé afin de promouvoir l'inflammation et l'athérogénèse. Réciproquement, l'adhésion neutrophilique à l'endothélium dysfonctionnel conduit également à l'adhésion plaquettaire et à la formation locale d'un thrombus (190).

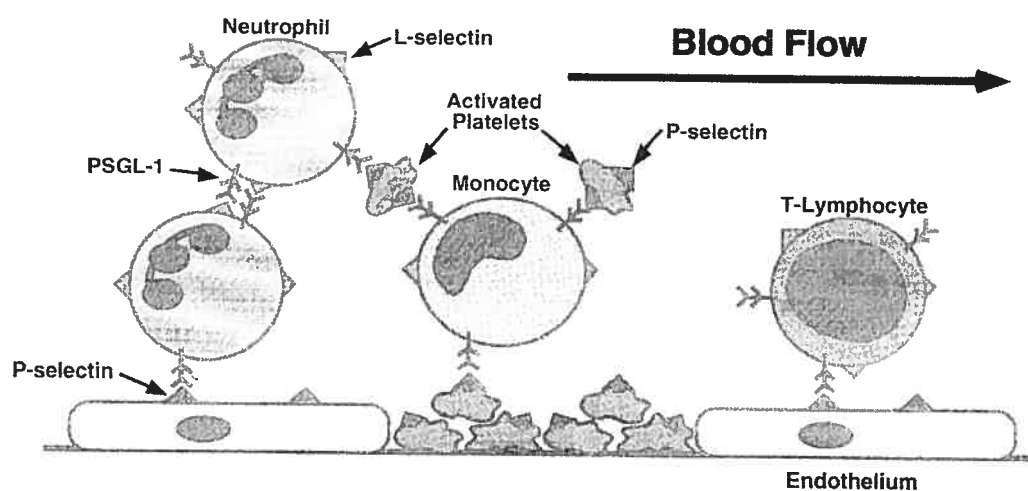
Dans leur état inactivé, les plaquettes lient très faiblement les neutrophiles; environ 15% des neutrophiles présentent des plaquettes à leur surface, tandis que lorsque les plaquettes sont stimulées à la thrombine, cette proportion grimpe à 60% et même plus (275). Ceci dénotant bien le caractère dépendant de l'activation plaquettaire dans les interactions plaquettes-neutrophiles. Rapidement, l'implication de la liaison de la P-sélectine au PSGL-1 dans l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles fut démontrée. En effet, l'adhésion d'une plaquette activée à un neutrophile se réalise tout d'abord grâce à une interaction de forte affinité entre la P-sélectine et le PSGL-1. Cette association, quoique peu résistante aux forces de cisaillement, représente le premier contact s'effectuant entre les deux types cellulaires (188). L'importance de cette interaction dépasse largement la simple adhésion par le fait qu'elle facilite la modulation des activités cellulaires des plaquettes et des neutrophiles et favorise la coopération et l'échange biochimique, ainsi que la génération d'une série de signaux intracellulaires conduisant à la sécrétion d'une gamme de substances vasoactives incluant des

leukotriènes, des radicaux libres, des cytokines, des facteurs de croissance et de coagulation et des métalloprotéinases (8-16). D'autre part, des travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré que l'utilisation du rPSGL-Ig, une forme recombinante et soluble du PSGL-1, inhibe l'adhésion plaquettaire aux leucocytes et réduit la resténose (28). D'une façon intéressante, dans cette même étude on a observé un remodelage positif des artères après une double angioplastie chez les porcs. La liaison des plaquettes aux neutrophiles est, entre autres, régulée par le NO et les MMPs. En fait, la liaison des plaquettes aux neutrophiles dépendante de la P-sélectine entraîne une augmentation de l'activation des MMPs (274). Cette étude avance aussi que lorsque le ratio plaquettes/neutrophiles est élevé (60:1-100:1); les neutrophiles facilitent l'agrégation plaquettaire, mais que lorsque le ratio diminue (5:1); les neutrophiles inhibent l'agrégation des plaquettes. Ceci peut s'expliquer par le fait que les radicaux libres produits par les plaquettes parviennent à inactiver le NO sécrété par les neutrophiles lorsqu'ils sont peu nombreux mais quand leur nombre augmente, les radicaux libres ne parviennent plus à neutraliser le NO issu des neutrophiles. Notons ici qu'il s'agit du NO généré par iNOS (synthase du monoxyde d'azote inductible) qui, contrairement à son isoforme le cNOS (synthase du monoxyde d'azote constitutive) que l'on retrouve dans certaines cellules (cellules endothéliales, plaquettes, neurones) n'est pas présente dans les cellules non activées mais doit être exprimée suite à la stimulation. Ces résultats ont été confirmés, en partie, par une étude très récente menée dans notre laboratoire qui démontre que l'activation et la liaison des plaquettes aux neutrophiles, via P-sélectine et PSGL-1, augmente la production des MMP-2 par les plaquettes et favorise l'agrégation plaquette-neutrophile (article en cours de publication). Devant l'importance grandissante

des interactions adhésives entre les plaquettes et les leucocytes, il apparaît que ces interactions seront un meilleur marqueur de l'activation plaquettaire que de l'expression de la P-sélectine (275).

Les interactions adhésives entre les plaquettes et les neutrophiles sont sans doute au cœur des événements thrombotiques et inflammatoires (2), par influence mutuelle de leur métabolisme intracellulaire et par la création d'un espace privilégié entre elles, ayant pour conséquence une réponse accrue et des effets délétères plus prononcés (190).

Figure 11 : Interactions Sélectines-PSGL-1 dans la lésion vasculaire



2.3.3 Agrégation des neutrophiles

Plusieurs observations cliniques et expérimentales montrent que les neutrophiles peuvent agréger suite à l'activation. Par exemple, des neutrophiles ayant déjà adhérents à l'endothélium dysfonctionnel peuvent aussi permettre le roulement et le recrutement d'autres neutrophiles par un phénomène nommé attachement secondaire « secondary tethering ». Les neutrophiles sont recrutés selon le même principe que celui décrit pour

les plaquettes, sauf que le mécanisme impliqué dépend seulement des interactions entre la L-sélectine des neutrophiles en mouvement et le PSGL-1 des neutrophiles attachés à la surface endothéliale (276, 277).

Une conséquence directe du recrutement de neutrophiles par d'autres neutrophiles sera de former un agrégat de neutrophiles et de causer l'obstruction de capillaires (278). Des traitements qui modifient la cinétique du « shedding » de la L-sélectine sont en mesure d'inhiber l'agrégation des neutrophiles, laissant prévoir un rôle pour la L-sélectine (279, 280). De plus, l'implication des interactions entre la L-sélectine et le PSGL-1 fut démontrée dans l'agrégation des neutrophiles (281, 282). Cette interaction L-sélectine/PSGL-1 serait la première étape de l'agrégation des neutrophiles et serait suivi d'une phase de consolidation des liens neutrophiles-neutrophiles par l'intermédiaire des β_2 -intégrines. D'autre part, les leucocytes participent activement aux réponses thrombotiques; la présence des leucocytes dans les thrombus est claire mais le mécanisme par lequel les leucocytes s'y retrouvent recrutés n'est pas certain : les leucocytes sont-ils simplement emprisonnés par les fibres de fibrine ou ils interagissent avec des molécules d'adhésion plaquettaire ? Cependant, les interactions des neutrophiles avec les plaquettes et leur co-localisation aux sites de lésion sont tellement évidentes (261) qu'il s'avère trop difficile de séparer l'agrégation des neutrophiles de celle des plaquettes. De plus, une étude réalisée par Palabrica et coll (283) a démontré que l'accumulation des leucocytes dans un thrombus formé est inhibée par des anticorps dirigés contre la P-sélectine, ce qui laisse entrevoir une connexion possible entre les sélectines, le PSGL-1 et les intégrines dans l'agrégation des neutrophiles (39, 284).

Chapitre III

Les métalloprotéinases

3.1 Structure et fonction des métalloprotéinases

Les métalloprotéinases (MMPs) constituent une famille d'endopeptidases dépendantes de l'ion Zinc (Zn^{2+}), capables de cliver certains composants de la matrice extracellulaire (285, 286). Cette propriété de modifier l'intégrité structurale des tissus est essentielle dans certains aspects de la physiologie normale, tel que le développement embryonnaire, la migration cellulaire, la cicatrisation, la résorption tissulaire (287) et l'immunité (288). La modification des intégrines membranaires et l'activation de certaines cascades de signalisation par les MMPs contribuent également à réguler la fonction plaquettaire, l'activation leucocytaire et la réactivité vasculaire (287, 271-291). Cependant, une dérégulation dans l'activation ou l'expression des MMPs, peut résulter en des états pathologiques comme l'infarctus du myocarde (292), le remodelage cardiaque et vasculaire, la dissémination hématologique du cancer et certains aspects de l'arthrite rhumatoïde (287,293). Récemment, un grand nombre d'investigations a confirmé l'implication des MMPs dans la rupture de la plaque athéromateuse et les syndromes coronariens aigus subséquents (287).

Des membres de cette famille ont été caractérisés pour la première fois par Gross et Lapière en 1962, au cours d'une étude sur le phénomène de la métamorphose chez le têtard. Ils avaient démontré que la peau de la queue résorbée de têtard, mise en culture sur des gels de collagène, sécrétait une enzyme qui dégradait la triple hélice de collagène

(294). Depuis ce temps, plus de 66 MMPs (dont 20 MMPs humains) ont été clonées et séquencées. Les MMPs se trouvent chez la plupart des organismes vivants, incluant la plus simple bactérie, suggérant que certaines MMPs primordiales ont dû évoluer depuis plus de 3,5 billions d'années (295, 296).

Les MMPs peuvent être classées sous les groupes suivants :

1 - les collagénases : MMP-1, MMP-8 et MMP-13

2 - les gélatinases : MMP-2 et MMP-9

3 - les stromélysines : MMP-3, MMP-10 et MMP-11

4 - les matrilysines : MMP-7

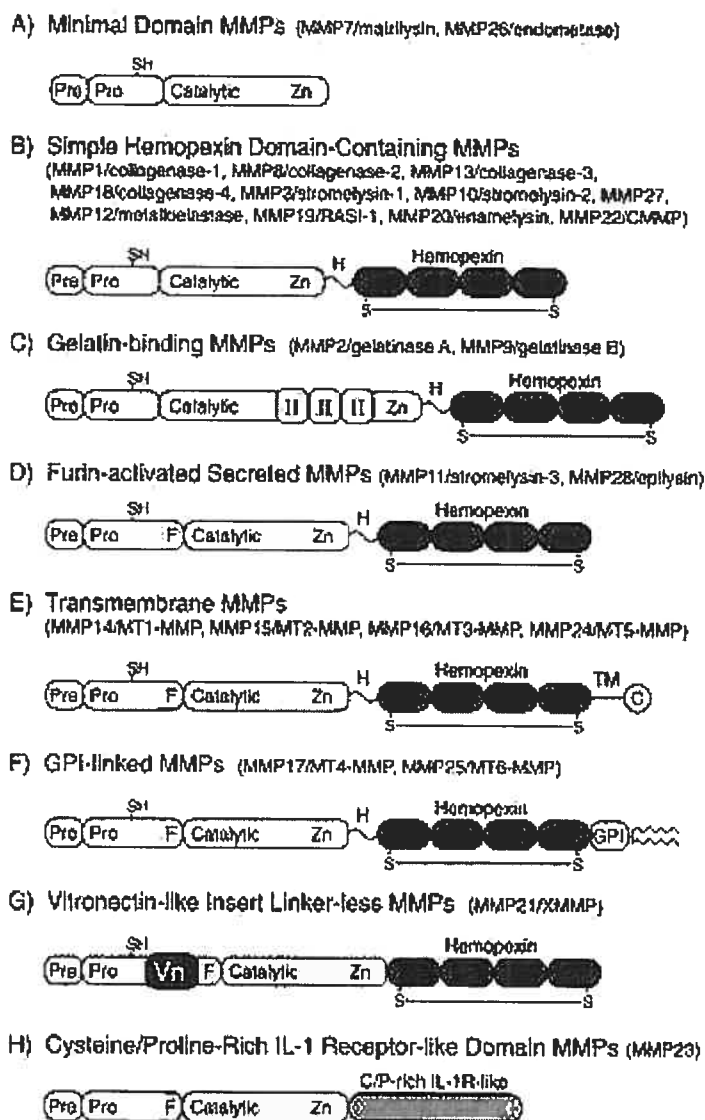
5 - les métalloélastases : MMP-12

6 - les MT-MMPs (Membrane-type-Matrix Metalloproteinases) : MT-MMP1

(MMP-14), MT-MMP2 (MMP-15), MT-MMP3 (MMP-16), MT-MMP4 (MMP-17).

De point de vue structure, les MMPs sont composées de trois domaines principaux (figure 12) : 1) en NH₂-terminal, un pro-peptide qui est clivé lors de l'activation de l'enzyme et qui grâce à une cystéine libre « cysteine switch » interagirait avec le site de fixation de l'ion Zn²⁺, empêchant l'activation de l'enzyme (297), 2) un domaine catalytique contenant des séquences de liaison pour l'ion Zn²⁺ et l'ion Ca²⁺, qui participe à la protéolyse des substrats, à l'auto-activation de la métalloprotéinase et à l'interaction avec leurs inhibiteurs spécifiques, les TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases), et 3) un domaine à rôles variables d'une métalloprotéinase à l'autre ou domaine hémopexine : pour la MMP-2, il est impliqué dans les interactions avec les membranes et les TIMPs (298) et dans le cas de la MMP-9, il permet la liaison de TIMP-1 mais non celle de TIMP-2 (299).

Figure 12 : Structure des métalloprotéinases.



Abréviations : Pre, séquence signal; Pro, peptide avec un groupement thiol (SH) liant le Zinc; F, site de clivage pour la Furine; Zn, site de liaison du Zinc; II, domaines fibronectine du type II liant le collagène; H, région charnière; TM, domaine transmembranaire; C, queue cytoplasmique; GPI, domaine d'ancrage du glycoposphatidyl inositol; C/P, cystéine/proline ; IL-1R, récepteur d'Interleukine-1. Le domaine hémopexine/vitronectine présente une répétition de 4 motifs dont le premier et le dernier sont liés par un pont disulfure. *Adapté de Sternlicht MD et coll. How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behaviour. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2001; 17: 469.*

Bien que très peu des substrats naturels des métalloprotéinases furent définitivement identifiés *in vivo* (300), un large ensemble de molécules a été listé (301). Cette liste comprend des protéines qui ont été testées *in vitro* comme des substrats

potentiels des MMPs (tableau III). Cependant, il n'y a aucune garantie que le substrat en question soit dégradé *in vivo* par l'enzyme testée à moins que le potentiel existe. Par dessus, le nombre des constituants de la matrice extracellulaire dépasse actuellement le chiffre de 150 et seulement une petite portion a été testée et identifiée comme substrats. Pour établir le substrat naturel, il est nécessaire d'isoler les produits de dégradation à partir du tissu et montrer ensuite par séquençage que les sites de clivage correspondent bien à ceux produits par la métalloprotéinase en question. Ce principe a été appliqué seulement à trois substrats : le collagène interstitiel, l'aggrécan et les protéines de liaison (link protein). Cependant, des ambiguïtés restent toujours présentes : différentes MMPs peuvent cliver la même protéine, au même endroit, et les fragments produits peuvent subir une digestion ultérieure par d'autres enzymes de la matrice. Un autre itinéraire à suivre est d'essayer de montrer l'absence des produits de dégradation du substrat par des expériences de « gene knockout » (302). Le tableau III regroupe les substrats connus des métalloprotéinases mais, à l'exception des trois exemples cités ci-dessus, il n'existe pas de fortes évidences qu'un de ces substrats est dégradé par une métalloprotéinase particulière *in vivo*.

Tableau III : Substrats des métalloprotéinases.

MMP	1	2	3	7	8	9	10	11	12	13	14	16	18	19	26
ECM Proteins :															
Aggrecan	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+				
Collagen I	+	+	-	+	+	-			+	+	+		+	+	-
Collagen II	+				+	-				+	+				-
Collagen III	+	+	+	-	+	-	+			+	+	+			
Collagen IV	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-				+	+
Collagen V	-	+	+	-	-	+	+			-					
Collagen VI	-	-	-			-				+					
Collagen VII	+	+	+												
Collagen VIII	+														
Collagen IX	-	-	+							+					
Collagen X	+	+	+	-						+					
Collagen XI	+	+	+			+				-					
Collagen XIV	-		-	-		+				+					
Decorin	-	+	+	+		+									
Elastin	-	+	+	+		+	+		+						-
Entactin/Nidogen	+	+	+	+					+		+				
Fibrillin		+	+			+			+	+	+				
Fibronectin	+	+	+	+	-	-	+		+	+	+	+		+	+
Fibulins		+		+											
Gelatin I	+	+	+	+		+	+		+	+	+			+	+
IGFBPs	+	+	+					+							
Laminin	+	+	+	+		+		-	+		+				-
Link Protein	+	+	+	+		+	+								
Myelin Basic	+	+	+	+		+			+						
Osteonectin		+	+	+		+				+					
Tenascin	+	+	+	+		-								+	
Vitronectin	+	+	+	+		+			+		+				
Other Proteins :															
α 1-AC	+	+	+			-									
α 2-M	+	-	+		+	+		+	+	+	+				

MMP	1	2	3	7	8	9	10	11	12	13	14	16	18	19	26
α 1-PI	+	+	+	+	+	+		+	+		+				+
Casein	+	-	+	+		+	+	-		+				+	-
C1q	+	+	+		+	+				+					
E-cadherin			+	+											
Factor XII					-				+	+	+				
Fibrin	+	+	+			+					+				
Fibrinogen	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+				+
IL1 α	-	-	-			-									
IL1 β	+	+	+			+									
ProMMP2											+	+			
ProTGF β		+				+									
ProTNF α	+	+	+	+		+			+		+				
Plasminogen		+	+	+		+			+						-
Substance P		+	+		+	+									
T kininogen		-	+			-									

^aLes symboles indiquent si la protéine désignée est (+) ou n'est pas (-) dégradée par la MMP correspondante.

Abréviations : α 1-AC, α 1-antichymotrypsine; α 2-M, α 2-macroglobuline; α 1-PI, α 1-inhibiteur de protéinase . *Adapté de Woessner & Nagase 2000 avec des données additionnelles d'Ashworth et coll. 1999, Hiller et coll. 2000, Hiraoka et coll. 1998, Manes et coll. 1997, Noe et coll. 2001, Park et coll. 2000, Stracke et coll. 2000, Sternlicht et coll. 2001, Uria & Lopez-Otin 2000.*

3.2 Activation des métalloprotéinases

L'activité des MMPs est soumise à de larges restrictions, faute de quoi la matrice avoisinante risque d'être exposée à une dégradation non contrôlée. En effet, l'activité des MMPs est régulée à trois niveaux (303) :

1) *régulation transcriptionnelle* : les cellules ne sécrètent pas les MMPs d'une façon aléatoire mais seulement en réponse à de signaux bien définis, lorsqu'une activité métalloprotéinase est sollicitée. Ceci implique l'interaction des facteurs de transcription,

des co-activateurs et des co-répresseurs avec certains éléments de la région du promoteur des gènes exprimant les MMPs. Le mécanisme par lequel la transcription des gènes ait lieu semble impliquer la cascade signalétique PGE_2 /protéines-G/AMPc (304). L'activation transcriptionnelle peut être stimulée par des cytokines pro-inflammatoires (IL- β , IL-6, TNF α), des hormones, des facteurs de croissance (EGF, PDGF, bFGF). D'autres facteurs sont aussi impliqués comme la HSP60 (Heat Shock Protein 60) qui induit l'expression de TNF α et de la MMP-9; CD40L qui induit l'expression des MMP-1, MMP-3 et MMP-8 (309-311); les LDL (Low Density Lipoproteins) oxydées qui augmentent l'expression des MMP-1, MMP-9 et MMP-14 (312-314). L'insuline stimule l'expression de la MMP-12 en influençant la liaison de l'AP-1 (Activator Protein-1) (315) et la thrombine induit l'expression de l'ARNm de MMP-2 et de MMP-3. L'hypoxie de courte durée diminue l'expression de l'ARNm de MMP-2 tandis que l'hypoxie prolongée (plus que 24 heures) ou la ré-oxygénation après une courte durée d'hypoxie augmentent l'expression de l'ARNm de MMP-2 et de MMP-14 (316). Plusieurs autres facteurs tels que l'indométacine, les corticostéroïdes et l'IL-4 sont aussi reconnus pour inhiber l'expression génique des MMPs (286, 306, 317), mais leurs effets inhibiteurs peuvent être levés par la PGE_2 et l'AMPc exogènes (304). Les ligands des facteurs de transcription nucléaires PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma) comme les métabolites de la PGD_2 et le troglitazone diminuent l'expression de l'ARNm de MMP-9 dans les CML (318). Cependant, les MMPs ne répondent pas toutes de la même façon aux mêmes stimuli et l'impact des différents facteurs est spécifique à chaque type cellulaire. Par exemple, chez les macrophages humaines du sang périphérique le facteur de croissance transformant $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) inhibe l'expression de la MMP-12 à

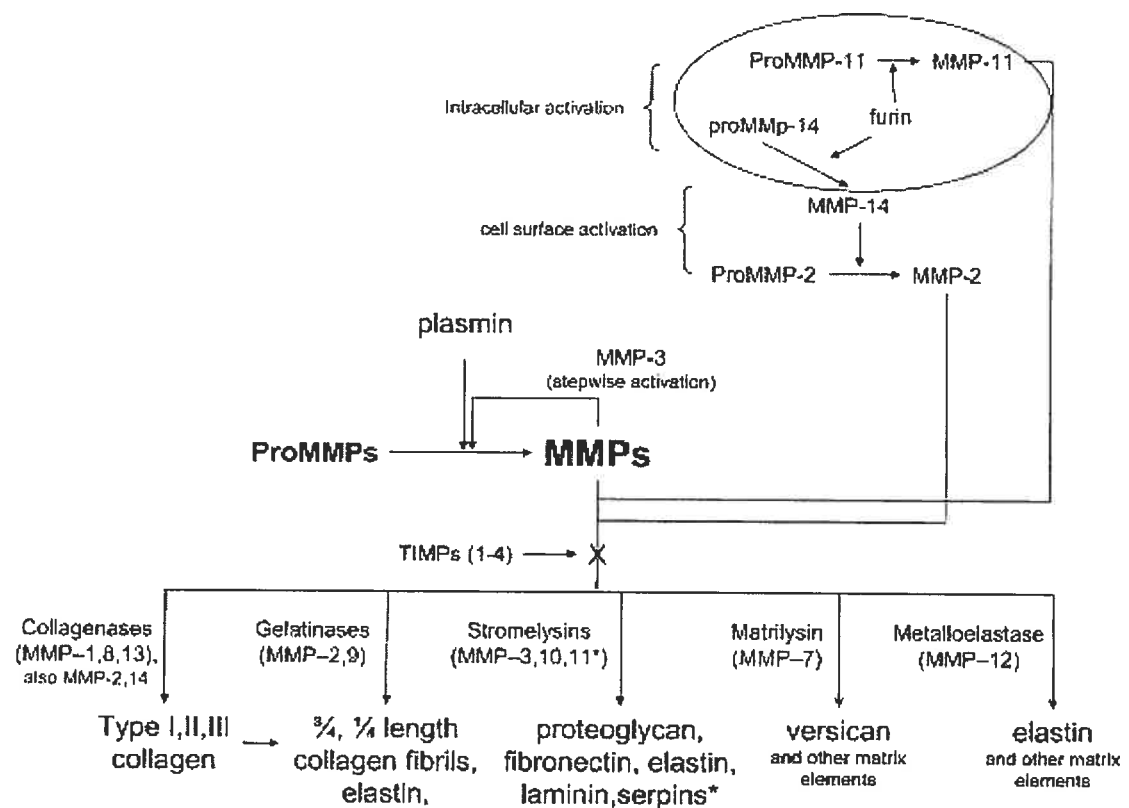
l'encontre de chez les monocytes où il induit l'expression de MMP-2 et MMP-9 (307,319). De manière similaire, le facteur dérivé des cellules stromales (SDF-1) réduit l'expression de MMP-9 dans les monocytes des patients souffrant de l'angine instable tandis qu'il augmente l'expression et la synthèse de MMP-9 dans les mégacaryocytes humaines (319,320). Finalement, la transcription génique des MMPs peut être altérée par une variation dans la séquence de la région du promoteur (321). Par exemple, la substitution de C par T dans la position -1562 de la région du promoteur de gène MMP-9 influence son expression (322). Ces études, ainsi que plusieurs autres portant sur le polymorphisme génique au niveau du promoteur, ont été associées avec des maladies cardiovasculaires malgré que, dans la plupart des cas, les mécanismes précis ne soient pas assez clairs.

2) *régulation post-traductionnelle* : les MMPs sont produites fréquemment sous une forme latente requérant des processus d'activation spécifiques. L'activation des formes latentes des MMPs peut avoir lieu à l'intérieur de la cellule par l'action des protéinases endogènes, à la surface cellulaire mettant en jeu des MT-MMPs, dans l'espace extracellulaire par l'action d'autres protéases ou encore par des métalloprotéinases activées en amont dans une cascade appelée activation extracellulaire en chaîne « extracellular stepwise activation » (figure 13).

