

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

ÉTUDE DE L'EFFET D'UN ANTICORPS MONOCLONAL  
(AcD<sub>51</sub>) SUR LES CELLULES DE LA LIGNE MYELOIDE

PAR

RAYNALD GAREAU

THESE PRÉSENTÉE

À

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE  
PHILOSOPHIAE DOCTOR (BIOPHYSIQUE)

OCTOBRE 1988

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

### REMERCIEMENTS

Je ne puis déposer cette thèse sans exprimer mes remerciements les plus sincères. Ces remerciements, je les adressent d'abord à mon directeur de recherche le Dr. Julian Gruda qui m'a permis de franchir le dernier échelon conduisant à la réalisation d'un vieux rêve.

Je désire aussi remercier le Dr. Art Sullivan, médecin hématologue à l'université McGill, sans qui toute cette recherche à saveur hématologique n'aurait jamais pu être menée à terme. Sans être officiellement co-directeur, vous avez toujours montré beaucoup d'intérêt pour mes travaux et la justesse de vos remarques ainsi que la pertinence de vos conseils étaient, à chacun de mes déplacements à Montréal, un encouragement tangible.

Je suis de plus reconnaissant envers le personnel du département de chimie-biologie de l'U.Q.T.R. et envers le Dr Francine Décarie qui m'a permis de faire un stage de haut niveau dans les services transfusionnels de la Croix-Rouge.

Mes derniers remerciements mais non les moindres convergent vers mon épouse et mes deux filles pour leur patience, leur tolérance et dans les moments difficiles leurs encouragements.

À Lise, Mélanie et Véronique

## TABLE DES MATIERES

	page
LISTE DES FIGURES .....	iii
LISTE DES TABLEAUX .....	iv
SOMMAIRE .....	v
REMERCIEMENTS .....	vi
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE PREMIER	
1.0- Structure plaquettaire .....	5
1.1- Fonctions plaquettaires .....	12
1.1.1- Adhésion .....	14
1.1.2- Sécrétion .....	25
1.1.3- Agrégation .....	29
CHAPITRE DEUXIEME - MATERIEL ET METHODES	
2.0- Matériel .....	50
2.0.1-Prélèvements et préparation des plaquettes .....	51
2.0.2-Génération de l'Ac D <sub>51</sub> .....	52
2.0.3-Préparation des monocytes .....	52
2.1- Méthodes .....	53
2.1.1- Agrégation plaquettaire .....	53
2.1.2- Immunoblotting .....	55
2.1.3- Choc hypotonique plaquettaire .....	62
2.1.4- Immunofluorescence (général) .....	62
2.1.5- Sérologie plaquettaire .....	62

2.1.6- Érythrophagocytose monocytaire .....	64
2.1.7- Épreuve au NBT .....	65
2.1.8- Bactéricidie .....	66
2.1.9- Immunoprécipitation .....	68
2.1.10- Anisotropie de fluorescence .....	71
 CHAPITRE TROISIÈME - RÉSULTATS	
3.1- Purification de l'AcD <sub>51</sub> .....	73
3.2- Ultrapurification de l'AcD <sub>51</sub> .....	75
3.3- Iodination de surface et immunoprécipitation .....	76
3.4- Détermination du poids moléculaire de AgD <sub>51</sub> .....	79
3.5- Fonctions cellulaires .....	80
a- Fonctions granulocytaires .....	81
b- Fonction monocytaire .....	81
c- Réduction du NBT .....	83
d- Fonction plaquettaire .....	84
3.6- Agrégation en fonction de la concentration (AcD <sub>51</sub> ) .....	87
3.7- Choc hypotonique plaquettaire .....	88
3.8- Sérologie plaquettaire .....	90
3.9- Sérologie et agrégation plaquettaire .....	91
3.10-Anisotropie de fluorescence .....	93
3.11-Détermination de la classe de l'AcD <sub>51</sub> .....	93
 DISCUSSION .....	94
 RÉFÉRENCES .....	104

## LISTE DES ABREVIATIONS

ABP	: Actin-binding-protein
ACD	: Acide-citrate-dextrose
ACD-A	: Acide-citrate-dextrose-adénine
AcD <sub>51</sub>	: Anticorps D <sub>51</sub>
ADP	: Adénosine diphosphate
AgD <sub>51</sub>	: Antigène D <sub>51</sub>
AMP <sub>c</sub>	: 3',5' Adénosine monophosphate
DG	: Diacyl glycérol
DPH	: 1,6-diphényl-1,3,5, hexatriène
EDTA	: Ethylène diamine tétraacétique acide
Fc	: Fragment cristallisable (immunoglobuline)
FvW	: Facteur von Willebrand
FITC	: Isothiocyanate de fluorescéine
GP(x)	: Glycoprotéine (identification)
GDP	: Guanosine diphosphate
GTP	: Guanosine triphosphate
IP <sub>3</sub>	: Inositol triphosphate
LLC	: Leucémie lymphoïde aigüe
NBT	: Nitro-bleu de tétrazolium
PAF	: Facteur d'activation plaquettaire
PAGE-SDS	: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante
PBS	: Tampon phosphate salin
PGE <sub>1</sub>	: Prostaglandine E <sub>1</sub>
PGI <sub>2</sub>	: Prostaglandine I <sub>2</sub>
PIP <sub>2</sub>	: Phosphatidyl inositol diphosphate
PLC	: Phospholipase C
PPP	: Plasma pauvre en plaquette
PRP	: Plasma riche en plaquette
SCRS	: Système connecté à la surface
S.T.d.	: Système tubulaire dense
TSP	: Thrombospondine
TXA <sub>2</sub>	: Thromboxane A <sub>2</sub>

## LISTE DES FIGURES

FIGURES	page
1- Schéma d'une plaquette .....	5
2- Distribution des phospholipides de la membrane plaquettaire .....	6
3- Contenu cytoplasmique plaquettaire .....	8
4- Étape de la formation du bouchon hémostatique .....	13
5- Structure de la glycoprotéine Ib (GP Ib) .....	16
6- Association GPIb-GPIX .....	17
7- Structure du Facteur Von Willebrand .....	19
8- Structure et arrangement des fibres de collagène .....	22
9- Intervenants dans l'adhésion plaquettaire .....	24
10- Mécanismes de la sécrétion plaquettaire .....	28
11- Action de la thrombine .....	28
12- Structure de GPIb/IIIa .....	31
13- Pont interplaquettaire .....	33
14- Structure du fibrinogène .....	34
15- Structure de la thrombospondine .....	36
16- Schéma de l'activation plaquettaire .....	38
17- Schéma de l'hypothèse de Colman .....	43
18- Biosynthèse du PAF .....	45
19- Purification de AcD51 .....	74
20- Ultrapurification de l'AcD51 .....	76
21- Nomogramme de la lyse plaquettaire .....	78
22- Autoradiogramme .....	79
23- Western Blot .....	80
24- Érythrophagocytose .....	83
25- Agrégation plaquettaire (1 <sup>e</sup> série) .....	85
26- Agrégation plaquettaire (2 <sup>e</sup> série) .....	86
27- Agrégation en fonction de la concentration AcD51 (ADP) .....	87
28- Agrégation en fonction de la concentration AcD51 (épinéphrine) ..	88

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAUX	page
I- Distribution de l'antigène D <sub>51</sub> .....	4
II- Glycoprotéines de la membrane plaquettaire .....	9
III- Contenu des divers granules plaquettaires .....	11
IV- Les collagènes fibrillaires .....	21
V- Liste des principales substances agrégeantes.....	30
VI- Inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire.....	48
VII- Préparation des agents agrégeants .....	54
VIII-Solutions pour la confection des gels d'acrylamide .....	57
IX- Fonctions granulocytaires .....	81
X- Fonction monocytaire .....	82
XI- Production du NBT .....	84
XII- Choc hypotonique plaquettaire .....	89
XIII- Sérologie plaquettaire .....	90
XIV- Agrégation via certains sites antigéniques connus.....	92
XV- Anisotropie de fluorescence .....	93

## Sommaire

L'AcD<sub>51</sub> est un anticorps monoclonal développé chez la souris, contre un antigène de la surface des cellules myéloïdes jeunes ou matures. Cet antigène est exprimé par tous les granulocytes, plaquettes, mégacaryocytes et monocytes mais par seulement 5 à 10% des lymphocytes. Quant à la lignée érythroïde nous n'avons jamais observé de réaction positive avec l'AcD<sub>51</sub>.

Dans ce travail l'anticorps D<sub>51</sub> a été purifié en une étape par passage sur colonne de DEAE AFFI-BLUE et sa pureté vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (PAGE-SDS). Nous avons démontré que cet anticorps monoclonal se lie à une protéine de 137 kDa localisée sur la membrane plaquettaire et impliquée dans l'une des fonctions primordiales de la plaquette: L'AGRÉGATION. En effet la liaison de l'AcD<sub>51</sub> à son récepteur plaquettaire modifie l'agrégation de ces cellules lorsqu'elle est induite par l'épinéphrine, l'ADP ou le PAF mais n'affecte pas ce phénomène lorsqu'il est induit par le collagène, la ristocétine, la thrombine ou l'ionophore A23187.

À l'heure actuelle l'effet de D<sub>51</sub> semble se restreindre aux fonctions plaquettaires; il n'a en effet aucune action sur les fonctions suivantes des granulocytes ou monocytes: érythrophagocytose, chimiotactisme, phagocytose ou bactéricidie. De plus cet anticorps monoclonal n'interfère d'aucune façon dans la liaison des principaux anticorps antiplaquettaires connus: PLA<sup>1</sup>, BaK<sup>9</sup>, HLA , YuK) à leur récepteur membranaire localisé sur les glycoprotéines de la membrane de cette cellule.

Ces travaux nous ont amenés à émettre l'hypothèse que l'AcD<sub>51</sub> suite à sa liaison avec son récepteur (137 kDa) sur la membrane plaquettaire, induirait un changement conformationnel de ce dernier avec comme conséquence une augmentation de la fluidité membranaire locale. Cette perturbation de la fluidité empêcherait l'interaction du couple protéine Gi-adénylate-cyclase et pourrait ainsi expliquer l'effet de l'AcD<sub>51</sub>.

## INTRODUCTION

Pourtant reconnu fort hâtivement comme élément fondamental des organismes vivants, la cellule est, faute de moyens, demeurée longtemps impénétrable. Aujourd'hui, malgré une connaissance plus approfondie de la carte cellulaire et de sa légende, l'organisme humain nous laisse découvrir de multiples textes que nous avons encore, il faut l'avouer, peine à interpréter.

Parmi les grands systèmes cellulaires de l'organisme, le sang est probablement celui qui porte le plus lourd fardeau d'étiquettes. Que de légendes, de préjugés et de faussetés ont été attribués à ce fluide si vital. En effet, de tout temps, le sang a exercé une sorte de fascination sur les hommes et, comme le rapportent Zmijewski et Fletcher (1), il est facile d'imaginer la crainte et la terreur de nos ancêtres des cavernes et des siècles suivants, qui voyaient s'échapper de leurs blessures ou de celles de leur proches, le sang et la vie. En ces époques, et pour de nombreux siècles par la suite, ce fluide devait être réputé comme étant le siège de l'âme et des grandes vertus.

Un grand pas contribuant cependant à démystifier le sang fut accompli lorsqu'en 1628, William Harvey décrivit la circulation sanguine. Dans sa monographie (2) il démontre que toute la masse sanguine est constamment en mouvement dans un sens déterminé. Dès cette époque, les esprits ouverts s'interrogent et tirent la conclusion que, si le sang est vital à l'organisme, il n'est pas nécessairement doué de toutes les étiquettes qui lui sont généralement attribuées.

Nous savons aujourd'hui que le sang est un tissu qui a la propriété

distinctive de pouvoir circuler à l'intérieur de l'arbre vasculaire. Cette circulation est possible, malgré la très forte concentration de cellules sanguines, parce que toutes ces cellules à l'état normal sont dissociées les unes des autres et possèdent une remarquable plasticité.

Malheureusement, la circulation des cellules sanguines ne se fait pas toujours sans heurts ni contraintes. Lorsque par exemple, une rupture de l'arbre vasculaire se produit, il est nécessaire, afin de limiter la perte sanguine, que la brèche vasculaire se colmate dans les délais les plus courts. La mise à feu de ce processus de réparation se produit par le contact du sang avec des surfaces qui lui sont habituellement étrangères et par le mélange au sang de substances tissulaires activatrices. Par ailleurs, lorsqu'une thrombose se constitue, il est fréquent de voir s'amorcer, et dans les cas les plus heureux s'achever, la destruction du thrombus, levant par conséquent l'obstruction circulatoire. **Ainsi existe-t-il dans le sang des mécanismes capables d'entrainer sa solidification ou sa fluidification.**

Tout cet ordre supracellulaire est régi par des interactions précises qui contrôlent l'adhésion, l'agrégation, l'étalement et la motilité cellulaire. Ainsi l'**adhésion** des plaquettes au sous-endothélium, la **mobilisation** des granulocytes et la **prolifération** des lymphocytes sont autant de réactions qui dépendent de l'expression de récepteurs à la surface de ces cellules. Un certain nombre de ces récepteurs ont été identifiés, jadis à l'aide d'anticorps polyvalents et aujourd'hui, grâce aux anticorps monoclonaux, capable de reconnaître un antigène particulier et même un épitope précis de cette même molécule antigénique.

La reconnaissance par un anticorps monoclonal d'un de ces récepteurs à distribution ubiquitaire parmi les cellules sanguines (exception faite de la lignée érythroïde) nous a permis cette incursion parmi les éléments figurés du sang. Cette portion de notre patrimoine cellulaire se subdivise en trois grandes catégories: les globules rouges (ou érythrocytes), les globules blancs (ou leucocytes) et les plaquettes (ou thrombocytes). Les érythrocytes et les thrombocytes sont des populations homogènes de cellules, tandis que les leucocytes constituent un ensemble hétérogène de cellules de morphologie et de fonctions différentes.

Dans le cadre des recherches effectuées dans les laboratoires d'hématologie de l'université McGill, Sullivan et coll. (3) ont généré, lors d'une fusion cellulaire, un anticorps monoclonal reconnaissant, indépendamment du stade de maturation, un antigène ou un épitope antigénique localisé à la surface des leucocytes et des plaquettes (Tableau I). Suite à leurs travaux nous voulions, dans le cadre initial de ce projet, **isoler, identifier et caractériser** l'antigène reconnu par ce nouvel anticorps monoclonal. Il nous semblait que ce projet était d'autant plus intéressant que l'expression cellulaire de cet antigène était modifiée au cours de certaines pathologies telle la leucémie lymphoïde chronique (LLC).

Les plaquettes exprimant à tous les stades de leur maturation l'antigène recherché avaient aussi l'avantage d'être faciles à obtenir en grand nombre; pour ces raisons elles furent choisies comme source d' $\text{AgD}_{51}$  dès le début de ce projet à caractère biochimique.

Cependant, la direction des recherches prit une tout autre tangente lorsque nous nous sommes rendus compte que parmi toutes les fonctions des cellules exprimant l'antigène  $\text{D}_{51}$  ( $\text{AgD}_{51}$ ), seules certaines fonctions

TABLEAU 1

FILIACTION DES CELLULES SANGUINES

RÉGÉNÉRATION SOMAQUE

LOCALISATION NORMALE	MULTIPLICATION CELLULAIRES	LIGNÉES GLOBULAIRES							
		NORMOCYTES	BASOPHILES (SANGUINS)	EOSINOPHILES	NEUTROPHILES	MEGACARYOCYTES PLAQUETTES	MONOCYTES	LYMPHOCYTES	
ORGANE HEMATO- POIETIQUE	STADES DE MULTIPLICATION	PRONORMO- BLASTE	BASOPHILO- BLASTE *	EOSINOPHILO- BLASTE *	NEUTROPHILO- BLASTE *	MEGACARYO- BLASTE *	MONOBLASTE *	LYMPHOBLASTE	
		MACROPRONOR- MOBLASTE		PROMYÉLOCYTE EOSINOPHILE	PROMYÉLOCYTE NEUTROPHILE *				
		NORMOBLASTE BASOPHILE	PROMYÉLOCYTE BASOPHILE *	PROMYÉLOCYTE EOSINOPHILE *	PROMYÉLOCYTE NEUTROPHILE *				
		NORMOBLASTE POLYCHROMAT.	MYELOCYTE BASOPHILE *	MYELOCYTE EOSINOPHILE DEMI-MUR	MYELOCYTE NEUTROPHILE DEMI-MUR *	PROMEGA- CARYOCYTE *	PROMONOCYTE *	PROLYMPHOCY	
		NORMOBLASTE OXYPHILE		MYELOCYTE EO- BASOPHILE	MYELOCYTE NEU- TROPHILE MUR *		MONOCYTE	LYMPHOCYTE	
	FIN DE LA MULTIPLICATION	NORMOBLASTE OXYPHILE			METAMYELOCYTE NEUTROPHILE *	MEGACARYOCYTE 16 A 32-POIDS			
			METAMYELOCYTE BASOPHILE *	METAMYELOCYTE EOSINOPHILE *	NEUTROPHILE JUVÉNILE *	MEGACARYOCYTE *			
	PLUS DE MULTIPLICATION	NORMOBLASTE OXYPHILE		EOSINOPHILE A NOYAU EN BATONNET	NEUTROPHILE A NOYAU EN BATONNET *				
				EOSINOPHILE A NOYAU SEGMENTÉ	EOSINOPHILE A NOYAU SEGMENTÉ *				
					NEUTROPHILE A NOYAU SEGMENTÉ *	PLAQUETTES SANGUINES *			
SANG	PASSAGE DANS LE SANG	PRONORMOCYTE (RETICULOCYTE)							
		NORMOCYTE							

\* Cellules réagissant avec l'anticorps D51.

plaquettaires étaient perturbées par la présence de l'anticorps D<sub>51</sub> (**AcD<sub>51</sub>**).  
Cette nouvelle voie de recherche plus physiologique que prévue initialement,  
nous obligea à nous pencher sérieusement sur l'une des grandes fonctions  
plaquettaires et, à titre de comparaison, sur certaines grandes fonctions  
leucocytaires. Dans un premier temps étudions l'objet de toute cette  
recherche: la plaquette.

## CHAPITRE PREMIER

### 1.0- STRUCTURE PLAQUETTAIRE

Les quelques 210 milliards de plaquettes (thrombocytes) produites chaque jour (4) par l'organisme humain sont des éléments figurés impliqués dans le processus hémostatique. Ces éléments figurés sont de petites cellules anucléées dont le diamètre varie de 2 à 5  $\mu\text{m}$ . Elles ont la forme d'un petit disque à surface biconvexe dont le cytoplasme est chargé de nombreux organites (fig. 1). Plusieurs de ces organites sont communs à une grande variété de cellules, tandis que d'autres constituent, avec l'aide de certaines structures cytoplasmiques, le support morphologique et fonctionnel des thrombocytes.

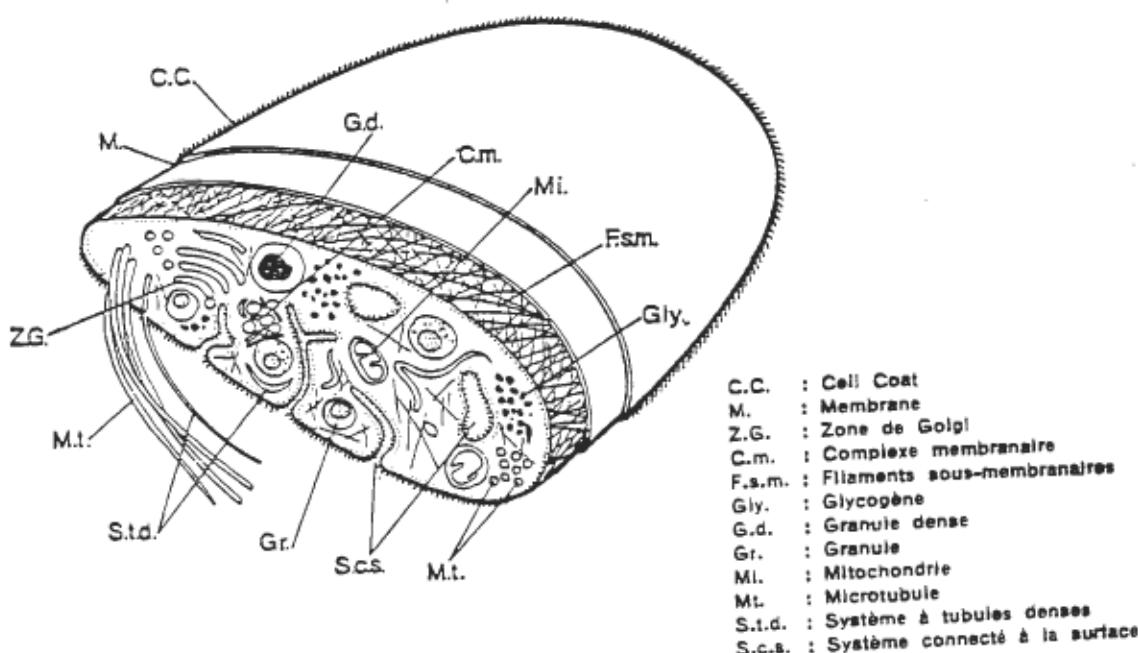


Figure 1 - Schéma d'une plaquette  
(extrait : ref. 75)

La plaquette est limitée par une membrane plasmique externe réalisant une mosaïque fluide pseudo-lipidique (5), similaire à celle des autres cellules. Cette mosaïque est constituée de phospholipides (6) répartis de façon asymétrique (fig. 2), de cholestérol et d'une cinquantaine de glycoprotéines connues à l'heure actuelle.

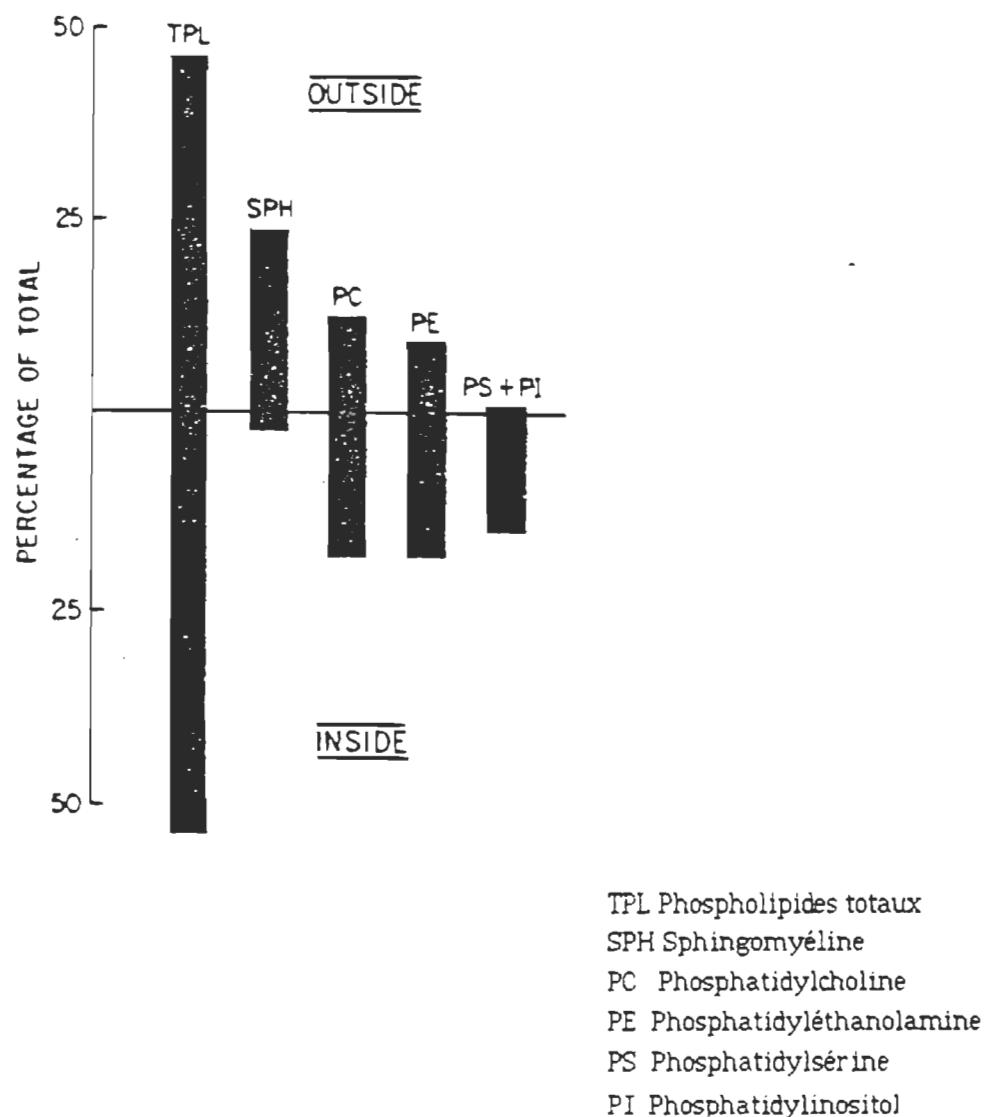


Figure 2- Distribution des phospholipides de la membrane plaquettaire  
(extrait : ref.75)

La face externe de cette membrane est coiffée d'une couche d'environ 15 nm d'épaisseur. Cette couche externe (nommée par Roskam, en 1923, atmosphère plasmatique) composée entre autre de mucopolysaccharides acides (7) et d'acide sialique possède la propriété d'emmagasiner des cations divalents, d'absorber des facteurs plasmatiques de la coagulation, des amines vasoconstrictrives (8) et de très nombreux enzymes (9).