La MMP-11 et la MMP-14 sont activées à l'intérieur de la cellule. Ces deux MMPs contiennent un motif d'acides aminés basiques en amont du domaine catalytique, qui semble agir comme un signal de clivage protéolytique pour la furine via le réseau trans-Golgien (317, 318). Dans l'espace extracellulaire, la MMP-3 peut activer la forme zymogène de MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-9 et MMP-13 (303, 325-327). Une fois

activée, la MMP-7 peut activer MMP-1, MMP-9 et MMP-13, créant ainsi un effet d'activation extracellulaire en cascade ou « extracellular stepwise activation ». De façon semblable, MMP-2 peut activer pro-MMP-9 (303) et MMP-12 peut activer pro-MMP-2 et pro-MMP-3 (286).

Figure 13 : Schéma d'activation et d'activité des MMPs



Adapté de Jones CB et coll. Matrix metalloproteinases : A review of their structure and role in acute coronary syndrome. Cardiovascular research. 2003; 59: 815.

3) *régulation post-sécrétoire* : interaction des MMPs sécrétées avec des inhibiteurs généraux qui bloquent rapidement l'action des MMPs comme la famille de l' α_2 -macroglobuline et les TIMPs. Ces derniers sont produits localement par les cellules,

le plus souvent par les mêmes cellules qui sécrètent les MMPs. Depuis leur découverte en 1975, les TIMPs ont acquis un rôle important dans les réactions vasculaires suite à l'endommagement artériel et aux remodelages post-angioplasties. À date, quatre TIMPs génétiquement différents ont été caractérisés : 1) TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4 (329). Même si TIMP-1 et TIMP-2 démontre une inhibition de la majorité des métalloprotéinases, MMP-2 lie TIMP-2 avec 4 à 7 fois plus d'affinité que TIMP-1, tandis que ce dernier lie avec 2 fois plus d'affinité MMP-1 (330). Par ailleurs, TIMP-2 est capable de contrôler la quantité de MT1-MMP (MMP-14) active à la surface des cellules par un mécanisme peu claire (331) Le TIMP-3 diffère des autres TIMPs dans la mesure où il peut s'associer avec les protéines de la matrice extracellulaire (332). Le TIMP-4 peut interagir avec le domaine C-terminal de la MMP-2 au même titre que TIMP-2, avec lequel il entre en compétition pour la liaison à ce site (333). Le tableau IV résume quelques propriétés des TIMPs.

Tableau IV: Caractéristiques des TIMPs.

Propriété	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Masse moléculaire	20.6 kDa	21.5 kDa	21.6 kDa	22.3 kDa
Masse glycosylée	28.5 kDa	-	27 kDa	-
Localisation tissulaire	Ovaire, Os	Rein, placenta	Rate, ovaire	Cœur, Cerveau
Complexe pro-MMP	MMP-9	MMP-2	-	MMP-2
Inhibition des MMPs	Toutes	Toutes	Toutes	1, 2, 3, 7, 9

Adapté de Woessner and Nagase. In : Matrix Metalloproteinases and TIMPs .Oxford : Oxford University Press, 2001; 1- 9.

Un autre aspect du contrôle post-sécrétoire des métalloprotéinases réside dans le fait que plusieurs MMPs sécrétées restent dans le microenvironnement cellulaire, liées à la surface cellulaire ou à des composantes de la matrice, de façon que leurs activités peuvent être modulées à chaque moment selon les besoins cellulaires et/ou tissulaires. Ainsi, ces différents moyens de régulation permettent à la cellule de "titrer" l'activité des MMPs et ce même après leur sécrétion dans le milieu extracellulaire.

3.3 La famille des gélatinases

La MMP-2 (Gélatinase A, E.C.3.4.24.24) est un membre de la famille des métalloprotéinases impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire. Sa structure comprend trois domaines fibronectine du type II insérés dans le site catalytique et contribue à la liaison de l'enzyme aux substrats de gélatine (figure 12). Cette triple répétition du domaine fibronectine fait de la gélatinase A une des plus larges métalloprotéinases. La MMP-2 est sécrétée sous forme d'un pro-enzyme de 72 kDa et son activation requiert la protéolyse d'un fragment de 8 à 10 kDa et la présence des cations métalliques Zn^{2+} et Ca^{2+} . Dans les plaquettes, cette sécrétion/activation résulte des interactions cellule-matrice et dépend de l'activation des molécules d'adhésion tels que les intégrines (334, 335). Or, le mécanisme principal de l'activation de MMP-2 implique la formation d'un complexe ternaire à la surface cellulaire entre la forme zymogène, la MMP-14 et le TIMP-2, en même temps qu'une MMP-14 adjacente clive pro-MMP-2 au niveau du domaine pro (336). Ce processus semble être facilité par la liaison de plusieurs intégrines comme $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$ au domaine hémopexine du pro-MMP-2. (337, 338). En outre, les quatre MT-MMPs sont capables d'activer MMP-2, (339, 340) puis en

collaboration avec cette dernière, peuvent activer MMP-13 (341). Deux facteurs de coagulation, la thrombine et le facteur Xa, sont capables d'activer MMP-2 (342, 344). Certaines protéases, la plasmine en particulier, sont considérées comme initiateurs de l'activation extracellulaire en chaîne « extracellular stepwise activation » qui active les formes latentes des MMPs sécrétées. Le mode d'action de ces protéases consiste en un clivage du pont cysteine-Zn²⁺ « cysteine switch » au niveau du domaine pro (345). La MMP-2 se distingue des autres MMPs par le fait qu'elle ne possède pas au domaine NH₂-terminal les sites de clivage requis pour l'activation par les protéases (342). Par conséquent, elle est insensible à la digestion par les enzymes classiques et les protéinases exogènes comme l'urokinase, la plasmine, la kallikréine, l'élastase plasmatique, la trypsine, la chymotrypsine, la thermolysine, la cathépsine G et la MMP-3 qui activent les autres MMPs (346-348). Cependant, les radicaux libres d'oxygène qui interagissent avec les groupements thiols sont reconnus pour activer la pro-MMP-2 par un mécanisme qui implique l'hydrolyse du « cysteine switch » (341). Par ailleurs, une étude a démontré que la MMP-1 en présence de l'héparine (349) et de la MMP-7 (350, 351) est capable d'activer la pro-MMP-2. Finalement, plusieurs autres MMPs ont montré la capacité d'activer la pro-MMP-2 en initiant la première étape de la cascade d'activation en chaîne (287).

La MMP-9 (Gélatinase B, EC 3.4.24.24) est l'enzyme la plus large des MMPs, avec un poids moléculaire de 92 kDa dans sa forme latente. Son activation nécessite la protéolyse d'un fragment de 6 à 8 kDa et la présence des cations métalliques Zn²⁺ et Ca²⁺, lui conférant une masse de 86 kDa. Cet intermédiaire est ensuite protéolysé en une forme active de 67 kDa. La liaison de TIMP-1 à la forme intermédiaire empêche cette dernière

de devenir active. La MMP-9 est activée par la trypsine, la chymotrypsine, la kallikréine, la cathépsine G, la thrombine, la plasmine et la thermolysine. Parmi ces derniers, la trypsine semble être l'activateur le plus efficace avec une activation totale, tandis qu'une activation partielle (10-30%) a été observée avec la plasmine, la cathépsine et la chymotrypsine (352). Bien qu'il avait été proposé par Vissers et coll. que la MMP-9 sécrétée par des neutrophiles stimulés avec la fMLP en présence de la cytochalasine B peut être activée avec l'élastase des neutrophiles (353), plusieurs études ont rapporté que l'élastase des neutrophiles était incapable d'activer la pro-MMP-9 (353-355). Plusieurs MMPs dont MMP-1 (356) MMP-2 (357) MMP-3 (355, 357-359) MMP-7 (355, 356) MMP-10 (360) et MMP-13 (361) sont des activateurs potentiels de la MMP-9 qui agissent selon la cascade d'activation en chaîne « stepwise mechanism ». Notons aussi que quoique la MMP-9 se retrouve souvent sous forme "constitutive", stockée dans des granules spécifiques cytosoliques (e.g neutrophiles) et sécrétée suite à l'activation par les médiateurs inflammatoires (26), il existe d'autre forme de MMP-9 qui soit "inductible" (e.g cellules endothéliales) et impliquée dans le remodelage vasculaire et la réorganisation de la matrice extracellulaire suite aux lésions vasculaires (420).

3.4 Les métalloprotéinases des plaquettes

Bien que l'activité collagénolytique des plaquettes fut découverte au début des années 1974 par Chesney et coll. (362), l'identité moléculaire des enzymes impliquées n'a pas été révélée que vers la fin des années 1990. Jusqu'à date, cinq MMPs incluant MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 et MMP-14 ont été identifiées dans les plaquettes humaines, porcines et murines (18, 23-25, 170, 363-367). Dans les plaquettes inactivées,

ces enzymes sont stockées sous une forme latente. L'adhésion des plaquettes médiée par le vWf (365) ainsi que l'agrégation plaquettaire par le collagène, la thrombine et les cellules cancéreuses humaines, provoquent la sécrétion de MMP-1 et de MMP-2 (23-25, 368). Ces enzymes sont translocées rapidement vers la surface cellulaire où elles co-localisent avec l'intégrine membranaire β_3 dans les régions d'interaction cellulaire (23, 25). La translocation de MMP-1 et de MMP-2 vers la surface cellulaire et l'association avec des composants de la membrane, leur permettent de contrôler plusieurs fonctions plaquettaires comme l'agrégation, la modulation et la distribution de certaines intégrines membranaires, l'activation de cascades de signalisation, la phosphorylation de protéines intracellulaires et, entre autres, stimuler l'activation des enzymes (18, 23-25, 287).

Des expériences utilisant des inhibiteurs moléculaires et pharmacologiques, ainsi que des formes recombinantes de MMP-1 et de MMP-2, ont montré que ces enzymes peuvent stimuler l'adhésion et l'agrégation des plaquettes (24, 25). Cependant, seules les formes activées de MMP-1 et de MMP-2 et non pas les formes latentes influencent la fonction plaquettaire suggérant qu'une protéolyse limitée de ces composés est exigée pour stimuler les plaquettes (24, 25). En effet, Galt et coll. ont montré que les plaquettes contiennent de la MMP-1 (16.5 +/- 7.2 ng pour 10^9 plaquettes) qu'elles secrètent de façon constitutive. Leurs travaux démontrent que la MMP-1, que ce soit d'une source exogène ou endogène, génère des signaux qui augmentent considérablement le nombre des protéines phosphorylées à l'intérieur des cellules. Aussi, la MMP-1 dirige et distribue les β_3 intégrines sur la surface cellulaire au niveau de points de contact cellulaire et priment les plaquettes pour l'agrégation (25).

En différence avec les leucocytes où les MMPs sont stockées dans les granules spécifiques de gélatinases (369), la MMP-2 est distribuée uniformément dans le cytosol des plaquettes sans aucune association détectable avec les granules (23). L'absence d'une association discernable de MMP-2 avec les granules plaquettaires est intrigante. En effet, la séquestration des enzymes protéolytiques dans des granules spécifiques protège les constituants internes des cellules de la protéolyse ainsi que les enzymes elles mêmes de la dégradation par d'autres protéases endogènes (369). Dans les neutrophiles, la MMP-2 se trouve souvent associée avec le NGAL (Lipocaline associée à la gélatinase des neutrophiles) (370) une protéine transporteuse de 25 kDa de la famille des lipocalines (371). Les lipocalines constituent une classe de petites protéines spécialisées dans le transport de molécules hautement bioactives entre différents compartiments cellulaires. De même, comme on a déjà vu dans cette section, les TIMPs peuvent former un complexe avec les MMPs et inhiber leur activité. Par ailleurs, des études ont montré que les plaquettes humaines expriment TIMP-2 (363), TIMP-4 et TIMP-1 (372) et que l'utilisation d'une forme humaine recombinante de TIMP-2 ou de TIMP-4 résulte en une inhibition de l'agrégation plaquettaire (24, 372). Donc, il est fort probable que les interactions des MMPs avec NGAL et TIMPs contrôlent la biocativité des métalloprotéinases dans les plaquettes. L'activation de la MMP-2 peut avoir lieu par la voie classique de MT-MMP/TIMP-2 (363) ou par un mécanisme n'impliquant pas TIMP-2 (373).

Très peu de MMP-2 sous sa forme non-active est sécrété par les plaquettes sous conditions physiologiques, soit environ 0.3 ± 0.1 ng pour 10^8 plaquettes. La lyse des plaquettes inactives permet de récupérer 17.29 ± 3.72 ng de MMP-2 sous forme inactive

pour 10^8 plaquettes, ce qui semble être la totalité de la MMP-2 présente dans les plaquettes (24). Le collagène et la thrombine provoquent la sécrétion respective de 10.59 ± 2.43 et 16.46 ± 2.93 ng de MMP-2 pour 10^8 plaquettes (24). Cette sécrétion est dose-dépendante et se trouve en accord avec des études antérieures qui démontrèrent que l'activité collagénolytique des plaquettes et la sécrétion d'une gélatinase correspondait avec l'agrégation plaquettaire (374, 375). L'utilisation des anticorps monoclonaux contre la MMP-2, de la phénanthroline, du TIMP-2 recombinant et le SC44463, tous des inhibiteurs des gélatinases furent utilisés pour caractériser la sécrétion induite par différents agonistes et l'impact sur l'agrégation plaquettaire. Les résultats démontrent la spécificité des traitements anti-MMP-2, car ils inhibent l'agrégation engendrée par le collagène (forte sécrétion de MMP-2) mais non celle induite par le fibrinogène et le PMA, car ces activateurs ne mènent pas à la sécrétion de MMP-2 par les plaquettes (24). Poussant un peu plus loin leur étude, les auteurs parviennent à démontrer que la phénanthroline inhibe l'agrégation insensible à l'aspirine et à l'apyrase, ce qui permet d'avancer que l'effet pro-agrégant de MMP-2 est indépendant de la TXA_2 et de l'ADP sécrétés par les plaquettes. Cependant, bien que les modes d'actions des MMPs sur les plaquettes ne nécessitent pas la formation des médiateurs cellulaires comme la TXA_2 et l'ADP, ses effets pro-agrégants se croisent avec d'autres agonistes plaquettaires comme les PAR-AP (Proteinase-Activated Receptor-Agonist Peptides) (376). De plus, l'ajout de la MMP-2 active à une suspension de plaquettes activées au collagène, potentialise l'agrégation des plaquettes, mais ne déclenche pas l'agrégation de plaquettes non activées (24). Cette étude met aussi en évidence le fait que la sécrétion de MMP-2 par la thrombine et le collagène est inhibée par un donneur de NO et de la PGI_2 , ce qui laisse

croire qu'il existe une corrélation entre les taux d'AMPc et de GMPc cellulaires et la sécrétion de MMP-2 par les plaquettes (figure 14). Quelques années plus tard, le même groupe étudia la sécrétion de MMP-2 lors de l'adhésion des plaquettes au fibrinogène. Ils concluaient que la MMP-2 favorisait l'adhésion des plaquettes au fibrinogène, phénomène pouvant être inhibé par la phénanthroline et le NO qui agissent en synergie par un mécanisme indépendant du GMPc (376). Pourtant, dans un autre modèle où la MMP-2 est l'un des médiateurs de l'agrégation plaquettaire induite par les cellules tumorales, la mécanistique de signalisation intracellulaire semble dépendre du GMPc (343). Aussi, une étude menée par Cipellone et coll. a reporté que la production des MMPs par les macrophages dans les plaques athéromateuses se produit via un mécanisme dépendant du PGE₂/AMPc (378). Ceci relance à nouveau le débat sur l'importance du GMPc dans les mécanismes de régulation de la sécrétion de MMP-2. En effet, l'utilisation des donneurs de NO comme le SNAP (S-nitroso-n-acétylpénicillamine) et le GSNO (S-nitrosoglutathion), inhibe la sécrétion de MMP-2 par les plaquettes et les cellules tumorales de même que l'agrégation plaquettaire induite par les cellules tumorales. Cette inhibition par des donneurs de NO, peut être renversée par l'ODQ (1H-[1, 2,4] oxadiazole [4,3] quinoxalin-1-one), un inhibiteur sélectif de la guanylyl cyclase soluble (368). Dans un autre cadre, Radomski et coll. se sont penchés sur l'adhésion des plaquettes sur une surface de vWf. L'exposition des plaquettes à cette surface de vWf déclenche la sécrétion de MMP-2 par un mécanisme indépendant de la TXA₂ et de l'ADP et leur adhésion au vWf immobilisé est augmentée en présence de MMP-2 (10 ng/mL) pour de faibles concentrations de vWf (< 0,5 µg/mL). Dans ce même modèle, la MMP-2

serait responsable d'une augmentation de la présence de GPIb à la surface des plaquettes (365).

Tout comme la MMP-2, la MMP-9 est présente au niveau des plaquettes mais en moindre quantité que la MMP-1 et la MMP-2 (25). À l'instar de la sécrétion de MMP-2 qui est maximale dans les plaquettes complètement agrégées, celles de la MMP-9 est maximale aux environs de 30% de la réponse plaquettaire en présence de 0.01 U/mL de thrombine (18). Dans cette étude, l'utilisation d'anticorps dirigés contre la MMP-9 parvient à provoquer l'agrégation des plaquettes en absence d'agoniste et à potentialiser l'agrégation plaquettaire en réponse à la thrombine et au collagène. Puis, l'ajout exogène de MMP-9 (0.1 à 30 ng/mL) parvient à inhiber l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine et le collagène. Les résultats de cette étude démontrent que ces deux métalloprotéinases semblent jouer des rôles différents au cours de l'agrégation plaquettaire : MMP-2 favorise l'agrégation plaquettaire tandis que MMP-9 la limite et l'inhibe.

Les plaquettes contiennent aussi de la MMP-3 (2.6 +/- 0.8 ng total pour 10^9 plaquettes) mais cette dernière ne semble manifester aucun effet sur la phosphorylation des protéines ou sur l'agrégation plaquettaire (18).

La MMP-14 (MT-MMP-1) est la dernière métalloprotéinase identifiée chez les plaquettes. Outre sa capacité de procéder à l'activation de MMP-2, elle possède aussi la capacité de dégrader différentes protéines de la matrice extracellulaire (cf. tableau IV). En plus, la MMP-14 ainsi que toutes les autres MT-MMP peuvent relâcher du TNF α soluble à partir d'une molécule de pro- TNF α , (mais ne peuvent pas transformer la pro-IL-1 β en IL-1 β) (324, 379, 380). D'ailleurs, la MMP-14 favorise la croissance des

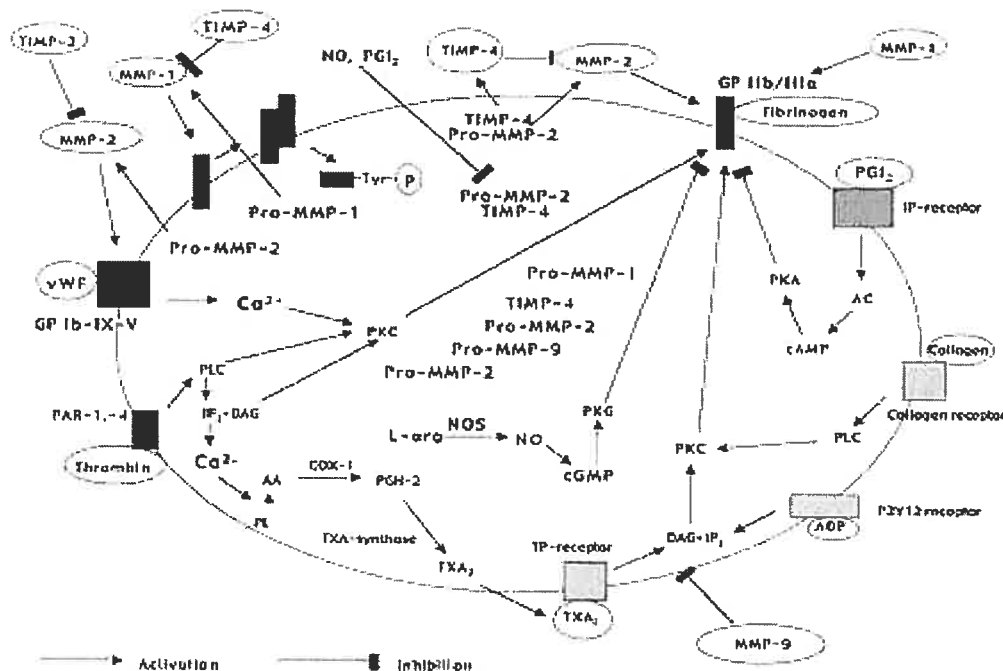
tumeurs par angiogénèse en entraînant une augmentation de l'expression de VEGF (Facteur de croissance endothéliale vasculaire) par les cellules surexprimant la MMP-14 (381).

Parmi les quatre inhibiteurs endogènes des MMPs, seules les TIMP-1 et TIMP-4 seront exprimés en quantités mesurables dans le cytosol des plaquettes, où le TIMP-4 est associé avec la MMP-2 (373). Cependant, il semble que le TIMP-2 qui est exprimé en grande quantité dans le lit vasculaire (382), contribue également à la régulation de l'activité des MMPs dans les plaquettes *in vivo*.

De même que les MMPs exercent un effet sur les plaquettes, les plaquettes ont aussi un effet sur la sécrétion des MMPs (16): les monocytes synthétisent la MMP-9 quand ils adhèrent au collagène conjointement avec les plaquettes (383).

Ainsi, les effets des MMPs sur l'agrégation plaquettaire nécessitent encore plus d'investigations, bien que ces effets laissent croire l'existence d'un effet de boule de neige (snowball effect) entre la régulation des plaquettes par les MMPs et l'effet des plaquettes sur la sécrétion des MMPs par d'autres cellules.

Figure 14 : Aperçu des principales réactions plaquettaires et les voies de signalisation dépendantes des MMPs



Légende : les rectangles représentent les récepteurs et les ligands sont représentés par des cercles. ADP indique l'adénosine diphosphate ; AA, acide arachidonique ; AC, adénylate cyclase ; cAMP, Adénosine monophosphate cyclique ; cGMP, guanosine monophosphate cyclique ; COX, cyclooxygénase ; DAG, diacylglycérol ; GP, glycoprotéine ; IP₃, inositol triphosphate ; MMP, métalloprotéinases de la matrice ; PL, phospholipides membranaires ; NO, monoxyde d'azote ; NOS : monoxyde d'azote synthase ; PLC ; phospholipase C ; PGI₂, prostacycline ; IP-receptor, récepteur de la prostacycline ; PAR, récepteurs activés par les protéinases (proteinase-activated receptor) ; PKA, protéine kinase A ; PKG, protéine kinase G ; TXA₂ ; thromboxane A₂ ; TP-receptor, récepteur de la thromboxane ; TIMP, inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases et vWF, facteur von willebrand. *Adapté de Radomski MW et coll. Non remodeling properties of Matrix Metalloproteinases : The platelet connection. Circulation Research.2002; 90 : 1041-1043.*

3.5 Les métalloprotéinases des neutrophiles

La présence d'une collagénase dans les neutrophiles a été décrite pour la première fois en 1968 par Lazarus et coll. (384, 385). Cette collagénase baptisée collagénase 2 ou MMP-8 était la deuxième MMP découverte après la collagénase interstitielle (MMP-1). Pour de nombreuses années, cette MMP fut qualifiée de collagénase des neutrophiles

« neutrophil collagenase » pour la distinguer de celle des fibroblastes (MMP-1) (386). Dans les neutrophiles, cette enzyme comme la plupart des autres MMPs, est stockée dans des granules spécifiques (387) et est sécrétée suite au processus de phagocytose (388). L'expression de la MMP-8 a été pour longtemps confinée aux neutrophiles mais des études récentes ont montré que cette enzyme est également exprimée chez les chondrocytes (389), les fibroblastes et les cellules endothéliales (390), les CML et les macrophages (391). La MMP-8 peut être activée par les protéases classiques comme la kallikréine, l'élastase, la trypsine, la cathépsine G et la MMP-3 (392, 393). Aussi, un facteur présent dans le liquide synovial est capable d'activer la collagénase 2 (388). Une autre métalloprotéinase, la gélatinase B ou MMP-9, fut découverte dans les leucocytes granulocytaires en 1974 par Sopata et coll. (394). Dans les neutrophiles, la MMP-9 est contenue dans des granules spécifiques (peroxidase-negative granules) en association avec la protéine transporteuse NGAL (26). En réponse à l'activation par les médiateurs inflammatoires, les neutrophiles sécrètent rapidement leurs granules spécifiques contenant de la MMP-9 dans le milieu extracellulaire, où elles subissent le mécanisme d'activation en chaîne (26). Bien que plusieurs travaux ont révélé l'existence dans les neutrophiles de petites granules de sécrétion contenant de la MMP-2 associée avec NGAL (395- 397), d'autres études ont nié l'existence de MMP-2 et de TIMP-1 dans les neutrophiles (26).