Afin de permettre aux lecteurs une bonne compréhension des fonctions plaquettaires étudiées ultérieurement, il est important de mettre en relief, à ce stade, les glycoprotéines de la membrane plaquettaire. Ces dernières, comme nous le verrons, sont impliquées dans l'**adhésion** et l'**agrégation** plaquettaire, servent aussi de **récepteurs** à de très nombreuses substances et, finalement, sont les porteurs de motifs antigéniques que l'on commence à peine à identifier comme étant responsables de certaines pathogénies, telles les purpura thrombocytopéniques post-transfusionnels. Le tableau II actualise les connaissances sur les glycoprotéines membranaires de la plaquette.

À l'heure actuelle il est admis que la membrane plaquettaire fournit une surface catalytique pour la formation d'activateur intrinsèque de la prothrombine, de plus elle jouerait en un rôle primordial dont l'adhésivité et l'agrégation plaquettaire.

La face interne de cette membrane plasmatique est tapissée de microfilaments d'environ 5 nm de diamètre, semblables à ceux présents

dans le cytoplasme plaquettaire (fig. 3). Cette région sous-membranaire est traversée par ce que nous appelons aujourd'hui le système membranaire interne (fig. 1). Behnke (10) fut l'un des pionniers de ce sujet en démontrant grâce à ses travaux sur les thrombocytes de rat, la présence de deux systèmes membranaires lisses qui paraissaient indépendants l'un de l'autre. Les deux systèmes forment un labyrinthe constitué d'un réseau d'invaginations de la membrane plasmatische : le système connecté à la surface (S.C.R.S.), et le système membranaire clos, ce dernier constituant le système tubulaire dense (s.t.d.) particulièrement riche en ions calcium

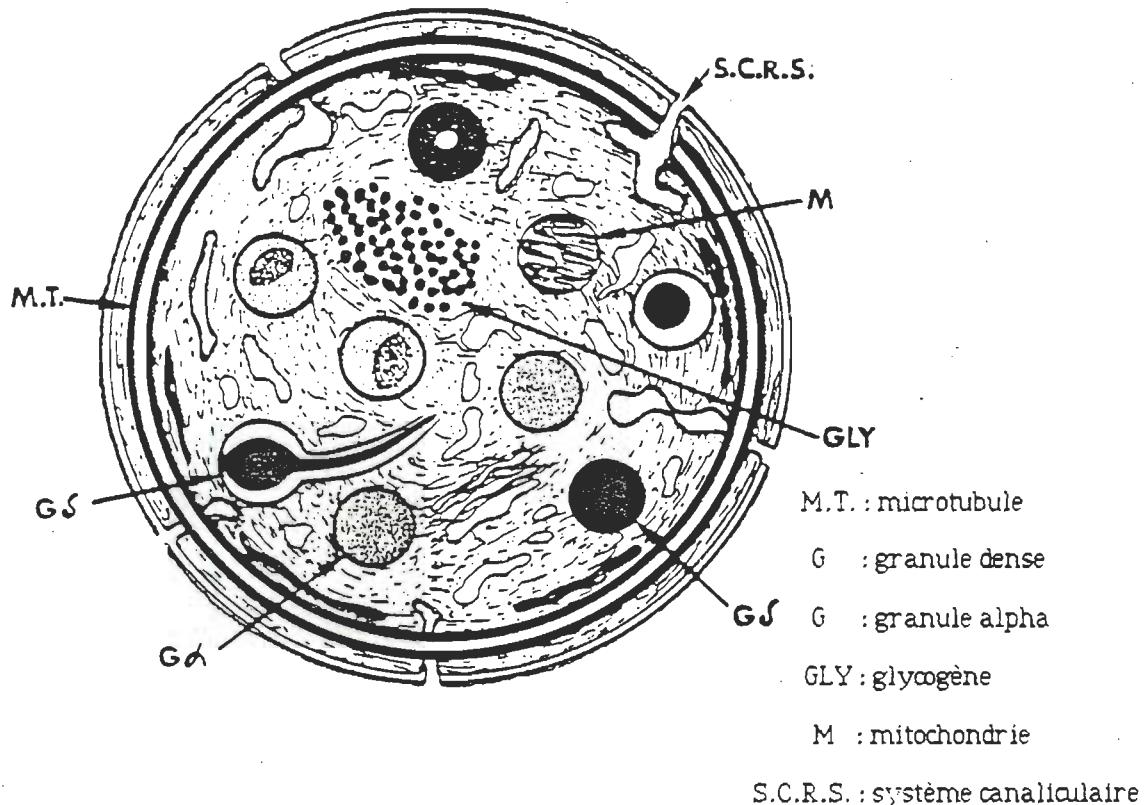


Figure 3 - Contenu cytoplasmique plaquettaire

(extrait : ref.10a)

TABLEAU I

NOM	P.M. (kd)	Sucre	Porteur motif antigénique	Nombre de copies	Rôle
GP I					
Ia	167				Récepteur du collagène
Ib	143 $\alpha$ 22 $\beta$	50%		34,000 $\pm$ 5000	Récepteur FvW et thrombine
Ic	134 $\alpha$ 27 $\alpha$				
GP II					
IIa	157				
II b	132 $\alpha$ 23 $\beta$	15%	Bak <sup>a</sup> Lek <sup>a</sup>		Portion du récepteur du fibrinogène
GP III					
IIIa	114		PLA <sup>a</sup> Pen <sup>a</sup> (Yuk)	50,000	Portion du récepteur du fibrinogène
GP IV (ou IIIb)	95	30-40%			
GP V	82				Substrat de la thrombine
GP IX	22				Complexé avec GP Ia

Le cytoplasme pour sa part est beaucoup plus complexe que ne le laisse supposer l'examen en microscopie optique. Outre les structures conventionnelles telles que les microtubules, microfilaments, mitochondries, appareil de Golgi et ribosomes, le cytoplasme est riche en granules divers (tableau III). Ces granules sont nombreux, entre 3 et 25 par plaquettes (11) et l'on en distingue deux variétés principales: les granules **alpha** (  $\alpha$  ) et les granules **denses**. Les granules alpha sont généralement ronds ou ovalaires, tandis que les granules denses sont habituellement plus grands et nettement plus opaques (12). Le contenu des ces différents granules plaquettaires prend toute son importance lors des études de fonctions plaquettaires. En effet, les pages subséquentes permettront d'illustrer le mécanisme par lequel les plaquettes sécrètent rapidement leur contenu granulaire, l'implication physiologique de certains de ces composants granulaires et leur importance au niveau des fonctions de la plaquette.

TABLEAU II

Granules $\alpha$	Granules denses	Microperoxysome	Granules lysosomiaux
Fibrinogène	Anions	Catalase	$\beta$ -hexosaminidase
Facteurs V, VIIIvW	ATP		$\beta$ - galactosidase
Fibronectine	ADP		$\beta$ - glucuronidase
Albumine	GTP		$\beta$ -arabinosidase
Kallicréine	GDP		$\beta$ - glycérophatase
Thrombospondine	(PPi)		
$\alpha$ 2-antiplasmine	(pi)		Arylsulfatase
Glycoprotéine-G	Cations		
Facteur IV plaquettaire	Ca <sup>++</sup>		
B-Thromboglobuline	Sérotonine		
Facteur de croissance (PGGF)			
Protéine basique			
Cl inhibiteur			

### 1.1- FONCTIONS PLAQUETTAIRES

Tel qu'énoncé précédemment, les thrombocytes jouent un rôle important dans l'hémostase, principalement dans "l'hémostase primaire". Ce terme sous-entend l'ensemble des phénomènes qui concourent *in vivo* à la formation du bouchon hémostatique ou clou plaquettaire.

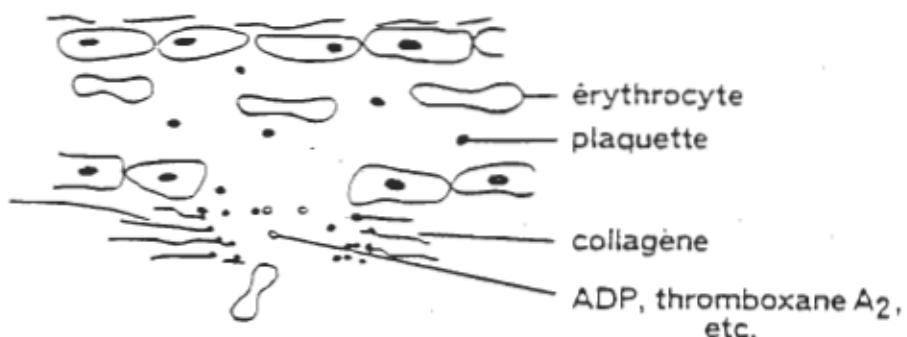
Dès la section vasculaire (fig. 4), survient une vasoconstriction, puis les plaquettes qui s'échappent par la brèche vasculaire s'accrochent au pourtour de celle-ci (13): c'est **l'adhésion**. Ce phénomène induit de nombreuses modifications membranaires et cytoplasmiques de la part des thrombocytes, dont l'aboutissement est l'expulsion de substances intraplaquettaires: c'est la **sécrétion**. Parmi ces substances sécrétées certaines ont la capacité d'induire l'accolement des plaquettes les unes aux autres: c'est **l'agrégation**.

Dans cette séquence réactionnelle de l'hémostase primaire, une emphase particulière sera attribuée au mécanisme de l'agrégation plaquettaire. Il est tout de même nécessaire d'aborder, de façon plus discrète, l'adhésion et la sécrétion plaquettaire ne serait-ce que pour illustrer les interrelations existantes et bien faire comprendre l'arbitraire de cette catégorisation.

## 1 - Vasoconstriction



## 2 - Adhésion et sécrétion plaquettaires



## 3 - Agrégation plaquetttaire

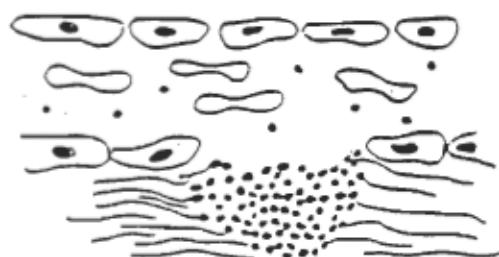


Figure 4 - Étapes de la formation du bouchon hémostatique  
(extrait : ref.10a)

### 1.1.1- L'ADHESION

Les propriétés d'adhésion des cellules interviennent dans des processus aussi divers que la prolifération et la différentiation cellulaires, l'embryogénèse, la réponse hémostatique, l'angiogénèse et la réponse immunitaire, pour ne citer que ces quelques exemples. Dans la plupart des cas, l'interaction adhésive est le prélude à l'expression d'une fonction cellulaire et constitue de ce fait un des éléments de la régulation des phénomènes dans lesquels elle est impliquée.

Nous savons aujourd'hui que la cellule, qui utilise les **réactions adhésives** pour exprimer ses fonctions, possède en surface les récepteurs qui lui sont nécessaires. Ces récepteurs sont majoritairement des glycoprotéines (GP) membranaires qui servent d'éléments de reconnaissance à des facteurs d'origine **plasmatique** ou **tissulaire** possédant des propriétés adhésives. Parmi ces facteurs, citons la fibronectine (14), la laminine (15), le facteur de von Willebrand (FvW)(16) et la vitronectine (17).

En confinant, pour les besoins de la cause, ce phénomène d'adhésion à la plaquette, il devient possible d'en faire une étude systématique et mieux balisée. Dans le premier volet de cette étude sur l'adhésion plaquettaire, un examen des intervenants plaquettaire , plasmatique et endothérial s'impose.

### a- Intervenant plaquettaire

#### Glycoprotéine GPIb

Le complexe glycoprotéique I est constitué d'au moins trois glycoprotéines différentes, toutes localisées au niveau de la membrane plaquettaire. Ce complexe comprenant les glycoprotéines GPIa, GPIb et GPIc est brièvement décrit au tableau II.

La GPIb (fig. 5) est une glycoprotéine composée de deux chaînes polypeptidiques  $\alpha$  et  $\beta$  liées par au moins un pont disulfure (18). La portion extracellulaire de la chaîne  $\alpha$  est appelé glycocalicine (19) et possède un poids moléculaire d'environ 120 kDa. Lorsque des plaquettes sont solubilisées en absence d'EDTA, la glycocalicine peut être facilement reconnue, probablement grâce à une digestion partielle de la GPIb par des protéases plaquettaires endogènes dépendantes du calcium (20). La protéine médiane de cette chaîne  $\alpha$  est riche en sucres, tandis que la portion distale contient les sites de liaison pour le FvW et la thrombine, tout en étant relativement pauvre en glucides (21,22). Des études de liaison d'anticorps monoclonal anti-GPIb ont permis d'évaluer à environ  $34,000 \pm 5000$  copies l'expression de GPIb à la surface d'une plaquette (23).

Nurden et Caen (24) ont été les premiers à proposer que cette glycoprotéine pourrait jouer un rôle essentiel dans l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium. En effet dans la mesure où les plaquettes de patients atteints du syndrome de Bernard Soulier (absence de GPIb plaquettaire) étaient incapables de fixer le FvW, il a été postulé que la GPIb pourrait être le site récepteur de ce facteur plasmatique (FvW) (25-

26) capable d'établir le pont entre la plaquette et le sous-endothélium.

*In vitro* cette hypothèse se vérifie facilement car les traitements enzymatiques qui dégradent la GPIb suppriment également la liaison du FvW à la plaquette (27). Le FvW n'est pas la seule molécule reconnue par cette importante glycoprotéine. En effet, GPIb pourrait servir de récepteur pour les anticorps quinine et quinidine dépendants (28), pour la thrombine (22) et pour le fragment Fc des immunoglobulines (26)

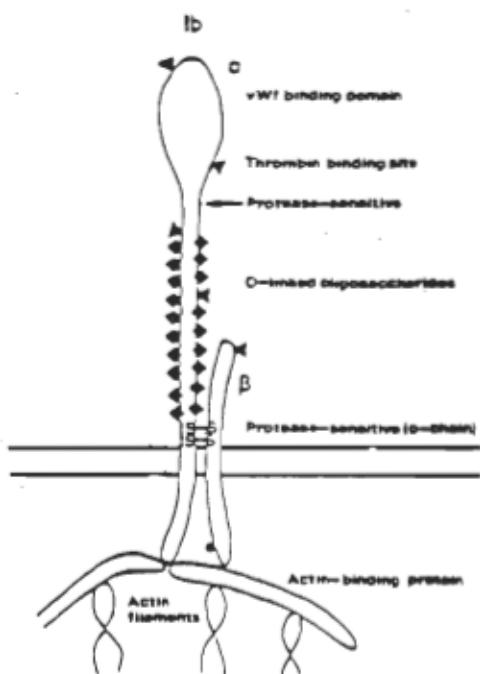


Figure 5 : Structure de la glycoprotéine Ib (GPIb)  
(extrait : ref. 195).

Lors d'études plus poussées sur le rôle de la GPIb, les chercheurs identifièrent l'existence de cette molécule non pas isolée sur la membrane plaquettaire comme on le croyait précédemment, mais en association avec une autre glycoprotéine (fig. 6), la GPIX (29-30), petite molécule de 22 kDa. C'est à ce complexe qu'on attribue aujourd'hui plusieurs fonctions préalablement attribuées à la GPIb. Dernièrement, Fox (31-32) renchérissait en écrivant que ce complexe (GPIb- GPIX) serait un site d'attachement du squelette sous-membranaire à la membrane plasmique plaquettaire.

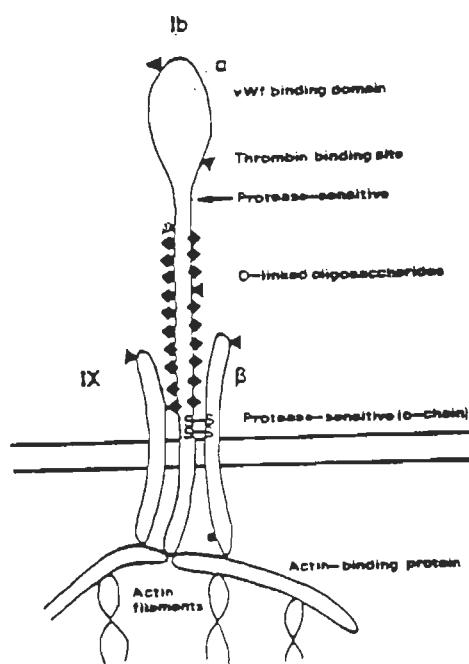


Figure 6- Association (GPIb-GPIX)  
(extrait : ref. 196)

## b- Intervenant plasmatique

### Facteur von Willebrand (FvW)

Le facteur von Willebrand (FvW) est un complexe glycoprotéique dont la forme mature du protomère a un poids moléculaire de 230 kDa (33). Ces protomères sont glycosylés et réunis par des liens disulfures pour former des multimères composés de 2 à plus de 50 protomères et donc d'un poids moléculaire apparent variant de 0.5 à  $12 \times 10^6$  daltons (33).

Cette glycoprotéine est synthétisée par les cellules endothéliales (34) et les mégacaryocytes (35-36) et emmagasinée respectivement dans les corps de Weibel-Palace et les granules alpha. Le modèle actuel illustrant la structure du FvW est représenté à la figure 7. Cette conceptualisation, fruit de nombreux travaux (37), représente les protomères de FvW liés tête à tête par de multiples liens disulfures dans la région C-terminale et par un ou deux de ces liens près de la région N-terminale. Cette énorme molécule, capable de se lier aussi bien à la plaquette qu'aux composants du sous-endothélium, porte de nombreux sites de liaison regroupés en domaines. Dans la portion N-terminale, le domaine de liaison pour la GPIb plaquettaire, l'héparine et le collagène sont ceux qui nous intéressent de façon prépondérante dans ce chapitre sur l'adhésion. Le FvW possède de plus dans son fragment C-terminal un site contenant la séquence RGDS (arginine-glycine-a-aspartique-sérine) permettant la liaison au complexe plaquettaire GP IIb/IIIa (38). Le FvW est aussi capable de se lier au facteur VIII (39-40) et à la membrane basale. Il existe aujourd'hui des évidences convaincantes que l'efficacité hémostatique des multimères de FvW circulant est reliée au poids moléculaire de ces derniers (41-36). En

effet, le temps de saignement est toujours prolongé chez un patient présentant une diminution des formes multimériques les plus lourdes et ce indépendamment de la concentration plasmatique totale de FvW (41-36-42).

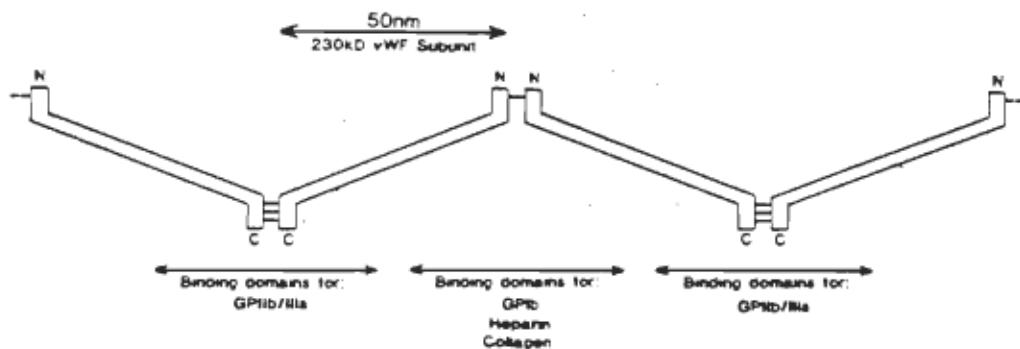


Figure 7-Structure du facteur Von Willebrand  
(extrait : ref. 53a)

### Interaction FvW et plaquettes

Il est maintenant évident que le FvW se lie à la GPIb en présence de l'antibiotique ristocétine, mais le mécanisme exact de cette interaction n'est pas complètement élucidé. Cependant, il a été démontré que la charge positive de la ristocétine était indispensable à cette liaison (43-44) ce qui suggère une action modulée par une diminution de la charge négative de surface de la plaquette (45-46-47). Cette hypothèse électrostatique trouve aujourd'hui de nouveaux appuis: en effet, il est connu que d'autres

polycations permettent la liaison du FvW à la plaquette 48-49) et même que l'asialo-vW se lierait directement à la surface plaquettaire (50). Ces expérimentations récentes avec les asialo-vW font émerger l'idée que le récepteur plaquettaire pour le FvW serait constamment exposé, même dans la cellule au repos (51) mais masqué par un blindage, induit probablement par les glycosaminoglycans plaquettaires selon une étude très récente (52).

### c-**Intervenant structural**

#### Le collagène

Parmi les macromolécules de la matrice extracellulaire, le collagène constitue la classe de protéine la plus abondante (53). Même si sa fonction la plus évidente est de conférer aux tissus conjonctifs leur résistance à l'étirement, le collagène remplit une multitude d'autres fonctions. À cette variété de fonctions correspond une variété de structures primaires et d'organisations moléculaires classées à l'intérieur de onze types différents de collagène (54) (tableau IV). Le collagène est une protéine structurale de la matrice cellulaire dont une grande partie est formée par une triple hélice de trois chaînes polypeptidiques entrelacées (55). Ces parties hélicoïdales ont une structure primaire répétitive  $(\text{Gly-X-Y})_n$  dans laquelle X est le plus souvent une proline et Y un hydroxyproline. Les résidus X et Y ont leur chaînes latérales dirigées vers l'extérieur de la triple hélice. C'est donc eux qui seront responsables des interactions latérales des molécules de collagène entre elles ou avec d'autres constituants de la matrice cellulaire.

TABLEAU IVLes collagènes fibrillaires

Type	Chaines	Tissus représentatifs
<b>A- Associés au Type I</b>		
I	$\alpha 1(I)$ , $\alpha 2(I)$	Peau, os, tendons, dentine etc..
III	$\alpha 1(III)$	Peau, vaisseaux
V	$\alpha 1(V)$ , $\alpha 2(V)$ , $\alpha 3(V)$	Cellules de poumons de hamster en culture
<b>B- Associées au type II</b>		
II	$\alpha 1(II)$	Cartilage hyalin, humeur vitrée
XI <sup>(b)</sup>	$\alpha 1(XI)$ , $\alpha 2(XI)$ , $\alpha 3(XI)$	Cartilage hyalin

Les collagènes non-fibrillaires

Type	Chaines	Tissus représentatifs
IV	$\alpha 1(IV)$ , $\alpha 2(IV)$	Membranes basales
VI	$\alpha 1(VI)$ , $\alpha 2(VI)$ , $\alpha 3(VI)$	Vaisseaux, peau, disque intervertébral
VII	$\alpha 1(VII)$	Membranes foetales
VIII	?	Cellules endothéliales
IX	$\alpha 1(IX)$ , $\alpha 2(IX)$ , $\alpha 3(IX)$	Cartilage hyalin
X	$\alpha 1(X)$	Plaque de croissance

Ces interactions confèrent aux molécules de collagène la propriété essentielle de s'agréger latéralement. La figure 8 nous montre l'arrangement caractéristique des collagènes fibrillaires reconnus depuis longtemps par les histologistes.

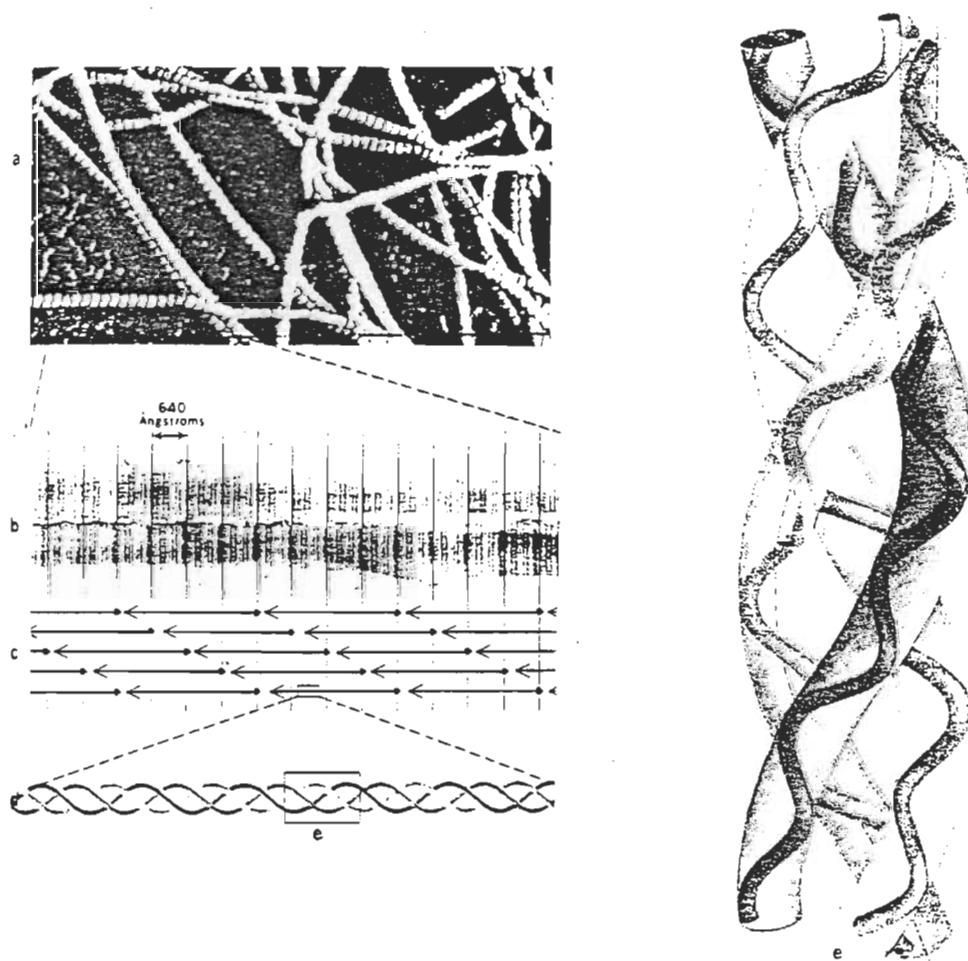


Figure 8- Structure et arrangement des fibres de collagène  
(extrait : ref. 54a)

Comme le démontre le tableau IV, il existe de nombreuses variétés de collagène et la capacité de stimulation plaquettaire de ces différents types de collagène est fort variée (56-57). Cette différence de capacité de stimulation plaquettaire est attribuée, à l'heure actuelle, plus à des différences stériques induites par le taux de réticulation qu'à des différences chimiques (58).