3.6 Les métalloprotéinases dans la biologie vasculaire

À l'heure actuelle, les MMPs ont acquis une place très importante dans la biologie vasculaire. Leur rôle est rendu incontestable à fur et à mesure que des données viennent

souligner leur implication dans l'angiogénèse, la pathogénèse de l'athérosclérose, leur capacité à dégrader la cape fibreuse des plaques d'athérome, leurs effets sur l'agrégation plaquettaire et la thrombose, et leur rôle dans le phénomène de resténose post-angioplastie.

3.6.1 Les MMPs dans l'angiogénèse

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants (angiogénèse) est un phénomène indispensable pour le développement et la réparation tissulaire ainsi que pour la croissance tumorale. Les MMPs peuvent contribuer à l'angiogénèse par au moins trois manières : 1) elles facilitent la migration de cellules endothéliales vers les tissus avoisinants en dégradant les composants de la matrice extracellulaire, 2) elles favorisent cette migration en libérant des facteurs angiogéniques séquestrés, et 3) elles peuvent contrecarrer ce phénomène en générant de produits anti-angiogéniques. De plus, l'équilibre entre les MMPs et leurs inhibiteurs spécifiques devrait être restauré lors de la néovascularisation pour favoriser la formation de membranes basales et la différenciation de cellules endothéliales (398). Dans l'angiogénèse, une dégradation de la matrice extracellulaire précède la migration et la prolifération des cellules endothéliales qui forment les bourgeons donnant naissance à des nouveaux vaisseaux sanguins (399). Les MMP-2, MMP-9 et MMP-1 sont toutes sécrétées par les cellules endothéliales et participent activement à la dégradation/synthèse du collagène de type IV et I, de la laminine et de la fibronectine de la matrice extracellulaire durant l'angiogénèse (400, 401). Une autre manière par laquelle les métalloprotéinases exercent un rôle au niveau de la prolifération cellulaire est le langage de facteurs de

croissance associés aux protéines de la matrice extracellulaire. En effet, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et le TGF- β dénotent une forte affinité pour les constituants de la matrice extracellulaire. Au cours de la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire, ces facteurs de croissance sont alors solubilisés et peuvent ainsi exercer leurs fonctions biologiques. C'est le cas pour la protéolyse du perlecan par MMP-1 et MMP-3 qui permet la libération du FGF (402) et celle de la décorine par la MMP-2, MMP-3 et MMP-7 qui relâche le TGF- β (403). Un autre mécanisme par lequel les métalloprotéinases modifient l'activité de certains facteurs de croissance est par une protéolyse directe de ces derniers. Ainsi, la MMP-9 peut activer le TGF- β (404), l'interleukine-1 β (IL-1 β) peut être protéolysé en sa forme active par MMP-2, MMP-3 et MMP-9 (405) et le pro-TNF α est activé par protéolyse à l'aide de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 et MMP-14 (406, 407).

Les métalloprotéinases peuvent aussi inhiber l'action de certains facteurs de croissance et de certaines cytokines : 1) MMP-9 peut par protéolyse du récepteur IL-2 de type α des lymphocytes T, empêcher la prolifération cellulaire induite par IL-2 (408) et 2) l'action de MMP-2 peut mener à la dégradation du récepteur FGF de type I (409). L'angiostatine, un inhibiteur spécifique de la prolifération endothéliale et de l'angiogénèse, est issue de la digestion enzymatique du plasminogène sous l'effet de MMP-2, MMP-3 et MMP-9 (410-413).

3.6.2 Les MMPs dans l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie des grosses et moyennes artères caractérisée par la présence de dépôts lipidiques et de leucocytes au niveau de l'intima, par la migration et

la prolifération des CML et la déposition de matrice extracellulaire (414, 415). L'athérosclérose est la cause principale des attaques cardiaques. Elle prédispose à la thrombose et à la calcification et provoque le rétrécissement des artères. Le développement et la progression de l'athérosclérose à travers la paroi artérielle sont amorcés par des interactions entre les cellules intrinsèques de la paroi artérielle avec celles de la matrice extracellulaire, les cellules du sang et les composants du plasma. Une variété de produits effecteurs incluant des facteurs de croissance, des cytokines, des médiateurs lipidiques, des protéinases et des molécules vasorégulatrices participe à ce processus (414,415). Plusieurs évidences indiquent que les MMPs influencent le processus de formation de lésions athérosclérotiques (tableau V). Par exemple, la MMP-2 et la MMP-9 promeuvent la migration et la prolifération des CML pendant que les monocytes et les lymphocytes-T adhérents aux cellules endothéliales sécrètent de larges quantités du MMP-9 et du MMP-2 respectivement. Ceci s'associe avec une dégradation de la membrane endothéliale basale et une invasion intimale par les monocytes et les lymphocytes-T, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales. Ces réactions ainsi que l'afflux des constituants plasmatiques incluant les lipoprotéines accélèrent la formation et la progression de la plaque athéromateuse. D'autre part, une série de facteurs de croissance et de cytokines se lient à la matrice extracellulaire et demeurent sequestrés jusqu'à ce qu'elles soient libérées et aptes à interagir suite à la dégradation de la matrice par les MMPs (416). De plus, les MMPs dégradent d'autres facteurs incluant l'IL-1 β , le TNF- α , le TGF- β latent et l'HB-EGF (Facteur de croissance liant l'héparine) (417).

Tableau V : Implication des MMPs dans les syndromes cardio-vasculaires.

MMPs	Activité dans les plaques	Elévation dans le syndrome coronaire aigu	Elévation en PTCA
Collagénases MMP-1 MMP-8 MMP-13	+ + +		
Gélatinases MMP-2 MMP-9	+ +	+ +	+ +
Stromélysines MMP-3 MMP-10 MMP-11	+ + +/-		
Matrilysines MMP-7			
Métalloélastases MMP-12			
MT-MMPs MMP-14			+

Adapté de Jones CB et coll. Matrix metalloproteinases : A review of their structure and role in acute coronary syndrome. Cardiovascular Research. 2003; 59: 817.

Des travaux de manipulations génétiques variées sur des modèles animaux ont été effectués pour révéler l'identité des MMPs impliquées dans la progression de l'athérosclérose. Une réduction de la taille de la plaque athéromateuse a été enregistrée au cours d'une étude sur des souris transgéniques, déficientes en TIMP-1 (dans lesquelles l'activité des MMPs est augmentée) (418). Par contre, une autre étude menée par les mêmes auteurs sur des souris transgéniques déficientes en MMP-3 (MMP-3 knockout mice) et nourries au cholestérol pendant 30 jours, démontre une augmentation dans la taille de la plaque (419). Galis et coll. ont utilisé les carotides de souris transgéniques

déficientes en MMP-9 (MMP-9 knockout mice) pour démontrer que la déficience en MMP-9 résulte en une réduction de l'hyperplasie intimale et de rétrécissement luminale, et aussi en une accumulation de collagène interstitiel (303). Les auteurs spéculent donc que l'inhibition de la MMP-9 peut renforcer la stabilité mécanique des artères en augmentant leur teneur en collagène et en réduisant le rétrécissement luminale.

MMPs et rupture de la plaque

Étant donné que l'athérosclérose est principalement une lésion qui progresse grâce à une série de réactions induites par un mécanisme de réparation de la lésion intimale (420), la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire semble être largement contrôlés. Cependant, l'implication spécifique des lipides dans ce type de lésion fait diviser la plaque vulnérable en 2 portions : une cape fibreuse constituant la couche superficielle et un cœur lipidique (lipid cores) constituant la couche interne. Des grandes quantités de matrice extracellulaire sont déposées dans la cape fibreuse et maintenues par les forces tensiles de la plaque tandis que dans le cœur lipidique, en plus du dépôt lipidique, la dégradation de la matrice extracellulaire est potentialisée conduisant à une augmentation de la fragilité de la plaque et, éventuellement, à sa rupture (421). Plusieurs travaux soulignent le rôle joué par les MMPs dans la dégradation de la cape fibreuse vulnérable. En effet, la rigidité de la cape fibreuse est attribuée essentiellement au collagène du type I et III, ainsi qu'à l'élastine et aux protéoglycanes (422-425). L'accumulation des cellules spumeuses dérivant de macrophages (macrophage-derived foam cells) dans les lésions athérosclérotiques est corrélée à une sécrétion locale accrue des MMPs et à la formation d'une fine cape fibreuse (305, 426). Les résultats découlant des études faites chez des patients athéromateux indiquent que la MMP-2 est largement

exprimée dans les plaques coronaires et son activation correspond avec une calcification de la plaque (427-429). La même observation a été enregistrée pour les MMP-9, MMP-1 et MMP-13 dans les plaques des patients qui ont subi une ablation de la plaque au niveau de carotides (endartérectomie) (430, 431). L'expression de la MMP-1 est aussi augmentée au niveau des lésions coronaires mises sous un stress mécanique élevé (432). Les MMP-7 et MMP-12 semblent jouer un rôle important dans la rupture de la plaque, suite à leur expression dans les plaques athérosclérotiques par les cellules spumeuses des coeurs lipidiques. Plus récemment, il fut reporté que la MMP-8 (collagénase de neutrophiles) est exprimée par les cellules endothéliales, les CML et les macrophages (311) et que son activité est augmentée dans les régions de plaques vulnérables à la rupture (311, 433). De même, la MMP-3 est exprimée par les cellules des plaques athérosclérotiques mais non par les cellules des artères normales (428, 434-436). La MMP-11 est aussi présente au niveau des plaques athérosclérotiques mais son activité s'exprime en dehors de la matrice par une action sur la cascade de coagulation (activité fibrinolytique) (437). Finalement, la MMP-14 co-localise avec la MMP-2 dans les plaques athérosclérotiques au niveau de la couche sous-jacente des régions fibreuses et riches en lipides (312). D'autres affirmations associant les MMPs aux ruptures des plaques viennent s'ajouter à partir des données associant la COX et la prostaglandine E₂ synthase (PGES) à la production des MMPs. Les plaques vulnérables à la rupture expriment des concentrations en MMP-2 et en MMP-9 ainsi qu'en COX-2 et PGES qui sont significativement plus grandes que celles exprimées dans les plaques moins vulnérables (378).

3.6.3 Les MMPs dans la thrombose

La rupture des plaques athéromateuses conduit à un afflux de sang dans l'intima et le cœur lipidique des plaques. Il s'ensuit une série d'événements incluant l'agrégation plaquettaire et la formation d'un thrombus (la thrombose) qui peut entraver ou même bloquer le torrent circulatoire dans les artères aboutissant au syndrome coronaire aigu (438). La thrombose dans une artère coronaire implique des interactions complexes entre la matrice sous-endothéliale, l'endothélium, les plaquettes, les leucocytes, et certaines protéines plasmatiques telles que le vWf et le fibrinogène. L'adhésion plaquettaire est médiée principalement par l'interaction de vWf avec les glycoprotéines plaquettaires GPIb et GPIIb/IIIa. La GPIb est impliquée principalement dans l'adhésion plaquettaire tandis que la GPIIb/IIIa contribue aux étapes subséquentes de l'agrégation plaquettaire (439), ce qui peut résulter en la formation d'un thrombus occlusif. Les mécanismes régissant la formation des thrombus occlusifs diffèrent selon les forces de cisaillement en présence (65).

Certaines MMPs ont une action directe sur la formation du thrombus. La MMP-1 est localisée dans la membrane plasmique des plaquettes où elle modifie l'intégrine GPIIb/IIIa induisant ainsi une phosphorylation intracellulaire de résidus tyrosine et prime les plaquettes pour l'agrégation (25). La MMP-2 est localisée dans le compartiment cytosolique des plaquettes humaines et est translocée à la surface cellulaire pour être sécrétée durant l'agrégation (23). La MMP-2 potentialise l'expression de GPIb induite par le vWf et l'adhésion des plaquettes (365). De même, la MMP-2 amplifie l'effet pro-agrégant du collagène sur les plaquettes par un mécanisme indépendant du TXA₂ car l'utilisation de l'aspirine est incapable d'inhiber cet effet (24). Par contre, certaines

MMPs exercent un effet inhibiteur sur l'agrégation plaquettaire : des concentrations élevées de MMP-2 et de MMP-9 peuvent inhiber l'agrégation plaquettaire (18, 24).

3.6.4 Les MMPs dans la resténose

L'angioplastie coronarienne transluminale (PTCA) est, à l'heure actuelle, une procédure largement pratiquée en revascularisation. En dépit de son efficacité et de sa contribution dans le traitement des artères coronariennes obstruées par la formation d'une plaque athéromateuse, d'un spasme ou d'un thrombus, cette intervention initie une séquence d'événements conduisant à une resténose artérielle. En effet, dans les 15 premières minutes après le PTCA, la constriction élastique immédiate de l'artère « elastic recoil », les réponses thrombo-inflammatoires et la sécrétion locale de cytokines, de facteurs de croissance et de molécules vasoactives contribuent à la réorganisation du thrombus. Ces réactions précoces sont suivies par une hyperplasie néointimale provoquée par la prolifération et la migration des CML du média vers l'intima avec formation d'une nouvelle matrice extracellulaire et une réduction de la lumière vasculaire ou resténose (440-441). Ces phénomènes impliquent également des changements adaptés et chroniques dans la structure vasculaire causant des changements dimensionnels de l'artère ou remodelage. Ceci inclut des altérations dans les conditions hémodynamiques dues aux facteurs de croissance et aux substances vasocatives locaux et la production/dégradation de la matrice extracellulaire (442-445). Une contribution possible des MMPs dans ce processus peut consister en une digestion et un remodelage des artères dilatées. Une augmentation dans l'expression des MMPs a été constatée chez des sujets ayant subi une angioplastie. Par exemple, il a été prouvé dans un modèle porcin qu'une

angioplastie carotidienne est accompagnée d'une augmentation de l'expression de MMP-2 et de MMP-9 (446). Jenkins et coll. ont constaté une élévation de l'activité de la MMP-2 dans la néointima après une angioplastie des artères carotidiennes du rat, et que cette activité coïncide avec une migration des CML et une activation de la MMP-14 (447). Les mêmes données ont été confirmées par des études cliniques réalisées chez des patients qui ont subi des interventions de PTCA. Hojo et coll. ont constaté une élévation de l'expression et de l'activité de MMP-2 dans la circulation coronaire après l'angioplastie et qu'une corrélation positive existe entre les niveaux de MMP-2 et le degré de resténose angiographique (448 et tableau V). Il est à noter que l'angioplastie suivie de l'implantation d'un stent intravasculaire déclenche une réaction inflammatoire plus importante de que lorsque l'artère n'est que simplement dilatée. En effet, 2 fois plus de collagène s'accumulent, l'activité de la MMP-2 et de la MMP-9 est 2 fois plus importante et la prolifération cellulaire est de 4 fois supérieure dans des artères stentées comparativement aux artères seulement dilatées.

Des études ont aussi considéré l'effet positif de l'inhibition des MMPs dans la prévention de resténose. L'inhibition des métalloprotéinases après implantation d'un stent intravasculaire parvient à limiter l'accumulation de collagène, la formation de néointima et la resténose, sans influencer la prolifération des CML. Une étude réalisée par Smet et coll. a démontré que l'inhibition des MMPs par le Batimastat après une angioplastie chez les porcs induit une réduction du rétrécissement lumenale (449). Cependant, cette étude démontre une réduction du remodelage constrictif et non pas une inhibition de l'hyperplasie intimale. De façon similaire, Li et coll. ont investigué les effets de GM 60001, un inhibiteur des MMPs, dans les artères iliaques des lapins ayant subi

l'angioplastie. Ils découvraient qu'une semaine de traitement post-angioplastie réduisait significativement l'extension de l'hyperplasie intimale et la déposition de collagène (450). D'autre part, Cher et coll. n'ont pas observé une réduction d'hyperplasie intimale ou de resténose constrictive post-angioplastie en utilisant le RO113-2908, un inhibiteur de MMPs à large spectre, chez les singes *Cynomologus* (451).

Plusieurs autres études ont exploré le rôle de la thérapie génique comme un moyen d'inhibition de l'activité des MMPs après le PTCA. Le transfert du gène du TIMP-1 réduisait l'épaississement intimal et la migration des CML dans un modèle humain et animal de resténose (452-454). Une autre étude menée par Cheng et coll. chez des rats dont les CML ont été infectées par un TIMP-2-adénovirus, montre une diminution du pouvoir invasif des CML et un retardement de l'hyperplasie intimale après une angioplastie carotidienne (455). Des résultats similaires ont été obtenus par le transfert de gène du monoxyde d'azote synthase endothéliale (eNOS). La présence de cette enzyme diminue significativement l'activité de la MMP-2 et de la MMP-9 et augmente la sécrétion de TIMP-2 (456).

L'utilisation des inhibiteurs de métalloprotéinases permet de reproduire les résultats obtenus par transfert génétique du gène du TIMP-1. En plus de limiter la formation de la néointima, il y a une diminution de l'accumulation du collagène et une réduction de la réponse constrictive suivant l'angioplastie (457, 458). D'autre part, l'utilisation de l'Abciximab (Reopro®) diminue grandement la migration des CML par 66% et l'activation des métalloprotéinases (MMP-2 et MMP-9) par 75%, sans affecter TIMP-1 (459). Si l'on parvient à inhiber les MMPs durant les 14 à 28 jours suivant l'angioplastie, le remodelage négatif associé à ce type d'intervention est inhibé. Ceci

suggérant que les mécanismes délétères dépendants des MMPs lors du remodelage négatif ne sont pas principalement actifs que lors des deux semaines suivant l'intervention (460). L'étude génétique de séquences des gènes des MMPs en relation avec les différentes pathologies cardiovasculaires soulève l'importance d'un polymorphisme dans la séquence promotrice du gène de la MMP-3 comme étant un facteur de risque pour le développement de resténose (461), et une autre étude au niveau coronarien démontre que la MMP-3 est associée à un remodelage positif (462).

Les TIMPs participent aussi aux réactions vasculaires suite à un endommagement artériel. Dans une étude de Dollery et coll., il fut démontré que le TIMP-4 voit son expression et sa localisation dans la paroi vasculaire modifiées après endommagement endothélial. Vingt quatre heures suivant la procédure d'angioplastie carotidienne chez le rat, on dénote la présence de TIMP-4, tant au niveau de la synthèse protéique que de son ARN messenger, dans l'adventice. Au jour 7 et 14 après l'intervention, le TIMP-4 se retrouve aussi dans la média et la néointima. Le rôle de TIMP-4 pourrait être de freiner la migration des CML, car l'utilisation de TIMP-4 recombinant, dans un essai de migration des CML dans une matrice de Matrigel, inhibe de 50% la migration des cellules (463).

Jusqu'à présent, peu d'études ont évalué l'importance des MT-MMP dans les pathologies cardiovasculaires. L'une d'entre elles révèle la participation de la MT-MMP3 au niveau des plaques athérosclérotiques en association avec les macrophages (308). Les mêmes observations s'appliquent aussi à la MT-MMP1 (312).

Problématique et hypothèse

Il est bien établi aujourd'hui, que les réactions thrombo-inflammatoires sont au coeur de plusieurs pathologies vasculaires et, en particulier, celles qui surviennent suite à l'angioplastie coronarienne menant à la resténose (27, 464-468). Ces réactions thrombo-inflammatoires sont gouvernées par une série d'interactions homo - et hétérotypiques entre les différents éléments figurés du sang et plus spécifiquement, entre les plaquettes et les leucocytes. Peu de temps après le PTCA, les interactions plaquettes-leucocytes, via leurs protéines adhésives la P-sélectine et le PSGL-1, initient les réactions thrombo-inflammatoires, induisent la sécrétion des substances vasoactives (cytokines, facteurs de croissance, MMPs, etc.) et favorisent la progression de la resténose (8-16, 469). En effet, l'inhibition de la liaison des plaquettes aux neutrophiles avec des anti-P-sélectine ou avec une forme soluble recombinante du PSGL-1 (rPSGL-Ig) a donné des résultats bénéfiques dans des modèles animaux de thrombose veineux (470), d'ischémie-reperfusion (471, 472), d'hyperplasie intimale post-angioplastie, et de thrombose artérielle (473, 474). Bienvenue et coll. ont investigué l'effet du rPSGL-Ig sur l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles dans un modèle porcin de double angioplastie des artères carotides (28). Ils ont aussi examiné l'effet d'un tel traitement sur le développement de la resténose. L'administration de rPSGL-Ig, 15 minutes avant la deuxième angioplastie, réduit significativement l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles aux surfaces artérielles endommagées et ce jusqu'à 4 semaines post-angioplastie. De plus, une augmentation de 63% de la lumière vasculaire des artères traitées comparativement avec celles des artères

témoins a été enregistrée 4 semaines après l'angioplastie. Cette même étude a montré que l'inhibition de la resténose par le rPSGL-Ig, était principalement due à un remodelage positif des artères traitées. Ces résultats étaient en accord avec d'autres études montrant une inhibition du remodelage et de la formation néointimale chez des souris déficientes en P-sélectine (P-selectin knock-out mice) (475).

Ces études mettent en évidence l'importance de la liaison entre la P-sélectine plaquettaire et le PSGL-1 des neutrophiles dans les réponses aux lésions artérielles produites par angioplastie. Elles indiquent aussi que le blocage de la P-sélectine avec le rPSGL-Ig réduit les événements thrombotiques et inflammatoires et inhibe la resténose en induisant un remodelage positif des artères dilatées. Ainsi, l'élucidation et la compréhension des modalités et des mécanismes régissant l'interaction P-sélectine/PSGL-1 peuvent mener à identifier de nouveaux mécanismes et au développement des traitements plus efficaces dans la prévention des désordres thrombotiques et de la resténose.

L'hypothèse principale de notre étude est que les interactions adhésives entre les plaquettes et les neutrophiles, via la P-sélectine et le PSGL-1, modulent la sécrétion des MMPs. Plus spécifiquement, les objectifs spécifiques du travail visent à caractériser la sécrétion de la MMP-2 et de la MMP-9 par les plaquettes et les neutrophiles ainsi que les effets des antagonistes des sélectines sur cette sécrétion et sur l'agrégation plaquettes-neutrophiles.

Contribution Originale**Neutrophil PSGL-1 Binding to Platelet P-Selectin Enhances MMP-2
Secretion and Platelet-Neutrophil Aggregation**

Haissam Abou-Saleh; Jean-François Théorêt; Daniel Yacoub and Yahye Merhi.

Short Title : P-Selectin and platelet MMP-2 secretion

Journal Subject Heads : Thrombosis, Platelets, Secretion, Aggregation

Word Count : 4395

Cet article a été soumis à Thrombosis and Haemostasis

From the Research Center (H.A.S., J.F.T., D.Y., Y.M.), Montreal Heart Institute and University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence to Yahye Merhi, PhD, Laboratory of Experimental Pathology, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street East, Montreal, Quebec, Canada H1T 1C8. Tel. (514) 376-3330 ext. 3035; Fax (514) 376-1355; [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED] [REDACTED]

Abstract

Background - Platelets and neutrophils constitute a high source of metalloproteinase-2 (MMP-2) and-9 (MMP-9), respectively; and their interactions via P-selectin and PSGL-1 are involved in the thrombo-inflammatory reactions that lead to thrombosis, vascular remodeling and restenosis. In this study, we investigated the impact of P-selectin binding to PSGL-1 on platelet MMP-2 secretion and function in platelet and neutrophil aggregation.

Methods and results - The secretion of MMP-2 from human platelets, as detected by zymography, was significantly increased by 3 fold after thrombin activation and further enhanced by 2 fold in the presence of neutrophils. Neutrophil releasate was without any significant effect on platelet MMP-2 secretion. While no MMP-2 was detected in the supernatant of resting and activated neutrophils, high amount of MMP-9 was released by neutrophils, but unchanged by thrombin activation or the presence of platelets. Platelet P-selectin expression increased significantly after activation and triggers platelet binding to neutrophils, which was completely inhibited by a recombinant soluble form of PSGL-1 (rPSGL-Ig) and blocking monoclonal antibodies against P-selectin and PSGL-1, and reduced by 50% in the presence of a GPIIb/IIIa antagonist (Reopro). In addition, P-selectin or PSGL-1 antagonism abolished the enhanced MMP-2 secretion by activated platelets in the presence of neutrophils and reduced platelet-neutrophil aggregation.

Conclusion - Platelet activation and binding to neutrophils enhance the secretion of platelet MMP-2 via an adhesive interaction between P-selectin and PSGL-1, which contribute to increased platelet-neutrophil aggregation.