### Mécanisme de l'adhésion plaquettaire

L'adhésion plaquettaire est la propriété qu'ont les thrombocytes de se fixer à des substances étrangères. À l'état normal, l'endothélium constitue une barrière entre le sang et les différentes composantes de la paroi vasculaire. Le sous-endothélium, quant à lui, se présente comme une couche de matériel hétérogène discontinu, comprenant selon les vaisseaux, la membrane basale, l'élastine, les fibres de collagène, les microfibrilles, la fibronectine et du matériel amorphe (glycosaminoglycans).

Les plaquettes n'adhèrent pas aux cellules endothéliales intactes mais, après lésion vasculaire, adhèrent au sous-endothélium de la paroi vasculaire. Cette adhésion des plaquettes au sous-endothélium fait intervenir d'une part le FvW (59-60), d'autre part la glycoprotéine GPIb localisée sur la membrane plaquettaire et finalement un constituant du sous-endothélium (fig. 9).

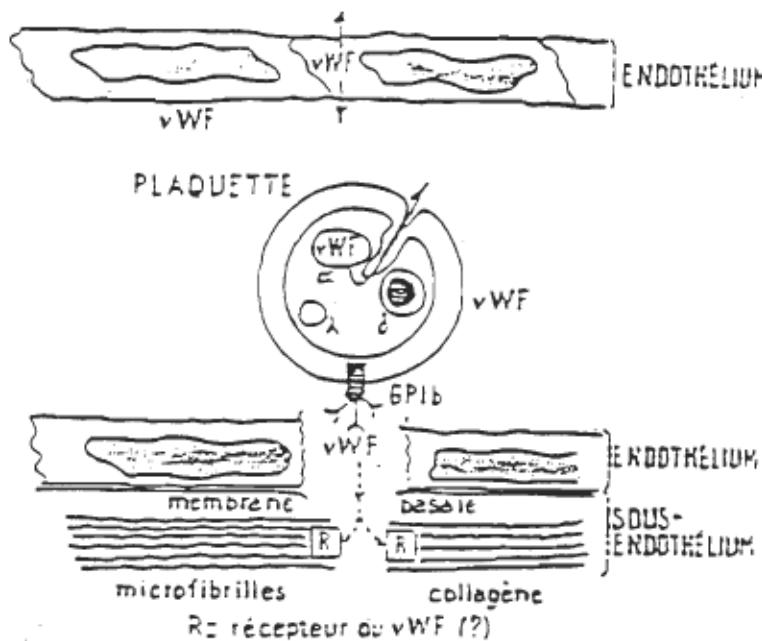


Figure 9 - Intervenants dans l'adhésion plaquettaire  
(extrait : ref. 197)

La nature précise de ce constituant sous-endothélial auquel adhèrent *in vivo* les plaquettes en présence de FvW est encore à l'étude. Il existe toutefois quelques candidats potentiels pour ce rôle : la membrane basale (61-62), le collagène (61-56-57-63) et les microfibrilles (64).

La plupart des études se sont attardées au trio plaquette - FvW - collagène pour conclure que l'adsorption du FvW par le collagène était de nature électrostatique et ne dépendait ni de la température ni de la présence de cations divalents (65). D'un autre côté, le FvW se lie, comme il a déjà été mentionné, de façon prépondérante à la plaquette par la GPIb (66). En effet, l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium est non seulement diminuée dans la maladie de Willebrand mais également dans la dystrophie thrombocytaire hémorragipare, toutes deux caractérisées par

une absence ou une diminution de la glycoprotéine Ib (GPIb) (67-68). Une fois ce premier pas franchi dans la formation du caillot une cascade d'événements plus ou moins rapides se succèdent et s'entremêlent. Parmi l'ensemble de ces événements, il nous faut porter une attention particulière aux mécanismes de la sécrétion plaquettaire qui permettent la recrudescence et l'amplification du phénomène amorcé par l'adhésion des plaquettes.

### 1.1.2- LA SECRETION

L'adhésion des plaquettes aux structures sous-endothéliales est suivie d'une phase au cours de laquelle de profondes modifications morphologiques plaquettaires vont survenir: les plaquettes initialement discoïdes vont changer de forme et devenir sphériques en même temps qu'elles subissent de nombreux changements ultrastructuraux: disparition du système microtubulaire, apparition de pseudopodes et d'invaginations, le tout induisant une organisation concentrique des granules de stockage (tableau III). La sécrétion plaquettaire est considérée comme un mécanisme unique (69); en effet, dans la majorité des cellules à fonction sécrétoire, les organelles migrent vers la surface, fusionnent avec la membrane et relarguent leur contenu à l'extérieur de la cellule. Ce processus pour les plaquettes humaines est inversé: c'est la membrane qui s'invagine et permet la formation de canaux excréteurs.

Toutes les modifications morphologiques constatées lors de la sécrétion des plaquettes sont accompagnées bien entendu d'importantes transformations (70) moléculaires qui permettent finalement l'expulsion du contenu des diverses granules cytoplasmiques. Ces transformations moléculaires ont comme dénominateur commun des protéines telles l'actine,

la myosine, l'alpha-actinine, la tropomyosine et les proréines se liants à l'actine. Gerrard (71) a proposé récemment un modèle permettant une meilleure compréhension de ce mécanisme contractile chez la plaquette. Par exemple, l'adhésion plaquettaire au fibre de collagène (déjà discuté) du sous-endothélium induirait une activation de la plaquette par des voies métaboliques comme celle de l'acide arachidonique et permettrait l'assemblage des filaments d'actine et de myosine. Les longs filaments d'actine s'orienteraient de façon bidirectionnelle et permettraient, en entourant les granules cytoplasmiques, une centralisation de ces dernières dûe au chevauchement progressif des filaments d'actine par la myosine. Pour permettre la génération d'une force significative, les filaments d'actine doivent bien entendu être ancrés. Malheureusement, l'identification des protéines d'ancrage de l'actine au niveau plaquettaire n'a pas permis d'établir avec certitude si l'actine était directement ou même indirectement liée au complexe GPIIb/IIIa ce qui la relierait ainsi à la cascade réactionnelle qu'est l'activation plaquettaire. L'idée de centralisation n'est cependant pas nouvelle puisque White en 1968 (72) avait déjà démontré que le phénomène de sécrétion plaquettaire était toujours précédé par la centralisation des granules cytoplasmiques. Ce même auteur postula que la sécrétion plaquettaire se produisait par fusion des granules avec le labyrinthe que forme le système connecté à la surface (S.C.S.). Ginsberg et coll. (73), tout en ne niant pas ce mécanisme, ont démontré l'existence d'un deuxième mécanisme de sécrétion. Dans ce mécanisme alternatif plusieurs granules fusionneraient pour former un "sac granulaire" qui gonflerait et diluerait son contenu par apport d'eau et d'électrolytes. Ces "sacs granulaires" deviendraient moins denses et pourraient migrer du centre vers la périphérie à travers les câbles d'actine-myosine pour finalement fusionner avec la membrane plasmique et relarguer leur contenu.

Ces deux mécanismes de sécrétion illustrés à la figure 10 expliquent comme nous l'avons déjà mentionné, le recrutement et l'amplification de la réponse plaquettaire. Nous pouvons regarder à nouveau ce phénomène de la sécrétion plaquettaire mais, cette fois-ci, sous un aspect plus moléculaire (fig.11).

La séquence des événements observés *in vitro* lorsque l'on stimule des plaquettes avec un agoniste fort tel la thrombine permet, grâce à des marqueurs radioactifs, une certaine compréhension des voies métaboliques employées par cette cellule lors du processus sécrétoire. Suite à l'interaction avec son récepteur plaquettaire de surface, la thrombine induit l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol-4',5' diphosphate (PIP<sub>2</sub>) par la phospholipase C (PLC). Cette action est probablement médiée par une protéine dénommée protéine-G qui agirait comme transducteur lors de l'activation de la PLC. L'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> permet l'activation plaquettaire en générant des messagers comme l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et des diglycérides (DG). L'inositol triphosphate est un messager soluble dans l'eau qui agit au niveau du système tubulaire dense et permet le relargage du calcium emmagasiné dans le système tubulaire dense (s.t.d.). Les diglycérides, quant à eux, sont des messagers solubles dans les lipides et agissent au niveau de la membrane en permettant l'activation de la protéine kinase C. Cette dernière entraîne la phosphorylation de différentes protéines: 47 kDa, chaîne légère de la myosine et une dernière décrite plus récemment l'ABP (74). Ces modifications moléculaires reliées à l'activation de la plaquette entraîneront la sécrétion des granules plaquettaires et ultérieurement l'agrégation de ces dernières.

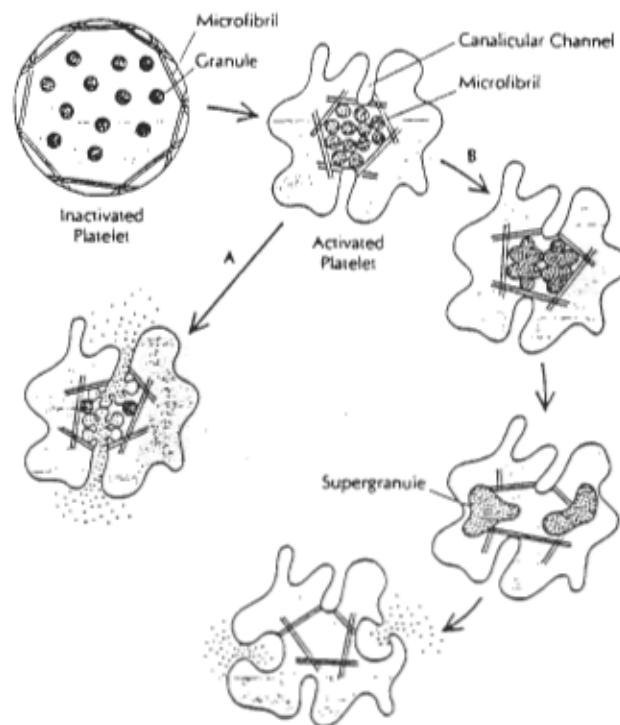


Figure 10- Mécanismes de la sécrétion plaquettaire  
(extrait : ref. 71)

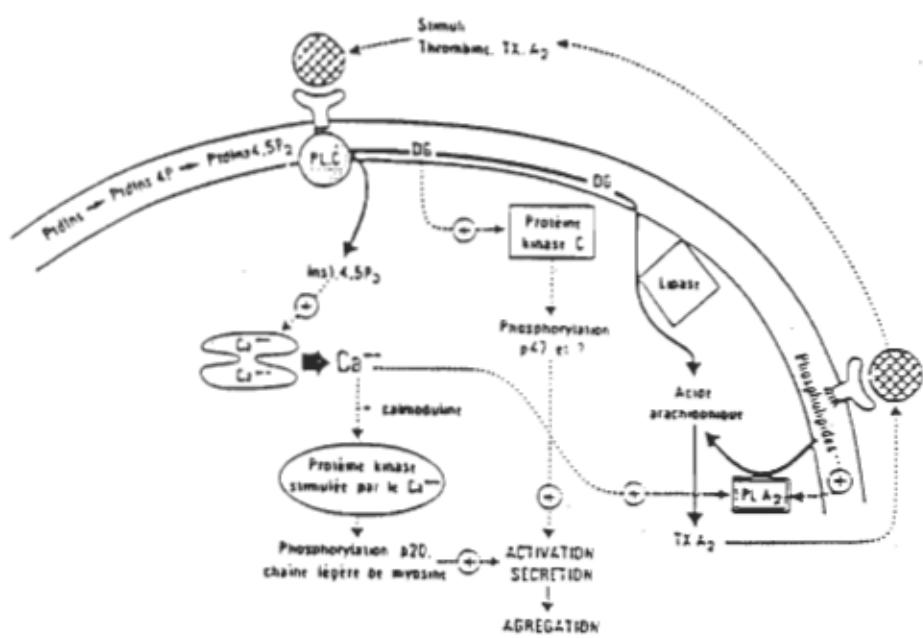


Figure 11- Action de la thrombine  
(extrait : ref 198)

### 1.1.3- L'AGREGATION PLAQUETTAIRE

Phénomène reconnu depuis plus de 20 ans comme pouvant être induit *in vitro* par une substance comme l'ADP, l'agrégation plaquettaire reste un phénomène encore empreint de mystère. Étudié *in vitro* par une méthode turbidimétrique, l'agrégation plaquettaire se définissait comme la faculté des plaquettes à adhérer, sous l'effet d'un stimulus, les unes aux autres pour former des agrégats cellulaires plus ou moins importants et plus ou moins solides (75). Récemment Leung et Nachman (76) proposaient que l'on redéfinisse l'agrégation plaquettaire comme: un processus dynamique à plusieurs étapes, gouverné initialement par des interactions fibrinogène- GPIIb/IIIa avec des interactions thrombospondine (TSP)-fibrinogène jouant un rôle important dans la stabilisation de l'agrégat plaquettaire et supportant ainsi la conversion des microagrégats réversibles en macroagrégats irréversibles.

Mes résultats de recherches étant, si l'on peut s'exprimer ainsi, au cœur même de ce processus d'agrégation, il me semble donc impératif de mettre une certaine emphase sur ce mécanisme et sur ce qui gravite autour.

#### 1.1.3.1- Substances agrégeantes

Il existe à l'heure actuelle toute une variété de substances capables d'initier l'agrégation plaquettaire. Parmi ces substances certaines sont physiologiques (thrombine, ADP, épinéphrine, complexe antigène-anticorps), tandis que d'autres sont purement pharmacologiques (ristocétine, A-23187). Le tableau suivant décrit les principales substances

agrégeantes et leur localisation.

Tableau V

Substance agrégeante	Localisation
ADP	Érythrocyte, plaquettes
Épinéphrine	Plasma
Thrombine	Plasma
Collagène	Sous-endothélium
Complexe Ag-Ac	Plasma
Ristocétine	Antibiotique
A-23187	Ionophore de calcium
Platelet activating factor (PAF)	Différents leucocytes et cellules endothéliales
Acide arachidonique	Membranes cellulaires
Thromboxane A <sub>2</sub>	Plaquettes

#### 1.1.3.2- Intervenants dans l'agrégation plaquettaire

##### a- Intervenants plaquettaires

###### Le complexe GPIIb/IIIa

Le complexe GPIIb/IIIa est un hétérodimère formé de GPIIb et GPIIIa (fig.12) dont la liaison non-covalente est dépendante du calcium. Les plaquettes normales contiennent approximativement 50,000 copies de ce complexe, qui représente 1 à 2 % des protéines plaquettaires totales (77). Environ 70% du complexe GPIIb/IIIa est distribué de façon aléatoire sur la

surface plaquetaire (78) tandis que le solde "cryptique" est localisé sur les membranes du système canalicular ouvert (79) et sur les membranes des granules  $\alpha$  (80). Il semble que tous les complexes GPIIb/IIIa à la surface des plaquettes activées sont accessibles de façon non-discriminatoire (80-81) lors du phénomène d'agrégation.

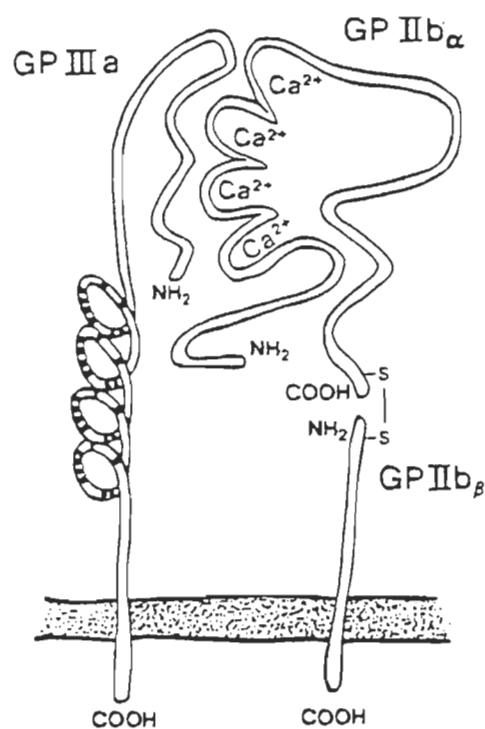


Figure 12 - Structure de GPIIb/IIIa  
(extrait : ref. 199)

La GPII est constituée de deux chaînes peptidiques, IIb  $\alpha$  et IIb  $\beta$ , reliées par un pont disulfure. Leurs masses apparentes sont respectivement de 132 et 23 kDa. La GPIIIa pour sa part comporte une seule chaîne peptidique de masse apparente de 114 kDa.

Ce complexe nécessite une concentration de calcium de l'ordre de 1  $\mu$ M pour préserver sa structure hétérodimérique (82-83) et la GPIIb est la sous-unité de ce complexe qui lie le calcium (84-85). L'utilisation d'agents chélateurs de calcium a en effet permis de constater une dissociation du complexe GPIIb/IIIa et, conséquemment, une perte de fonction qui en découle à cause de l'altération d'une conformation dépendante du calcium sur GPIIb. Il existe aujourd'hui plusieurs anticorps monoclonaux qui ont été générés contre le complexe GPIIb/IIIa (86); certains reconnaissent les protéines monomériques, tandis que d'autres sont dirigés contre des épitopes présents seulement lorsque le complexe possède toute son intégrité (87-88).

D'un point de vue biosynthétique ce complexe est détecté très tôt dans la mégacaryocytopoïèse (89) et il semble que son insertion membranaire est tributaire de cette complexation GPIIb/IIIa (90). La compréhension des détails mécanistiques de la biosynthèse du complexe GPIIb/IIIa semble indispensable pour la compréhension des thrombasténies de Glanzman (absence ou diminution de GPIIb/IIIa). L'hypothèse actuelle veut qu'une anomalie d'une des glycoprotéines inhiberaît la formation du complexe et/ou son insertion membranaire. Une telle situation est déjà connue par exemple dans le cas de la famille LFA-1/Mac-1/p150,95 où aucun membre du complexe n'est exprimé à la surface leucocytaire lorsqu'il existe un défaut de synthèse de la sous-unité  $\beta$  qui leur est commune.

### GPIIb/IIIa dans l'agrégation

Les plaquettes activées par des agonistes forts (thrombine, collagène) ou faibles (ADP, épinéphrine) changent de forme et ultérieurement expriment à leur surface les récepteurs du fibrinogène (GPIIb/IIIa) (92). La liaison du fibrinogène qui est dépendante de la présence des cations divalents est indispensable pour l'agrégation plaquettaire (93). Les premières indications de cette indispensabilité viennent d'études de plaquettes de patients atteints de thrombasténie de Glanzman, (absence ou diminution de GPIIb/IIIa) pathologie caractérisée par des saignements prolongés induits par un empêchement des plaquettes à agréger après stimulation (94). Depuis ce temps, de très nombreux résultats furent compilés identifiant le complexe GPIIb/IIIa comme étant le récepteur du fibrinogène. Il est maintenant connu que la liaison du fibrinogène induit l'agrégation par formation de ponts interplaquettaires (95) (fig. 13).

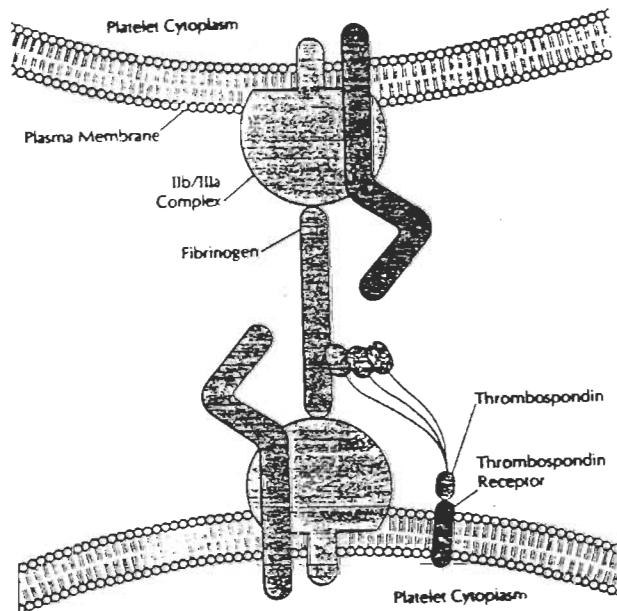


Figure 13- Pont interplaquettaire  
(extrait : ref. 71)

b- Intervenants plasmatiques:

Le fibrinogène

Le fibrinogène joue un rôle important à différents niveaux de la coagulation sanguine; il est non seulement un facteur essentiel à la formation du caillot, mais module aussi l'activité des plaquettes sanguines et des cellules endothéliales.

Le fibrinogène est une glycoprotéine de 340 kDa constituée de deux sous-unités, chacune d'elles comportant trois chaînes polypeptidiques (fig. 14) dont les séquences sont connues (96). Quoique majoritairement localisé dans le plasma (340 mg/dl) on retrouve des quantités appréciables de fibrinogène dans les granules  $\alpha$  de la plaquette (97).

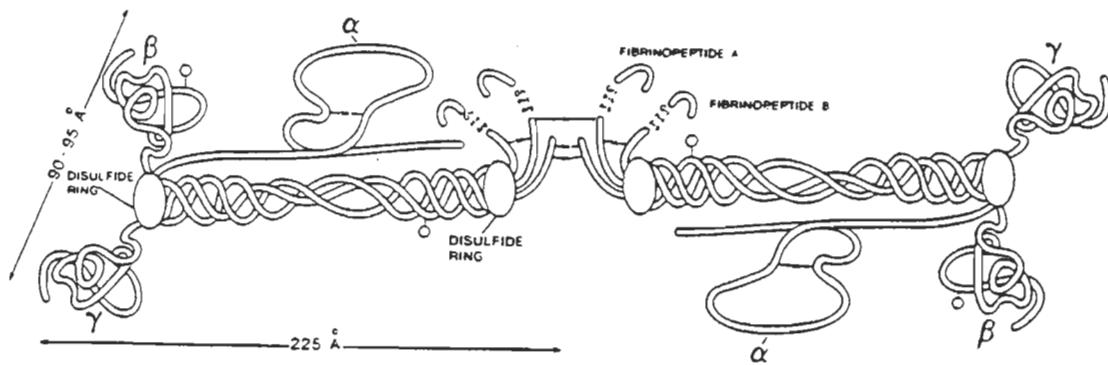


Figure 14 - Structure du fibrinogène  
(extrait : ref. 201)

Les fibrinogènes plasmatique et plaquettaire ont des caractéristiques structurales identiques, toutefois certaines différences ont été observées : réactivité immunochimique différente et anomalies congénitales décrites pour le fibrinogène plasmatique et non-retrouvées au niveau plaquettaire (98).

Le rôle du fibrinogène dans l'agrégation plaquettaire comme précédemment mentionné est son interaction avec le récepteur spécifique (GPIIb/IIIa) (voir 1.1.3.1). Il est maintenant admis que cette interaction entre le fibrinogène et son récepteur contrôle l'agrégation et un effort particulier est aujourd'hui consacré à l'identification des structures de la molécule de fibrinogène qui contiennent les sites d'interactions.

#### Thrombospondine

La thrombospondine (TSP) est la glycoprotéine principale sécrétée par la plaquette suite à l'activation de cette dernière (99). Cette protéine est capable d'une grande variété d'interactions moléculaires et elle intervient dans de nombreuses fonctions cellulaires (100). Cette glycoprotéine de 450 kDa est composée de trois chaînes peptidiques apparemment identiques de 150 kDa liées par des ponts disulfures (101) (fig. 15).

Lors de l'activation plaquettaire les granules **alpha ( $\alpha$ )** sont mobilisés, leur contenu libéré dans le milieu environnant (voir 1.1.2) et la concentration sérique de TSP à ce moment peut atteindre 30 µg/ml (102). Cette protéine reconnue comme lectine endogène plaquettaire par son habileté à se lier au fibrinogène (103) est responsable de la stabilisation des interactions plaquette - fibrinogène (104). Son action s'exerce donc lors de la deuxième phase du processus agrégatoire (agrégation irréversible) et facilite la microagrégation irréversible des plaquettes.