Key Words : Platelets, Leukocytes, Cell Adhesion Molecules, Metalloproteinases

Introduction

Platelets and leukocytes participate in the maintenance of normal homeostasis and are actively involved in many thrombo-inflammatory reactions. The interactions among platelets, leukocytes and endothelial cells are governed by specific cell adhesion molecules that induce homotypic and heterotypic binding between these cells in coronary artery disease.¹ More specifically, the aggregation of platelets and their interactions with neutrophils constitute part of the reactions that link homeostasis to inflammation.²⁻⁴ Binding of activated platelets to neutrophils is mainly mediated by platelet P-selectin and its high-affinity ligand on neutrophils, P-Selectin-Glycoprotein-Ligand-1 (PSGL-1).⁵⁻⁷ This adhesive interaction between platelets and neutrophils may facilitate modulation of each other's activity and favor biochemical cooperation or exchange in the generation of intracellular signals leading to the secretion of various vasoactive substances including leukotrienes, cytokines, reactive oxygen species, growth and coagulation factors and matrix metalloproteinases (MMPs).⁸⁻¹⁶

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a multigene family of over 25 secreted and cell surfaces enzymes known to remodel the extra cellular matrix in many physiological and pathological processes such as angiogenesis, platelet aggregation, thrombosis, cell migration and proliferation, wound repair and fetal growth.¹⁷⁻¹⁹ Metalloproteinases share various features such as Zinc-dependent catalytic site, requirement of Ca²⁺ for activity, and biosynthesis as pro-enzymes requiring activation.²⁰ Gelatinase A (MMP-2 or type IV collagenase) and gelatinase B (MMP-9 or type V collagenase) have relative molecular weight of 72 and 92 kDa respectively, and belong to the group of MMPs that degrade components of the extra cellular matrix and largely contribute to its remodeling.

Following secretion, these enzymes are activated in the extra cellular microenvironment into their activated forms of 64 kDa MMP-2 and 86 kDa MMP-9.^{21,22} In resting platelets, MMP-2 is randomly distributed in the cytosol without detectable association with platelet granules and is rapidly translocated to the plasma membrane upon activation by agonists such as thrombin and collagen, and then released as a pro-enzyme in the extracellular space.²³ This release is concentration-dependent and the pro-enzyme is activated in the extracellular microenvironment by specific cell-surface events.^{23,24} MMP-9 is stored in the gelatinase granules of neutrophils, released following activation by inflammatory mediators, and activated outside the cells.²⁵ MMP-9 is also found in platelets, but in a smaller quantity than MMP-2. Non-aggregated platelets release MMP-9 basally, and this release reached its maximum upon stimulation with thrombin.¹⁸

We have previously reported that platelet P-selectin antagonism with a recombinant and soluble form of PSGL-1 (rPSGL-Ig) inhibits circulating activated platelet binding to neutrophils induced by damaged arterial surfaces,²⁶ reduce the adhesion of platelets and neutrophils, and prevents restenosis after angioplasty and stenting of porcine coronary arteries.^{27,28} Interestingly, inhibition of restenosis with P-selectin antagonism was mainly related to a positive impact on vascular remodeling, which suggest that platelet and neutrophil interactions modulate MMPs and extra cellular matrix reorganization.²⁷

In this study, we sought to demonstrate that neutrophil binding to platelets via PSGL-1 and P-selectin enhances platelet MMP-2 secretion and platelet-neutrophil aggregate.

Materials and Methods

Preparation of Platelets

Venous blood (60 ml) was withdrawn from healthy volunteers free from medication known to interfere with platelets and neutrophils functions at least 10 days before the experiments. The protocol was approved by the ethical committee of the Montreal Heart Institute. The blood obtained from the anticubital vein through a 19-gauge butterfly needle, was collected in syringes containing acid citrate dextrose (ACD) in a ratio of 5 parts blood to 1 part ACD. Platelets were prepared as previously described.^{26,29,30} Briefly, platelet rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation of whole blood at 500 g for 15 minutes. Platelets were then obtained by centrifugation of PRP for 10 minutes and resuspended in Hanks balanced salt solution-HEPES buffer with 0.4 mmol/L : ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (HBSS-EDTA) pH 6.5 free from Ca^{2+} and Mg^{2+} . After removal of red blood cells by a low centrifugation, the isolated platelets were resuspended in a HBSS-HEPES buffer pH 7.4 with Ca^{2+} (CaCl_2 1.3 mmol/L) and Mg^{2+} (MgSO_4 0.81 mmol/L) and adjusted to a final concentration of $500 \times 10^6/\text{ml}$, using an automated cell counter (T890, Coulter). The purity of platelet suspension normally exceeded 99% as determined by an electronic Coulter counter and by light microscopy examination. Platelets were not activated by the isolation procedure as determined by the low level of P-selectin expression at baseline.

Preparation of Neutrophils

Neutrophil preparation was carried out as previously reported.^{26,29,30} After PRP collection, during the platelet preparation procedure, the lower phase was treated with an equal volume of HBSS-HEPES citrate (dihydrate sodium citrate 12.9 mmol/L) buffer pH 7.4 without Ca^{2+} and Mg^{2+} that contained 4% dextran (MW 260 kDa, Sigma). After 35 to 40 minutes sedimentation, the leukocyte-rich suspension was washed, layered over an equal volume of Ficoll-Paque gradient separation medium (Pharmacia Biotech), and centrifuged at 400 g for 30 minutes. After hypotonic lysis of red blood cells, the isolated neutrophils were resuspended in HBSS-HEPES with Ca^{2+} and Mg^{2+} and adjusted to a final concentration of $5 \times 10^6/\text{ml}$, using an automated cell counter. This procedure yielded a neutrophil population that is over 95% pure as determined by Coulter counter and Wright-Giemsa staining and more than 95% viable, as assessed by the Trypan blue exclusion test.

In some experiments, neutrophil releasate was obtained by stirring $5 \times 10^6/\text{ml}$ of the isolated neutrophils in the aggregometer at 1000 rpm for 15 minutes, followed by centrifugation at 2500 g for 3 minutes to separate neutrophils from neutrophil releasate.

Lumi-aggregometry

Platelets alone and in the presence of neutrophils in a physiological ratio or neutrophil releasate were co incubated in a 4-channel lumi-aggregometer (Chronolog) under shearing conditions (1000 rpm) at 37°C. The concentration of platelets and neutrophils remained constant in all experiments. Five minutes before the initiation of the aggregation process, a recombinant soluble form of PSGL-1, rPSGL-Ig (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,

Wyeth/Genetics Institute), an anti P-selectin Mab, P8G6 (2 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology), an anti PSGL-1 Mab, KPL-1 (2 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology) or an anti GPIIb/IIIa antagonist (Reopro, 100 nmol/L, Centocor) were preincubated with the different suspensions. Platelet and platelet-neutrophil aggregation was initiated by adding thrombin (0.1 U/ml) and monitored by Aggro-Link software for 5 minutes. The percentage and the slope of the aggregation process were recorded and their index (% aggregation x slope) was calculated. After 15 minutes, the suspensions were centrifuged and the supernatants collected to analyze MMPs by gelatin zymography.

Gelatin Zymography

The presence of gelatinases released from platelets and neutrophils was assessed by Zymography.^{18,23,24,31,32} Briefly, the samples obtained from the aggregometer were centrifuged at 2500 g for 5 minutes to pellet the cells. Fifty-five (55) µl of the different supernatants was then analyzed at 4°C on an 8% SDS-PAGE gel containing 2 mg/ml gelatin (Sigma). The gel was then washed twice and incubated overnight on a shaker at room temperature with rinse buffer containing 2.5% Triton X-100. The Triton X-100 wash extracted SDS, allowing gelatinases to renature within the gel. The following day, the gel was incubated 48 hours in enzyme assay buffer (38 mmol/L Tris-maleic acid hydrochloride, 13 mmol/L pH 7.5, CaCl₂ anhydrous, 0.02% NaN₃) for the development of enzyme activity bands. After incubation, the gel was washed twice with water for 15 minutes and stained with 0.2% Coomassie brilliant blue {methanol : acetic acid : water (4:1:6)} for 1 h and destained in 40% methanol with 10% acetic acid until gelatinases

activity appears as clear bands against a dark background. The gels were then scanned and the density of the bands was measured.

Flow Cytometry

The expression of platelet P-selectin, neutrophil PSGL-1, and platelet binding to neutrophils were assessed by flow cytometry as described previously.^{26,29,30} All samples were analyzed within 6 hours on a Coulter Altra cytofluorometer (Beckman Coulter, Inc.) using single- or double-color immunofluorescence staining with saturating concentration of fluorescence dye-conjugated mAbs. Non-specific binding was excluded by using appropriately labeled isotype-matched IgGs. Platelets and neutrophils were identified and gated by their characteristic forward- and side-scatter properties. For one-color analyses of platelets, antibody binding was determined as the percentage of positive platelets and the mean fluorescence intensity. For double-color analyses, the fluorescence threshold was set to analyze only dual FITC- and PE-labeled cells, corresponding to neutrophils exhibiting platelet-CD62P fluorescence from 5000 cells in each sample. The results are presented as the percentage of positive cells with the relevant antibody minus the percentage of positive cells with the isotype-matched control.

Results

MMP-2 and MMP-9 in Platelets and Neutrophils

As shown in Figure 1A, gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) are secreted as proenzymes with a relative molecular weight of 72 kDa and 92 kDa respectively. Using gelatin zymography (Figure 1A) and densitometry measurements (Figure 1B), we

assessed MMP-2 and MMP-9 secreted by platelets, neutrophils and their mixture at baseline and following activation with thrombin. We found that platelets at baseline readily release a small quantity of MMP-2 (0.14 D.O units), which is increased significantly by 3-fold upon platelet activation with thrombin to 0.44 D.O units. Also, MMP-9 was released from platelets, but in smaller amount than MMP-2. In contrast, no trace of MMP-2 was detected in neutrophils, which secrete a high amount of MMP-9. Neutrophil MMP-9 secretion was not affected by thrombin or platelets. In contrast, when platelets were activated in the presence of neutrophils, MMP-2 secretion was further increased by 2 folds to 0.78 D O units, when compared to activated platelets alone. This increase of MMP-2 secretion was not observed when neutrophils were substituted with neutrophil releasate. Therefore, these results suggest that a close physical contact between platelets and neutrophils is required to enhance platelet MMP-2 secretion.

P-selectin and PSGL-1 in Platelet-neutrophil Binding

As shown in Figure 2A, P-selectin is present on the surface of few resting platelets (10%) and increase significantly to 90% after platelet activation. In contrast, PSGL-1 is constitutively expressed on neutrophils. The increase in P-selectin translocation to the surface of activated platelets is associated with the formation of platelet-neutrophil aggregates (PNA) as 80% of neutrophils exhibit platelet-associated labeling, whereas only 10% of neutrophils bind to inactivated platelets. The number of platelets that bind 100 neutrophils, which is representative of PNA, is presented in Figure 2B. At baseline, PNA averaged 26 platelets/100 neutrophils and increased significantly to 320 after thrombin activation. Blocking platelet P-selectin or neutrophil PSGL-1 almost completely

inhibited PNA. In addition, Reopro, a GPIIb/IIIa antagonist, was less efficient as it prevented 50% of PNA. These results depict that once P-selectin is translocated to the platelet membrane, it binds neutrophil PSGL-1 to form PNA.

P-selectin and PSGL-1 in Neutrophil-induced Platelet MMP-2 Secretion

Since platelet/ neutrophil adhesive interaction was inhibited by blockade of the P-selectin/PSGL-1 bond, we investigated its capacity to influence platelet MMP-2 secretion. In Figure 3, either P-selectin or PSGL-1 antagonism totally prevented the increased secretion of MMP-2 by activated platelets in the presence of neutrophils. The same effect was also obtained with GPIIb/IIIa antagonism using Reopro.

P-selectin and PSGL-1 in Platelet-neutrophil Aggregation

Showing that platelet-neutrophil interaction influences platelet MMP-2 secretion and that MMP-2 is a proaggregatory enzyme, we assessed the aggregation of platelets in the presence of neutrophils and the effects of P-selectin antagonism. Figure 4A shows that P-selectin or PSGL-1 antagonism slowed and reduced the aggregation response of platelets in the presence of neutrophils. Of note, GPIIb/IIIa antagonism was more effective than P-selectin antagonism in inhibiting platelet aggregation. The index of platelet aggregation was inhibited by approximately 50% with P-selectin or PSGL-1 antagonism and by more than 80% with the GPIIb/IIIa antagonist, Reopro.

Discussion

In this study, we examined platelet and neutrophil interactions that are relevant to MMPs secretion and platelet-neutrophil aggregate formation. We found that MMP-2 is secreted by activated human platelets, a process that is greatly enhanced by the presence of neutrophils, but not by cell free neutrophil supernatant. In addition, blocking P-selectin or its ligand PSGL-1 abolished the effects of neutrophils on platelet MMP-2 secretion, by reducing platelet-neutrophil binding and aggregate formation. These effects, which are P-selectin and PSGL-1 dependent, suggest that the enhanced secretion of MMP-2 by platelets in the presence of neutrophils may be exacerbated at sites of thrombo-inflammatory reactions.

When platelets are activated, they express P-selectin on their surfaces, making them capable of binding and stimulating adjacent leukocytes, via PSGL-1. Consistent with these observations, we found that activated platelets binds neutrophils forming platelet-neutrophil aggregates that were completely inhibited by blocking P-selectin or PSGL-1. The ability of thrombin to induce platelet activation and binding to neutrophils is required to enhance MMP-2 secretion by platelets, but not MMP-9 secretion by neutrophils. In fact, neutrophils secrete a large amount of MMP-9 at baseline that is not affected by thrombin activation or by the presence of platelets. Although several studies have shown that platelet binding to leukocytes delivers outside-in signals that lead to activation and secretion of various vasoactive substances.⁸⁻¹⁵ More recently, it has been shown that synthesis of MMP-9 is increased following adhesion of monocytes to collagen and platelets, and is inhibited by P-selectin antagonism;¹⁶ but platelets alone were insufficient to induce signaling and MMP-9 synthesis. In addition, it seems that ligation of L-selectin

and the MAC-1 integrin are necessary to induce release of MMP-9 from human neutrophils.³³

In addition to their putative roles in the regulation of the extra-cellular matrix production and degradation during the remodeling process, MMPs are actively involved in platelet function. Indeed, Radomski et al have identified MMP-2 in human platelets and have shown that platelet aggregation stimulated by aggregating agents such as collagen and thrombin leads to the release of platelet MMP-2.^{18,23,24} This release mediates a non-ADP, non-thromboxane pathway of platelet aggregation. It seems that there is an interesting interplay between MMP-2 and MMP-9 in the regulation of the aggregation process. MMP-2 is believed to be a stimulator, whereas MMP-9 is an inhibitor of platelet aggregation.¹⁸ P-selectin participates, as well, in platelet aggregation by stabilizing initial GPIIb/IIIa-fibrinogen interactions, thereby allowing the formation of large stable platelet aggregates.³⁴ In this connection, we have shown that P-selectin antagonism, beside its effect on platelet-neutrophil binding, amplifies the anti-aggregatory potential of GPIIb/IIIa antagonist.³⁰ In addition, it has been shown that leukocyte adhesion to platelets, through P-selectin and PSGL-1, enhances platelet aggregation by increasing TxA₂ secretion.³⁵ There is evidence that MMP-2 regulates interactions between fibrinogen and its receptor,³⁶ as well as glycoprotein Ib and vWf,³⁷ suggesting that MMPs may directly modify cell surface integrins and platelet aggregation. In fact, not only MMP-2 secretion was inhibited by P-selectin and GPIIb/IIIa antagonism, but platelet aggregation in the presence of neutrophils was also reduced. The effects of P-selectin and PSGL-1 antagonism may be related to their effect on platelet-neutrophil binding and in part to reduced MMP-2 secretion; whereas the effect

of GPIIb/IIIa antagonism with Reopro is likely related to its inhibition of platelet aggregation, thus reducing the number of bound platelets to neutrophils and the secretion of MMP-2, as reported previously.³⁸

We hypothesize that P-selectin ligation could induce signaling that modulate platelet function. This was pointed out recently by studies showing that platelet P-selectin is linked to calcium mobilization and GPIIb/IIIa activation.^{39,40} The finding that neutrophils deliver a second signal for MMP-2 secretion by activated platelets extends previous reports showing that platelets induce gene expression in leukocytes and shows for the first time that engagement of platelet P-selectin by neutrophil PSGL-1 may delivers signals that regulate secretion of MMP-2.

Thrombosis, atherosclerosis and restenosis represent the major cardiovascular diseases associated with arterial lesions and endothelial dysfunction which often lead to unstable angina and myocardial infraction. These pathological complications are governed by a series of complex interactions between platelets, neutrophils and damaged arteries. During this process, platelets become activated and bind to neutrophils, as part of the thrombo-inflammatory reactions associated with arterial injury. In this connection, we have revealed that platelet interaction with neutrophils may be involved in arterial remodeling and restenosis. In fact, P-selectin antagonism with rPSGL-Ig was associated with a positive impact on arterial remodeling after angioplasty.²⁷ These findings are in agreement with previous results showing inhibition of remodeling and neointimal formation in P-selectin-deficient mice.⁴¹ In addition, we have demonstrated that this effect on vascular remodeling was associated with concomitant reductions in platelet and

neutrophil adhesion, suggesting a role of platelets and neutrophils in the remodeling process that may be related to interplay between MMP-2 and MMP-9.

In an attempt to explain this phenomenon, we have found that the binding of activated platelets to neutrophils increases the production of MMP-2 and influences platelet-neutrophil aggregation, which may be relevant to the thrombo-inflammatory reactions associated with vascular remodeling.

Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC). rPSGL-Ig was kindly provided by Dr Robert Schaub from Wyeth/Genetics Institute.

Q:\Secrétariat Central\beginu\publications\circulation\Neutrophil PSGL-I_has.doc

References

1. Jang Y, Lincoff M, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1994; 24: 1591-1601.
2. Nash GB. Adhesion between neutrophils and platelets : a modulator of thrombotic and inflammatory events? *Thromb Res.* 1994; 74 (suppl 1):S3-S11.
3. Freedman JE, Loscalzo J. Platelet-monocyte aggregates bridging thrombosis and inflammation. *Circulation.* 2002; 105:2130-2132.
4. Cambien B, Wagner DD. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med* 2004; 10:179-186.
5. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 1996; 88:3259-3287.
6. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest.* 1997; 100(Suppl):S97-S103.
7. Moore KL. Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk Lymphoma.* 1998; 29:1-15.
8. Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB, Ullman HL, Islam N, Sherhan CN, Rutherford LE, Korchak HM, Weissmann G. Formation of leukotrienes and other hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982; 109:130-137.
9. Coeffier E, Delautier D, Le Couedic JP, Chignard M, Denizot Y, Benveniste J. Cooperation between platelets and neutrophils for PAF-acether (platelet-activating factor) formation. *J Leukoc Biol.* 1990; 47:234-243.
10. Maugeri N, Evangelista V, Piccardoni P, Dell'Elba G, Celardo A, de Gaetano G, Cerletti C. Transcellular metabolism of arachidonic acid: increased platelet thromboxane generation in the presence of activated polymorphonuclear leukocytes. *Blood.* 1992; 80:447-451.
11. Cerletti C, Evangelista V, Molino M, de Gaetano G. Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes: role of cathepsin G and P-selectin. *Thromb Haemost.* 1995; 74:218-223.
12. Bonomini M, Stuard S, Carreno MP, Settefrati N, Santarelli P, Haeffner-Cavaillon N, Albertazzi A. Neutrophil reactive oxygen species production during hemodialysis: role of activated platelet adhesion to neutrophils through P-selectin. *Nephron.* 1997; 75:402-411.

13. Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinl C, May A, Schomig A. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation*. 1997; 95:2387-2394.
14. Ostrovsky L, King AJ, Bond S, Mitchell D, Lorant DE, Zimmerman GA, Larsen R, Niu XF, Kubes P. A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process. *Blood*. 1998;91:3028-3036.
15. Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, Totani L, Piccardoni P, Vestweber D, de Gaetano G, Cerletti C. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood*. 1999; 93:876-885.
16. Galt SW, Lindemann S, Medd D, Allen LL, Kraiss LW, Harris ES, Prescott SM, McIntyre TM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets. *Circ Res*. 2001;89:509-516.
17. Ray JM, Stetler-Stevenson, WG. The role of metalloproteinases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis, and angiogenesis. *Eur Respir J*. 1994; 7:2062-2072.
18. Fernandez-Patron C, Martinez-Cuesta MA, Salas E, Sawicki G, Wozniak M, Radomski MW, Davidge ST. Differential regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases-9 and -2. *Thromb Haemost*. 1999; 82:1730-1735.
19. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17: 463-516.
20. Woessner JF Jr. The family matrix metalloproteinases. *Ann NY Acad Sci*. 1994; 732: 11-21.
21. Vissers MC, Winterbourn CC. Activation of human neutrophil gelatinase by endogenous serine proteinases. *Biochem J*. 1998; 249: 327-331.
22. Mazzieri R, Masiero L, Zanetta L, Monea S, Onisto M, Garbisa S, Mignatti P. Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system : a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J*. 1997; 16 : 2319-2332.

23. Sawicki G, Sanders EJ, Salas E, Wozniak M, Rodrigo J, Radomski MW. Localization and translocation of MMP-2 during aggregation of human platelets. *Thromb Haemost.* 1998; 80: 836-839.
24. Sawicki G, Salas E, Murat J, Miszta-Lane H, Radomski MW. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature.* 1997; 386: 616-619.
25. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol.* 2001; 69:851-859.
26. Théorêt JF, Bienvenu JG, Kumar A, Merhi Y. P-selectin antagonism with recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-1g) inhibits circulating activated platelet binding to neutrophils induced by damaged arterial surfaces. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 298:658-664.
27. Bienvenu JG, Tanguay JF, Théorêt JF, Kumar A, Schaub RG, Merhi Y. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1-Ig reduces restenosis through inhibition of platelet-neutrophil adhesion after double angioplasty in swine. *Circulation.* 2001; 103:1128-1134.
28. Tanguay JF, Geoffroy P, Sirois MG, Libersan D, Kumar A, Schaub RG, Merhi Y. Prevention of in-stent restenosis via reduction of thrombo-inflammatory reactions with recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1. *Thromb Haemost.* 2004; 91:1186-1193.
29. Libersan D, Merhi Y. Platelet P-selectin expression: requirement for protein kinase C, but not protein tyrosine kinase or phosphoinositide 3-kinase. *Thromb Haemost.* 2003; 89:1016-1023.
30. Caron A, Théorêt JF, Mousa SA, Merhi Y. Anti-platelet effects of GPIIb/IIIa and P-selectin antagonism, platelet activation, and binding to neutrophils. *Cardiovasc Pharmacol.* 2002; 40:296-306.
31. Kazes I, Elalamy I, Sraer JD, Hatmi M, Nguyen G. Platelet release of trimolecular complex components MT1-MMP/TIMP2/MMP2: involvement in MMP2 activation and platelet aggregation. *Blood.* 2000; 96:3064-3069.
32. Oh LY, Larsen PH, Krekoski CA, Edwards DR, Donovan F, Werb Z, Yong VW. Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes. *J Neurosci.* 1999; 19:8464-8475.

33. Wize J, Sopata I, Smerdel A, Maslinski S. Ligation of selectin L and integrin CD11b/CD18 (Mac-1) induces release of gelatinase B (MMP-9) from human neutrophils. *Inflamm Res*. 1998; 47:325-327.
34. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation*. 2000; 102:1931-1936.
35. Faraday N, Scharpf RB, Dodd-o JM, Martinez EA, Rosenfeld BA, Dorman T. Leukocytes can enhance platelet-mediated aggregation and thromboxane release via interaction of P-selectin glycoprotein ligand 1 with P-selectin. *Anesthesiology*. 2001; 94:145-151.
36. Martinez MA, Salas E, Radomski A, Radomski MW. Matrix metalloproteinase-2 in platelet adhesion to fibrinogen: interactions with nitric oxide. *Med Sci Monit*. 2001; 7:646-651.
37. Radomski A, Stewart MW, Jurasz P, Radomski MW. Pharmacological characteristics of solid-phase von Willebrand factor in human platelets. *Br J Pharmacol*. 2001; 134:1013-1020.
38. Bendeck MP, Nakada MT. The beta3 integrin antagonist m7E3 reduces matrix metalloproteinase activity and smooth muscle cell migration. *J Vasc Res*. 2001; 38:590-599.
39. Sathish JG, Falati S, Croce K, Crump C, Furie BC, Furie B, Poole AW. Antibody cross-linking of human platelet P-selectin induces calcium entry by a mechanism dependent upon Fcgamma receptor IIA. *Thromb Haemost* 2004; 92:598-605.
40. Merten M, Beythien C, Gutensohn K, Kuhn P, Meinertz T, Thiagarajan P. Sulfatides activate platelets through P-selectin and enhance platelet and platelet-leukocyte aggregation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2005; 25:258-263.
41. Kumar A, Hoover JL, Simmons CA, Lindner V, Shebuski RJ. Remodeling and neointimal formation in the carotid artery of normal and P-selectin-deficient mice. *Circulation* 1997; 96:4333-4342.