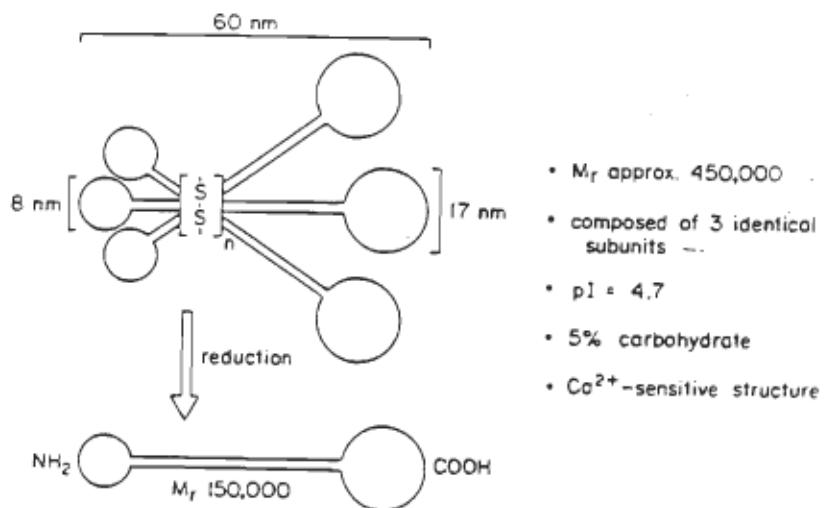


Figure 15-Structure de la thrombospondine  
(extrait : ref.104)

#### 1.1.3.3 - Mécanisme de l'agrégation plaquetttaire

Comme déjà mentionné de très nombreuses substances sont capables *in vitro*, et probablement *in vivo*, d'induire une agrégation plaquetttaire : ADP, collagène, thrombine,adrénaline, sérotonine, acide arachidonique, endoperoxydes, tyrosine, complexes immuns etc... Initialement mise sur le compte d'une sécrétion d'ADP endogène susceptible d'induire l'agrégation secondaire, l'action de ces différentes substances est vraisemblablement plus complexe et peut être différente selon la substance envisagée.

Nous aborderons ce chapitre en décrivant brièvement les grandes voies d'agrégation plaquetttaire pour ensuite porter notre attention sur certains

récepteurs plaquettaires, les transducteurs membranaires impliqués et finalement les inhibiteurs de ces voies d'agrégation.

Selon l'intensité du stimulus, les plaquettes répondent en changeant de forme et en agrégeant, puis en libérant de l'acide arachidonique membranaire avec sécrétion du contenu des granules. On distingue à l'heure actuelle, trois voies d'agrégation plaquettaire : l'une dépend de l'ADP, l'autre de l'acide arachidonique et la troisième d'un ou de plusieurs mécanismes indépendants des deux premiers (105). La figure 16 schématise l'ensemble des réactions plaquettaires induites par différents agents agrégeants.

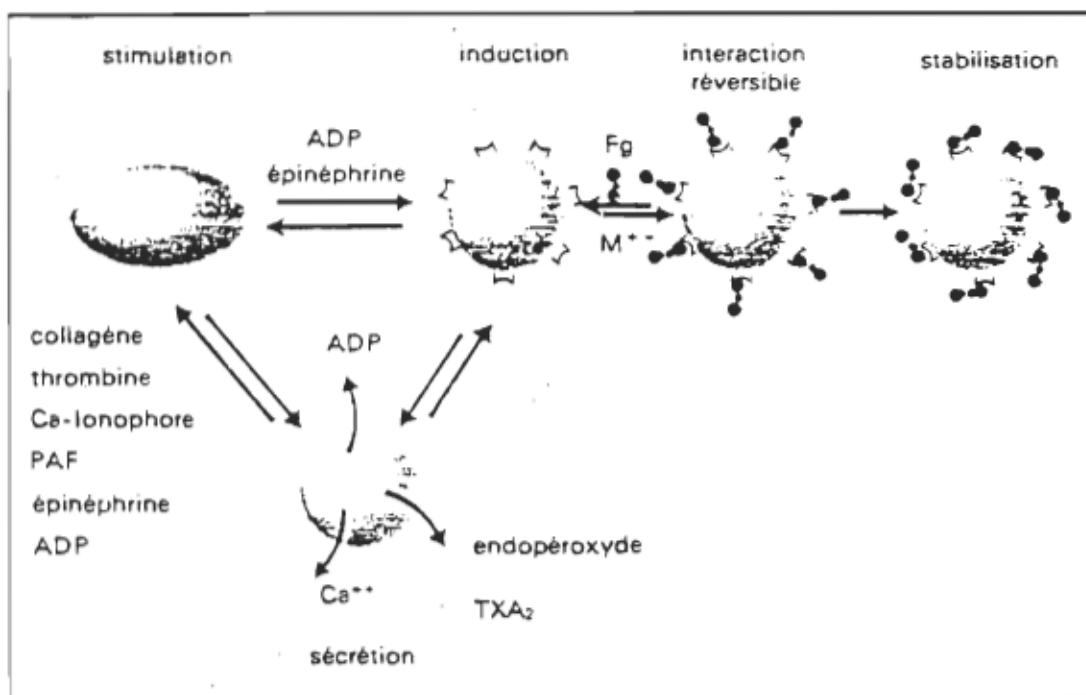


Figure 16-Schéma de l'activation plaquettaire  
(extrait : ref. 105a)

#### 1.1.3.4- Agents agrégants et leurs récepteurs

Ce sous-chapitre s'attardera principalement aux trois agents agrégants dont la réponse plaquettaire est modifiée par l'emploi de notre anticorps monoclonal (Ac D<sub>51</sub>)

##### a- Agents adrénnergiques

L'épinéphrine (adrénaline) ainsi que la noradrénaline et l'isoprénaline sont de puissants agents de l'agrégation plaquettaire. En effet, la plaquette sanguine, à l'image de nombreuses autres cellules, possède des récepteurs adrénnergiques lui permettant de répondre à une stimulation par l'adrénaline circulante. La notion de récepteurs adrénnergiques, ainsi que leur classification en deux catégories  $\alpha$  et  $\beta$ , ont été initialement développées par Ahlquist en 1948 (106). Plus récemment, Ariens et Simonis (107) ont repris la classification physiologique et pharmacologique des récepteurs adrénnergiques et distinguent trois sous-classes pour chaque type de récepteurs  $\alpha$  ou  $\beta$ . Les études ont montré que les récepteurs adrénnergiques des plaquettes humaines sont essentiellement composées du récepteur  $\alpha_2$  (108) de poids moléculaire de 64 kDa (109) mais l'on soupçonne toutefois la présence en très faible quantité de récepteurs  $\beta_2$  (110) dont la masse moléculaire varierait entre 62 et 67 kDa (111).

Il existe aujourd'hui une liste fort volumineuse d'études (revue de Cazenave (112)) consacrée à la détermination du nombre de sites de liaison par plaquette pour les récepteurs adrénnergiques.

En résumé, on dénombre, et ce en fonction de la technique utilisée, entre 208 et 529 sites par plaquette. Ces résultats ajoutés aux différentes

études avec les nucléotides guanyliques ont permis de constater que les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques plaquettaires existent sous deux formes moléculaires,  $\alpha H$  et  $\alpha L$ , l'une possédant une forte ( $\alpha H$ ) et l'autre une faible ( $\alpha L$ ) affinité pour les ligands adrénnergiques (112).

La stimulation des récepteurs plaquettaires  $\alpha_2$ -adrénergiques entraîne une inhibition de l'adénylate-cyclase membranaire et donc une diminution de l'AMPc intracellulaire (113). Le couplage entre la liaison du ligand avec le récepteur  $\alpha_2$ -adrénnergique et l'inhibition de l'adénylate cyclase sont assurés par une protéine régulatrice "Ni" possédant des analogies de structure(108-114) avec la protéine régulatrice "Ns" couplée aux récepteurs  $\beta$ -adrénnergiques. Ni, tout comme Ns, est une entité moléculaire distincte du site récepteur et de l'unité catalytique de l'adénylate cyclase (112). Ni est aussi capable de lier le GTP et de l'hydrolyser en GDP + Pi (115). Elle est en fait composée comme Ns de trois sous-unités  $\alpha_i$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Alors que  $\beta$  et  $\gamma$  sont identiques pour Ns et Ni, des résultats récents démontrent que la protéine  $\alpha_i$  est un polypeptide de 40 kDa distinct de  $\alpha s$  (116).

Pendant que la dissociation de Ns en  $\alpha s + \beta \gamma$  en présence de GTP permet d'expliquer l'activation de l'adénylate cyclase, le mécanisme d'action de Ni demeure fort controversé. Il est vrai que le complexe Ni se dissocie lui aussi en  $\alpha_i$  plus  $\beta \gamma$  en présence de GTP, mais il a été démontré que  $\alpha_i$  n'entraîne que de faibles inhibitions de l'adénylate cyclase (117). Cerione (118) propose que, comme Ns et Ni sont présents simultanément, Ni pourrait agir en libérant de nombreuses sous-unités de  $\beta \gamma$ ; ces sous-unités, en se réassociant à  $\alpha s$  permettraient une inactivation de l'adénylate cyclase.

Malheureusement, tous ces faits et hypothèses sont encore loin de pouvoir expliquer le mécanisme de l'agrégation plaquettaire induite par l'adrénaline. Il est connu que l'adrénaline inhibe l'adénylate cyclase dans les préparations membranaires de plaquettes, mais qu'elle n'entraîne aucune diminution du taux d'AMPc total dans les plaquettes entières. Il a toutefois été constaté que l'adrénaline inhibe l'augmentation du taux d'AMPc induit normalement par la prostaglandine E1 (PGE1) (119-120). De plus, même si l'augmentation de l'AMPc est clairement corrélée à un effet inhibiteur de l'agrégation des plaquettes, il n'a jamais été démontré que la diminution d'AMPc était responsable de ce mécanisme.

Plusieurs études ont démontré qu'en plasma citraté (PRP) l'adrénaline entraînait l'agrégation des plaquettes humaines (121). En effet, cet agent agrégeant induit une première vague d'agrégation suivie d'une deuxième vague, accompagnée par la sécrétion du contenu des granules (fig.10). La deuxième vague correspond à l'activation de la voie de l'acide arachidonique et à la formation de thromboxane A2 (fig. 16) (122). La première vague, quant à elle, dépend directement de l'effet de l'adrénaline et présente toujours une très faible amplitude. Milton et Frojmovic (123) ont montré que cet agoniste permettait l'apparition de pseudopodes à la surface plaquettaire, ce qui permettait d'expliquer les interactions plaquettes-plaquettes, observées avec l'utilisation d'agents agrégeants faibles. .

L'adrénaline entraîne aussi une potentialisation de l'agrégation induite par de faibles doses d'autres agents agrégeants tels l'ADP (121-124), la thrombine (125), le platelet activating factor (PAF) (126-127) ou l'acide arachidonique (128). Finalement, plusieurs études utilisant des

préparations de plaquettes entières lavées ont montré que l'adrénaline entraînait une liaison du fibrinogène marqué à l'<sup>125</sup>I à ces plaquettes (129,130,131). Cette liaison est cependant peu importante, retardée et ultérieure à la sécrétion de traces d'ADP (131).

b- ADP.

Pour cet agent agrégeant qu'est l'adénosine diphosphate (ADP), de très nombreuses théories ont été évoquées depuis la mise en évidence de son pouvoir agrégeant, mais aucune d'elles n'explique encore son rôle. L'agrégation plaquettaire induite à l'ADP est un phénomène dose-dépendant *in vitro* et il semble possible que la deuxième vague d'agrégation (phénomène d'amplification) soit liée à la sécrétion d'ADP endogène.

Dans la mesure où l'ADP exogène ne pénètre pas dans la plaquette, les études se sont orientées vers l'action de l'ADP sur la membrane plaquettaire. A part Colman (132), peu de chercheurs ont abordé ce problème de récepteur membranaire de l'ADP. Le récepteur décrit par Colman et son équipe serait une protéine membranaire de 100 kDa (fig.17) non complètement caractérisée. Cette protéine posséderait un site de liaison des nucléotides et la liaison de l'ADP à ce site induirait un changement conformationnel ce qui à son tour permettrait l'exposition des récepteurs du fibrinogène (GPIIb/IIIa) indispensables à l'agrégation plaquettaire.

Le modèle proposé par Colman (fig. 17) évoque aussi une relation possible avec le cytosquelette plaquettaire probablement via les protéines

liants l'actine, où cette fois-ci on constaterait une dépendance vis-à-vis la concentration de calcium intracellulaire.

Toutefois ce modèle ne fait pas l'unanimité chez les chercheurs et l'on peut même dire que l'existence de la protéine de 100 kDa est fortement remise en question à l'heure actuelle. Ce point sera traité de façon plus élaborée dans la discussion.

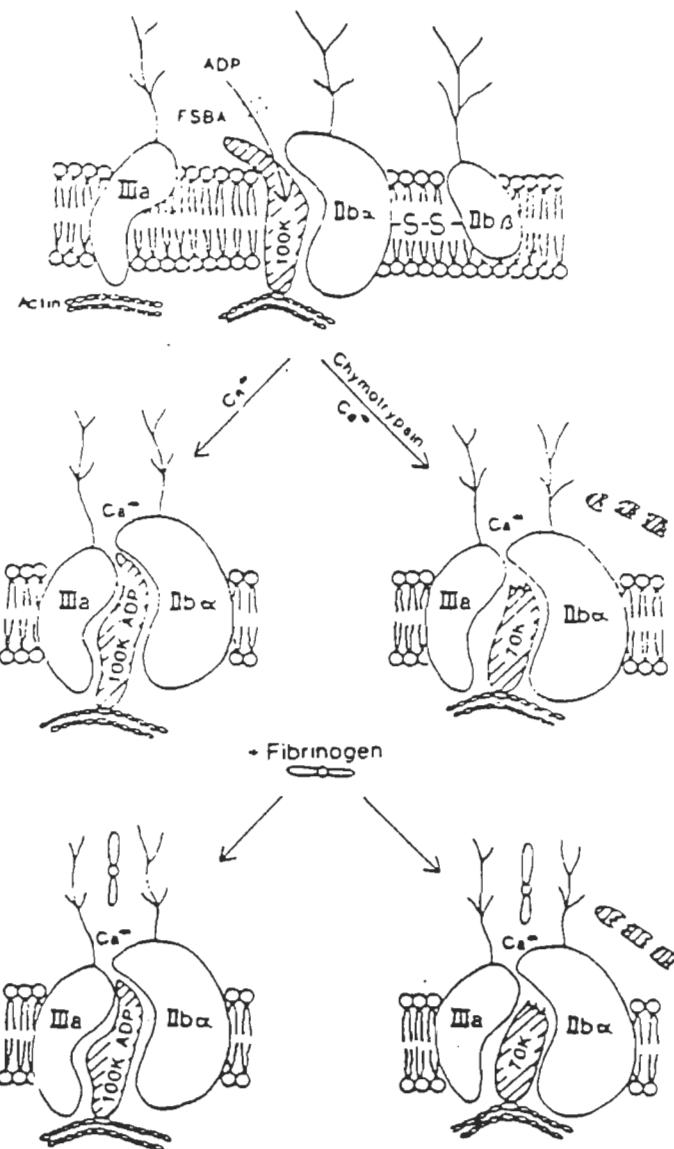


FIGURE 17 - Hypothèse de Colman  
(extrait : ref. 132)

Indépendamment de ces interrogations d'identité sur son récepteur, il est établi fermement que l'ADP est capable d'induire chez la plaquette un changement de forme ainsi que son agrégation. Ce nucléotide réduit le niveau de l'AMPc en inhibant l'adénylate cyclase préalablement stimulée par les prostaglandines  $PGI_2$  ou  $PGE_1$  (133). L'ADP posséderait de plus 2 sites de liaison à la surface des plaquettes (134): des sites de haute affinité présents même sur les plaquettes thrombasténiques, ce qui pourrait peut-être expliquer le changement de forme induit par cet agent agrégeant dans les plaquettes de patients atteints de thrombasténie de Glanzmann et une deuxième catégorie, les sites de faible affinité, qui seraient par contre absents dans les plaquettes de patients atteints de ce genre de thrombasténie.

Pour conclure, notons que l'ADP induit une agrégation plaquettaire irréversible en présence de plasma contenant une concentration relativement faible de calcium (40  $\mu M$ ) (135). Cette agrégation est toujours précédée par une augmentation de calcium intracellulaire (136), par une importante formation de thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) et par une sécrétion plaquettaire.

### c) PAF

Le PAF (platelet-activating-factor) est un médiateur dérivé des phospholipides membranaires cellulaires. L'élucidation de sa structure (1-0-Alkyl-2-0-acétyl-SN-glycéro-3-phosphorylcholine) déterminée en 1979 constitue le premier exemple de phospholipide de structure connue, doué d'une activité biologique. Nous savons actuellement que le PAF peut être libéré par les monocytes (137), les neutrophiles (138), les plaquettes

(139), les macrophages (140), les éosinophiles (141) et les cellules endothéliales (142). Ce phospholipide est impliqué dans les réactions allergiques (143) et inflammatoires et a été décrit comme probablement le plus puissant agent agrégeant connu (144).

Les principales actions intraplaquettaires du PAF sont illustrées à la figure 18.

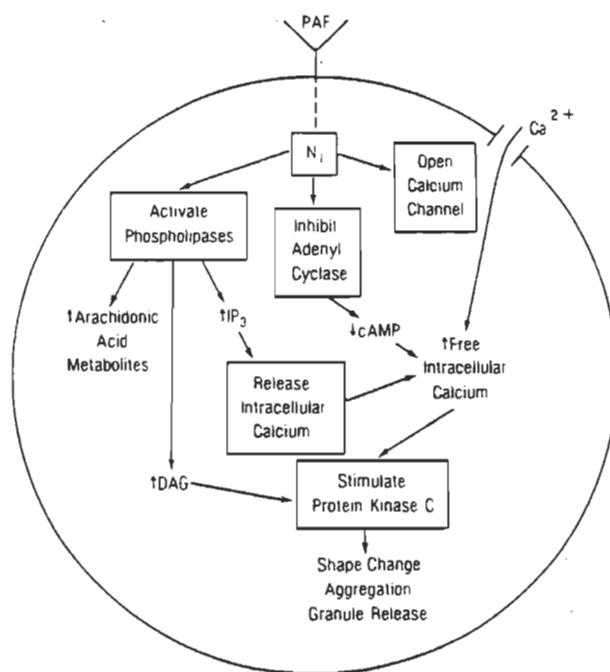


Figure 18 - Schéma des actions du PAF  
(extrait : ref. 144a)

Il existe une sérieuse controverse quant au mode d'action du PAF. En effet, certains auteurs (145) affirment que l'agrégation induite au PAF est indépendante de la voie de la cyclooxygénase et de celle la lipoxygénase.

tandis que d'autres (146) ont démontré l'implication de la voie de la cyclooxygénase dans la réponse plaquettaire au PAF. La découverte de ce puissant agent agrégeant est beaucoup trop récente pour nous permettre de trancher ce débat. Par contre nous savons que le PAF induit à faible concentration une agrégation irréversible des plaquettes et que son effet maximum se situe entre  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$  M (147). Il semble que le PAF, tout comme plusieurs autres agents agrégeants, induit la formation d'acide phosphatidique (148) par la réaction séquentielle déjà illustrée à la figure 16. L'acide phosphatidique serait donc un médiateur intracellulaire de l'activation plaquettaire induite par le PAF. De plus, l'acide phosphatidique est un précurseur de 1,2-diacylglycérol (DG) lequel active le système de la protéine kinase C (149) par l'intermédiaire de la phospholipase C. Il a aussi été démontré que l'activation plaquettaire causée par le PAF induisait la phosphorylation d'une protéine plaquettaire de 40 kDa.

#### d) Autres agrégeants

##### Acide arachidonique :

L'agrégation des plaquettes par l'acide arachidonique est un mécanisme dépendant, d'une part de la sécrétion de l'ADP intraplaquettaire et de l'autre, de la formation à partir des phospholipides membranaires des prostaglandines et de TXA<sub>2</sub> (150). La dégradation par l'addition d'un système enzymatique de l'ADP sécrété ne bloque pas l'agrégation à l'acide arachidonique, parce que le PGH<sub>2</sub> et le TXA<sub>2</sub> sont des agents agrégeants en l'absence d'ADP. L'aspirine, qui pour sa part bloque la formation de PGH<sub>2</sub> et de TXA<sub>2</sub>, inhibe totalement l'agrégation à l'acide arachidonique.

Collagène :

L'interaction des plaquettes avec le collagène se produit d'abord par l'adhésion de quelques plaquettes aux fibres de collagène. Ces plaquettes adhérées sécrètent de l'ADP ce qui conduit à la formation du TXA<sub>2</sub> (151) qui va à son tour affecter les autres plaquettes en suspension. C'est cette dernière portion de la réaction qui est inhibée par l'utilisation de l'aspirine (151).

Il a cependant été démontré, dans d'autres conditions expérimentales, que la sécrétion du contenu des granules de plaquettes adhérentes n'est pas bloquée par l'inhibition de la cyclo-oxygénase par l'aspirine (152). Ce fait laisse supposer que l'activation des plaquettes adhérentes au collagène peut être essentiellement indépendante de l'activation reliée à la voie de l'acide arachidonique et de la sécrétion d'ADP.

Thrombine :

La thrombine est un puissant inducteur de la sécrétion et de l'agrégation plaquettaire. La thrombine fait sécréter le contenu des granules denses et des lysosomes; elle active aussi la formation de TXA<sub>2</sub> à partir de l'acide arachidonique (153). À forte concentration, la thrombine peut entraîner l'agrégation des plaquettes et leur sécrétion par un mécanisme indépendant de la sécrétion de l'ADP et de la formation de TXA<sub>2</sub>. La nature de ce troisième mécanisme d'agrégation n'est pas encore élucidée, bien que l'on ait proposé qu'il soit lié à la formation de PAF par les plaquettes elles-mêmes au cours de leur activation (154).

### Ionophore A23187:

L'ionophore A23187 est capable de transporter du  $\text{Ca}^{++}$  et du  $\text{Mg}^{++}$  et il est supposément apte à induire le relargage du  $\text{Ca}^{++}$  emmagasiné dans les sites plaquettaires (155) en formant avec ce cation un complexe capable de traverser la membrane. Ces modifications de la concentration en calcium intracellulaire entraîne dans la plaquette un changement de forme, l'agrégation et la sécrétion.

Mürer (156) notait que la sécrétion induite par une faible concentration de A23187 pouvait être inhibée par l'aspirine ou l'indométhacine. Cette donnée s'ajoute à une autre se situant dans la même veine : en absence d'agrégation, A23187 ne produit pas de sécrétion dans les plaquettes lavées et filtrées (157). Ceci suggère que l'ionophore A23187 agit directement et exerce aussi un effet synergique sur la production de TXA<sub>2</sub> (158).

#### 1.1.3.5- Inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire

Il existe un nombre tellement élevé de ces inhibiteurs qu'en faire une liste exhaustive n'introduirait dans cette thèse qu'un phénomène de dilution. En effet, ces inhibiteurs se retrouvent dans à peu près toutes les catégories de substances et, en plus, ils agissent sur des récepteurs souvent non identifiés. Pour conserver une certaine homogénéité à ce travail, j'ai choisi d'énumérer (tableau VI) les inhibiteurs qui ont une action similaire à notre anticorps tout au moins en ce qui concerne la voie d'agrégation par l'ADP. Bien entendu, les effets de ces inhibiteurs sur l'agrégation plaquettaire induite par d'autres agonistes seront aussi contenus dans ce même tableau.

TABLEAU VI

PRODUIT	ACTION	INHIBITION DE L'AGRÉGATION PAR			
		ADP	Épinéphrine	PAF	Autres
<u>Vasodilatateurs</u>	augm. [AMPc]				
PGI <sub>2</sub>		+			
PGI <sub>1</sub>		+	?	?	-
Adénosine		+	?	?	-
<u>Stabilisants de membranes</u>					
Imipramine		+			
Amitriptyline					
Antihistaminique					
Anesthésique local (procaine)		+	+	?	Thrombine
<u>Anti-inflammatoires</u>	Inhib. cyclo-oxygénase	+			
Aspirine					
Indométhanine					
<u>Produits divers</u>					
β-Bloqueurs	Récepteur -β adrénergique	+	+	?	A. Arachidonique Collagène
Bloqueurs α-adrénergique	Récepteur α adrénergique	+			
Monoxide de carbone		+	-	?	A. Ara. Collagène Thrombine, U46619
Métiamide et Cimétidine	Antagoniste H-2 récepteur	+	+		Collagène
Trigramin	Interaction Fibrinogène - plaquettes	+	?	?	
Chloramphénicol		+	+	+	Tous les agonistes sauf collagène
Cycloheximide	Synth. protéines mitochondriales Ribosomes 80S	+			Thrombine Collagène

TABLEAU VI

PRODUIT	ACTION	INHIBITION DE L'AGRÉGATION PAR			
		ADP	Épinéphrine	PAF	Autres
<u>ANTICORPS</u>					
UMR-304	Anti- $B_2$ microglobuline	+	+		Thrombine
Anti-TSB	Anti-thrombospondine	+	-		Thrombine Collagène
Anti-PLA <sup>1</sup>	Action plaquette A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> via GPIIIa	+			Collagène
Anti-Pen <sup>a</sup>	Plaquette Pen <sup>a</sup> via GP IIIa	+	+		
Anti-GPIV	Action sur GPIV	+			
PBM 6.4	Anti-GPIIb/IIIa	±	+		a.a., collagène Thrombine
Anti-GPIIIa	Anti-GP IIIa	+			
TAB Anti-GPIIb/IIIa		±			Thrombine
T10 Anti-GPIIb/IIIa		+			Thrombine
IgG (Tobalem)	Anti-GPIIb/IIIa	+	+		Collagène Thrombine
J 15 (IgM)	Anti-GPIIb/IIIa	+	+	+	Tous
Anti-HLA-A2	Contre HLA chez patient HLA déf	+			Collagène
AcD51		+	+	+	Aucune autre action

## CHAPITRE DEUXIÈME

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.0.0- MATÉRIEL

##### Produits et Fournisseurs

Les agents agrégeants tels l'ADP, l'épinéphrine, le collagène et la ristocétine ont été achetés chez Pacific Hemostasis tandis que la thrombine, le PAF (platelet activating factor) et l'ionophore de calcium proviennent de chez Sigma. De cette même compagnie (Sigma) nous avons acheté la glucose oxydase et la lactoperoxydase ainsi que les antiprotéases : leupeptine, pepstatine, aprotinine et trypsine inhibiteur.