Figure Legends

Figure 1. A) Representative gelatin zymography of MMP-2 and MMP-9, and B) densitometry measurements of MMP-2 secreted by resting and thrombin-activated

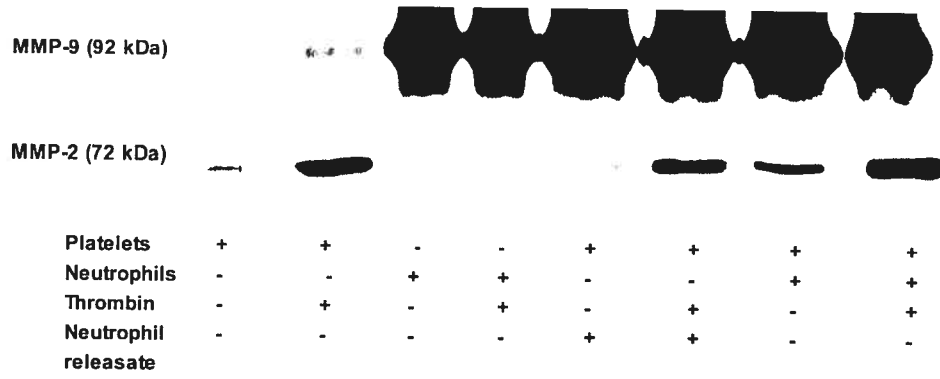
platelets, neutrophils and the mixture of platelet with neutrophils or with neutrophil releasate. In B, results represent the mean of at least 4 experiments; * $P < 0.05$ versus baseline, + $P < 0.05$ versus activated platelets alone.

Figure 2. **A)** Platelet P-selectin and neutrophil PSGL-1 expression, and platelet binding to neutrophils at baseline and after thrombin activation. **B)** The number of platelets/100 neutrophils and the effects of anti-P-selectin, anti-PSGL-1 or anti-GPIIb/IIIa (Reopro). Results represent the mean of at least 5 experiments; * $P < 0.05$ versus baseline and treatments.

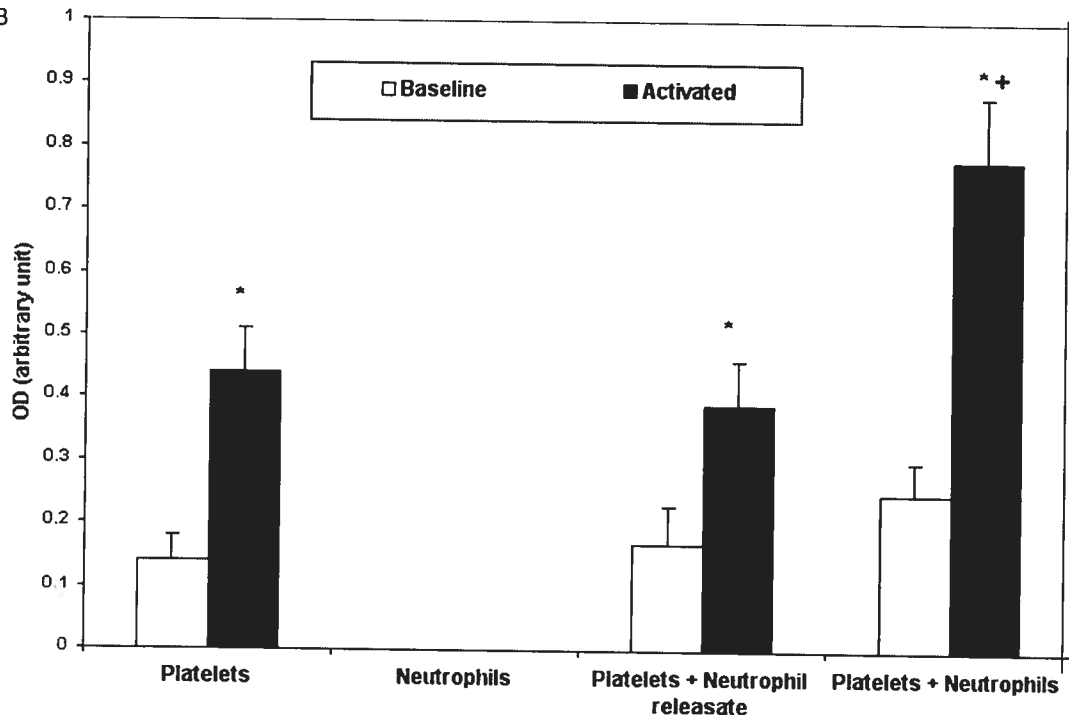
Figure 3. **A)** Representative gelatin zymography of MMP-2 secretion by thrombin-activated platelets alone or in the presence of neutrophils with and without anti-P-selectin, anti-PSGL-1 or anti-GPIIb/IIIa (Reopro). **B)** The ratio of the increase in activated platelet MMP-2 secretion in the presence of neutrophils with and without anti-P-selectin, anti-PSGL-1 or Reopro. Results represent the mean of at least 4 experiments, * $P < 0.05$ versus control and treatments.

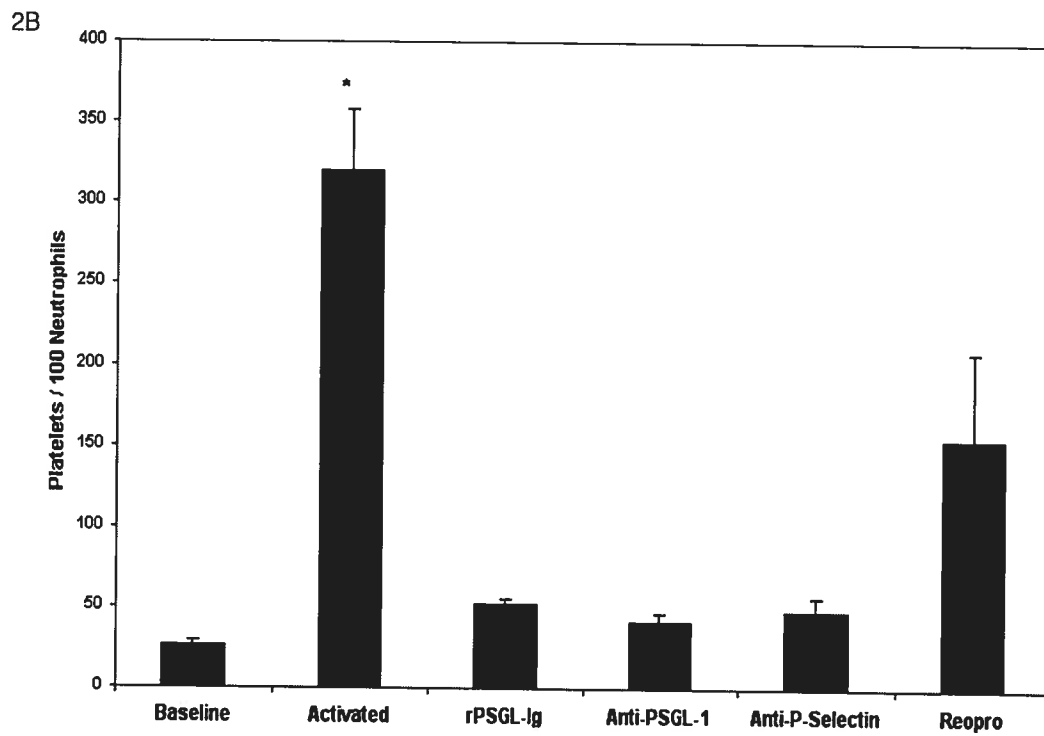
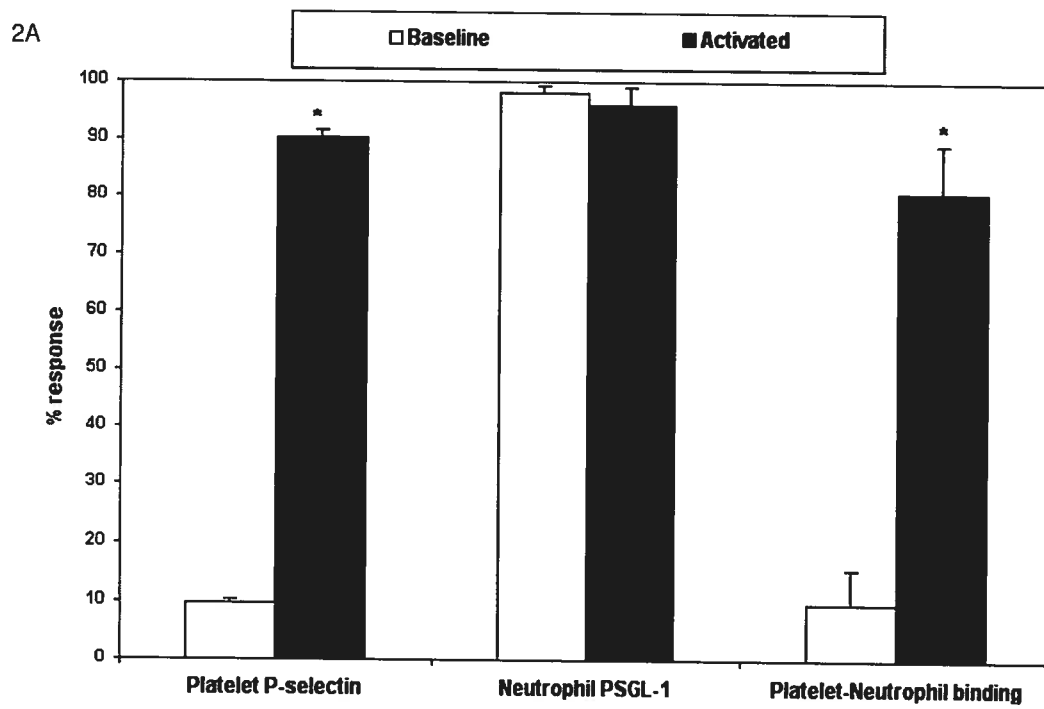
Figure 4. **A)** Representative trace of thrombin-induced platelet aggregation in the presence of neutrophils with and without anti-P-selectin, anti-PSGL-1 or Reopro. **B)** The mean and the slope of thrombin-induced platelet aggregation in the presence of neutrophils, and their index (10^2) with and without anti-P-selectin, anti-PSGL-1 or Reopro. Results represent the mean of at least 5 experiments, * $P < 0.05$ versus treatments.

1A

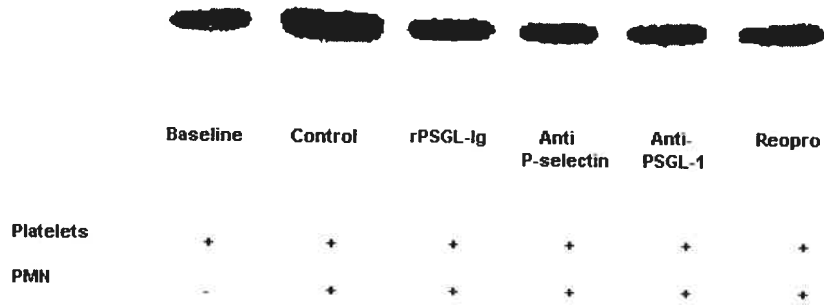


1B

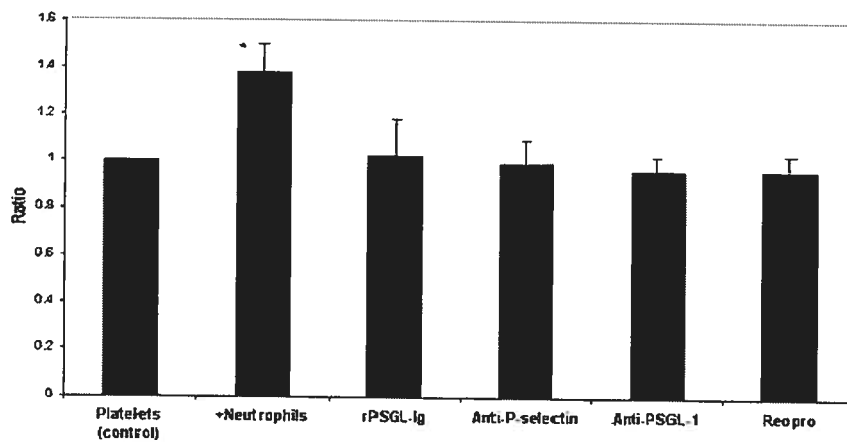




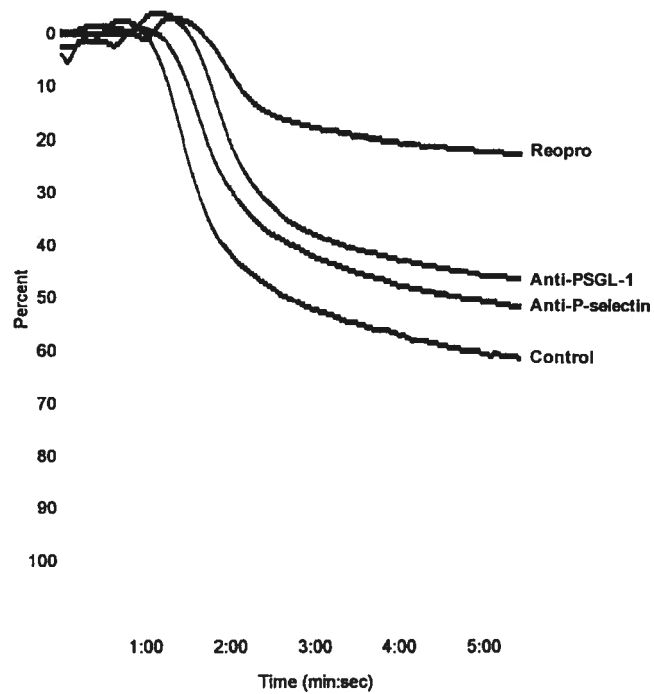
3A



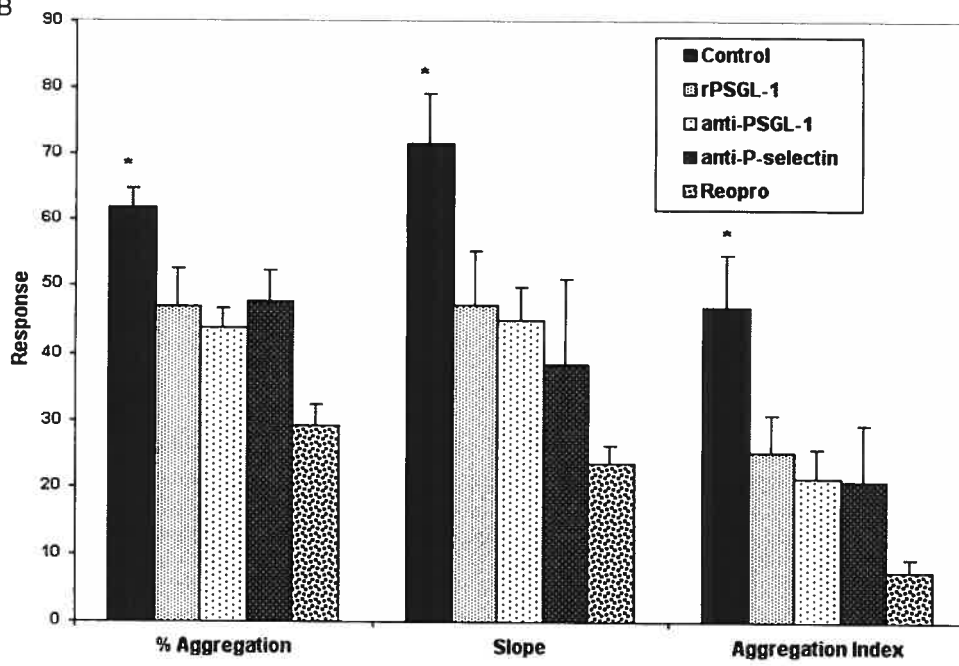
3B



4A



4B



Discussion et conclusion

Dans cette étude, on a investigué les interactions des plaquettes avec les neutrophiles et leurs effets sur la sécrétion des MMPs et l'agrégation plaquette-neutrophile. On a trouvé que :

- La liaison P-sélectine/PSGL-1 peut générer des signaux dans les plaquettes qui modulent la sécrétion de la MMP-2 :

Cette hypothèse a été consolidée par des études récentes qui montrent que la P-sélectine plaquettaire est associée à la mobilisation du calcium intracellulaire et à l'activation de la GPIIb/IIIa (478). Nos résultats montrant que les neutrophiles, par leur adhésion à la P-sélectine, génèrent des signaux pour la sécrétion de la MMP-2 par les plaquettes activées, étendent d'autres données qui stipulent que les plaquettes induisent une expression génique dans les leucocytes. Notre étude démontre, pour la première fois, que la liaison de la P-sélectine au PSGL-1 des neutrophiles peut générer des signaux dans les plaquettes pour induire la sécrétion accrue de MMP-2.

- La sécrétion de la MMP-2 par les plaquettes activées est augmentée en présence des neutrophiles mais non pas en présence de leurs surnageants :

En effet, la MMP-2 est produite par les plaquettes humaines activées, un processus qui est grandement favorisé par la présence physique des neutrophiles mais non pas quand les plaquettes sont incubées avec le surnageant des neutrophiles. Ceci met encore en relief la

signification biochimique de la liaison entre la P-sélectine plaquettaire et le PSGL-1 des neutrophiles dans la modulation de la fonction cellulaire.

- Les antagonistes de la P-sélectine ou de son ligand le PSGL-1 abolissent cet effet d'augmentation de la sécrétion de la MMP-2 en affectant la liaison des plaquettes aux neutrophiles et la formation d'un agrégat :

Quand les plaquettes sont activées, elles expriment la P-sélectine à leur surface, ce qui les rend aptes à lier et à stimuler les leucocytes adjacents via le PSGL-1. En se basant sur ces observations, on a trouvé que les plaquettes activées se lient aux neutrophiles et forment des agrégats plaquettes-neutrophiles qui étaient complètement inhibés en bloquant l'interaction P-sélectine/PSGL-1. La propriété de la thrombine de stimuler les plaquettes et d'induire leurs liaisons aux neutrophiles est sollicitée pour induire une sécrétion accrue de MMP-2 par les plaquettes. Toutefois, la thrombine ne semble avoir aucun effet sur la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles. En effet, les neutrophiles à l'état basal produisent des larges quantités de MMP-9, qui ne soient pas affectées par l'activation des neutrophiles avec la thrombine ou par la présence des plaquettes. Plusieurs études, cependant, ont montré que la liaison des plaquettes aux leucocytes génère des signaux extérieur-intérieur « outside-in signals » qui mènent à l'activation et à la sécrétion de plusieurs substances vasoactives (8-15). Plus récemment, il fut démontré que la sécrétion de MMP-9 induite par l'adhésion des monocytes aux plaquettes et au collagène est inhibée par blocage de la P-sélectine (16). Les plaquettes, seules, étaient incapables d'induire une signalisation et/ou une synthèse de MMP-9. De plus, il semble

que la liaison L-sélectine-CD11b/CD18 est importante pour l'induction et la synthèse de MMP-9 par les neutrophiles (476).

- Ces effets dépendants de la P-sélectine et du PSGL-1 suggèrent que la sécrétion de la MMP-2 par les plaquettes en présence des neutrophiles soit limitée aux sites des réactions thrombo-inflammatoires.

En plus de leur rôle putatif dans l'organisation de la matrice extracellulaire lors de processus du remodelage, les MMPs participent activement dans la régulation de la fonction plaquettaire. En effet, Radomski et coll. ont identifié la MMP-2 dans les plaquettes humaines et ont montré que les agonistes puissants comme la thrombine et le collagène provoquent la sécrétion de MMP-2 par les plaquettes (18, 23, 24). Cette sécrétion enclenche l'agrégation plaquettaire par une voie indépendante de l'ADP et de la TXA₂. Les contre-effets de la MMP-2 et de la MMP-9 sur l'agrégation plaquettaire stipulent qu'il existe un véritable enjeu entre ces 2 métalloprotéinases dans la régulation du processus d'agrégation : la MMP-2 favorise l'agrégation plaquettaire tandis que la MMP-9 la limite et l'inhibe (18).

De même, la P-sélectine contribue à l'agrégation plaquettaire en stabilisant le lien initial entre la GPIIb/IIIa et le fibrinogène, favorisant ainsi la formation de larges agrégats plaquettaires (179). Dans ce contexte, on a montré que les antagonistes de la P-sélectine, à côté de leurs effets sur l'interaction plaquette-neutrophile, amplifient le potentiel anti-agrégant des antagonistes de la GPIIb/IIIa (477). De plus, il a été démontré que l'adhésion des leucocytes aux plaquettes, via la P-sélectine et le PSGL-1 favorise

l'agrégation plaquettaire en induisant la sécrétion de la TXA₂ (183). Il existe aussi des évidences que la MMP-2 règle les interactions entre le fibrinogène et son récepteur (364), de même qu'entre le GPIb et le vWf (340), suggérant que les MMPs peuvent directement moduler les intégrines membranaires et l'agrégation plaquettaire. En effet, dans cette étude, l'utilisation des antagonistes de la P-sélectine ou de la GPIIb/IIIa n'inhibe pas seulement la sécrétion de MMP-2 par les plaquettes mais réduit aussi l'agrégation plaquettaire en présence des neutrophiles. Alors que les effets des antagonistes de la P-sélectine sont liés à leurs effets sur l'interaction plaquette-neutrophile et, en partie, à réduire la sécrétion de MMP-2; l'effet du Réopro (antagoniste de la GPIIb/IIIa) est probablement dû à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, réduisant ainsi le nombre des plaquettes lié aux neutrophiles et la sécrétion subséquente de la MMP-2 comme il a été décrit précédemment (459).

La thrombose, l'athérosclérose et la resténose représentent les principales maladies cardiovasculaires associées aux lésions artérielles et la dysfonction endothéliale; ils mènent souvent à l'angine instable et à l'infarction de myocarde. Ces complications pathologiques sont gouvernées par une série d'interactions complexes entre les plaquettes, les neutrophiles et les artères endommagées. Durant ce processus, les plaquettes s'activent et se lient aux neutrophiles constituant ainsi une partie des réactions thrombo-inflammatoires associées aux lésions artérielles. Dans ce contexte, on a démontré que les interactions des plaquettes avec les neutrophiles sont impliquées dans le remodelage artériel et la resténose. En effet, l'inhibition de la P-sélectine avec le rPSGL-Ig a été corrélée à un remodelage positif des artères suite à l'angioplastie (28). Nos résultats sont alors, en accord avec des études antérieures qui exhibent l'inhibition du

remodelage et de la formation néointimale chez des souris déficientes en P-sélectine (475). De plus, on a démontré que cet effet sur le remodelage vasculaire est secondaire à une réduction concomitante de l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles pointant vers un rôle pour ces 2 types cellulaires dans le processus du remodelage, un rôle qui peut être lié aux effets de la MMP-2 et de la MMP-9 sur la fonction plaquettaire. En tentant d'élucider ce phénomène, nos résultats nous permettent de conclure que la liaison des plaquettes activées aux neutrophiles augmente la sécrétion de la MMP-2 et influence l'agrégation plaquettes-neutrophiles, ce qui peut être un facteur déterminant dans les réactions thrombo-inflammatoires associées au remodelage vasculaire.

Directions futures

Malgré le progrès impressionnant des connaissances scientifiques au sujet des métalloprotéinases et de leur implication directe dans un grand nombre de pathologies cardiovasculaires ainsi que de leurs rôles au niveau de la fonction plaquettaire, de nombreuses interrogations demeurent à résoudre. Parmi celles-ci, notons entre autres ;

- ❖ La cascade de signalisation générée par 1) la liaison de la P-sélectine et 2) la liaison du fibrinogène à la GPIIb/IIIa induisant la sécrétion de MMP-2 : en effet, plusieurs études ont montré que la liaison des plaquettes aux leucocytes génère des signaux extérieur-intérieur « outside-in signals » qui mènent à l'activation et à la sécrétion de plusieurs substances vasoactives incluant les MMPs (8-15). D'autre part, il est bien connu que la GPIIb/IIIa, une fois activée, peut générer des signaux extérieur-intérieur (outside-in signals) (82) qui maintiennent et potentialisent l'activation plaquettaire en induisant la sécrétion de plusieurs molécules pro-activatrices, ce qui laisse croire qu'il existe un synergisme entre la P-sélectine et le GPIIb/IIIa dans la sécrétion de la MMP-2. Donc, il s'avère très utile de pousser plus loin et de décortiquer la cascade signalétique générée par la liaison de la P- sélectine et du GPIIb/IIIa.

- ❖ Le mécanisme cellulaire de sécrétion de la MMP-2 par les plaquettes : la MMP-2 a été localisée dans le compartiment cytosolique des plaquettes humaines et la translocation et la sécrétion de cette enzyme correspondaient

avec l'activation plaquettaire (18, 23, 24). Cette translocation de la MMP-2 à la surface membranaire des plaquettes et son association avec certains composants membranaires joue un rôle important dans le processus d'activation de la MMP-2 et dans l'agrégation plaquettaire médiée par cette enzyme (18, 23, 24, 287). Des changements dans la distribution, la translocation et la sécrétion de MMP-2 peuvent contribuer à la pathogenèse de nombreux désordres associés avec une altération de la fonction plaquettaire.

- ❖ Les effets mécanistiques de la sécrétion de la MMP-2 sur l'agrégation plaquettaire : plusieurs études récentes spéculent que les MMPs sécrétées peuvent se lier à certains composants de la membrane plasmique et réguler la fonction plaquettaire, mais des évidences directes supportant ces hypothèses n'ont pas été fournies. Toutefois, il a été suggéré que les actions de la MMP-2 peuvent impliquer une modification des principales molécules d'adhésion plaquettaires comme les glycoprotéines GPIIb/IIIa (364) et GPIb (365) ou de leur ligands, tandis que celles du MMP-1 et/ou d'autres MMPs reposent sur la phosphorylation de la tyrosine kinase et le regroupement des β_3 -intégrines sur les points d'adhésions focaux (25). Par conséquent, ces différents modes d'action ainsi que les voies de signalisation qui peuvent en résulter méritent d'être analysées.

Bibliographie

- 1- Jang Y, Lincoff M, Plow EF, et al. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1994; 24: 1591-1601.
- 2- Nash GB. Adhesion between neutrophils and platelets: a modulator of thrombotic and inflammatory events? *Thromb Res*. 1994; 74 (suppl 1): S3-S11.
- 3- Freedman JE, Loscalzo J. Platelet-monocyte aggregates bridging thrombosis and inflammation. *Circulation*. 2002; 105: 2130-2132.
- 4- Cambien B, Wagner DD. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med*. 2004; 10: 179-186.
- 5- Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*. 1996; 88: 3259-3287.
- 6- McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest*. 1997; 100 (Suppl): S97-S103.
- 7- Moore KL. Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk Lymphoma*. 1998 ;29: 1-15.
- 8- Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB, et al. Formation of leukotrienes and other hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982; 109: 130-137.
- 9- Coeffier E, Delautier D, Le Couedic JP, et al. Cooperation between platelets and neutrophils for PAF-acether (platelet-activating factor) formation. *J Leukoc Biol*. 1990; 47: 234-243.
- 10- Maugeri N, Evangelista V, Piccardoni P, et al. Transcellular metabolism of arachidonic acid: increased platelet thromboxane generation in the presence of activated polymorphonuclear leukocytes. *Blood*. 1992; 80: 447-451.
- 11- Cerletti C, Evangelista V, Molino M, et al. Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes: role of cathepsin G and P-selectin. *Thromb Haemost*. 1995; 74: 218-223.
- 12- Bonomini M, Stuard S, Carreno MP, et al. Neutrophil reactive oxygen species production during hemodialysis: role of activated platelet adhesion to neutrophils through P-selectin. *Nephron*. 1997; 75: 402-411.

- 13- Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, et al. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation*. 1997; 95: 2387-2394.
- 14- Ostrovsky L, King AJ, Bond S, et al. A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process. *Blood*. 1998; 91: 3028-3036.
- 15- Evangelista V, Manarini S, Sideri R, et al. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood*. 1999; 93: 876-885.
- 16- Galt SW, Lindemann S, Medd D, et al. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets. *Circ Res*. 2001; 89: 509-516.
- 17- Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of metalloproteinases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis, and angiogenesis. *Eur Respir J*. 1994; 7: 2062-2072.
- 18- Fernandez-Patron C, Martinez-Cuesta MA, Salas E, et al. Differential regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases-9 and -2. *Thromb Haemost*. 1999; 82: 1730-1735.
- 19- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17: 463-516.
- 20- Woessner JF Jr. The family matrix metalloproteinases. *Ann NY Acad Sci*. 1994; 732: 11-21.
- 21- Vissers MC, Winterbourn CC. Activation of human neutrophil gelatinase by endogenous serine proteinases. *Biochem J*. 1998; 249: 327-331.
- 22- Mazziere R, Masiero L, Zanetta L, et al. Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J*. 1997; 16: 2319-2332.
- 23- Sawicki G, Sanders EJ, Salas E, et al. Localization and translocation of MMP-2 during aggregation of human platelets. *Thromb Haemost*. 1998; 80: 836-839.
- 24- Sawicki G, Salas E, Murat J, et al. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature*. 1997; 386: 616-619.
- 25- Galt SW, Lindemann S, Allen S, et al. Outside-in signals delivered by matrix metalloproteinase-1 regulate platelet function. *Circ Res*. 2002; 90: 1093-1099.

- 26- Opdenakker G, van den Steen PE, Dubois B, et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte. *J Leukoc Biol.* 2001; 69: 851-859.
- 27- Théorêt JF, Bienvenu JG, Kumar A, et al. P-selectin antagonism with recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-1g) inhibits circulating activated platelet binding to neutrophils induced by damaged arterial surfaces. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 298: 658-664.
- 28- Bienvenu JG, Tanguay JF, Théorêt JF, et al. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1-Ig reduces restenosis through inhibition of platelet-neutrophil adhesion after double angioplasty in swine. *Circulation.* 2001; 103: 1128-1134.
- 29- Tanguay JF, Geoffroy P, Sirois MG, et al. Prevention of in-stent restenosis via reduction of thrombo-inflammatory reactions with recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1. *Thromb Haemost.* 2004; 91: 1186-1193.
- 30- Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. Histologie fonctionnelle. McGraw-Hill, 2^e éd. Paris, 1988; 36-51.
- 31- Solomon EP, Davis PW. Anatomie et physiologie humaine. McGraw-Hill, Montréal, 1981; 385-398.
- 32- Tortora GJ, Grabowski SR, Parent JC. Principes d'anatomie et de physiologie. Centre Éducatif et Culturel (CEC), 7^e Éd. Montréal, 1993.
- 33- Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev.* 1999; 79: 387-423.
- 34- Williams JK, Heistad DD. The vasa vasorum of the arteries. *J. Mal Vasc.* 1996 ; 21 Suppl C: 226-269.
- 35- Robb-Smith AH. Why the platelets were discovered. *Br. J. Haematol.* 1967; 13: 618-637.
- 36- Bizzozero G. Su di un nuovo elemento morfologico del sangue dei mammiferi e della sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. *L'osservatore.* 1881; 17: 785-787.
- 37- Bizzozero G. Ueber einen neuen Formbestandtheil des blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol.* 1882; 90: 261-332.
- 38- George JN. Platelets. *Lancet.* 2000; 355: 1531-1539.

- 39- Furie B, Furie BC, Flaumenhaurt R. A journey with platelet P-Selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb. Haemost.* 2001; 86: 214-221.
- 40- Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling : the platelet paradigm. *Blood.* 1998; 91: 2645-2657.
- 41- Boyles J, Fox JEB, Phillips DR, et al. Organization of the cytoskeleton in resting, discoid platelets : preservation of actin filaments by a modified fixation that prevents osmium damage. *J. Cell Biol.* 1985; 101: 1463-1472.
- 42- Fox JEB, Boyles J, Berndt M, et al. Identification of a membrane skeleton in platelets. *J. Cell Biol.* 1988; 106: 1525-1538.
- 43- Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS. Adhesive signaling in platelets. *Current opinion in Cell Biol.* 1994; 6: 695-704.
- 44- Stenberg PE, Mc Ever RP, Shuman MA, et al. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J. Cell Biol.* 1985; 101: 880-886.
- 45- Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, et al. Bernard-Soulier syndrome. *Blood.* 1998; 91: 4397-4418.
- 46- Kroll MH, Schafer AI. Immunopharmacology of platelets. Chapter 3, The analysis of ligand-receptor interactions in platelet activation. 31-65.
- 47- Clemeston KJ. Platelet activation : signal transduction via membrane receptors. *Thromb. Haemost.* 1995; 74: 111-116.
- 48- Du X, Ginsberg MH. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and platelet function. *Thromb. Haemost.* 1997; 78: 96-100.
- 49- Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997; 29: 91-105.
- 50- Giesberts AN, Van Willigen G, Lapetina EG, et al. Regulation of platelet glycoprotein IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) function via the thrombin receptor. *Biochem. J.* 1995; 309: 613-620.
- 51- Levy-Toledano S. Platelet signal transduction pathways : could we organize them into a "hierarchy" ? *Haemost.* 1999; 29: 2-15.
- 52- Kenneth J. Clemeston. Platelet Receptors. In: *Platelets*. Academic press, Alan D. Michelson Ed, San Diego. 2002; 5: 65-84.

- 53- Santoro SA, Rajapra SM, Staatz WD, et al. Isolation and characterisation of a platelet surface collagen binding complex related to VLA-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 153: 217-223.
- 54- Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP, et al. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature.* 1985; 318: 470-472.
- 55- Santoro SA. Identification of a 160,000 daltons platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell.* 1986; 46:913-920.
- 56- Saelman EUM, Nieuwenhuis HK, Hese KM et al. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$ -integrin). *Blood.* 1994; 83: 1224-1250.
- 57- Staatz WD, Rajapra SM, Wayner EA. The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg^{++} -dependant adhesion of platelet to collagen. *J.Cell.Biol.* 1989; 108: 1917-1924.
- 58- Moroi M, Jung, SM, Shinmyozu K, et al. Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion, *Blood.* 1996; 88: 2081-2092.
- 59- Jarvis GE, Atkinson BT, Snell DC, et al. Distinct roles of GPVI and integrin $\alpha_2\beta_1$ in platelet shape change and aggregation induced by different collagens. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 137: 107-117.
- 60- He L, Pappan LK, Grenache DG et al. The contributions of the $\alpha_2\beta_1$ integrin to vascular thrombosis in vivo. *Blood.* 2003; 102: 3652-3657.
- 61- Berndt MC, Shen Y, Dopheide, SM et al. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb. Haemost.* 2001; 86: 178-188.
- 62- Yap CL, Hughan SC, Cranmer SL, et al. Synergistic adhesive interaction and signaling mechanisms operating between platelet glycoprotein Ib/IX and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 41377-41388.
- 63- Yuan YS, Kulkarni P, Ulsemer S, et al. The von Willebrand factor- Glycoprotein Ib/V/IX interaction induces actin polymerization and cytoskeletal reorganization in rolling platelets and glycoprotein Ib/V/IX-transfected cells. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 36241-36251.
- 64- Aiken, ML, Ginsberg MH, Byers-Ward V, et al. Effects of OKM5, a monoclonal antibody to glycoprotein IV, on platelet aggregation and thrombospondin surface expression. *Blood.* 1990; 76: 2501-2509.

- 65- Kroll MH, Harris TS, Moake JL, et al. Von Willbrand factor for binding to platelet GPIb initiates signals for platelet activation. *J Clin Invest.* 1991; 88: 1568-1573.
- 66- Nurden P. Bidirectional trafficking of membrane glycoproteins following platelet activation in suspension. *Thromb. Haemost.* 1997; 78: 1305-1315.
- 67- Jandrot-Perrus M, Bouton MC, Lanza F, et al. Thrombin interaction with platelet membrane glycoprotein Ib. *Sem. Thromb. Haemost.* 1996; 22: 151-156.
- 68- Englund GD, Bodnar R., Li Z, et al. Regulation of von Willebrand factor binding to the platelet glycoprotein Ib-IX by a membrane skeleton-dependent inside-out signal. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 16952-16959.
- 69- Christodoulides N, Feng S, Resendiz JC, et al. Glycoprotein Ib/IX/V binding to the membrane skeleton maintains shear-induced platelet aggregation. *Thromb. Res.* 2001; 102: 133-142.
- 70- Philips DR, Charo IF, Parise LV et al. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood.* 1988; 71: 831-843.
- 71- Jennings LK, Phillips DR. Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* 1982; 257: 10458-10466
- 72- Shattil SJ. Regulation of platelet anchorage and signaling by integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *Thromb. Haemost.* 1993; 70: 224-228.
- 73- Woods VL Jr, Wolff LE, Keller DM. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 15242-15251.
- 74- Smyth SS, Joneckis CC, Parise LV. Regulation of vascular integrins. *Blood.* 1993; 81: 2827-2843.
- 75- Lam SCT. Isolation and characterization of a chymotryptic fragment of platelet glycoprotein IIb-IIIa retaining Arg-Gly-Asp binding activity. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 5649-5655.
- 76- Fujimura K, Phillips DR. Calcium cation regulation of glycoprotein IIb-IIIa complex formation in platelet plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 1983; 258: 10247-10252.

- 77- Kunicki TJ, Pidard D, Rosa JP, et al. The formation of Ca^{2+} -dependent complexes of platelet membrane glycoprotein IIb and IIIa in solution as determined by crossed immunoelectrophoresis. *Blood*. 1981; 58: 268-278.
- 78- Missy K, Giuriato S, Bodin S, et al. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans les plaquettes sanguines: un rôle dans la transduction des signaux. *Médecine/Science*. 2000; 17: 155-161.
- 79- Lerea KM, Cordero, KP, Sakariassen K.S. Phosphorylation sites in the integrin β_3 cytoplasmic domain in intact platelets. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 1914-1919.
- 80- Chen YP, Djaffar I, Pidard D, et al. Ser752 \rightarrow Pro mutation in the cytoplasmic domain of integrin β_3 subunit and defective activation of platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (glycoprotein IIb-IIIa) in a variant of Glanzmann thrombasthenia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1992; 89: 10169-10173.
- 81- Chen YP, O'Toole TE, Ylanne J, et al. A point mutation in the integrin β_3 cytoplasmic domain (S752 \rightarrow P) impairs bidirectional signaling through $\alpha_{IIb}\beta_3$ (platelet glycoprotein IIb-IIIa). *Blood*. 1994; 84: 1857-1865.
- 82- Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Phillips DR. Outside-in integrin signal transduction. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 10811-10815.
- 83- Parise LV, Criss AB, Nannizzi L, et al. Glycoprotein IIIa is phosphorylated in intact human platelets. *Blood*. 1990; 75: 2363-2368.
- 84- Fox JEB, Lipfer L, Clark EA, et al. On the role of platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 25973-25984.
- 85- Fox JEB. Regulation of platelet function by the cytoskeleton. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1993; 344: 175-185.
- 86- Fox JEB, Shattil SJ, Kinlough-Rathbone RL, et al. The platelet cytoskeleton stabilizes the interaction between $\alpha_{IIb}\beta_3$ and its ligand and induces selective movements of ligand-occupied integrin. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 7004-7011.
- 87- Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb.Haemost.* 1999; 81: 1-7.
- 88- Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*. 1996; 88: 3259-3287.
- 89- Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, et al. Selectins a family of adhesion receptors, *Cell*. 1991; 67: 233.

- 90- Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, et al. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood*. 1992; 80: 143-152.
- 91- Norcott, JP, Solari R, Cutler DF. Targeting of P-selectin to two regulated secretory organelles in PC12 cells. *J. Cell Biol.* 1996; 134: 1229-1240.
- 92- Hsu-Lin SC, Berman CL, Furie BC, et al. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 9121-9126.
- 93- McEver RP, Beckstead, JH, Moore KL, et al. GMP-140, a platelet a-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel Palade bodies. *J.Clin.Ivest.* 1989; 84: 92-99.
- 94- Bonfanti R, Furie BC, Furie B, et al. PADGEM (GMP140) is a component of the Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood*. 1989; 73: 1109-1112.
- 95- Koedam JA., Cramer EM, Briend E, et al. P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulated secretory pathway in AtT-20 cells. 1992. *J. Cell Biol*; 116: 617-625.
- 96- Disdier M, Morissey JH, Fugate RD, et al. Cytoplasmic domain of P-selectin (CD62) contains the signal for sorting into the regulated secretory pathway, 1992; *Mol. Biol. Cell.* 3: 309-321.
- 97- Barkalow FJ, Barkalow KL, Mayadas TN. Dimerization of P-selectin in platelets and endothelial cells. *Blood*. 2000; 96: 3070-3077.
- 98- Johnston GI, Pickett EB, McEver RP, et al. Heterogeneity of platelet secretion in response to thrombin demonstrated by fluorescence flow cytometry. *Blood*. 1987; 69:1401-1403.
- 99- Parmentier S, McGregor L, Catimel B, et al. Inhibition of platelet functions by a monoclonal antibody (LYP20) directed against a granule membrane glycoprotein (GMP-140/PADGEM). *Blood*. 1991; 77: 1734-1739.
- 100- Dupont A, Fontana P, Bachelot-Loza C, et al. An intronic polymorphism in the PAR-1 gene is associated with platelet receptor density and the response to SFLLRN. *Blood*. 2003; 101: 1833-1840.
- 101- Semenov AV, Romanov YA, Loktionavo SA, et al. Production of soluble P-selectin by platelets and endothelial cells. *Biochem (Moscow)*. 1999; 64:1570-1582.
- 102- Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994; 84: 2068-2101.

- 103- Green SA, Setiadi H, McEver RP, et al. The cytoplasmic domain of P-selectin contains a sorting determinant that mediates rapid degradation in lysosomes. *J. Cell Biol.* 1994; 124: 435-448.
- 104- Subramaniam M, Koedam JA, Wagner DD, et al. Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell.* 1993; 4: 791-801.
- 105- Dunlop LC, Skinner MP, Bendall LJ et al. Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein. *J. Exp. Med.* 1992; 175: 1147-1150.
- 106- Moog S, Mangin P, Lenain N, et al. Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. *Blood.* 2001; 98: 1038-1046.
- 107- Schneider DJ, Taatjes DJ, Sobel BE. Paradoxical inhibition of fibrinogen binding and potentiation of α -granule release by specific types of inhibitors of glycoprotein IIb-IIIa. *Cardiovas. Res.* 2000; 45: 437-446.
- 108- Bachelot C, Rendu F, Gulino D. Anti-GPIIb/IIIa antibodies : powerful tools to investigate function and regulation of an integrin. *Thromb. Haemost.* 1995; 21: 23-36.
- 109- Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1997; 29: 91-105.
- 110- Frenette PS, Monya C, Hartwell DW, et al. Platelets endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood.* 1998; 91: 1318-1324.
- 111- Wilkins PP, McEver RP, Cummings RD. Structures of the O-glycans on P-selectin glycoprotein ligand-1 from HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 18732-18742.
- 112- Bombeli T, Schawrtz BR, Harlan JM. Adhesive of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa- dependent bridging mechanism and novel for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), α v β 3 integrin, and GP1b α . *J. Exp. Med.* 1998; 187: 329-339.
- 113- Moroi M, Jung SM. Integrin-mediated platelet adhesion. *Front Biosci.* 1998; 3: 719-728.
- 114- Ruggeri ZM. Mechanism initiating platelet thrombus formation. *Thrombosis and haemostasis.* 1997; 78: 611-616.

- 115- Jung SM, Moroi M. Signal-transducing mechanism involved in activation of the platelet collagen receptor integrin alpha2-beta-1. *J.Biol.Chem.* 1999; 275: 8016-8026.
- 116- Ware JA, Heistad DD. Platelet-endothelium interaction. *New. Engl. J. Med.* 1993; 9: 628.
- 117- Ruf A, Morgenstern E. Ultrastructural aspects of platelet adhesion on subendothelial structures. *Sem Thromb Hemos.* 1995; 21: 119-122
- 118- Ruf A, Patscheke H, Morgenstern E. Role of internalization in platelet activation induced by collagen fibers-differential aspect of aspirin, cytochalasin D, and prostaglandin E1. *Thrombosis and hemostasis.*1991;66: 708-714.
- 119- Shattil SJ, Function and regulation of the $\beta 3$ integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb. Haemost.* 1995; 74: 149.
- 120- Frojmovic MM. Platelet aggregation in flow : differential roles for adhesive receptors and ligands. *Am. Heart J.* 1998; 135:S119-S131
- 121- Offermanns, S. The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation. *Biol. Chem.* 2000; 381: 389-396.
- 122- Bennett JS. Novel platelet inhibitors. *Ann. Rev. Med.* 2001; 52: 161-184.
- 123- Sixma JJ, Slot JW, Geuze HJ. Immunohistochemical localization of platelet granule proteins. *Methods Enzymol.* 1989 ;169 :310-311.
- 124- Costa JL, Reese TS, et al. Serotonin storage in platelets : estimation of storage-packet size. *Science.* 1974; 183: 537-538.
- 125- Brass LF, Manning DR, Cichowski K et al. Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond. *Thromb Haemost.* 1997; 78: 581-589.
- 126- Barnes MJ, Knight CG, Farndale RW. The collagen-platelet interaction. *Curr. Opin. Hematol.* 1998 ; 5: 314-320.
- 127- Rink TJ, Smith SW, Tsien RY. Cytoplasmic free Ca^{2+} in human platelets: Ca^{2+} thresholds and Ca-independent activation for shape-change and secretion. *FEBS Lett.*1982; 148: 21-26.
- 128- Knight DE, Hallam TJ, Scrutton MC. Agonist selectivity and second messenger concentration in Ca^{2+} -mediated secretion. *Nature.* 1982; 296: 256-257.

- 129- Ware JA, Johnson PC, Smith M. Effect of common agonists on cytoplasmic ionized calcium concentration in platelets. Measurements with 2-methyl-6-methoxy-8-nitroquinoline (quin 2) and aequorin. *J.Clin. invest.* 1986; 77: 878-886.
- 130- Chang JD, Ware JA. Ca²⁺ and protein kinase C in platelets. In: *The Platelet*. E.G. Lapetina Ed., Greenwich : JAI Press, 1997; 275-310.
- 131- Carty DJ, Spielberg F, Gear AR. Thrombin causes subsecond changes in protein phosphorylation of platelets. *Blood.* 1986; 67:1738-1743.
- 132- Tyers M, Rachubinski RA, Stewart MI, et al. Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets. *Nature.* 1988; 333: 470-473.
- 133- Elzagallaai A, Rose SD, Trifaro JM. Platelet secretion induced by phorbol esters stimulation is mediated through phosphorylation of MARCKS: a MARCKS-derived peptide blocks MARCKS phosphorylation and serotonin release without affecting pleckstrin phosphorylation. *Blood.* 2000 ; 95: 894-902.
- 134- Reed GL, Houg AK, Fitzgerald ML. Human platelets contain SNARE proteins and a *seclp* homologue that interacts with syntaxin 4 and is phosphorylated after thrombin activation: implications for platelet secretion. *Blood.* 1999; 93: 2617-2626.
- 135- Chung SH, Polgar J, Reed GL. Protein Kinase C phosphorylation of syntaxin 4 in thrombin activated-human platelets. *J. Biol.Chem.* 2000; 275: 25286-25291.
- 136- Flaumenhaft R, Croce K, Chen E, et al. Proteins of the exocytotic core complex mediate platelet α -granule secretion. Roles of vesicle-associated membrane protein, SNAP-23, and syntaxin 4. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 2492-2501.
- 137- Lemons PP, Chen D, Bernstein AM, et al. Regulated secretion in platelets : identification of elements of the platelet exocytosis machinery. *Blood.* 1997; 90:1490-1500.
- 138- Chen D, Bernstein AM, Lemons PP, et al. Molecular mechanisms of platelet exocytosis : role of SNAP-23 and syntaxin 2 in dense granule release. *Blood.* 2000; 95: 921-929.
- 139- Lemons, PP, Chen D, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis requirements for α -granule release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 267: 875-880.
- 140- Kantheti P, Qiao X, Diaz ME et al. Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse

- links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron*. 1998; 21: 111-1222.
- 141- Dell'Angelica EC, Aguilar RC, Wolins N, et al. Molecular characterization of the protein encoded by the Hermansky-Pudlak syndrome type 1 gene. *J Biol Chem*. 2000 ; 275: 1300-1306.
 - 142- Nagle DL, Karim MA, Woolf EA, et al. Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. *Nature. Genet*. 1996; 14: 307-311.
 - 143- Barbosa MD, Nguyen QA, Tchernev VT, et al. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature*. 1996; 382: 262-265.
 - 144- Richards-Smith B, Novak EK, Jang EK, et al. Analyses of proteins involved in vesicular trafficking in platelets of mouse models of Hermansky Pudlak syndrome. *Mol Genet Metab*. 1999; 68: 14-23.
 - 145- Odorizzi G, Cowles CR, Emr SD. The AP-3 complex: a coat of many colours. *Trends Cell Biol*. 1998 ; 87: 282-288.
 - 146- Detter JC, Zhang Q, Mules EH, et al. Rab geranylgeranyl transferase alpha mutation in the gunmetal mouse reduces Rab prenylation and platelet synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 ; 97: 4144-4149.
 - 147- Huang L, Kuo YM, Gitschier J. The pallid gene encodes a novel, syntaxin 13-interacting protein involved in platelet storage pool deficiency. *Nat Genet*. 1999; 23: 329-332.
 - 148- Shirakawa R, Yoshioka A, Horiuchi H, et al. Small GTPase Rab4 regulates Ca²⁺-induced alpha-granule secretion in platelets. *J Biol Chem*. 2000; 275: 33844-33849.
 - 149- Bernstein AM, Whiteheart SW. Identification of a cellubrevin/vesicle associated membrane protein 3 homologue in human platelets. *Blood*. 1999; 93: 571-579.
 - 150- Chen D, Lemons PP, Schraw T, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. *Blood*. 2000; 96; 5: 1782-1788.
 - 151- Fitzgerald ML, Reed GL. Rab6 is phosphorylated in thrombin-activated platelets by a protein kinase C-dependent mechanism: effects on GTP/GDP binding and cellular distribution. *Biochem J*. 1999; 342: 353-360.