Les anticorps anti-IgG de souris ainsi que le HRP (4-chloro-1-naphthol) ont pour leur part été achetés chez BIO-RAD, tandis que le conjugué biotin-streptavidin provient de la compagnie Amersham.

Pour ce qui est des autres anticorps anti-IgG de souris marqués au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) ils proviennent tous de la compagnie Kirkegaard&Perry.

Les différents anticorps antiplaquettaires (PLA, PEN, BAK, YUK, HLA) nous ont été gracieusement offerts par les services transfusionnels de la Croix-Rouge.

L'iode radioactif  $I^{125}$  provient de la compagnie New England Nuclear et l'ensemble des autoradiogrammes a été effectué avec des films Kodak X OMART AR (Kodak)

L'ammonyx LO a été acheté chez Millmaster-Onyx International Inc. tandis que le Nonidet P40 (NP-40) provient de la compagnie Sigma.

Tous les autres produits sont de grade analytique.

### 2.0.1 PRELEVEMENT ET PREPARATION DES PLAQUETTES

#### Choix des donneurs:

L'interrogatoire avant le prélèvement sanguin vérifie si le donneur est à jeûn, qu'il n'a pas pris d'alcool dans les heures qui précédent et n'a absorbé aucune médication depuis 10 jours, en particulier de l'aspirine ou de ses dérivés.

#### Prélèvement:

Le prélèvement de sang veineux doit être franc et l'écoulement rapide, de façon à minimiser la génération de thrombine. On utilise comme anticoagulant le citrate de Na 3.8% ( 1 volume de citrate pour 9 volumes de sang) pour un volontaire ayant un hématocrite compris entre 35 et 48%.

#### Centrifugation

Elle se fait à température ambiante à 250g pendant 10 minutes.

Le PRPc (plasma citraté riche en plaquettes) est prélevé avec une pipette Pasteur en plastique et conservé à température ambiante dans un tube plastique bouché pour minimiser la variation de pH pouvant être causée par le CO<sub>2</sub>.

#### Numération plaquettaire

Les plaquettes du PRPc sont comptées et leur nombre ajusté à environ  $3 \times 10^8/\text{ml}$  en diluant le PRPc par du plasma pauvre en plaquettes (PPP) autologue.

### 2.0.2 GENERATION DE L'ANTICORPS MONOCLONAL D<sub>51</sub>

L'anticorps D<sub>51</sub> (AcD<sub>51</sub>) généré dans les laboratoire de l'université McGill par l'équipe du Dr. Sullivan (3) est le résultat de deux injections intraveineuses de 10<sup>7</sup> cellules du variant blastique HL60-D à des souris. Après une série de sélections, de clonages et de resélections les auteurs ont obtenus des hybridomes produisant l'AcD<sub>51</sub>. Ces hybridomes ont été subséquemment cultivés sous forme d'ascite, c'est-à-dire sous la forme d'une suspension de cellules tumorales dans la cavité péritonéale d'une souris, pour obtenir un titre élevé d'AcD<sub>51</sub>.

### 2.0.3. PREPARATION DES MONOCYTES

Un prélèvement de 30 ml de sang sur héparine est centrifugé à 1850 rpm (élimine les plaquettes) et le "buffy coat" (couche blanchâtre) est prélevé et mélangé 1:1 avec de la solution Hank's (sans calcium).

On dépose le tout sur Ficoll(4 ml Ficoll + 8 ml mélange) et l'on centrifuge 20 minutes à 2200 rpm. L'anneau formé suite à cette centrifugation est recueilli et un cycle de lavage-centrifugation est accompli dans les mêmes conditions. Les cellules sont par la suite suspendus dans du milieu de culture (RPMI 1640) et leur quantité est évaluée à l'aide d'un compteur de cellules (COULTER). Ces cellules diluées (1x10<sup>7</sup>/ ml) sont réparties dans des boîtes de Pétri, préalablement enduites de sérum AB. et l'on procède à une incubation de 90 min. à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Un cycle de trois lavages avec du milieu de culture Hank's froid permet de recueillir à l'aide d'un policeman les cellules adhérées.

Après un dernier lavage, ces cellules sont suspendues dans du RPMI 1640 et recomptées. Habituellement, 60 à 80% des cellules adhérées sont des monocytes.

## 2.1- MÉTHODES

### 2.1.1- AGRÉGATION PLAQUETTAIRE

La technique de mesure de l'agrégation plaquettaire utilisée ici a été décrite pour la première fois par Born (159) et la plupart des méthodes actuelles sont basées sur des variantes de cette technique. Le principe de la méthode consiste à placer le plasma riche en plaquettes (PRPc) dans le faisceau lumineux d'un agrégomètre et de consigner la variation, dans le temps, du pourcentage de transmission de la lumière. Pour initier l'agrégation des plaquettes on ajoute un agent de déclenchement exogène à une quantité connue de plaquettes, maintenues en suspension par une agitation constante. Les plaquettes adhèrent les unes aux autres et de l'augmentation de la masse de l'agrégat, résulte la sédimentation. Le pourcentage de transmission de la lumière qui traverse l'échantillon est en corrélation directe avec l'intensité de la réponse plaquettaire et augmente donc avec celle-ci.

#### Mesure de l'agrégation plaquettaire

Il est important de toujours effectuer la mesure de l'agrégation plaquettaire dans les trois heures qui suivent le prélèvement. Une calibration de l'agrégomètre Payton 600 (Payton Ass. Ontario) est requise au début de chaque série d'échantillon. Cet appareil grâce à ses deux canaux offre la possibilité de traiter simultanément deux échantillons.

D'abord dans la cuvette de référence (Payton 7.92 mm) on dépose 425  $\mu$ l de PPP, tandis que dans la cuvette d'échantillon (Payton 7.92 mm) le même volume (425  $\mu$ l) mais cette fois-ci de PRPc (matériel et méthodes)

est ajouté. L'addition respective a ces cuvettes de 25  $\mu$ l du tampon ou de 25  $\mu$ l de substance a analyser (AcD<sub>51</sub>) complète le volume à 450  $\mu$ l

On incube les deux cuvettes 8 minutes (37°C) sans agitation, puis on agite 30 sec à 1100 RPM (37°C) et, finalement, on rajoute 50  $\mu$ l d'un des agents agrégants (tableau VII). La réponse plaquettaire, c'est-à dire l'augmentation de transmittance causée par la diminution de la turbidité de PRPc suite à l'agrégation des plaquettes et à leur sédimentation, est enregistrée simultanément pour le contrôle et pour l'échantillon à l'aide d'un enregistreur à deux canaux (Riken Densi Co. Ltd. SP H5P).

Tableau VII  
Préparation des agents agrégants

Agent agrégants	Sol'n mère	Sol'n de travail	Notes
ADP	5 mM	66 $\mu$ M	cong. (-20)
Épinéphrine	1 mM	100 $\mu$ M	att. lumière
Collagène	0.25 %	dil. 1/100	4°C
Thrombine	1000 U/ml	5 et 1 U/ml	4°C
Ionophore	10 mM	10 $\mu$ M	cong. (-20)
A-23187			
PAF	10 mM	10 $\mu$ M	cong. (-20)

A partir d'une solution mère, on prépare des solutions de travail qui seront encore dix fois plus concentrées que la concentration finale dans les cuvettes de mesure

On utilise 50  $\mu$ l d'agent agrégant pour 450  $\mu$ l de PRPc. Les agents agrégeants sont fraîchement préparés (dilution de la solution mère) au début de l'expérience

#### 2.1.2- IMMUNOBLOTTING (Western blot)

L'immunoblotting a été mis au point par Towbin et coll. (160) pour étudier l'interaction d'anticorps avec des protéines préalablement séparées en gel de polyacrylamide. La technique consiste à transférer, suite à une migration électrophorétique, les protéines du gel de polyacrylamide sur une membrane de nitrocellulose. L'immobilisation ainsi que la renaturation des protéines sur la feuille de nitrocellulose permet leur identification par des méthodes immunologiques. Le blotting s'est avéré particulièrement utile pour la détection de l'antigène D<sub>51</sub> (AgD<sub>51</sub>) qui ne répond pas au marquage de surface à l'iode et ne se colore pas ou très peu au bleu de Coomassie.

L'utilisation de cette technique se subdivise en quatre temps :

- a- Préparation de l'échantillon
- b- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
- c- Transfert des protéines sur nitrocellulose
- d- Révélation

##### a- Préparation de l'échantillon

On prépare 5 ml de PRP recueilli sur anticoagulant ACD 1/8 (acide-citrate-dextrose) auquel on ajoute 25  $\mu$ l d'EGTA 400  $\mu$ M. Le PRP est

centrifugé à température de la pièce pour 15 min. à 1500g. Au culot on ajoute 2 ml de PBS + E + I (page 61) à pH 6.5, suite à une agitation par aspiration on laisse reposer 10 min. On centrifuge, décante le surnageant et rince de nouveau le culot. Cette étape est exécutée 2 fois. Pour la dernière resuspension du culot on ajoute 1 ml de PBS + EDTA (page 61) et on laisse reposer 5 min. On ajoute ensuite la concentration plaquettaire à  $4 \times 10^9$  / ml à l'aide du tampon. Finalement on congèle ces plaquettes en aliquots de 0.5 ml à - 40°C.

#### b- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

La méthode d'électrophorèse sur plaque utilisée ici a été décrite par O'Farrel (161) et est en fait une amélioration de celle décrite par Laemmli (162). Toutes les solutions mère (page 61) sont gardées au froid (4°C).

Pour préparer le gel de migration, la technique (voir tableau VIII) consiste à mélanger les solutions A et B ainsi que l'eau dans un Erlenmeyer à vide puis à dégazer 5 minutes avec une trompe à eau. Les solutions C et D sont ensuite ajoutées, puis après un léger brassage rapide, on dépose rapidement, à l'aide d'une pipette, le mélange final entre les deux plaques de verre déjà montées sur leur support. Cette opération doit être effectuée rapidement mais avec grand soin pour éviter que des bulles d'air ne soient emprisonnées à l'intérieur du gel. Ce dernier, d'environ 8 cm de hauteur, est ensuite recouvert de 2 ml d'eau, puis laissé à polymériser pendant une heure. On peut à cette étape l'utiliser immédiatement ou le laisser pour la nuit.

Tableau VIIIPréparation des gels de migration et de compression pour l'électrophorèse

Solution	Préparation de 25 ml de gel de migration à 10%		Préparation de 10 ml de gel de compression à 3.5%	
	Concentration finale	Volume de solution mère (ml)	Concentration finale	Volume de solution mère (ml)
A Tris-HCl	0.375 M	6.25	0.125 M	2.50
SDS	0.1%		0.1%	--
B Acryl.	10%	8.33	3.5%	1.17
Bis-Acryl.	0.27%		0.094%	
C Persulfate d'ammonium	0.033%	0.082	0.03%	0.03
D TEMED	0.05% v/v	0.25	0.1% v/v	0.20
E H <sub>2</sub> O	--	10.09	--	6.10

L'opération suivante consiste à remplacer l'eau par la solution d'acrylamide 3.5% qui s'étalera dans l'espace laissé libre par le peigne de dépôt, et gélifiera pour donner le gel de compression. Ce gel est préparé de façon semblable à celle décrite plus tôt pour le gel de migration (tableau VIII). Après une polymérisation du gel de compression pendant 30 à 60 minutes, on dépose la plaque dans la cuve de l'appareil contenant déjà 1 à 2 litres de tampon glycine (page 61) de manière à ce que la partie inférieure du gel soit en contact avec le tampon glycine. On ajoute ensuite suffisamment du même tampon dans la cavité supérieure du support de façon à ce que le gel de compression en soit aussi recouvert. Le peigne est alors retiré doucement puis 30 à 150  $\mu$ l des échantillons (environ 20  $\mu$ g de protéine) sont déposés dans les puits ainsi formés. On applique alors aux bornes de l'appareil un courant continu équivalent à 40 mA par plaque de gel. Lorsque le marqueur (bleu de bromphénol) a atteint l'extrémité inférieure de la plaque, l'alimentation est coupée et les gels sont dégagés des plaques de verre.

### c- Transfert

Après avoir dégagé le gel d'électrophorèse des plaques de verre, on enlève le gel de concentration et on plonge le gel de séparation dans le tampon de transfert (page 61) pour une incubation de 30 min.

Simultanément à cette incubation la membrane de nitrocellulose, le papier buvard et les éponges de transfert sont déposés dans un autre volume de tampon de transfert. Après ces incubations, on confectionne le système sandwich pour le transfert avec l'appareil BIO-RAD. On dépose dans le portoir à sandwich une éponge surmontée d'un papier buvard sur

lequel on déposera le gel de séparation. Par dessus le gel, on place la membrane de nitrocellulose, un papier buvard et une éponge. Le système sandwich est alors refermé et positionné dans l'appareil de transfert contenant environ 3 litres de tampon de transfert.

Les transferts sont effectués à 0.1A pendant 16 heures ou à 0.4A pendant 3 heures dans l'appareil de transfert BIO-RAD selon les instructions de la compagnie.

d- Révélation

Une fois le transfert terminé on dépose la nitrocellulose dans une solution de lait en poudre 5% pour 12 heures à la température de la pièce. Cette opération est suivie de trois lavages au PBS Tween 20, 0.2% et ensuite commence l'incubation avec des anticorps. Nous avons utilisé pour cette révélation l'anticorps D51 purifié et dilué 1/20, suivi du conjugué anti-IgG de souris BIO-RAD marqué à la peroxydase dilué 1/100 ou le système biocin-streptavidin de Amersham. Indépendamment du conjugué employé, la révélation colorimétrique s'effectuait avec le système HRP de BIO-RAD (4-chloro-1-naphtol) (163).

## SOLUTIONS

### PBS + EDTA + Inhibiteurs fraîchement préparés (PBS + E + I)

20 mM phosphate de sodium

130 mM NaCl

2 mM EDTA (Na)

4 mM iodoacétamide

4 mM n-éthylmaléimide

Ajuster le pH à 6.5

Ajouter 100 µl d'aprotinine (100,000 unités)

---

Solutions mères: Toutes ces solutions sont aqueuses

Solution A: Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.4%

Solution B: Acrylamide 30% et bis-acrylamide 0.8%

Solution C: Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 0.4%

Solution D: Persulfate d'ammonium 10%

Solution E: TEMED 5% v/v

N.B. Les solutions D et E sont préparées juste avant leur utilisation.

---

### Tampon glycine:

Tris 0.025 M

Glycine 0.0192 M

SDS 0.1%

Le tout ajusté à pH 8.3 avec du HCl.

---

### Tampon de transfert

Dissoudre dans l'eau distillée:

Tris 25 mM

Glycine 192 mM

Méthanol 20 %

Ajuster le volume à 1 litre

Le pH est de 8.3

Faire 4 litres de ce tampon.

---

### 2.1.3 - CHOC HYPOTONIQUE

La réponse plaquettaire au choc hypotonique a été suivie selon la technique de Odink's (164) qui est basée sur la diminution rapide (10 sec.) de l'absorbance de la lumière lorsque les plaquettes sont placées dans l'eau. Cette première réaction est suivie par une lente récupération (5 min.) de l'absorbance initiale au fur et à mesure que les plaquettes chassent l'eau et les ions. Les valeurs initiale et minimale de densité optique ainsi que la valeur de la pente de récupération sont nécessaires pour les calculs ultérieurs.

#### Prélèvement

Les plaquettes sont préparées à partir d'un échantillon de sang anticoagulé avec de l'ACD-A 1/16(acide-citrate-dextrose-adenine) et séparées en deux fractions dont l'une sera incubée une heure avec l'AcD<sub>51</sub> (30 $\mu$ g/ml) .

#### Mesure de la réponse

Une fois le spectrophotomètre ajusté à 610 nm et calibré à zéro avec de la saline on place dans une cuvette de plastique 0.5 ml de saline et 1.5 ml de PRP. On mélange le tout rapidement en aspirant avec une pipette et on note la valeur de D.O<sub>610</sub> .

Dans une deuxième cuvette contenant 0.5 ml d'eau on ajoute 1.5 ml de PRP. On mélange rapidement et l'on note la D.O. minimale obtenue. On laisse le tracé s'enregistrer pendant 5 minutes.

#### 2.1.4 - IMMUNOFLUORESCENCE (général)

Cette technique mise au point par Fitz-Gibbon (3) nous permet de visualiser la liaison de l'**AcD51** avec les différentes lignées de cellules sanguines.

Dans une cupule Eppendorf on ajoute  $3 \times 10^5$  cellules que l'on lavera trois fois en les resuspendant dans 1.5 ml PBS suivit d'une centrifugation à 1800 rpm. Après le dernier lavage, on élimine le surnageant et l'on ajoute 50  $\mu$ l de **AcD51** dilué 1/20 avec du PBS. Une incubation de 60 min. sur glace est suivie d'un lavage au PBS 5% serum humain et de 2 lavages avec PBS seul. Suite au dernier lavage avec le PBS seul, on enlève le surnageant et l'on ajoute 25  $\mu$ l de conjugués (anti-IgG-FITC) pour une incubation sur glace de 30 min. Cette dernière incubation est suivie d'une séquence de 3 lavages comme dans l'étape précédente et encore là le surnageant est aspiré. Pour terminer on ajoute 20  $\mu$ l de PBS et l'on fait des frottis. Le tout est lu à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leitz Orthoplan) et l'on consigne comme valeur positive les points fluorescents nettement définis localisés à la surface des différentes catégories de cellules.

#### 2.1.5- SEROLOGIE PLAQUETTAIRE

Ces tests ont été effectués avec des anticorps antiplaquettaires couramment utilisés en sérologie plaquettaire.

### Fixation des plaquettes

On prélève 10 ml de sang sur EDTA de quatre sujets différents. On centrifuge pour obtenir un PRP auquel on ajoute un égal volume de PBS-EDTA pH 6.0. Une centrifugation de 10 min. à 3000 g permet l'obtention d'un culot qu'on lavera 3 fois avec du PBS-EDTA. Suite à la 4<sup>ème</sup> centrifugation, on assèche le culot, et y ajoute 1 ml de paraformaldéhyde-EDTA 1% à pH 6.0. Le culot est resuspendu et incubé 2 minutes à la température de la pièce. Suite à cette fixation on effectue deux autres lavages avec du PBS-EDTA et finalement on assèche le culot et le resuspend dans PBS-EDTA pour obtenir une concentration plaquettaire d'environ  $3 \times 10^7$  /ml.

### Immunofluorescence (indirecte)

Cette technique fut effectuée simultanément avec et sans **AcD<sub>51</sub>** et sur les plaquettes des mêmes sujets.

On prépare deux séries de plaquettes, l'une de façon conventionnelle et l'autre ayant été mise en contact avec une concentration saturante en **AcD<sub>51</sub>** (30 µg/ml).

À 0.1 ml de suspension plaquettaire, on ajoute 0.1 ml de l'antisérum à vérifier (anti-PLA<sup>a</sup>, BAK<sup>a</sup>, Pen<sup>a</sup>, Yuk<sup>b</sup>, HLA).

Le mélange est incubé à 37°C pour 30 minutes. Cette incubation est suivie d'une séquence de 3 lavages où alternent centrifugation, décantation et mise en suspension des plaquettes. Après la troisième centrifugation, on assèche le culot à l'aide d'une trompe à vide et y ajoute 0.1 ml de FITC (isothiocyanate de fluorescéine) anti-Ig (1mg/ml) dilué 1/30. On resuspend les plaquettes et les incube 30 minutes à la température de la pièce dans un endroit obscur. On lave deux fois comme décrit précédemment et après avoir réasséché le culot, on ajoute une goutte de glycérol-PBS pH 7.85, on resuspend les plaquettes et on confectionne les

frottis. Les réactions sont lues au microscope à fluorescence et comptabilisées selon la technique utilisé en sérologie plaquettaire. L'intensité de la fluorescence visualisée à la surface des cellules et exprimée par le nombre de + .

#### 2.1.6 - ERYTHROPHAGOCYTOSE MONOCYTAIRE

Après obtention par centrifugation d'hématies de groupe O R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, on procède à 3 lavages avec du NaCl 0.9% en centrifugeant à 1800 rpm pendant au maximum 1 min. À 150  $\mu$ l de ces globules rouges lavés et concentrés , on ajoute 150  $\mu$ l d'anti-D (Winrho) à 0.1 mg/ml et une incubation de 45 min. à 37°C est amorcée. Une fois l'incubation terminée, les érythrocytes sont dilués dans du liquide de HAYEM pour une concentration finale de  $2 \times 10^7$ /ml

Une incubation sans agitation de 60 minutes à 37°C est nécessaire pour un mélange de 125  $\mu$ l de monocytes ( $5 \times 10^6$ /ml) ( voir 2.0.3) incubé (30 min.) ou non avec **AcD<sub>51</sub>** (30 $\mu$ g/ml). Après cette incubation, on aspire le surnageant et resuspend le culot au volume initial avec du NaCl 0.9% ou du RPMI. Les frottis sont préparés en ajoutant 70  $\mu$ l du mélange dans la cytocentrifugeuse que l'on actionne à 1000 RPM pendant 5 min. Le frottis est fixé avec du méthanol 10 min. puis, coloré successivement au Wright 15 min. et au Giemsa pendant 5 min.. La compilation des résultats est effectuée au microscope, en dénombrant le pourcentage de monocytes ayant ingéré au moins une hématie.

### 2.1.7 - ÉPREUVE AU NBT

Ce test mis au point par Park et coll. (165) permet d'évaluer la capacité de réduction du nitro-bleu de tétrazolium (NBT) *in vitro* par les granulocytes neutrophiles. Ce colorant soluble incolore est transformé en un dépôt bleu-noir de formazan par les enzymes contenues dans les granulocytes. Cet examen explore l'ensemble du système phagocytaire de ces cellules sanguines. Certaines anomalies du chimiotactisme, de la phagocytose ou de la bactéricidie (granulomatose chronique, déficience en myéloperoxydase granulocytaire, ect.) chez les cellules granulocytaires affecteront le processus de réduction du NBT. La trousse #840 de Sigma Diagnostic a été utilisée pour cette étude histochimique.

Le prélèvement sanguin se fait à l'aide d'une seringue en plastique de 1 ml. contenant ou non 30 µg d'**AcD<sub>51</sub>**. Immédiatement après le prélèvement, l'aiguille de la seringue est enlevée et le sang versé dans un tube siliconisé contenant 20 unités d'héparine (Sigma 840-2U). On agite le tout doucement pendant 30 sec. et l'on procède de façon simultanée à une analyse dans des conditions stimulantes (présence d'extrait bactérien) ou non-stimulantes (sans extrait bactérien).

#### Conditions non-stimulantes:

À 0.1 ml de NBT on ajoute 0.1 ml de sang hépariné contenant ou non l'**AcD<sub>51</sub>** que l'on mélange doucement et que l'on incube à 37°C pendant 10 minutes, puis à la température de la pièce pendant un autre 10 minutes. Le mélange est de nouveau agité doucement et l'on procède à la confection des frottis puis à leur coloration avec la solution Wright. Les résultats sont obtenus par une lecture à l'immersion du pourcentage de neutrophiles contenant des dépôts de formazan.