- 152- Karniguian A, Zahraoui A, Tavitian A. Identification of small GTP binding rab proteins in human platelets: thrombin-induced phosphorylation of rab3B, rab6, and rab8 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 7647-7651.
- 153- Chen D, Guo J, Miki T, Tachibana M, Molecular cloning and characterization of rab27a and rab27b, novel human rab proteins shared by melanocytes and platelets. *Biochem Mol Med*. 1997; 60: 27-37.
- 154- McGarry MP, Reddington M, Jackson CW, et al. Increased incidence and analysis of emperipolesis in megakaryocytes of the mouse mutant gunmetal. *Exp Mol Pathol*. 1999; 66: 191-200.
- 155- Li W, Detter JC, Weiss HJ, et al. 5'-UTR structural organization, transcript expression, and mutational analysis of the human Rab geranylgeranyl transferase alpha-subunit (RABGGTA) gene. *Mol Genet Metab*. 2000; 71: 599-608.
- 156- Gahl WA, Brantly M, Kaiser-Kupfer MI, et al. Genetic defects and clinical characteristics of patients with a form of oculocutaneous albinism (Hermansky-Pudlak syndrome). *N Engl J Med*. 1998; 338: 1258-1264.
- 157- Gardner JM, Wildenberg SC, Keiper NM, et al. The mouse pale ear (ep) mutation is the homologue of human Hermansky-Pudlak syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 9238-9243.
- 158- Flaumenhaft R, Furie B, Furie BC. Alpha-granule secretion from alpha-toxin permeabilized, MgATP-exposed platelets is induced independently by H⁺ and Ca²⁺. *J Cell Physiol*. 1999; 179: 1-10.
- 159- Polgar J, Lane WS, Chung SH, et al. Phosphorylation of SNAP-23 in activated platelets. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 44369-44376.
- 160- Washington AV, Schubert RL, Quigley L, et al. TREM family member, TLT-1, is found exclusively in the α -granules of megakaryocytes and platelets. *Blood*. 2004; 104: 1042-1047.
- 161- Barrow AD, Astoul E, Floto A, et al. TREM-like transcript-1, a platelet immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif encoding costimulatory immunoreceptor that enhances, rather than inhibits, calcium signaling via SHP-2. *J. Immunol*. 2004; 172: 5838-5842.
- 162- Handa K, Igarashi Y, Nisar M, et al. Downregulation of GMP-140 (CD62 or PADGEM) expression on platelets by N,N-dimethyl and N,N,N-trimethyl derivatives of sphingosine. *Biochemistry*. 1991; 30: 11682-11686.

- 163- Libersan D, Merhi Y. Platelet P-selectin expression : requirement for protein kinase C, but not tyrosine kinase or phosphoinositide 3-kinase. *Thromb. Haemost.* 2003; 89: 1016-1023.
- 164- Lefebvre P, White JG, Kromwiede MD, et al. Role of actin in platelet function. *Eur. J. Cell Biol.* 1993; 62: 194-204.
- 165- Rozenwayn N, Flaumenhaft R. Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate mediates Ca^{2+} -induced platelet α -granule secretion, *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 22410-22419.
- 166- Frenette PS, Wagner DD. Molecular medicine : adhesion molecules. *New Eng. J. Med.* 1996; 334: 1526-1529.
- 167- Rozenwayn, N., Flaumenhaft, R. Protein kinase C mediates translocation of type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase required for platelet α -granule secretion. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 8126-8134.
- 168- Chen M, Geng JG. Inhibition of protein tyrosine phosphatases suppresses P-selectin exocytosis in activated human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 286: 831-838.
- 169- Marcu MG, Zhang, L, Nau-Staudi K, et al. Recombinant scinderin, an F-actin severing protein, increases calcium-induced release of serotonin from premeabilized platelets, an effect blocked by two scinderin-derived actin-binding peptides and phosphatidylinositol. *Blood.* 1996; 87:20-24.
- 170- Jurasz P, Chung AW, Radomski A, et al. Non remodeling properties of matrix metalloproteinases: the platelet connection. *Circ. Res.* 2002; 90:1041-1043.
- 171- Clemeston KJ, Polgar J. Platelet adhesion and aggregation receptors. In: *Platelet and their factors.* Von Bruchhausen F, Walter U. Ed, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1997; 155-179.
- 172- De Marco L, Mazzucato M, Masotti A, et al. Function of glycoprotein Ib α in platelet activation induced by α -thrombin. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 23776-23783.
- 173- Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, et al. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 11107-11114.
- 174- Merten M, Pakala R, Thiagarajan P, et al. Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. *Circulation.* 1999; 99: 2577-2582.

- 175- Shattil SJ, Gao J, Kashiwaga H, et al. Not just another pretty face : regulation of platelet function at the cytoplasmic face of integrin α IIb β 3. *Thromb. Haemost.*, 1997; 78: 220-225.
- 176- Bennett JS, Poncz M, Platelet glycoprotein IIb and IIIa, in High KA and Roberts HR Ed, Molecular basis of thrombosis and hemostasis, Marcel Dekker, NY, 1995; 579.
- 177- Coller BS. Potential non-glycoprotein IIb/IIIa effects of abciximab. *Am Heart J.* 1999; 138(Suppl): S1-S5.
- 178- Tcheng JF, Ellis SG, George BS. Pharmacodynamics of chimeric glycoprotein IIb-IIIa integrin antiplatelet antibody Fab 7E3 in high-risk coronary angioplasty. *Circulation.* 1994; 90: 1757-1764.
- 179- Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelet determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation.* 2000; 102: 1931-1936.
- 180- Merten M, Chow T, Hellums D. A new role for P-selectin in shear-induced platelet aggregation. *Circulation.* 2000; 102: 2045-2050.
- 181- Romo GM, Dong JF, Schabe AJ et al. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J. Exp. Med.* 1999; 190: 803-813.
- 182- Frenette PS, Denis CV, Weiss L, et al. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J. Exp. Med.* 2000; 191: 1413-1422.
- 183- Faraday N, Scharpf RB, Dodd-O JM, et al. Leukocytes can enhance platelet-mediated aggregation and thromboxane release via interaction of P-selectin glycoprotein ligand 1 with P-selectin. *Anesthesiology.* 2001; 94: 145-151.
- 184- Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* 1967; 13: 269-288.
- 185- Pasquet JM, Toti F, Nurden AT, et al. Procoagulant activity and active calpain in platelet-derived microparticles. *Thromb. Res.* 1996; 82: 509-522.
- 186- Forlow SB, Mc Ever RP, Nollret MU. Leukocytes-leukocytes interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood.* 2000; 95: 1317-1323.
- 187- Marieb EN. Anatomie et physiologie humaine. Le Renouveau Pédagogique Inc, 2^e éd, Montréal; 1993.

- 188- Brown KK, Henson PM, Maclouf J, et al. Neutrophil-platelet adhesion : relative roles of platelet P-selectin and neutrophil beta-2 (CD18) integrins. *Am J respir Cell Mol Biol.* 1998; 18: 100-110
- 189- Cecil RL, Benett JC, Plum F. Cecil textbook of medicine. W.B.Saunders Company, 20th ed.1996.
- 190- Faint RW. Platelet-neutrophil interactions : their significance. *Blood Reviews.*1992; 6: 83-91.
- 191- Jang Y, Lincoff M, Plow EF, et al. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1994; 24: 1591-1601.
- 192- Malik AB. Endothelial cell interactions and integrins. *New Horizons.*1993; 1: 37-51.
- 193- Arnaout MA. Structure and function of the leukocyte adhesion molecule CD11/CD18. *Blood.* 1990; 75: 1037.
- 194- Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD et al. Binding of the integrin MAC-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell.* 1991; 65: 961.
- 195- Hogg N. An integrin overview. *Chem Immunol.* 1991; 50: 1.
- 196- Hogg, Landis RC. Adhesion molecules in cell intercatons. *Curr Opin Immunol.* 1993; 5: 383.
- 197- Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest.* 1991; 87: 1.
- 198- Stacker SA, Springer TA. Leukocyte integrin p150,95 (CD11c/CD18) functions as an adhesion molecule binding to a counterreceptor on stimulated endothelium. *J immunol.* 1991; 146: 648.
- 199- Hogg N, Bates PA, Harvey J. Structure and function of intercellular adhesion molecule-1. *Chem Immunol.* 1991; 50: 98.
- 200- Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 1990; 346: 425-434.
- 201- Diamond MS, Staunton DE, De fougerolles AR. ICAM-1 CD54 : A counter-receptor for MAC-1 (CD11b/CD18). *J. Cell. Biol.* 1990; 111: 3129-3139.
- 202- Hogg N. The leukocyte integrins. *Immunol Today.* 1989; 4: 111-114.

- 203- Hynes RO. Integrins : versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992; 69: 11-25.
- 204- Vercellotti GM, Platt JL, Bach FH et al. Neutrophil adhesion to xenogeneic endothelium via iC3b. *J.Immunol.*1991; 146: 730-734.
- 205- Alteiri DC, Wiltse WL, Edgington TS. Signal transduction initiated by extracellular nucleotides regulates the high affinity ligand recognition of the adhesive receptor CD11b/CD18. *J.immunol.* 1990; 145: 662-670.
- 206- Kuijpers TW, Hakkert BC, Hoogerwerf M, et al. Role of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and platelet-activating factor in neutrophil adherence to IL-1-prestimulated endothelial cells. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-mediated CD18 activation. *J Immunol.* 1991; 147(4): 1369-1376.
- 207- Graham IL, Lefkowitz JB, Anderson DC, et al. Immune complex-stimulated neutrophil LTB4 production is dependent on beta 2 integrins. *J Cell Biol.* 1993; 120(6): 1509-1517.
- 208- Altieri DC . Occupancy of CD11b/CD18 (Mac-1) divalent ion binding site(s) induces leukocyte adhesion. *J Immunol.* 1991; 147(6): 1891-1898.
- 209- Altieri DC, Plescia J, Plow EF. The structural motif glycine 190-valine 202 of the fibrinogen gamma chain interacts with CD11b/CD18 integrin (alpha M beta 2, Mac-1) and promotes leukocyte adhesion. *Biol Chem.* 1993; 268(3): 1847-1853.
- 210- Vedder NB, Harlan JM. Increased surface expression of CD11b/CD18 (Mac-1) is not required for stimulated neutrophil adherence to cultured endothelium. *J Clin Invest.* 1988; 81(3): 676-82.
- 211- Hughes BJ, Hollers JC, Crockett-Torabi E, et al. Recruitment of CD11b/CD18 to the neutrophil surface and adherence-dependent cell locomotion. *J Clin Invest.* 1992; 90(5): 1687-1696.
- 212- Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol.* 1988; 107(1):321-331
- 213- Maxfield SR, Moulder K, Koning F, et al. Murine T cells express a cell surface receptor for multiple extracellular matrix proteins. Identification and characterization with monoclonal antibodies. *J Exp Med.* 1989; 169(6): 2173-2190.
- 214- Hemler ME, Elices MJ, Parker C, et al. Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol Rev.* 1990; 114: 45-65.

- 215- Mackay CR, Marston WL, Dudler L, et al. Tissue-specific migration pathways by phenotypically distinct subpopulations of memory T cells. *Eur J Immunol.* 1992; 22(4): 887-895.
- 216- Picker LJ, Terstappen LW, Rott LS et al. Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man. *J Immunol.* 1990; 145(10): 3247-3255.
- 217- Briscoe DM, Cotran RS, Pober JS. Effects of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vivo. Correlation with CD3+ T cell infiltration. *J Immunol.* 1992; 149(9): 2954-2960.
- 218- Gallatin WM., Weismann IL, Butcher EC. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature.* 1983; 304: 30-34.
- 219- Jung TM., Dailey MO. Rapid modulation of homing receptors (gp90mel-14) induced by activation of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *J. Immunol.* 1990; 144: 3130-3136.
- 220- Berg M., James, SP. Human neutrophils release the Leu-8 lymph node homing receptor during cell activation. *Blood.* 1990; 76: 2381-2388.
- 221- Bevilacqua M.P, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest.* 1993; 91: 379-387.
- 222- Moore L, Stults NL, Diaz S, et al. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J. Cell Biol.* 1992; 118:445-456.
- 223- Moore KL, Varki A., McEver RP. GMP-140 binds to a glycoprotein receptor on human neutrophils: evidence for a lectin-like interaction. *J. Cell Biol.* 1991;112:491-499.
- 224- Skinner MP, Lucas CM., Burns GF, et al. GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glyicans. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 5371-5374
- 225- Bischoff J, Brasel C. Regulation of P-selectin by tumor necrosis factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 210: 174-180.
- 226- Norgard KE, Moore KL, Diaz S, et al. Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells: a minor glycoprotein with sialylated o-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 12764-12774.
- 227- Sako D, Chang XJ, Barone KM, et al. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell.* 1993; 75: 1179-1186.

- 228- Epperson TK, Patel KD, McEver RP, et al. Noncovalent association of P-selectin glycoprotein ligand-1 and minimal determinants for binding to P-selectin. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 7839-7853.
- 229- Ramachadran V, Yago T, Epperson TK, et al. Dimerization of a selectin and its ligand stabilizes cell rolling and enhances tether strength in shear flow. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 10166-10171.
- 230- Cummings RD. Structure and function of the selectin ligand PSGL-1. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1999; 32: 519-528.
- 231- Li F, Wilkins PP, Crawley S, et al. Post-transcriptional modifications of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P- and E-selectin. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 3255-3264.
- 232- Moore KL, Eaton SF, Lyons DE. et al. The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated fucosylated O-linked poly-N-acetyllactosamine. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 23318-23327.
- 233- Wilkins PP, Moore KL, McEver RP, et al. Tyrosine sulfation of P-selectin glycoprotein ligand-1 is required for high affinity binding to P-selectin. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 22677-22680.
- 234- Pouyani T, Seed B. PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell.* 1995. 83:333-343.
- 235- Sako D, Comesa KM, Barone KM, et al. A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell.* 1995; 83: 323-331.
- 236- Rodgers SD, Cauphause RT, Hammer DA. Tyrosine sulfation enhances but is not required for PSGL-1 rolling adhesion on P-selectin. *Biophys. J.* 2001; 81: 2001-2009.
- 237- Lichtenthaler S, Dominguez DI, Westmeyer GG, et al. The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 :48713-48719.
- 238- Rehemtulla, A., Kaufman, R.J., Protein processing within the secretory pathway. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1992; 3: 560-565.
- 239- Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: Modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leuko. Biol.* 1994; 55: 662.
- 240- Moore KL, Patel KD, Bruehl RE. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J. Cell. Biol.* 1995; 128: 661-671.

- 241- Spertini O, Luscinskas FW, Gimbrone MA, et al. Monocyte attachment to activated human vascular endothelium in vitro is mediated by leukocyte adhesion molecule-1 (L-selectin) under nonstatic conditions. *J. Exp. Med.* 1992; 175: 1789-1792.
- 242- Hallman R, Jutila MA, Smith CW, et al. The peripheral lymph node homing receptor, LECAM-1, is involved in CD18-independent adhesion of human neutrophils to endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 174: 236-243.
- 243- Abbassi O, Lane CL, Krater S, et al. Canine neutrophil margination mediated by lectin adhesion molecule-1 in vitro. *J. Immunol.* 1991; 147: 2107-2115.
- 244- Shimaoka M, Ikeda M, Iida T, et al. Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153: 307-311.
- 245- Ley K, Linnermann G, Meinen M, et al. Fucoidin, but not yeast polyphosphomannan PPME, inhibits leukocyte rolling in venules of the rat mesentery. *Blood.* 1993; 81: 177-185.
- 246- Tangelder GJ, Arfors KE. Inhibition of leukocyte rolling in venules by protamine and sulfated polysaccharides. *Blood.* 1991; 77: 1565-1571.
- 247- Watson SR, Fennie C, Lasky LA. Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by a soluble homing receptor-IgG chimaera. *Nature.* 1991; 349: 164-167.
- 248- von Andrian UH, Chambers JD, Berg EL, et al. L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl LewisX-dependent and -independent recognition pathways. *Blood.* 1993; 82: 182-191.
- 249- Norman KE, Moore KL, McEver RP, et al. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood.* 1995; 86: 4417-4421.
- 250- Ramos CL, Kunkel EJ, Lawrence MB, et al. Differential effect of E-selectin antibodies on neutrophil rolling and recruitment to inflammatory sites. *Blood.* 1997; 89: 3009-3018.
- 251- Norman KE, Anderson GP, Kolb HC, et al. Sialyl LewisX (sLeX) and an sLeX mimetic, CGP69669A, disrupt E-selectin-dependent leukocyte rolling in vivo. *Blood.* 1998; 91: 475-483.
- 252- Rainger G.E, Fisher AC, Nash GB. Endothelial-borne platelet activating factor and interleukin-8 rapidly immobilize rolling neutrophils. *Am. J. Physiol.* 1997; 272: 114-122.

- 253- Kuijpers TW, Hakkert BC, Hart MH, et al. Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: a role for platelet-activating factor and IL-8. *J. Cell Biol.* 1992; 117:565-572.
- 254- Rainger GE, Fisher A, Shearman C, et al. Adhesion of flowing neutrophils to cultured endothelial cells after hypoxia and reoxygenation in vitro. *Am. J. Physiol.* 1995; 269: H1398-H1406.
- 255- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994; 76: 301-314.
- 256- Crockett-Torabi E, Sulenbarger B, Smith CW, et al. Activation of human neutrophils through L-selectin and MAC-1 molecules. *J. Immunol.* 1995; 154: 2291-2302.
- 257- Ng-Sikorski J, Linden L, Elerman D, et al. Engagement of L-selectin impairs the actin polymerizing capacity of β 2-integrins on neutrophils. *J. Cell Science.* 1996; 100: 2361-2369.
- 258- Gopalan PK, Smith CW, Lu H., et al. Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin. *J. Immunol.* 1997; 158: 367-375.
- 259- Taylor AD, Neelamegham S, Hellums JD, et al. Molecular dynamics of the transition from L-selectin- to β 2-integrin-dependent neutrophil adhesion under defined hydrodynamic shear. *Biophys. J.* 1996; 71: 3488-3500.
- 260- Tsang YTM, Neelamegham S, Hu Y, et al. Synergy between L-selectin signaling and chemotactic activation during neutrophil adhesion and transmigration. *J. Immunol.* 1997 ; 159: 4566-4577.
- 261- Sheikh S, Nash GB. Continuous activation and deactivation on integrin CD11b/CD18 during de novo expression enables rolling neutrophils to immobilize on platelets. *Blood.* 1996; 87: 5040-5050.
- 262- Field EJ, MacLeod I. Platelet adherence to polymorphs. *Br. Med. J.* 1963; 388-389.
- 263- Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, et al. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty : a mechanism for recurrent disease? *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996; 28: 345-353.
- 264- Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, et al. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *JJAC.* 1998; 31: 352-358.

- 265- Bazzoni G, Dejana E, Del Maschio A. Platelet-Neutrophil interactions: possible relevance in the pathogenesis of thrombosis and inflammation. *Haematol.* 1991; 76: 491-499.
- 266- Scalia R, Hayward R, Armstead VE, et al. Effect of recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocyte-endothelium interaction in vivo : role in rat traumatic shock. *Circ. Res.* 1999; 84: 93-102.
- 267- Takada M, Nadeau KC, Shaw GD et al. Early cellular and molecular changes in ischemia/reperfusion injury : inhibition by a selectin antagonist, P-selectin glycoprotein ligand-1. *Transplantation Proc.* 1997; 29: 1324-1325.
- 268- Mickelson JK, Lakkis NM., Villarreal-Levy G, et al. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty : a mechanism for recurrent disease? *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996; 28: 345-353.
- 269- Hagberg IA, Roald HE, Lyberg T. Platelet activation in flowing blood passing growing arterial thrombi. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 1331-1336.
- 270- Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, et al. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation.* 1996; 94:1239-1246.
- 271- Valante PA, Jy W, Horstman LL, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura plasma enhances platelet-leukocyte interaction in vitro. *Br. J. Haematol.* 1998; 100: 24-32.
- 272- Hernandez MR, Galan AM, Lozano M, et al. Platelet-leukocyte activation during hemodialysis detected with a monoclonal antibody to leukocyte integrin CD11b. *Nephron.* 1998; 80: 197-203.
- 273- Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood.* 1990; 75: 550-554.
- 274- Chung AWY, Radomski A, Alonso-Escolano D, et al. Platelet-leukocyte aggregation induced by PAR agonists: regulation by nitric oxide and matrix metalloproteinase. *Br. J. Pharmacol.* 2004; 143: 845-855.
- 275- Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, et al. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin. *Circulation.* 2001; 104: 1533-1537.
- 276- Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, et al. Neutrophil roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 1785-1792.

- 277- McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.* 1997; 100 suppl: S97-S103.
- 278- Helmke BP, Bremner SN, Zweifach BW, et al. Mechanisms for increased blood flow resistance due to leukocytes. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: 2884-2890.
- 279- Rochon YP, Simon SI, Lynam EB et al. A role for lectin interactions during human neutrophil aggregation. *J. Immunol.* 1994; 152: 1385-1393.
- 280- Simon SI, Rochon YP, Lynam EB, et al. B2-integrin and L-selectin are obligatory receptors in neutrophil aggregation. *Blood.* 1993; 82: 1097-1106.
- 281- Walcheck B, Moore KL, McEver RP, et al. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. *J. Clin. Invest.* 1996 ; 98: 081-1087.
- 282- Guyer DA, Moore KL, Lynam EB, et al. P-selectin-glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) is a ligand for L-selectin in neutrophil aggregation. *Blood.* 1996; 88: 2415-2421.
- 283- Palabrica T, Lobb R, Furie BC, et al. Leucocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature.* 1992; 359: 848-851.
- 284- McEver RP. P-selectin and PSGL-1 : exploiting connections between inflammation and venous thrombosis. *Thromb. Haemost.* 2002; 87: 364-365.
- 285- Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *Am Heart J.* 1999; 138: 421-425. .
- 286- Creemers EEJM, Cleutjens JPM, Smits JFM, et al. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res.* 2001; 89 :201-210.
- 287- Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: A review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovascular Research.* 2003; 59: 812-823.
- 288- Goetzl EJ, Banda MJ, Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol.* 1996; 156:1-4.
- 289- Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge SM. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res.* 1999; 85: 906-911.

- 290- Fernandez-Patron C, Stewart K, Zhang Y, Koivunen E, et al. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin-gene related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res.* 2000; 87: 670–676.
- 291- Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge S. Role of matrix metalloproteinase-2 in thrombin-induced vasorelaxation of rat mesenteric arteries. *Am J Physiol.* 2000; 278: H1473–H1479.
- 292- Hojo Y, Ikeda U, Ueno S. Expression of Matrix metalloproteinases in patients with acute myocardial infarction. *Jpn Circ J.* 2001; 65:71-75.
- 293- Sato H, Takino T, Okada Y. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature.* 1994; 370: 61-65.
- 294- Gross J, Lapière CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 1962; 48: 1014-1022.
- 295- Benjamin IJ. Matrix metalloproteinases: from biology to therapeutic strategies in cardiovascular disease. *J Invest Med.* 2001; 49: 381–397.
- 296- Woessner JF. Matrix metalloproteinase inhibition: from the Jurassic to the third millennium. *Ann NY Acad Sci.* 1999; 878: 388–403.
- 297- Birkedal-Hansen H., Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases : a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1993; 42: 197-250.
- 298- Nguyen Q, Willenbrock F, Cockett MI, et al. Different domain interactions are involved in the binding of tissue inhibitors of metalloproteinases to stromelysin-1 and gelatinase A. *Biochemistry.* 1994; 33: 2089-2095.
- 299- O’Connell JP, Willenbrock F, Docherty AJP, et al. Analysis of the role of the COOH-terminal domain in the activation, proteolytic activity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interactions of gelatinase B. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 14967-14973.
- 300- Woessner JF Jr. The matrix metalloproteinases family In: *Matrix Metalloproteinases.* W.C Parks and R.P.Mecham Ed., Academic Press, San Diego, 1998; 1-14.
- 301- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; 17: 463–516.
- 302- Woessner JF, Nagase H. Protein substates of the MMPs In: *Matrix metalloproteinases and TIMPs.* Oxford University Press Inc, NY, 2000; 87.

- 303- Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002; 90: 251–262.
- 304- Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG, DeWitt DL, et al. Effect of cholera toxin and pertussis toxin on prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases production by human monocytes. *Arc. biochem. Biophysic.* 1994; 748: 501-507.
- 305- Galis Z, Muszynski M, Sukhova GK, et al. Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic regions. *Ann NY Acad Sci.* 1995;7 48: 501-507.
- 306- Siwik DA, Chang DLF, Colucci WS. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinases activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ. Research.* 2000; 86: 1259-1265.
- 307- Feinberg MW, Jain MK, Werner F et al. Transforming growth factor β -1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages. *J Biol Chem.* 2000; 275:25766-25773.
- 308- Uzui H, Harpf A, Lui M et al. Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque. Role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation.* 2002; 106: 3024-3030.
- 309- Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JS, et al. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40 induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation.* 1997; 96: 396–399.
- 310- Lol A, Sukhova GK, Lichtman AH et al. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase expression. *Circulation.* 1998; 98: 300–307.
- 311- Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001; 107: 1117–1126.
- 312- Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, et al. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem.* 1999; 274: 11924–11929.
- 313- Xu P, Meisel SR, Ong JM et al. Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation.* 1999; 99: 993–998.