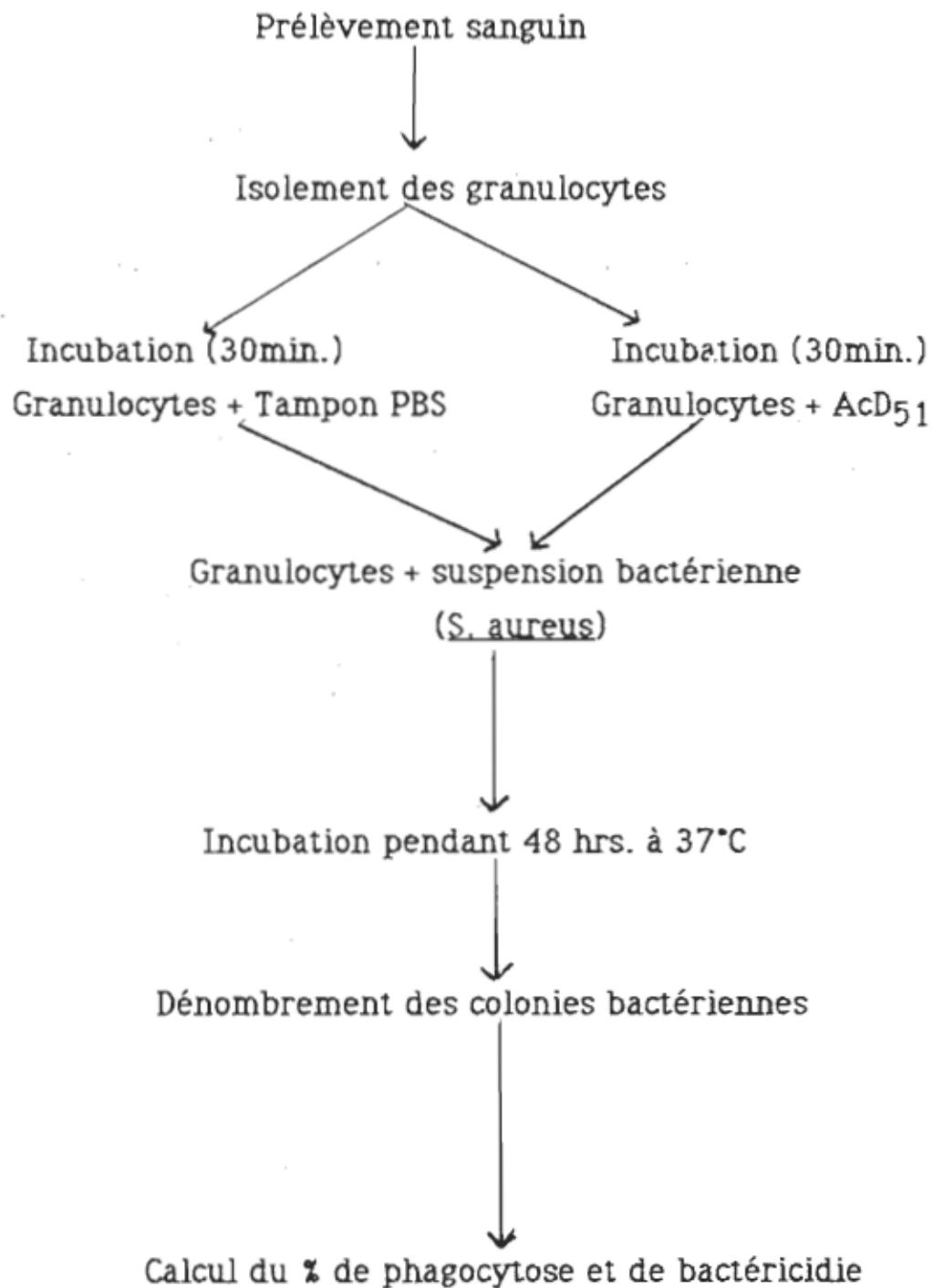
Conditions stimulantes :

Elles sont essentiellement les mêmes sauf que le 0.1 ml de sang hépariné utilisé dans le protocole non-stimulant est remplacé par 0.05 ml de sang hépariné contenant ou non l'**AcD<sub>51</sub>** auquel on ajoute 0.05 ml. de solution stimulante. Cette partie du protocole explore la possibilité d'une anomalie intrinsèque chez une population granulocytaire.

#### 2.1.8- BACTÉRICIDIE

La mesure de la bactéricidie telle que nous l'avons effectuée englobe les processus de chimiotactisme, d'opsonisation, d'ingestion et de dégranulation. Il s'agit donc d'une technique de choix pour l'évaluation globale du mécanisme de la phagocytose.

La méthode utilisée dans ce travail fut décrite pour la première fois par Tan (166) et améliorée plus tard par Leijh (167). Dans cette étude de la bactéricidie, on utilise le *Staphylococcus aureus* comme organisme cible et la lysostaphine pour l'élimination par digestion des bactéries extracellulaires. Par cette technique il est possible de déterminer séparément l'ingestion et le processus bactéricide. Cette technique à forte incidence bactériologique a été mise au point dans les laboratoires de l'hôpital Ste-Justine (1985) et en 1986 elle a été adoptée par les laboratoires d'hématologie du centre hospitalier de l'université Laval (CHUL) pour supporter le développement de l'hématologie pédiatrique. Nous avons fait incorporer nos analyses du processus de bactéricidie dans la routine du laboratoire d'hématologie spéciale du CHUL, ce qui nous permettait du même coup d'éliminer les erreurs possibles lors de l'utilisation de ce nouveau protocole d'ailleurs fort complexe. Les étapes principales de ce protocole sont :



### 2.1.9 - IMMUNOPRECIPITATION

L'immunoprécipitation est une méthode d'identification d'une substance donnée par sa liaison avec un anticorps spécifique. L'utilisation optimum de cette technique est observée lorsqu'une faible quantité d'antigènes cellulaires marqués est reconnue par un anticorps monospécifique. Nous avons utilisé pour marquer la surface plaquettaire une technique à l'<sup>125</sup>I initialement décrite par Phillips et Morrisson (168) où à l'aide d'un système enzymatique l'<sup>125</sup>I est utilisé pour marquer de façon prédominante (>90%) la tyrosine contenu dans les protéines localisées à la surface des cellules. Cette technique, aujourd'hui très répandue, a subit de nombreuses, mais légères modifications en fonction des cellules ou des antigènes étudiés.

Nous avons essayé quelques méthodes et comme chacune d'elles nous a donné le même résultat nous ne présentons ici que l'une d'elles. Nous discuterons de façon plus exhaustive de ces résultats négatifs dans un chapitre ultérieur.

#### Marquage de surface

Après avoir recueilli le sang et préparé le PRP selon la technique déjà décrite,(voir 2.0.1) les plaquettes sont lavées 3 fois au PBS-EDTA 2 mM et finalement le culot plaquettaire est resuspendu dans ce même tampon et agité doucement pendant une heure. À 2 ml de suspension plaquettaire (10<sup>2</sup> cellules/ml) on ajoute 200 µl de glucose oxydase (10µg/ml), 200 µl de lactoperoxydase (200 µg/ml) et 1mCi d'<sup>125</sup>I-. On mélange le tout doucement par inversion et l'ajout de 200 µl de glucose (50 mM) permet de démarrer la réaction d'iodination enzymatique des

protéines de surface. On incube pendant 15 minutes avec des agitations douces et répétées toutes les 5 minutes. Suite à cette incubation, la réaction est arrêtée par le lavage à trois reprises des plaquettes avec du PBS-antiprotéase (leupeptine 10 µg/ml, pepstatine 10µg/ml, aprotinine 10 µg/ml, trypsine inhibiteur 10µg/ml). Les cellules sont ensuite lysées avec des détergents non-ionique tels le Triton X-100 1% ou l'Ammonix LO 0.2% ou encore avec le NP-40 0.5% p/v pendant 30 minutes à 4°C.

### Immunoprecipitation

#### a- Réaction antigène-anticorps

Dans cette première étape de l'immunoprecipitation, nous avons ajouté des quantités variables d'anticorps D51 (**AcD51**) purifié à 200 µl d'extrait plaquettaire. De nombreuses alternatives en terme de choix de tampon, de température et de temps d'incubation furent vérifiées.

#### b- Agent précipitant

La formation d'un complexe antigène-anticorps monoclonal n'est pas nécessairement une réaction induisant la formation d'un produit auto-précipitable. Dans cette éventualité nous avons essayé les techniques les plus courantes d'agents précipitants. Des concentrations variables d'IgG anti-souris furent employées et la technique de précipitation mise au point par Kesler (169) fut celle la plus régulièrement utilisée. Dans cette technique le deuxième anticorps(Ac précipitant) est remplacé par la protéine A de *Staphylococcus aureus* mettant ainsi à profit la haute

affinité de cette protéine pour la portion Fc des IgG.

c- Lavage

Les lavages furent effectués avec le tampon réactionnel auquel on ajoutait 0.05% de détergent non-ionique(ex. NP-40)

d- Élution

Cette étape fut réalisée en ajoutant au culot de protéines précipitées 200  $\mu$ l de tampon à électrophorèse 4X (voir 2.1.2) et en incubant dans l'eau bouillante 5 minutes.. Suite à cette incubation une centrifugation de 10 min. à 3000 RPM nous permettait de nous débarrasser du Staphylococcus aureus. Le surnageant était recueilli et déposé sur un gel d'électrophorèse.

e- Électrophorèse

Cette technique décrite à la section 2.1.2 de ce chapitre fut utilisée dans des conditions dénaturantes et avec des concentrations d'acrylamide variant de 5 à 12%.

f- Révélation

Une fois le gel d'électrophorèse fixé et séché par des procédures standard la révélation s'effectuait par autoradiographie avec le système KodaK X-OMAT AR (code XAR) et le signal était amplifié à l'aide d'une cassette Kodak X-OMATIC (153-5335) déposé à -80°C pour des périodes variant de 1 journée à 7 jours. Le développement des autoradiogrammes

s'effectuait de façon automatique grâce à l'appareil Kodak M8.

### 2.1.10.-ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE

La mesure de l'anisotropie de fluorescence a été effectuée selon la technique décrite par Kowalska (170)

#### Préparation des plaquettes

Les plaquettes sont isolées du sang périphérique(voir 2.0.1) et sédimentées à 1000 x g pendant 20 minutes. Le culot de plaquettes est lavé 2 fois avec du tampon Tyrode modifié (140 mM NaCl/5 mM KCl/ 10 mM glucose / 15 mM Tris-HCl pH 7.4 )

Le culot plaquettaire final est resuspendu dans 1 ml de PPP (voir 2.0.1) et déposé sur une colonne de Sépharose 2B (1 cm. x 30 cm.) préalablement équilibrée avec le tampon Tyrode modifié. L'eluat plaquettaire recueilli est dilué pour obtenir  $1 \times 10^9$  cellules/ml. Toutes ces étapes sont effectuées dans du matériel en plastique et à la température de la pièce.

#### Marguage des plaquettes

Une solution de  $4 \times 10^{-4}$  M de DPH (1,6-diphényl-1,3,5,hexatriène) dans le diméthylformamide est diluée 100 fois, avec une agitation vigoureuse, dans le tampon Tris-HCl 0.015 M pH 7.4.

Les plaquettes ( $7.5 \times 10^8$ /ml) sont finalement incubées avec le DPH  $1 \times 10^{-6}$  M pour 40 minutes.

La fluorescence du DPH dans les plaquettes est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Perkin Elmer MPF 2A) et les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement 360 et 428 nm. La

polarisation de fluorescence ( $F_p$ ) est calculée selon l'équation suivante :

$$F_p = [I_{vv} - (I_{hv}/I_{hh})I_{vh}] / [I_{vv} + (I_{hv}/I_{hh})I_{vh}] \quad (170)$$

$I_{vv}$  et  $I_{vh}$  étant l'intensité de fluorescence mesurée avec un polariseur vertical et un analyseur installé respectivement de façon verticale ou horizontale.

## CHAPITRE TROISIÈME

### RÉSULTATS

Ce chapitre présente les résultats obtenus lors de la mise en évidence, de la caractérisation et de l'étude de certaines propriétés de l'antigène cellulaires D51 (**AgD<sub>51</sub>**).

#### 3.1.- Purification de l'anticorps monoclonal D<sub>51</sub>

Le premier pas de cette démarche devenait la purification de l'anticorps monoclonal D<sub>51</sub>. (**AcD<sub>51</sub>**) Après quelques essais avec divers supports chromatographiques, la technique de Bruck (171) fut adoptée pour la purification de cet anticorps.. Le liquide d'ascite dialysé et centrifugé est déposé sur une colonne de DEAE Affi Bleu Gel (0.9 cm X 15 cm) préalablement équilibrée avec du tampon Tris-HCl 0.02 M pH 7.2. Un lavage avec environ 60 ml du tampon d'équilibre est nécessaire pour baisser la densité optique de l'éluat à environ 0. Un gradient de NaCl est par la suite appliqué et les résultats obtenus sont illustrés à la figure 19. L'encart représente l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en milieu dénaturant, de l'éluat chromatographique conservé pour les travaux ultérieurs. Les chaînes lourdes (PM 50 kDa) et légères (PM 25 kDa) caractérisant les immunoglobulines de type G sont fortement révélées, mais on détecte aussi un contaminant (PM 90 kDa) en faible quantité. Ce contaminant est probablement de la transferrine dont le poids moléculaire est aussi de 90 kDa.

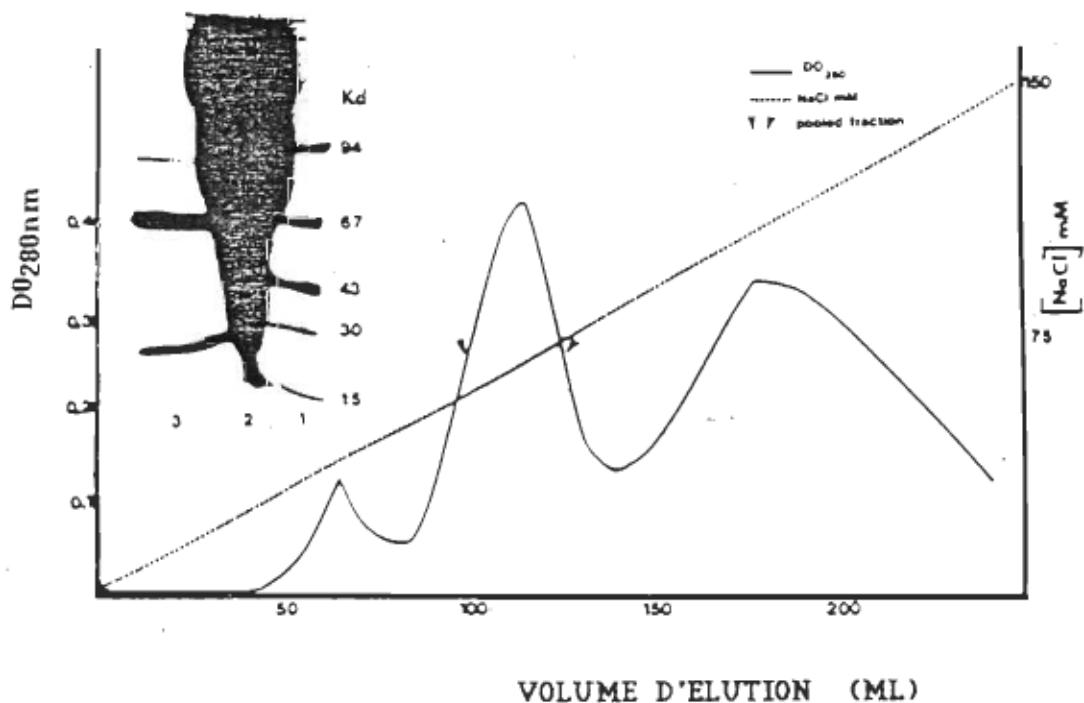


FIGURE 19 PURIFICATION DE L'AcD<sub>51</sub>

L'encart représente l'électrophorégramme (SDS-PAGE) avant et après la purification de l'AcD<sub>51</sub>.

Le puits 1 protéines standards ; 2 liquide d'ascite complet ; 3 AcD<sub>51</sub> purifié (coloration au Bleu de Coomassie).

Cette technique de purification de l'AcD<sub>51</sub> s'avère extrêmement rapide et efficace puisqu'avec 2 ml de liquide d'ascite on obtient environ 35 ml d'une solution d'anticorps D<sub>51</sub> (AcD<sub>51</sub>) purifié ( $D_{280} \approx 0.8$ ). Après cette purification il devient possible de conserver une solution de AcD<sub>51</sub> pendant trois mois à 4°C.

### 3.2- Ultrapurification de l'anticorps monoclonal D<sub>51</sub>

Suite à la purification sur DEAE AFFI Bleu Gel de l'anticorps D<sub>51</sub> (AcD<sub>51</sub>) nous avons voulu vérifier si les premiers résultats encourageants obtenus en agrégation plaquettaire seraient reproductibles après une purification plus poussée de l'AcD<sub>51</sub>. Une colonne PAK 300 (Millipore Waters) installée sur un chromatographe liquide à haute pression (Waters model 510) nous permit une nouvelle purification sur le principe du tamis moléculaire. La figure 20 représente le chromatogramme obtenu après injection de 200  $\mu$ l de l'AcD<sub>51</sub> ( $D.O_{280} = 0.8$ ) préalablement purifié sur DEAE AFFI Bleu Gel.

Avec les fractions contenant le maximum de D.O., et donnant en électrophorèse un profil d'anticorps totalement purifié (absence de bande à 90 kDa) nous avons répété les expériences d'agrégation plaquettaire en tenant compte cette fois-ci de la dilution de notre anticorps inhérente à ce genre de technique. Les résultats obtenus indiquent que cette nouvelle purification ne modifie en rien l'effet de l'AcD<sub>51</sub> sur l'agrégation des plaquettes car les résultats obtenus, ne diffèrent en rien de ceux présentés aux figures 25 et 26 pour l'AcD<sub>51</sub> non purifié par tamis moléculaire.

Compte tenu de ces résultats et pour des raisons pratiques nous avons donc poursuivi l'ensemble de nos travaux en omettant cette deuxième purification.

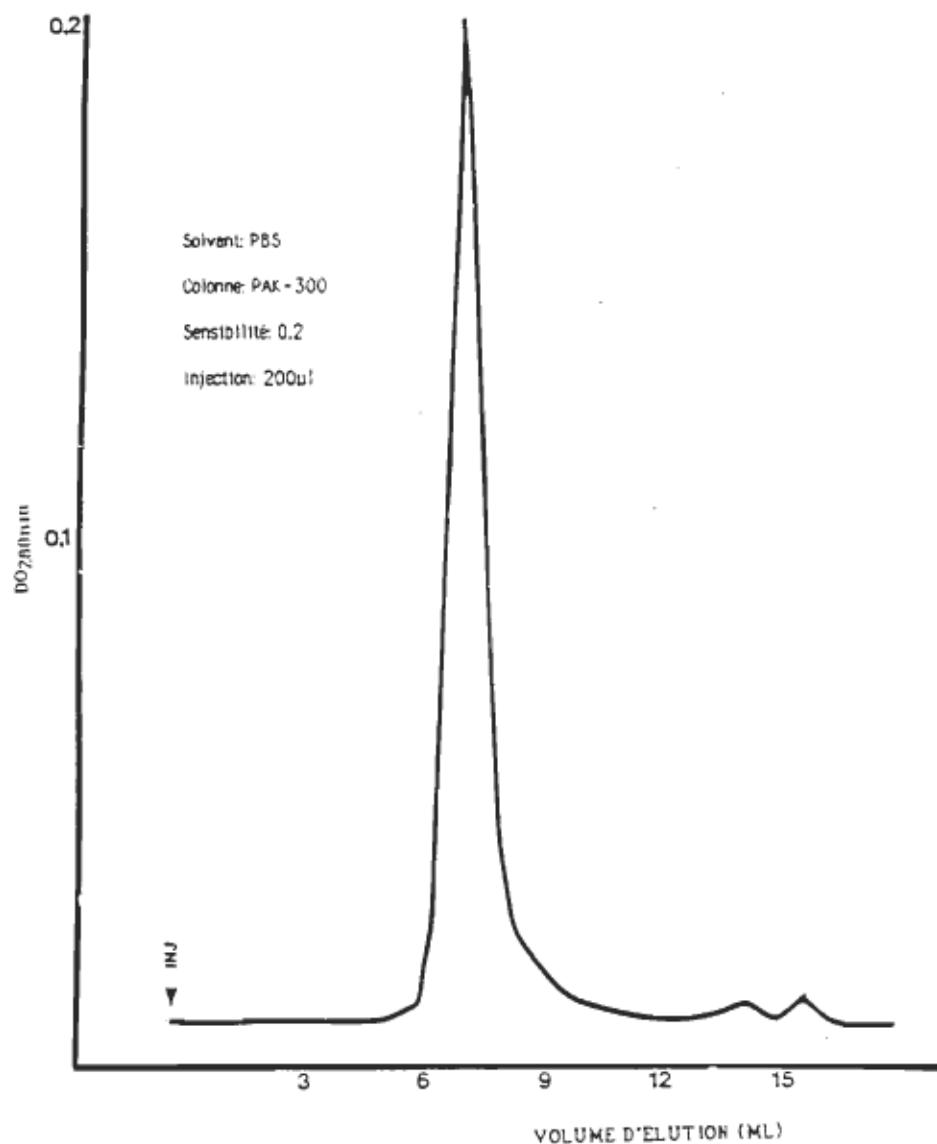


Figure 20 ULTRAPURIFICATION DE L'AcD<sub>51</sub>

### 3.3 Iodination de surface et immunoprecipitation

Pour contourner les difficultés causées par la faible quantité d'antigène à la surface des cellules, nous avons adopté, dès le début des étapes de détection de l'AgD<sub>51</sub>, la technique développée par Phillips et Morrison(168) permettant l'iodination de molécules de la surface cellulaire.

L'utilisation intégrale de cette technique ou de versions modifiées de cette technique d'iodination (voir 2.1.9), n'a malheureusement jamais fourni de résultats positifs quant à l'identité de l'antigène recherché.

En effet, bien que l'iodination de la surface plaquettaire s'avérait un succès et que la lyse de ces plaquettes marquées était complète (fig. 21) jamais les méthodes utilisées pour mettre en évidence l'antigène membranaire n'ont produit de résultats probants.

Bien entendu, ces insuccès ont engendré une remise en question de toutes les étapes reliées tant à la préparation des plaquettes qu'à la purification ou la révélation de l'antigène.

Tel que décrit pour d'autres antigènes de la surface cellulaire (172), le rendement de comptage suite aux diverses étapes d'iodination et d'immunoprecipitation oscille dans les environs de 0.05%. Les résultats obtenus peuvent donc se comparer avantageusement en terme de marquage aux valeurs déjà décrites dans la littérature. Cependant, jamais nous n'avons obtenu d'autoradiogramme mettant en évidence une bande ayant réagi avec l'AcD<sub>51</sub>. Les résultats illustrés (fig.22) sous forme schématique pour des raisons techniques évidentes sont représentatifs de ceux habituellement obtenus lors des très nombreux essais de cette technique.

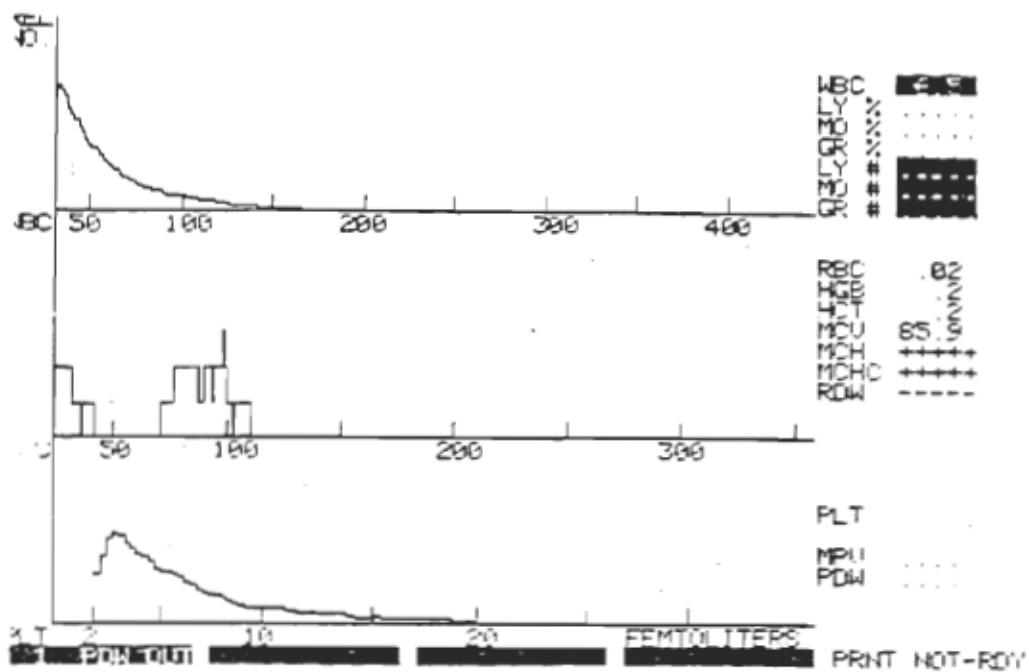


FIGURE 21 NOMOGRAMME DE LA LYSE PLAQUETTAIRE

Un volume de 0.1 ml d'extrait plaquettaire lysée est analysé à l'aide d'un compteur de cellule Coulter (modèle STKR)

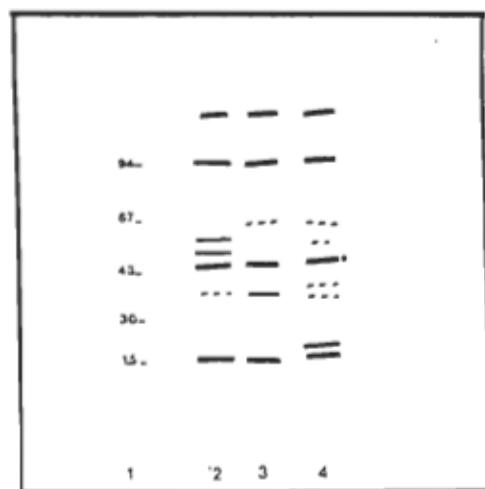


FIGURE 22-SCHEMA D'AUTORADIOGRAMME (immunoprecipitation)

La ligne 1: Standard de poids moléculaire; 2 AcD<sub>51</sub>; 3 Contrôle positif (Ac anti-plaquettaire G4); 4 Contrôle négatif (Ac ST2).

Les problèmes possibles causés par la contamination de l'échantillon plaquettaire par des leucocytes pouvant relarguer certaine protéases non inhibées par notre système d'antiprotéase devaient définitivement être exclus comme l'illustre le monogramme de la figure 21.

Compte tenu l'ensemble de ces résultats et des nombreux essais effectués, nous pensons que l'**AgD<sub>51</sub>** exposé sur les plaquettes ne possède pas ou n'expose pas les acides aminés (tyrosine, phénylalanine) nécessaires à la réaction d'iodination. L'explication qui nous semble plausible pour expliquer ces résultats négatifs serait que les molécules détectées à l'autoradiographie proviendraient de l'adsorption ou du trappage engendré par l'utilisation des systèmes d'anticorps.

### 3.4- Détermination du poids moléculaire de Ag D<sub>51</sub>

Après de multiples essais en utilisant une variété de techniques, il a été finalement possible de déterminer le poids moléculaire de l'**AgD<sub>51</sub>** par Western blot.

La préparation des plaquettes, l'électrophorèse en présence de lauryl sulfate (SDS) et le transfert sur nitrocellulose ont été réalisés sur 3 préparations différentes de plaquettes (matériel et méthodes) et les résultats obtenus furent identiques.

Une bande majeure et unique est présente (figure 23) dans la région de 137 kDa. Les standards proviennent de la croix rouge canadienne et n'ont pu malheureusement être purifiés à cause de la quantité insuffisante de matériel fourni par les services transfusionnels.

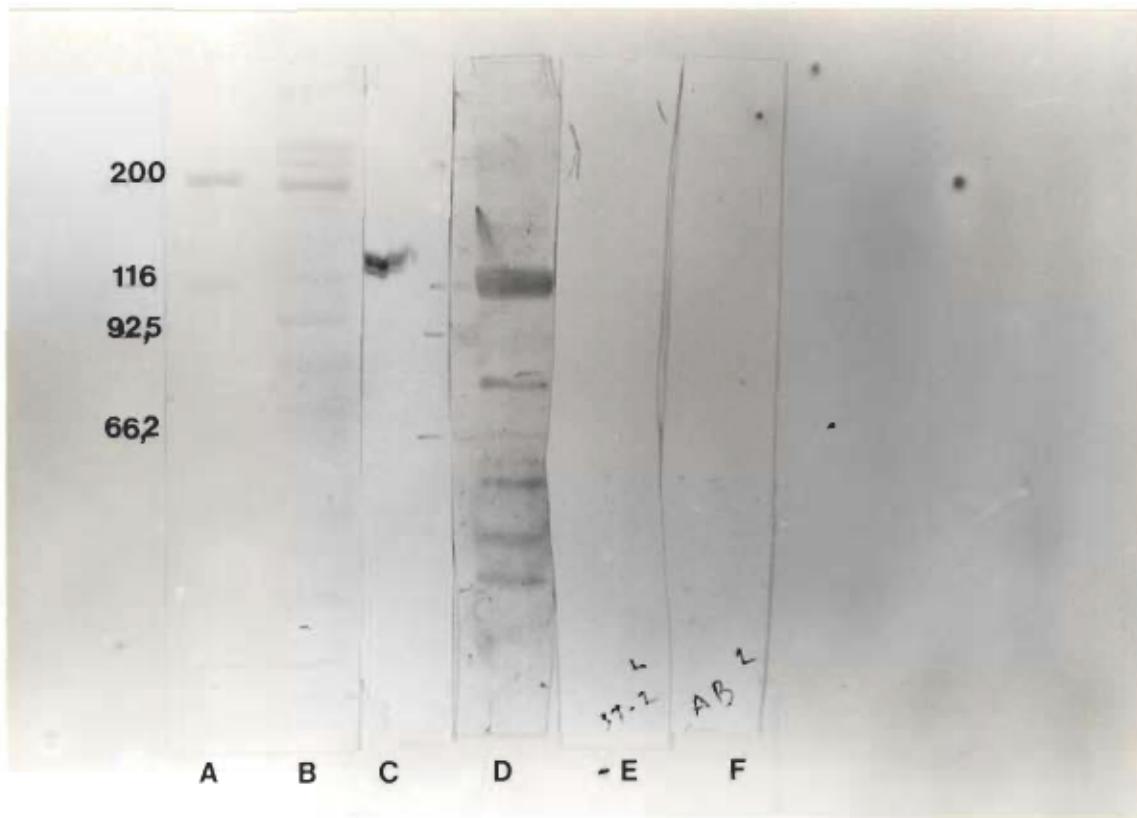


FIGURE 23-WESTERN BLOT DE L'AgD<sub>51</sub>

La ligne A : Standard de poids moléculaire; B : Extrait plaquettaire complet; C : AgD<sub>51</sub>; D : Anticorps positif Bak<sup>a</sup>; E : Anticorps négatif ST-2; F : Sérum décomplémenté AB. A et B sont révélées au Bleu de Coomassie, C à F sont les Western Blot

### 3.5- Fonctions cellulaire

#### a- Fonction granulocytaire

La mise en évidence de l'AgD<sub>51</sub> à distribution quasi-ubiquitaire à la surface des cellules sanguines nous amena à vérifier son implication dans certaines grandes fonctions leucocytaires. Le tableau IX relate les résultats calculés pour la bactéricidie, la phagocytose et indirectement pour le chimiotactisme.

**TABLEAU IX**  
**BACTERICIDIE ET PHAGOCYTOSE**

Sujet	SANS....AcD <sub>51</sub>				AVEC....AcD <sub>51</sub>			
	%bactéricidie		%phagocytose		% bactéricidie		%phagocytose	
	SA	Lyso		SA	Lyso		SA	Lyso
R.G.	83.3	99.3	82.0	84.0	99.0	80.0		
L.T.	85.1	99.4	80.0	87.0	99.1	76.0		

SA: STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Lyso: LYSOSTASPHINE

Ces résultats préliminaires laissent croire que les granulocytes traités avec l'anticorps **AcD<sub>51</sub>** ne présentent aucune modification des différentes fonctions étudiées.

**b- Fonction monocytaire**

Dans le but de vérifier si la fonction macrophagique des monocytes était ou non affectée par le blocage de l'antigène **AgD<sub>51</sub>**, des monocytes incubés avec l'**AcD<sub>51</sub>** ont été mis en présence d'érythrocytes sensibilisés avec de l'anti-D (érythrophagocytose).

Le tableau X démontre que le blocage de l'**AgD51** n'affecte en rien la capacité macrophagique des cellules monocytaires. La figure 24 est un exemple typique (phagocytose des érythrocytes) de champ microscopique obtenu dans cette technique.

TABLEAU X  
FONCTION MONOCYTAIRE

Sujet	SANS....AcD51	AVEC....AcD51
	% de phagocytose	% de phagocytose
R.G.	28	28
A.C.	31	32
L.C.	42	41
J.L.	36	36
P.T.	33	35

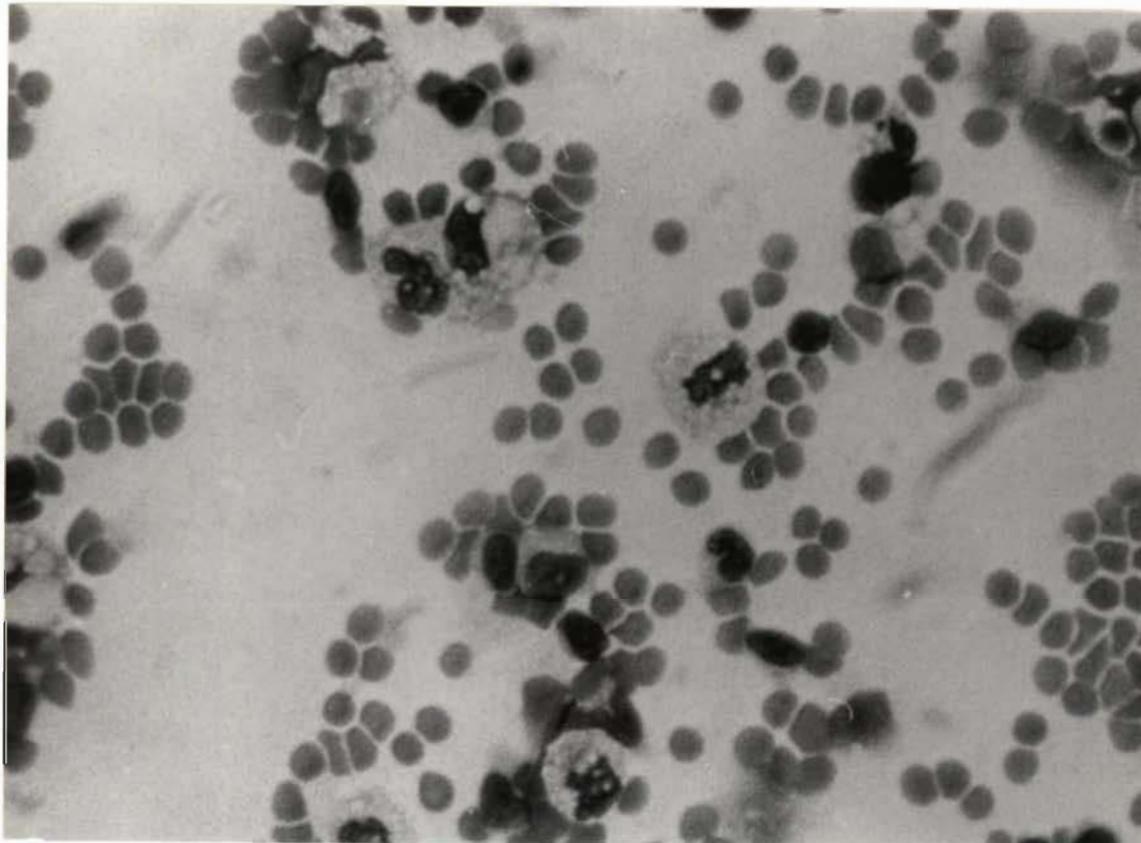


FIGURE 24- ERYTHROPHAGOCYTOSE

c- Réduction du bleu de tétrazolium (NBT)

Pour confirmer la non implication de l'antigène D<sub>51</sub> (AgD<sub>51</sub>) dans les grandes fonctions leucocytaires, un examen plus général tel le NBT fut utilisé.

Le tableau XI illustre encore ici l'absence d'effet du blocage de cet antigène cellulaire par l'**AcD<sub>51</sub>** sur les grandes fonctions leucocytaires

TABLEAU XI  
REDUCTION DU NBT PAR LES GRANULOCYTES

Sujet	SANS....AcD <sub>51</sub>				AVEC....AcD <sub>51</sub>			
	Non-stimulés		Stimulés		Non-stimulés		Stimulés	
	+	-	+	-	+	-	+	-
R.G.	14	86	34	64	15	85	32	68
A.M.	12	78	30	70	13	77	30	70
F.B.	15	85	33	66	12	88	31	69

#### d- Fonction plaquettaire

Contrairement aux différentes fonctions leucocytaires décrite ci-dessus, une fonction essentielle des plaquettes-l'**agrégation**- se trouve fortement influencée par l'**AcD<sub>51</sub>**. L'implication de l'antigène D<sub>51</sub> fut étudiée en fonction de différents agents stimulant l'agrégation plaquettaire.

Les figures 25 et 26 représentent l'effet de l'**AcD<sub>51</sub>** sur l'agrégation plaquettaire induite par les agonistes les plus couramment utilisés en clinique hématologique.

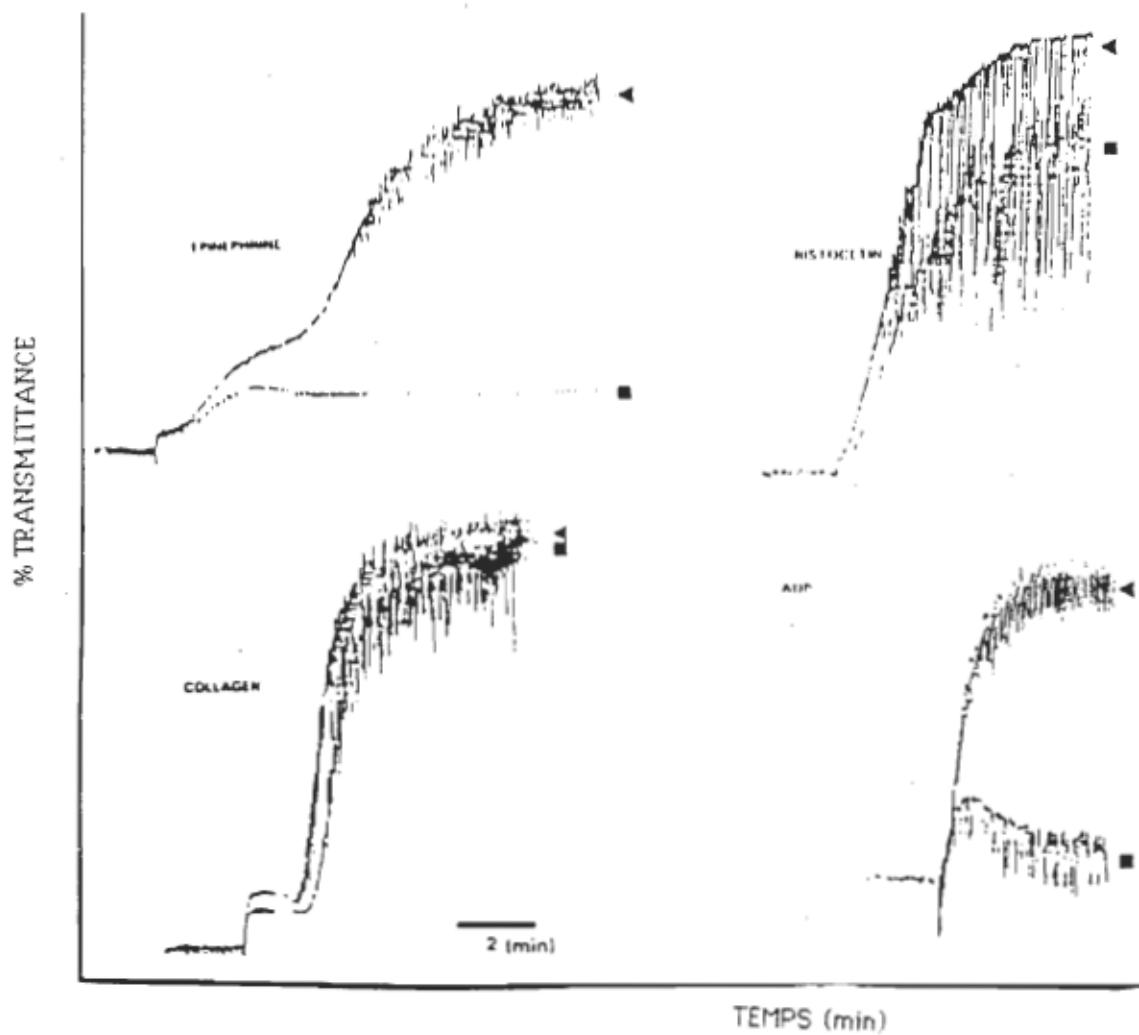
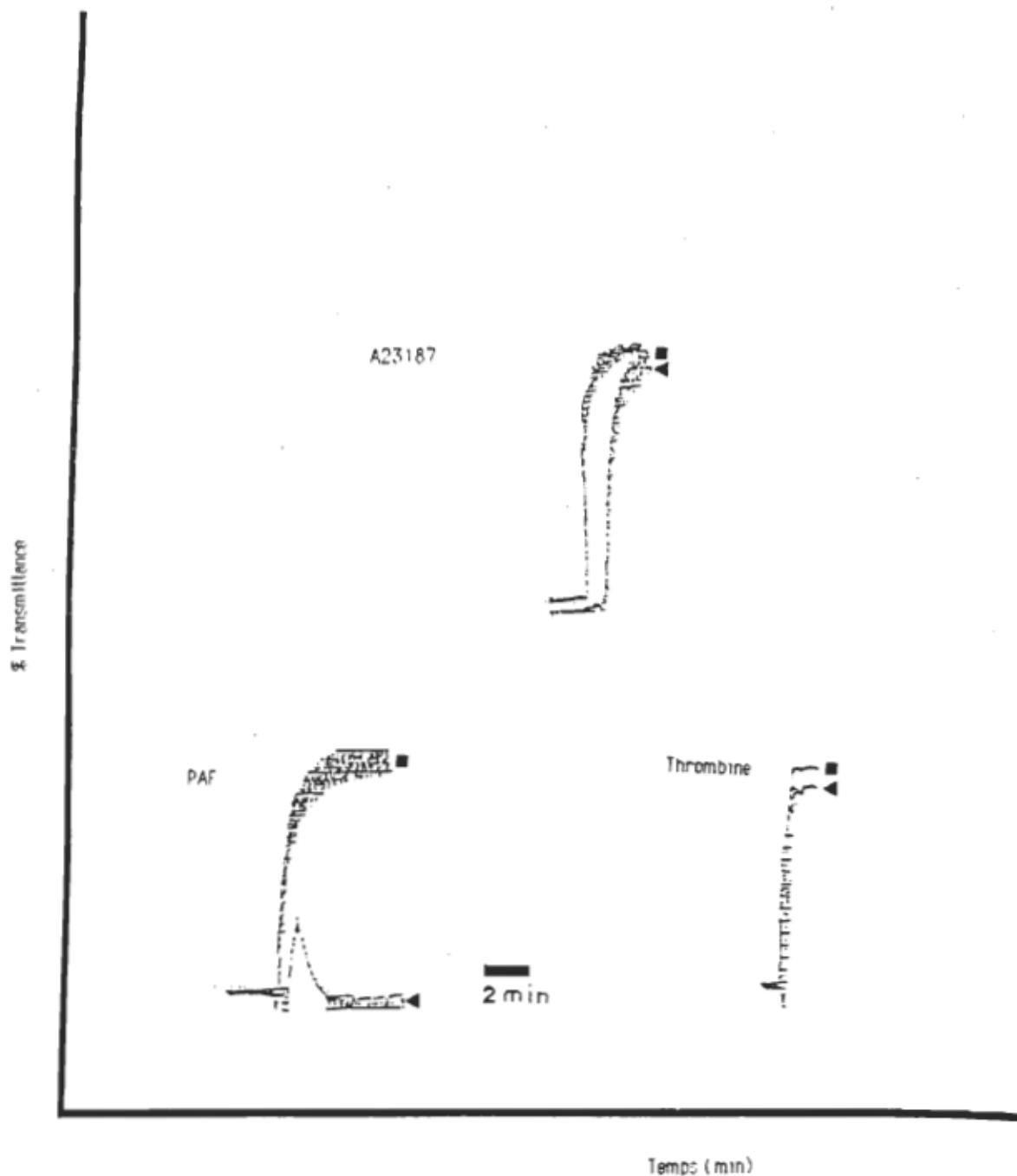


FIGURE 25-AGREGATION PLAQUETTAIRE (1<sup>e</sup> série)

- Présence de AcD51 (30 µg/ml)
- Absence de AcD51

FIGURE 26-AGREGATION PLAQUETTAIRE (2<sup>e</sup> série)

► Présence de AcD<sub>51</sub> (30 µg/ml)

■ Absence de AcD<sub>51</sub>

Ces résultats extrêmement reproductible illustrent que l'AcD<sub>51</sub> modifie l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, le PAF ou l'épinéphrine sans toutefois altérer cette réponse si elle est stimulée par le collagène, la ristocétine, la thrombine ou l'ionophore de calcium A23187.

### 3.6 - Agrégation en fonction de la concentration AcD<sub>51</sub>

Ayant préalablement établi que l'AcD<sub>51</sub> purifié inhibe l'agrégation plaquettaire, des expériences de dépendance de la concentration de cet anticorps démontrent une relation dose effet de cette inhibition. Les figures 27 et 28 illustrent cette relation entre la concentration de l'anticorps et son effet sur l'agrégation plaquettaire et permettent de surcroit de visualiser un effet de l'anticorps beaucoup plus marqué lorsque l'agrégation est stimulée par l'épinéphrine que quand elle l'est par l'ADP.

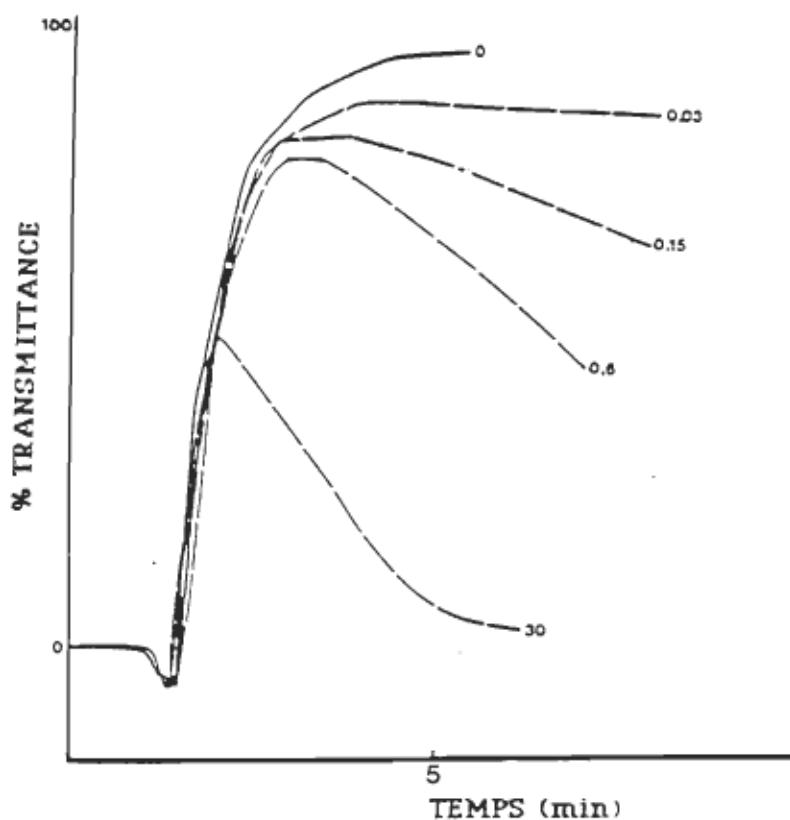


FIGURE 27-AGREGATION ADP 6.6 μM. (AcD<sub>51</sub> μg/ml)

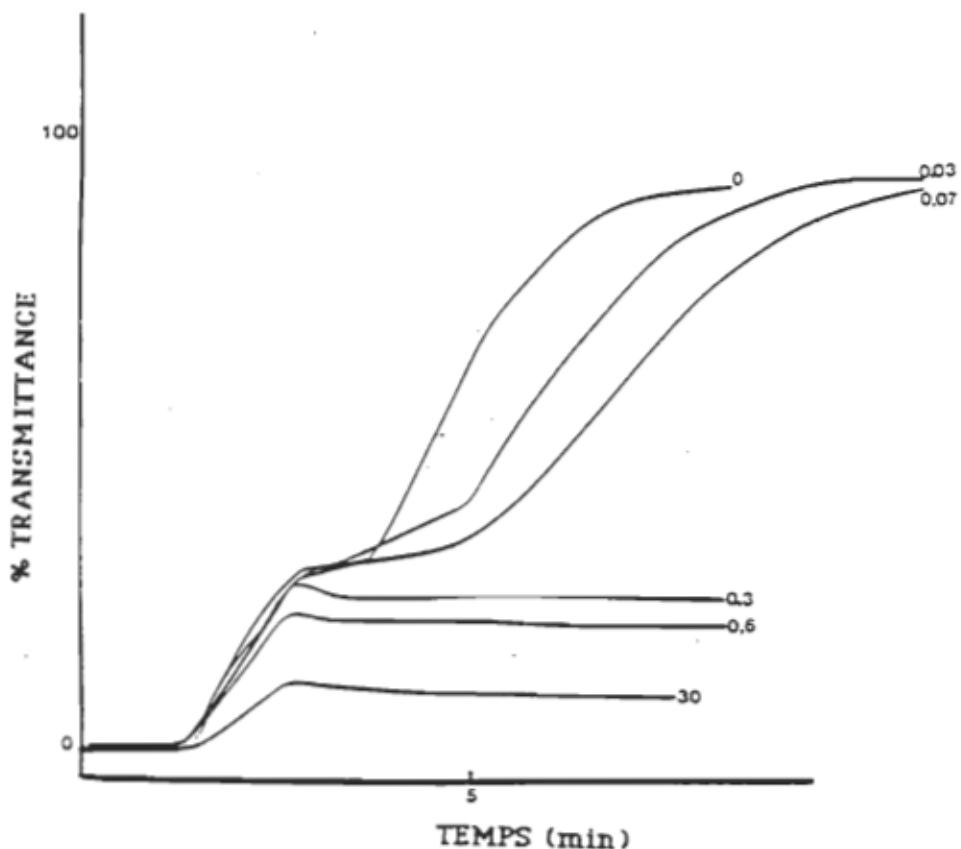


FIGURE 28-AGREGATION épinéphrine 10  $\mu$ M, (AcD<sub>51</sub> en  $\mu$ g/ml)

### 3.7- Choc hypotonique plaquettaire

Il est depuis longtemps (164) confirmé que la réponse des plaquettes au choc hypotonique est une phénomène complexe dépendant de l'intégrité des fonctions biochimiques et enzymatiques de ces mêmes cellules. Le tableau XII affiche la moyenne des valeurs obtenues lors des nombreux essais de cette technique. Des études avec des concentrations variables d'anticorps ont fourni des résultats non reproductibles et contradictoires.