- 314- Huang Y, Song L, Wu S, et al. Oxidized LDL differentially regulates MMP-1 and TIMP-1 expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2001; 156: 119–125.
- 315- Jormsjo S, Ye S, Moritz J. et al. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease. *Circ Res* . 2000; 86: 998–1003.
- 316- Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S, et al. H. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circ Res*. 2002; 90: 784–791.
- 317- Damas JK, Waehre TA, Yndestad A et al. Stromal cell-derived factor-1 α in unstable angina. *Circulation*. 2002; 106: 36–48.
- 318- Marx N, Schonbeck U, Lazar MA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998 ;83 : 1097–1103.
- 319- Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res*. 2000; 46: 214–224.
- 320- Lane WJ, Dias S, Hattori K et al. Stromal-derived factor 1-induced megakaryocyte migration and platelet production is dependent on matrix metalloproteinases. *Blood*. 2000; 96: 4152–4159.
- 321- Price S, Greaves D, Watkins H, et al. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7549–7558.
- 322- Zhang B, Ye S, Herrmann SM et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*.1999; 99: 1788–1794.
- 323- Santavicca. M, Noel A, Stoll I et al. Characterization of structural determinants and molecular mechanisms involved in pro-stromelysin-3 by 4-aminophenylmercuric acetate and furin-type convertases. *Biochem J*. 1996; 315: 953–958.
- 324- Pei D, Majmudar G, Weiss SJ, et al. Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. *J Biol Chem*. 1994; 269: 25849–25855
- 325- Imai K, Yokohama Y, Nakanishi I, et al. Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. *J Biol Chem*. 1995 ; 270: 6691–6697.

- 326- He CS, Wilhelm SM, Pentland AP, et al. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 2632–2636.
- 327- Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, et al. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry*. 1990; 29: 10261–10270.
- 328- Knauper V, Smith B, Lopes-Otin C et al. Activation of progelatinase B (proMMP-9) by active collagenase-3 (MMP-13). *Eur J Biochem*. 1997; 248: 369–373.
- 329- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1477: 267–283.
- 330- Howard EW, Bullen, EC, Banda MJ. Preferential inhibition of 72- and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J. Biol. Chem*. 1991; 266: 13070–13075.
- 331- Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, et al. Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2) regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J. Biol. Chem*. 2000; 275: 2080–2089.
- 332- Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J. Biol. Chem*. 1994; 269: 9352–9360.
- 333- Bigg HF, Shi YE, Liu YE, et al. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. *J. Biol. Chem*. 1997; 272: 15496–15500.
- 334- Petrequin PR, Tod RF, Devall LJ, et al. Association between gelatinase release and increased plasma membrane expression of the Mo1 glycoprotein. *Blood*. 1987; 69:605–610.
- 335- Seltzer JL, et al. Activation of 72 kDa type IV collagenase/gelatinase by normal fibroblasts in collagen lattices is mediated by integrin receptors but is not related to lattice contraction. *Exp. Cell. Res*. 1994; 213: 365–374.
- 336- Ellerbroek SM, Wu YI, Overall CM, et al. Functional interplay between type 1 collagen and cell surface matrix metalloproteinase activity. *J Biol Chem*. 2001; 276 :24833–24842.

- 337- Boger DL, Goldberg J, Silletti S, et al. Identification of a novel class of small-molecule antiangiogenic agents through the screening of combinatorial libraries which function by inhibiting the binding and localization of proteinase MMP-2 to integrin 3. *J Am Chem Soc.* 2001; 123: 1280–1288.
- 338- Silletti S, Kessler T, Goldberg J, et al. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin $\alpha V\beta 3$ by an organic molecule disrupts angiogenesis tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:119–124.
- 339- d'Ortho MP, Stanton H, Butler M, et al. MT1-MMP on the cell surface causes focal degradation of gelatin films. *FEBS Lett.* 1998; 421: 159–164.
- 340- d'Ortho MP, Will H, Atkinson S, et al. Membrane-type matrix 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *FEBS Lett.* 1997; 250: 751–757.
- 341- Knauper V, Will H, Lopes-Otin C, et al. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. *J Biol Chem.* 1996 ; 271:17124–17131.
- 342- Zucker S, Conner C, DiMassmo BI et al. Thrombin induces the activation of progelatinase A in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995; 270: 23730–23738.
- 343- Galis ZS, Kranzhofer R, Fenton JW, et al. Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 483–489.
- 344- Rauch BH, Bretschneider E, Braun M, et al. Factor Xa releases matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) from human vascular smooth muscle cells and stimulates the conversion of pro-MMP-2 to MMP-2. *Circ Res.* 2002; 90: 112–115.
- 345- Wart HEV, Hansen-Birkedal H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87; 5578–5582.
- 346- Murphy G, Atkinson S, Ward R, et al. The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992; 667: 1-12.
- 347- Murphy G, Mc Alpine CG, Poll CT, et al. Purification and characterisation of a bone metalloproteinase that degrades gelatine and type IV and V collagen. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. 831: 49-58.

- 348- Okada Y, Morodomi T, Enghild JJ, et al. Matrix metalloproteinases 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur.J.Biochem.* 194: 721-730.
- 349- Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1994; 732: 31-41.
- 350- Crabbe T, Smith B, O'Connell J, et al. Human progelatinase A can be activated by matrilysin. *FEBS Lett.* 1994; 345: 14-16.
- 351- Sang QA, Bodden MK, Windsor LJ. Activation of human progelatinase A by collagenase and matrilysin: activation of procollagenase by matrilysin. *J. Protein. Chem.* 1996; 15 :243-253.
- 352- Morodomi T, Ogata Y, Sasaguri Y, et al. Purification and characterization of matrix metalloproteinase 9 from U937 monocytic leukaemia and HT1080 fibrosarcoma cells. *Biochem. J.* 1992 .285; 603-611.
- 353- Vissers MC, Winterborn CC. Activation of human neutrophil gelatinase by endogenous serine proteinases. *Biochem J.* 1998; 249: 327-331.
- 354- Itoh Y, Nagase H. Preferential inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 that is bound to the precursor of matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) by human neutrophil elastase. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 16518-16521.
- 355- Okada Y, Gonoji Y, Naka K, et al. Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J. Biol.Chem.* 1992; 267: 21712-21719.
- 356- Sang QX, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. Proteolytic and non-proteolytic activation of human neutrophil progelatinase B. *Biochim. biophys. Acta.* 1995; 1251:99-108.
- 357- Fridman R, Toth M, Pena D, et al. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res.* 1995; 55: 2548-2555.
- 358- Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, et al. Interaction of 92- kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with the stromelysin. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 4583-4591.
- 359- Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J.Biol.Chem.* 1992; 267: 3581-3584.

- 360- Nakamura H, Fujii Y, Ohuchi E, et al. Activation of the precursor of human stromelysin 2 and its interactions with other matrix metalloproteinases. *Eur. J. Biochem.* 1998; 253: 67-75.
- 361- Knäuper V, Smith B, Lopez-Otin C, et al. Activation of progelatinase B (proMMP-9) by active collagenase-3 (MMP-13). *Eur. J. Biochem.* 1997; 248: 369-373.
- 362- Chesney CM, Harper E, Colman RW. Human platelet collagenase. *J. Clin. Invest.* 1974; 53: 1647-1654.
- 363- Kazes I, Elalamy I, Sraer JD, et al. Platelet release of trimolecular complex components MT1-MMP/TIMP2/MMP2: involvement in MMP2 activation and platelet aggregation. *Blood.* 2000; 96: 3064-3069.
- 364- Martinez-Cuesta MA, Salas E, Radomski W, et al. Matrix metalloproteinase -2 in platelet adhesion to fibrinogen : interactions with nitric oxide. *Med.Sci.Monitor.* 2001; 7: 646-651.
- 365- Radomski A, Stewart MW, Jurasz P, et al. Pharmacological characteristics of solid-phase von Willebrand factor in human platelets. *Br J Pharmacol.* 2001; 134: 1013-1020.
- 366- Jayachandran M, Owen WG, Miller VM. Effects of ovariectomy on aggregation, secretion, and metalloproteinases in porcine platelets. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003; 284: H1679-1685.
- 367- Alonso-Escolano D, Strongin AY, Chung AW, et al. Membrane type-1 matrix metalloproteinase stimulates tumor cell-induced platelet aggregation: role of receptor glycoprotein. *Br.J.Pharmacol.* 2004; 141: 241-252.
- 368- Jurasz P, Sawicki G, Duszyk M, et al. Matrix metalloproteinase-2 in tumour cell-induced platelet aggregation : regulation by NO. *Cancer Res.* 2001; 61: 376-382
- 369- Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, et al. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol.* 1993; 51: 187-198.
- 370- Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, et al. Isolation and primary structure of NAGL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem.* 1993; 268: 10425-10432.
- 371- Flower DR. The lipocalin protein family: a role in cell regulation. *FEBS Lett.* 1994; 354: 7-11.

- 372- Radomski A, Jurasz P, Sanders EJ, et al. Identification, regulation and role of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) in human platelets. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 137: 1330-1338.
- 373- Jurasz P, Radomski A, Sawicki G, et al. MMP-2 and TIMP-4 regulate tumor cell induced platelet aggregation. Paper presented at: international Congress on Membrane-Bound Proteolytic Enzymes and Cancer; May 19-21, 2001; Palermo, Italy.
- 374- Chesney CM, Harper E, Colman R, et al. Human platelet collagenase. *J. Clin. Invest.* 1974; 53: 1647-1654.
- 375- Leven RM, Yee T. Collagenase production by guinea pig megakaryocytes in vitro. *Exp. Hematol.* 1990; 18: 743-747.
- 376- Chung AWY, Jurasz P, Hollenberg MD, et al. Mechanisms of action of proteinase-activated receptor agonists on human platelets. *Br J Pharmacol.* 2002; 135: 1123-1132.
- 377- Martinez MA, Salas E, Radomski A, et al. Matrix metalloproteinase-2 in platelet adhesion to fibrinogen : interactions with nitric oxide. *Med. Sci. Monit.* 2001; 7: 646-651.
- 378- Cipollone F, Prontera C, Pini B, et al. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation* 2001; 104: 921-927.
- 379- D'Ortho M.P, Will H, Atkinson S, et al. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur. J. Biochem.* 1997; 250: 751-757.
- 380- Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 2446-2451.
- 381- Sounni NE, Devy L, Hajitou A, et al. MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *FASEB J.* 2002; 16: 555-564.
- 382- Kranzhofer A, Baker AH, George SJ, et al. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 1, -2, and -3 during neointima formation in organ cultures of human saphenous vein. *Arterio Thromb Vasc Biol.* 1999; 19 :255-265.

- 383- Chung Ada WY, Radomski A, Alonso-Escolano D, et al. Platelet-leukocyte aggregation induced by PAR agonists: regulation by nitric oxide and matrix metalloproteinases. *Br J Pharmacol.* 2004; 1-11.
- 384- Lazarus GS, Brown RS, Daniels JR, et al. Human granulocyte collagenase. *Science.* 1968; 159: 1483-1485.
- 385- Lazarus GS, Daniels JR, Brown RS, et al. Degradation of collagen by a human granulocyte collagenolytic system. *J. Clin. Invest.* 1968; 47: 2622-2629
- 386- Hasty KA, Hibbs MS, Kang AH, et al. Heterogeneity among human collagenases demonstrated by monoclonal antibody that selectively recognizes and inhibits human neutrophil collagenase. *J. Exp. Med.* 1984; 159: 1455-1463.
- 387- Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, et al. Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes. *Biochem. J.* 1977; 162: 195-197.
- 388- Oronsky AL, Perper RJ, Schroder HC. Phagocytic release and activation of human leukocyte procollagenase. *Nature.* 1973; 246: 417-419.
- 389- Shlopov BV, Lie WR, Mainardi CL, et al. Osteoarthritic lesions : involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 2065-2074.
- 390- Hanemaaijer RT, Sorsa YT, Kontinen YL, et al. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells –regulation by tumor necrosis factor α and doxyxyclyne. *J. Biol. Chem.* 1997. 272: 31504-31509.
- 391- Herman MP, Sukhova GK, Libby P, et al. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation.* 2001; 104: 1899–1904.
- 392- Capodici CG, Muthukumar MA, Amoruso MA, et al. Activation of neutrophil collagenase by cathepsin G. *Inflammation.* 1989; 13: 245-258.
- 393- Knauper V, Kramer S, Reinke H, et al. Characterization and activation of procollagenase from human polymorphonuclear leucocytes. N-terminal sequence determination of the proenzyme and various proteolytically activated forms. *Eur. J. Biochem.* 1990; 189: 295-300.
- 394- Sopata I, Dancewicz AM. Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1974; 370 :510-523.
- 395- Murphy G, Bretz U, Baggiolini M, et al. The latent collagenase and gelatinase of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Biochem J.* 1980; 192: 517-525.

- 396- Dewald B, Bretz U, Baggiolini M. release of gelatinase from a novel secretory compartment of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 1982; 70: 518-525.
- 397- Kjeldsen L, Sengelov H, Lollike K, et al. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood.* 1994; 83: 1640-1649.
- 398- Kraling BM, Wiederschain DG, Boehm T, et al. The role of matrix metalloproteinase activity in the maturation of human capillary endothelial cells in vitro. *J. Cell Sci.* 1999; 112: 1599-1609
- 399- Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res.* 1986; 46 :467-473.
- 400- Unemori EN, Bouhana KS, Werb Z. Vectorial secretion of extracellular matrix proteins, matrix-degrading proteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases by endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 445-451.
- 401- Fisher C, Gilbertson-Beadling S, Powers, EA, et al. Interstitial collagenase is required for angiogenesis in Vitro *Dev. Biol.* 1994; 162: 499-510.
- 402- Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, et al. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 10079-10086.
- 403- Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, et al. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases : identification of the cleavage sites, kinetics analyses and transforming growth factor- β 1 release. *Biochem. J.* 1997; 322: 809-814.
- 404- Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000; 14: 163-176.
- 405- Schonbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 β by matrix metalloproteinases : a novel caspase-1-independent pathway if IL-1 β processing, *J. Immunol.* 1998; 161: 3340-3346.
- 406- Haro H, Crawford HC, Fingleton B, et al. Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor- α in a model of herniated disc resorption. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 143-150.
- 407- McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases : they're not just for matrix anymore! *Current Opin. Cell Biol.* 2001; 13: 534-540.

- 408- Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, et al. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res.* 2001; 61: 237-242.
- 409- Levi E, Fridman R, Miao HQ, et al. Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 7069-7074.
- 410- Lijnen HR, Ugwu F, Bini A, et al. Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry.* 1998; 37: 4699-4702.
- 411- Patterson BC, Sang QXA. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 28823-28825.
- 412- Wu Z, O'Reilly MS, Folkman J, et al. Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997 ;236: 651-654.
- 413- Cao Y, Ji RW, Davidson D, et al. Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 29461-29467.
- 414- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993; 362: 801.
- 415- Steinberg D. Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. *J.intern. Med.* 1993; 233: 227.
- 416- Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* 1997; 11(1): 51-59.
- 417- Okada Y, Hashimoto G. Degradation of extracellular matrix by matrix metalloproteinases and joint destruction. *Seikagaku.* (Review. Japanese). 2001; 73(11): 1309-1321.
- 418- Silence J, Collen D, Lijnen HR. Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circ Res.* 2002; 90: 897-903.
- 419- Silence J, Lupu F, Collen D, et al. Persistence of atherosclerotic plaque but reduced aneurysm formation in mice with stromelysin-1 (MMP-3) gene inactivation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1440-1445.

- 420- Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340(2): 115-126.
- 421- Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 1995; 91(11): 2844-2850.
- 422- Ravn HB, E Falk. Histopathology of plaque rupture. *Cardiol Clin.* 1999; 17: 263-270.
- 423- Smith. EB. The influence of age and atherosclerosis on the chemistry of aortic intima. *J Atherosclerosis Res.* 1965; 5: 241-248.
- 424- Shah PK, Galis ZS. Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture: players keep piling up but questions remain. *Circulation.* 2001; 104: 1878-1880.
- 425- Burleigh MC, Briggs AD, Lendon CL, et al. Collagen types I and II, collagen content, GAGs and mechanical strength of human atherosclerotic plaque caps: span-wise variations. *Atherosclerosis.* 1992; 96: 71-81.
- 426- Moreau M, Brocheriou I, Petit L, et al. Interleukin-8 mediates down regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque. *Circulation.* 1999; 99: 420-426.
- 427- Noji Y, Kajinami K, Kawashiri M, et al. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med.* 2001; 39: 380-384.
- 428- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994; 90: 775-778.
- 429- Zempo N, Kenagy RD, Au YPT et al. Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery. *J Vasc Surg.* 1994; 20: 209-217.
- 430- Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke.* 2000; 31: 40-47.
- 431- Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation.* 1999; 99: 2503-2509.

- 432- Lee RT, Schoen FJ, Loree HM, et al. Circumferential stress and matrix metalloproteinase 1 in human coronary atherosclerosis. Implications for plaque rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16: 1070–1073.
- 433- Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hignen DJ, et al. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases 1, 2, and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis.* 2000; 245–253: 102.
- 434- Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ et al. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 8154–8158.
- 435- Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, et al. S. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 402–406.
- 436- Prescott MF, Sawyer WK, Linden-Reed JV, et al. Effect of matrix metalloproteinase inhibition on progression of atherosclerosis and aneurysm in LDL receptor-deficient mice overexpressing MMP-3, MMP-12, and MMP-13 and on restenosis in rats after balloon injury. *Ann NY Acad Sci.* 1999; 878: 179–190.
- 437- Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: regulation via CD40-CD40 ligand signaling in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 1999; 189: 843–853
- 438- Davies and A.C. Thomas. Plaque fissuring—the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J.* 1985; 53: 363–373.
- 439- Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *New Engl J Med.* 1995; 332: 1553–1559.
- 440- Gottsauner-Wolf M, Moliterno DJ, Lincoff AM, et al. Restenosis: an open file. *Clin Cardiol.* 1996; 19: 347-365.
- 441- Fuster V, Falk E, Fallon JT, et al. The three processes leading to post PTCA restenosis: dependence on the lesion substrate. *Thromb Haemost.* 1995; 74: 552-559.
- 442- Lafont A, Guzman La, Withlow PL, et al. Restenosis after experimental angioplasty: intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circ Res.* 1995; 76: 996-1002.
- 443- Post MJ, Borst C, Kuntz RE. The relative importance of arterial remodelling comparing with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon

- angioplasty: a study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic Yucatan micropig. *Circulation*. 1994; 89: 2816-2821.
- 444- Anderson HR, Maeng M, Thorwest M, et al. Remodeling rather than neointimal formation explains luminal narrowing after deep vessel wall injury.: insights from a porcine coronary (re) stenosis model. *Circulation*. 1996; 93: 1716-1724.
- 445- Shwartz RS, Topol EJ, Serrys PW, et al. Artery size, neointima, and remodeling: time for some standards. *J Am coll Cardiol*. 1998 ;32: 2087-2094.
- 446- Southgate KM, Fisher M, Banning AP, et al. Upregulation of basement membrane-degrading metalloproteinase secretion after balloon injury of pig carotid arteries. *Circ Res*. 1996; 79: 1177-1187.
- 447- Jenkins GM, Crow MT, Bilato C, et al. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*. 1998; 97: 82-90.
- 448- Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, et al. Matrix metalloproteinase expression in the coronary circulation induced by coronary angioplasty. *Atherosclerosis*. 2002; 161:185-192.
- 449- De Smet BJ, De Kleijn D, Hanemaaijer R et al. Metalloproteinase inhibition reduces constrictive arterial remodeling after balloon angioplasty: a study in the atherosclerotic Yucatan micropig. *Circulation*. 2000; 101: 2962-2967.
- 450- Li C, Cantor WJ, Nili N, et al. Arterial repair after stenting and the effects of GM6001, a matrix metalloproteinase inhibitor. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39: 1852- 1858.
- 451- Cherr GS, Motew SJ, Travis JA et al. Metalloproteinase inhibition and the response to angioplasty and stenting in atherosclerotic primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22: 161-166.
- 452- Turunen MP, Puhakka HL, Koponen JK, et al. Peptide-retargeted adenovirus encoding a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 decreases restenosis after intravascular gene transfer. *Mol Ther*. 2002; 6: 306-312.
- 453- George SJ, Johnson JL, Angelini GD, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of the human TIMP-1 gene inhibits smooth muscle cell migration and neointimal formation in human saphenous vein. *Human Gene Therapy*. 1998; 9: 867-877.
- 454- Furman C, Luo Z, Walsh K, et al Systemic tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene delivery reduces neointimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *FEBS Letters*. 2002; 531: 122-126.

- 455- Cheng L, Mantile G, Pauly R, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 blocks vascular smooth muscle cell invasiveness in vitro and modulates neointimal development in vivo. *Circulation*. 1998; 98: 2195-2201.
- 456- Gurjar, MV, Sharma RV, Bhalla RC. eNOS gene transfer inhibits smooth muscle cell migration and MMP-2 and MMP-9 activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999;19:2871-2877.
- 457- Cotran RS, Gimbrone MA, Bevilacqua MP, et al. Induction and detection of a human endothelial activation antigen in vivo. *J. Exp. Med.* 1986; 164: 661-666.
- 458- Siegelman, MH, van de Rijn M, Weissman IL. Mouse lymph node homing receptor cDNA clone encodes a glycoprotein revealing tandem interaction domains. *Science*; 1989; 243: 1165-1172.
- 459- Bendeck MP, Nakada MT. The $\beta 3$ integrin antagonist m7E3 reduces matrix metalloproteinase activity and smooth muscle cell migration. *Vasc. Res.* 2001; 38: 590-599.
- 460- Sierevogel MJ, Velema E, de Jaegere PP, et al. Minimal duration of oral matrix metalloproteinase inhibition to prevent constrictive arterial remodeling after balloon dilation in the pig. *Radiology*. 2002; 222: 468-473.
- 461- Humphries S, Bauters C, Meirhaeghe A, et al. The 5A6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP3) gene as a risk factor for restenosis. *Eur. Heart J.* 2002; 23: 721-725.
- 462- Schoenhagen P, Vince DG, Ziada KM, et al. Relation of matrix-metalloproteinase 3 found in coronary lesion samples retrieved by directional coronary atherectomy to intravascular ultrasound observation on coronary remodeling. *Am. J. Cardiol.* 2002 ; 89: 1354-1359.
- 463- Dollery CM, McEwan JR, Wang M, et al. TIMP-4 is regulated by vascular injury in rats. *Circ. Res.* 1999; 84: 498-504.
- 464- Merhi Y, L-Lacoste L, Lam JYT. Neutrophil implications in platelet deposition and vasoconstriction following deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Circulation* 1994; 90: 997-1002.
- 465- Merhi Y, Guidoin R, Provost P, Leung TK, et al. Increase of neutrophil adhesion and vasoconstriction with platelet deposition after deep, compared to mild, arterial injury by angioplasty. *Am Heart J.* 1995; 129: 445-451.

- 466- Merhi Y, Provost P, Guidoin R, et al. Importance of platelets in neutrophil adhesion and vasoconstriction after deep carotid arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1185-1190.
- 467- Chauvet P, Bienvenu JG, Théorêt JF, et al. Inhibition of platelet-neutrophil interactions by fucoidan reduces adhesion and vasoconstriction after arterial injury by angioplasty in pigs. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999; 34: 597-603.
- 468- Merhi Y, Provost P, Chauvet P, et al. Selectin blockade reduces neutrophil interaction with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 372-377.
- 469- Libby P, Schwartz P, Brogi E, et al. A cascade model for restenosis, a special case of atherosclerosis progression. *Circulation.* 1992; 86: (suppl III): III-47-III-52.
- 470- Wakefield TW, Strieter RM, Schaub R, et al. Venous thrombosis prophylaxis by inflammatory inhibition without anticoagulation therapy. *J Vasc Surg.* 2000; 31: 309-324.
- 471- Lefer AM, Campbell B, Scalia R, et al. Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion: role of selectins. *Circulation.* 1999; 99: 1322-1328.
- 472- Hayward R, Campbell P, Shin YK, et al. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein-1 protects against myocardial ischemic reperfusion injury in cats. *Cardiovasc. Res.* 1999; 41: 65-76.
- 473- Toombs CF, Degraaf GL, Martin JP, et al. Pretreatment with a blocking monoclonal antibody to P-selectin accelerates pharmacological thrombosis in a primate model of arterial thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 275: 941-949.
- 474- Kumar A, Villani MP, Patel UK, et al. Recombinant soluble form of PSGL-1 accelerates thrombolysis and prevents reocclusion in a porcine model. *Circulation.* 1999; 99: 1363-1369.
- 475- Kumar A, Hoover JL, Simmons CA, et al. Remodeling and neointimal formation in the carotid artery of normal and P-selectin-deficient mice. *Circulation.* 1997; 96: 4333-4342.
- 476- Wize J, Sopata I, Smerdel A, et al. Ligation of selectin L and integrin CD11b/CD18 (Mac-1) induces release of gelatinase B (MMP-9) from human neutrophils. *Inflamm Res.* 1998; 47: 325-327.
- 477- Caron A, Théorêt JF, Mousa SA, et al. Anti-platelet effects of GPIIb/IIIa and P-selectin antagonism, platelet activation, and binding to neutrophils. *Cardiovasc Pharmacol.* 2002; 40: 296-306.

- 478- Sathish JG, Falati S, Croce K, et al. Antibody cross-linking of human platelet P-selectin induces calcium entry by a mechanism dependent upon Fcγ receptor IIA. *Thromb Haemost.* 2004; 92: 598-605.