En effet pour les plaquettes d'un même individu ayant subi exactement les mêmes étapes et ayant été bien entendu incubées avec la même quantité d' $\text{AcD}_5$ , la réponse obtenue pouvait varier de positif à négatif. Une réponse positive est une modification de la réponse des plaquettes suite au choc hypotonique Toutefois l'ensemble des contrôles utilisés à l'intérieur de cette méthodologie affichent une excellente reproductibilité, comparable avec la littérature existante sur le sujet (164-173).

Ces données quelque peu décevantes ont été répétées dans un laboratoire externe avec l'obtention du même genre de résultats. Cette confirmation nous permettait d'éliminer toute erreur méthodologique mais nous laissait passablement désarmés quant à une explication possible de ces résultats.

TABLEAU XII  
CHOC HYPOTONIQUE PLAQUETTAIRE

Sujet	SANS.... $\text{AcD}_5$	AVEC.... $\text{AcD}_5$
R.G.	0.0736	0.0525
V.P.	0.0502	0.0878
E.G.	0.0410	0.0460
M.D.	0.0728	0.0774
A.M.	0.0652	0.0549

### 3.8 - Sérologie plaquettaire

Les expériences précédentes démontrent que l'anticorps monoclonal **AcD<sub>51</sub>** reconnaît un épitope localisé sur une molécule de surface impliquée dans le mécanisme de l'agrégation plaquettaire. Certains anticorps naturels développés au cours de différentes pathologies reconnaissent eux aussi des épitopes localisés sur des glycoprotéines de la surface plaquettaire. Ces études sérologiques visent à éliminer les compétitions possibles pour le même épitope entre D<sub>51</sub> et ces anticorps naturels. Les résultats obtenus (Tableau XIII) par une technique d'immunofluorescence et quantifiés selon la méthode utilisée en sérologie indiquent clairement que l'AcD<sub>51</sub> n'interfère avec aucun des anticorps habituellement utilisés en sérologie plaquettaire.

**TABLEAU XIII**  
**SÉROLOGIE PLAQUETTAIRE**

CONTROLE				ANTIGENE RECHERCHÉ	ÉCHANTILLONS INCUBÉS AVEC AcD <sub>51</sub>			
P1	P2	P3	P4		P1	P2	P3	P4
+++	++++	++++	+++	PLA <sup>1</sup>	+++	++++	++++	+++
++	++	+	+++	BaK <sup>a</sup>	++	++	+	+++
-	-	-	-	Yuk <sup>a</sup>	-	-	-	-
++	++	+++	++++	Yuk <sup>b</sup>	++	++	+++	++++
++	++	++	+++	HLApoly	++	++	++	+++
-	-	-	-	Sérum AB décomplémenté	-	-	-	-

En conséquence l'épitope reconnu par l'**AcD<sub>51</sub>** est différent de ceux reconnus par les autres anticorps utilisés en sérologie.

### 3.9- Sérologie et agrégation plaquettaire

Les anticorps antiplaquettaires décrits précédemment n'ont en général aucune capacité pour inhiber l'agrégation des plaquettes induite par l'épinéphrine, au contraire plusieurs d'entre eux favorisent, tout comme la majorité des anticorps connus, le processus d'agrégation des plaquettes. Comme l'**AcD<sub>51</sub>** reconnaît un épitope différent de ceux reconnus par les anticorps antiplaquettaires naturels, il était à ce stade intéressant de vérifier si la capacité d'inhibition de l'agrégation décrite pour l'**AcD<sub>51</sub>** pouvait être abolie par l'utilisation d'un second anticorps promoteur cette fois-ci de l'agrégation. Le tableau XIV illustre clairement que le pouvoir inhibiteur de **AcD<sub>51</sub>** n'a jamais pu être atténué par l'utilisation d'autres anticorps pourtant reconnus comme promoteurs de ce processus agrégatoire.

TABLEAU XIV  
 AGRÉGATION VIA CERTAINS SITES  
 ANTIGÉNIQUES CONNUS

	SANS...AcD <sub>51</sub>	AVEC...AcD <sub>51</sub>
	(%)	(%)
Anti-HLA	90 ± 5	25 ± 3
Anti-BAK <sup>a</sup>	85 ± 4	23 ± 3
Anti-PLA <sup>1</sup>	92 ± 3	20 ± 3
Contrôle	76 ± 4	22 ± 2

- Incubation des plaquettes avec l'anticorps anti-plaquettaire
- Incubation subseqüente de ces plaquettes avec D51
- Mesure de l'agrégation

Il est de plus important de noter que des résultats identiques sont obtenus en inversant l'ordre de l'ajout des anticorps.

### 3.10 - Anisotropie de fluorescence

C.S. Cierniewski (174) rapportait que la fluidité membranaire diminuait au cours du phénomène d'agrégation grâce à la diminution de la mobilité des constituants membranaires à cause de la formation des ponts interplaquettaires.

On pouvait en conséquence s'attendre éventuellement à une augmentation de la fluidité membranaire sous l'effet de l'**AcD<sub>51</sub>**.

L'utilisation de cet anticorps monoclonal (**AcD<sub>51</sub>**) avec des plaquettes lavées (matériel et méthodes) semble en effet augmenter légèrement la fluidité de la membrane plaquettaire (Tableau XV).

**TABLEAU XV**  
**ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE**

AUTEURS	SONDE	Plaquettes	Plaquettes +AcD <sub>51</sub>	Plaquettes +ADP
Kowalska	Diphényl- hexatriène	0,176 ±0.005		0,181 ±0.012
Gareau *	Diphényl- hexatriène	0,183 ±0.006	0,173 ±0.009	0,189 ±0.008

\* Les valeurs moyennes obtenues pour trois (3) expériences

### **3.11-Determination de la classe de l'**AcD<sub>51</sub>****

Par une expérience classique d' immunodiffusion il a été démontré dans le laboratoire du Dr. Sullivan que l'anticorps D<sub>51</sub> (**AcD<sub>51</sub>**) produit chez la souris faisait partie de la famille des IgG et de la sous-classe Ia (IgG Ia) Ce résultat n'est cependant pas présenté dans cette thèse.

## DISCUSSION

Une fois la présence de l'antigène D<sub>51</sub> (AgD<sub>51</sub>) démontrée à la surface de la majorité des cellules sanguines, il devenait intéressant d'identifier cette molécule et de vérifier si elle avait déjà été répertoriée.

À tout début de ce travail de recherche nous convenions que l'anticorps monoclonal D<sub>51</sub> (AcD<sub>51</sub>) présent dans le liquide d'ascite de souris devait être purifié avant son utilisation. Cette étape initiale s'avérait indispensable pour s'assurer que les résultats des études subséquentes dépendaient de l'anticorps monoclonal D<sub>51</sub> (AcD<sub>51</sub>) et non de certains contaminants présents dans le liquide d'ascite.

La technique de purification que nous recherchions devait être efficace, rapide et d'un coût abordable. Après quelques essais infructueux avec des techniques classiques de purification d'anticorps (175) nous avons utilisé un nouveau support chromatographique de la compagnie BIO-RAD (DEAE-AFFI Blue). Cette méthode décrite initialement par Bruck (171) combine les avantages du DEAE et du Cibacron F3GA. Les propriétés mises à profit dans ce type de chromatographie s'étendent de l'échange ionique jusqu'aux effets stériques en passant par des propriétés hydrophobiques et aromatiques. Compte tenu de l'étendue des propriétés de ce système chromatographique, il est utilisé dans des applications fort diversifiées. À l'origine, le Cibacron bleu qui est un colorant polyaromatique sulfonaté était employé comme pseudo-ligand pour la purification d'enzymes requérant le NAD, NADP, l'ATP ou d'autres coenzymes (176). Grâce aux travaux de Thompson (177) et de Wilson (178) il est maintenant connu que ce matériau réagit avec le pli dinucléotidien protéique composé d'environ 120 acides aminés. Suite à une

légère modification de cette technique de Bruck il devenait évident (Fig. 19) que ce support chromatographique offrait toutes les qualités recherchées. En effet, tel que démontré au chapitre 3 (résultats), cette méthode offrait une bonne purification en un temps relativement court (1/2 journée) ajouté à un excellent rendement. Cette purification élimine totalement du milieu chromatographié les protéases et nucléases. L'absence de protéase et les nucléase, toutes deux retenues de façon fort efficace par le Cibacron nous permettait de conserver notre anticorps monoclonal environ 3 mois à 4°C. Cette propriété fort intéressante de ce matériau élimine les cycles gel-dégel qui diminuent l'efficacité des anticorps. Ce processus de purification souleva cependant certaines interrogations dont les réponses nous apparurent, uniquement après le typage et le subtypage par immunodiffusion de notre anticorps purifié. En effet les résultats démontrèrent que **AcD<sub>51</sub>** était un IgG Ia de souris ce qui expliquait du même coup les problèmes rencontrés avec le système de la protéine A. En effet Ey (179) en 1978, démontra que cette classe d'anticorps de souris (IgGI) se liait très faiblement avec la protéine A.

Suite à l'obtention de résultats intéressants quant aux fonctions possibles de **AcD<sub>51</sub>**, nous décidions d'entamer des procédures de purification plus poussées (ultrapurification) pour éliminer le contaminant de 90 kDa (encart, fig. 20). L'électrophorèse nous permit d'évaluer à moins de 0.1% la quantité relative de ce contaminant de 90kDa qui semble être de la transferrine. Il est en effet connu (171) que la molécule de transferrine se comporte de façon similaire aux anticorps de type IgG I sur les colonnes de DEAE-AFFI Bleu. Des méthodes chromatographiques (HPLC) sur tamis moléculaire permirent finalement d'éliminer ce contaminant sans pour autant changer les résultats obtenus en sa présence.

Avec en main un anticorps monoclonal purifié, nous avons réussi par Western Blot à identifier à la surface des plaquettes, l'antigène reconnu par cet **AcD51**. La figure 21 démontre d'abord une grande spécificité de cet anticorps qui détecte uniquement un polypeptide de 137 kDa. En effet, le blot avec **AcD51** ne contient aucune trace d'impureté, contrairement à l'anticorps Bak<sup>a</sup> non purifié qui révèle bien une bande majeure de 116 kDa (GP IIb) mais aussi de nombreuses bandes contaminantes. Les différentes étapes conduisant à l'identification de cette molécule de 137 kDa nous ont permis de constater qu'elle semble fragile à la protéolyse et qui plus est, qu'elle n'est apparemment pas iodinable par des techniques de marquage de surface cellulaire (voir 2.1.9). Ce fait quoique peu courant n'est tout de même pas exceptionnel. Plusieurs glycoprotéines ont déjà été décrites (180) comme étant des substances réagissant très faiblement ou pas du tout à ce type de marquage. L'empêchement stérique ou l'absence d'acides aminés iodinables à la face cytoplasmique de la molécule sont les raisons mises de l'avant le plus fréquemment pour expliquer ce genre de résultats. D'autre part, nous devons aussi envisager la possibilité que les différentes étapes nécessaires à l'iodination de la surface plaquettaire permettent et/ou placent la molécule antigénique dans un environnement propice à sa protéolyse, ce qui pourrait conséquemment induire une perte de l'épitope et expliquer les résultats négatifs obtenus lors des nombreuses tentatives d'immunoprécipitations.

D'un point de vue plus fonctionnel et tel que décrit au chapitre précédent, l'**AcD51** n'altère aucune des fonctions leucocytaires étudiées (chimiotactisme, phagocytose, bactéricidie et érythrophagocytose monocyttaire). Par contre, ce même anticorps inhibe le processus d'agrégation des plaquettes lorsque l'agrégation est induite par certains agents agrégeants.

En effet, quoique l'**AcD<sub>51</sub>** n'interfère pas dans l'agrégation plaquettaire induite par le collagène, la ristocétine, la thrombine ou l'ionophore de calcium A23187, il modifie, et ce de façon draconienne, la réponse des plaquettes lorsqu'elles sont stimulées par l'ADP, l'épinéphrine ou le PAF (platelet activating factor). *In vitro*, **AcD<sub>51</sub>**, dans ces trois cas, permet la formation de l'onde d'agrégation primaire mais diminue ou abolit totalement l'onde d'agrégation secondaire induisant même une désagrégation totale lorsque l'ADP ou le PAF sont utilisés comme agents agrégeants. L'effet de l'**AcD<sub>51</sub>** sur la deuxième onde d'agrégation est plus marqué ( $\approx 20x$ ) lors d'utilisation d'épinéphrine, que lors de l'utilisation de l'ADP ce qui nous permet de croire que l'**AcD<sub>51</sub>** affecte de façon prépondérante la portion du processus agrégatoire normalement supportée par la sécrétion plaquettaire. La figure 25 illustre de plus que l'emploi d'une concentration élevée d'**AcD<sub>51</sub>** affecte même la cinétique de l'onde primaire si l'épinéphrine est utilisée comme agent stimulant. Ces résultats nous portent à conclure que **AcD<sub>51</sub>**, à forte concentration, affecte les  $\alpha 2$ -adrénorécepteurs plaquettaires, puisque ces derniers sont reconnus comme étant responsables de l'onde primaire d'agrégation à l'épinéphrine (122). Toutefois, il est improbable, à la lueur de nos résultats globaux, que l'**AcD<sub>51</sub>** agisse directement sur les  $\alpha 2$ -adrénorécepteurs puisque le poids moléculaire de ces récepteurs est de 64 kDa (109). Une action indirecte sur une molécule voisine des récepteurs adrénnergiques ou sur une portion de l'hétérotrimère (protéine-G) agissant comme transducteurs membranaires pour les récepteurs adrénnergiques serait à notre avis plus facilement conciliable avec nos résultats.

Il a déjà été démontré qu'une perturbation de la membrane plaquettaire occasionnée par des substances telles que les anesthésiants ou certains alcools (181), ou encore une modification de l'action hydrolytique de la sous-unité  $\alpha$ s de la protéine G réalisée par la toxine de *Bordetella pertussis* (182), sont des mécanismes d'action indirects inhibant l'agrégation plaquettaire induite par l'épinéphrine.

Nos études d'anisotropie de fluorescence, quoique sommaires tendent aussi à orienter nos conclusions vers ce genre de mécanisme d'action indirecte. Les résultats d'anisotropie de fluorescence obtenus (tableau XV) relèvent des différences faibles pour les différents agents utilisés. Ces résultats (valeurs absolues) sont du même ordre de grandeur et présentent le même incrément que ceux précédemment décrits par Kowalska (170), Kitagawa (183) ou Steiner (184) dans des conditions expérimentales similaires.

Ces résultats permettent de constater que la liaison de l'**AcD<sub>51</sub>** à son antigène diminue la polarisation de fluorescence indiquant du même coup une augmentation de la fluidité membranaire (174). Cette constatation ajoutée aux résultats d'agrégation décrits dans ce travail suggère qu'une inhibition de l'agrégation plaquettaire serait favorisée par une diminution de la rigidité membranaire de cette cellule. Ce genre d'hypothèse a déjà été proposé pour d'autres systèmes cellulaires tels les membranes d'érythrocytes (185), où un changement de la fluidité membranaire serait à l'origine d'une modification de la vitesse de transport de différents ions et de l'activité de certains enzymes.

Selon Noyi (186) un changement dans la fluidité membranaire pourrait aussi affecter certaines fonctions du cytosquelette de par les interactions de cette dernière avec la bicoche lipidique.

Cependant, nous pensons que l'utilisation d'une batterie de sondes fluorescentes (fluorescamine, ANS, 3-PM, tryptophane) se localisant dans différentes régions membranaire, nous fournirait un ensemble de données permettant de poser une hypothèse plus attrayante quant à l'action de l'**AcD<sub>51</sub>** sur la membrane plaquettaire.

Les études d'immunobiologie et de sérologie plaquettaire n'ont fait que mettre en relief le l'idée que l'**AcD<sub>51</sub>** ne se lie, ni n'interfère avec aucun des épitopes majeurs déjà répertoriés à la surface des plaquettes. Cependant, il faut noter que les anticorps anti-plaquettaire qui correspondent aux épitopes connus sont aussi pour la plupart des substances proagrégantes et nos résultats ont démontré (tableau XII) que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par **AcD<sub>51</sub>** ne pouvait être levée par l'utilisation de ces anticorps proagrégants. C'est donc dire que l'**AcD<sub>51</sub>** inhibe fortement une des voies principales du mécanisme de l'agrégation plaquettaire (fig.16) et que l'inhibition de cette voie (**causée par l'AcD<sub>51</sub>**) ne peut être supprimée par des anticorps proagrégants se liant à d'autres récepteurs localisés sur la surface plaquettaire.

Suite à ces résultats et considérations, peut-on dire que l'**AgD<sub>51</sub>** n'est contenu dans aucun des répertoires antigéniques actuels? L'idée de découvrir un nouvel antigène et d'expliquer les mécanismes dans lequel il est impliqué est fort alléchante. Toutefois, il est indispensable de mentionner que des protéines de poids moléculaire d'environ 137 kDa ont

déjà été répertoriés à la surface de la plaquette.

Parmi celles-ci la GPIc (138 kDa), une protéine relativement peu abondante de la surface plaquettaire (187) qui elle aussi colore peu au Bleu de Coomassie et qui forme un complexe avec la GPIIa (188) pour générer le récepteur de la fibronectine. Aucune donnée n'est disponible sur l'implication potentielle de la GPIc dans le mécanisme de l'agrégation mais, Piotrowicz (189) dans un travail récent, marquait à  $I^{125}$  la GPIc par des méthodes conventionnelles.

Rappelons pour fin de comparaison que nous n'avons jamais été en mesure de réussir ce marquage au niveau de **AgD<sub>51</sub>** plaquettaire. Il est de plus intéressant de noter qu'aujourd'hui la GPIc est associée à la chaîne  $\alpha$  du système VLA (very late activation antigen) (190) et qu'encore aucun lien avec le mécanisme de l'agrégation plaquettaire n'est connu.

La GP IIb $\alpha$  est une autre glycoprotéine dont le poids moléculaire (132 kDa) est similaire à celui de **AgD<sub>51</sub>**. Toutefois, dans ce cas précis, il est facile sur la base des réponses obtenues lors de l'utilisation de leurs anticorps respectifs, d'éliminer toute similitude d'identité entre ces deux glycoprotéines. En effet, l'**AcD<sub>51</sub>** inhibe seulement l'agrégation à l'ADP, à l'épinéphrine et au PAF, tandis que l'anticorps PBM 6.4 inhibe l'agrégation plaquettaire induite par **tous** les agonistes puisqu'il inhibe la liaison du fibrinogène à la surface plaquettaire.

Un dernier candidat potentiel serait le récepteur de l'ADP (132). Dans ce cas le poids moléculaire semble quelque peu divergent (100 kDa) mais les propriétés forts semblables. Le bloquage de ce récepteur induit une réponse fort similaire à celle observée avec l'**AcD<sub>51</sub>**, c'est-à-dire une inhibition de l'agrégation à l'ADP, et un effet sur la deuxième onde

d'agrégation à l'épinéphrine.

Pour ce qui est du PAF, aucun résultat n'a été rapporté pour ce système. Les premières démonstrations du récepteur de l'ADP par Colman (132), à l'aide d'analogues de structure et de coprécipitation, étaient fort peu convaincantes et laissaient encore une bonne place pour la spéculations quant au poids moléculaire de ce récepteur (voir 1.1.3.4). Toutefois, une publication du même auteur en avril de cette année (191), démontre de façon fort éloquente par des évidences immunologiques, structurales et fonctionnelles, que le récepteur de l'ADP a un poids moléculaire de 100 kDa et qui plus est, que c'est une protéine distincte de GP IIIa (100 kDa). La seule controverse demeurant face au récepteur de l'ADP ou "Aggregin" tel que nommé par Colman (191) est sa participation, active ou non, dans l'agrégation plaquettaire induite par le collagène.

Les résultats obtenus dans ce travail ajoutés aux éléments déjà connus, nous permettent de formuler une hypothèse sur le mécanisme par lequel l'**AcD<sub>51</sub>** serait impliqué dans l'agrégation plaquettaire.

**Considérant que** : l'interrelation de l'épinéphrine et de l'ADP dans le mécanisme de l'agrégation plaquettaire est connue depuis les travaux de Mehta (192), qui démontre que la première onde observée lors de l'agrégation induite par l'épinéphrine est dépendante des  $\alpha_2$ -adrénorécepteurs plaquettaires tandis que la deuxième onde est tributaire de la sécrétion de l'ADP plaquettaire endogène.

: l'**AcD<sub>51</sub>** à forte concentration (30  $\mu$ g/ml) affecte la première onde d'agrégation induite par l'épinéphrine et qu'une telle action laisse présager que l'**AcD<sub>51</sub>** à une concentration supérieure pourrait inhiber la première onde d'agrégation dépendante des  $\alpha_2$ -adrénorécepteurs.

: l'action des  $\alpha_2$ -adrénorécepteurs est dirigée vers le système de l'adénylate cyclase par l'intermédiaire de la protéine G<sub>j</sub> (108).

: l'action du PAF s'exercerait aussi sur l'adénylate cyclase (193) et qu'elle pourrait aussi être dépendante du système de la protéine G (194).

: l'action de l'ADP semble s'exercer sur deux sites plaquettaires distincts (adénylate cyclase, et agregin).

Nous pensons, compte tenu de ces faits, que l'AcD<sub>51</sub> suite à sa liaison avec son récepteur (137 kDa) sur la membrane plaquettaire, induirait un changement conformationnel de ce dernier avec, comme conséquence, une augmentation de la fluidité membranaire locale. Cette modification de la fluidité empêcherait l'interaction du couple protéine(Gi)-adénylate-cyclase et pourrait aussi expliquer l'effet sur le deuxième récepteur de l'ADP en autant que l'on admette une proximité topologique du récepteur de l'ADP et du récepteur de l'AcD<sub>51</sub>.

Avec l'espoir d'approfondir ces résultats nous avons récemment entrepris des démarches auprès de certains chercheurs possédant des anticorps monoclonaux contre des protéines de poids moléculaires similaires à l'AgD<sub>51</sub>. L'obtention de ces différents anticorps monoclonaux permettrait des études comparatives avec l'AcD<sub>51</sub>, et éluciderait possiblement le problème d'identité soulevé dans ce travail.

### CONCLUSION

Sullivan et collaborateurs écrivaient en 1985 (3) au sujet des **AgD<sub>51</sub>** et **D<sub>46</sub>** : "These cellular components are unknown, one can only speculate on an explanation for the wider range of their expression on cell lines than on cells fresh from normal tissues".

Trois années plus tard cette thèse apporte bon nombre d'éclaircissements sur l'identité, la localisation et l'implication de l'**AgD<sub>51</sub>** dans le mécanisme de l'agrégation plaquettaire et ouvre du même coup la voie à de nombreux travaux de recherche.

Le travail encore à accomplir me semble relativement peu abondant (Western blot et électrophorèse à deux dimensions) pour connaître si l'épitope reconnu par l'**AcD<sub>51</sub>** est porté par la même molécule sur les différentes cellules sanguines.

De plus, la préparation d'extraits de lymphocyte B et T ainsi que des cellules NK, nous révèlera peut-être si l'**AgD<sub>51</sub>** est présent et simplement masqué sur ces cellules, ce qui deviendrait intéressant d'un point de vue diagnostique.

RÉFÉRENCES

- 1- Zmijewski, C.M., Fletcher J.L. (1972). Immunohematology New-York 1972 2nd ed. eredith Corporation ed.
- 2- Genetet, B.,Mannoni,P. (1978) La Transfusion. Flammarion Médecine Sciences ed.
- 3- Fitz-Gibbon, L., Shematek, G. et Sullivan, A.K. (1985). Antigens differentially expressed on surface and cytoplasmic structures of human myeloid cells. Leuk. Res., 9, 123-134.
- 4- Harker L.A. Finch,C.A. (1969). Thrombokinetics in man. J. Clin. Invest., 48, 963-974.
- 5- Singer, S.J. et Nicholson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 175, 720-731.
- 6- Shick, P.K., Kurica, K.B. et Chacko, G.K. (1976). Location of phosphatidyl-éthanolamine and phosphatidylserine in human platelet plasma membrane. J. Clin. Invest., 57, 1221-1233.
- 7- Rodman, N.F. (1967). Platelet ultrastructure, in: Platelets their role in haemostasis and thrombosis. Suppl. Thromb. Diath. Haemorrh. Stuttgart: Schauttaeur Verlag, 9.
- 8- Bounameaux, Y. (1961). L'accolement des plaquettes aux fibres sous-endothéliales. Throm. Diath. Haemorrh., 6, 504.
- 9- Dastugue, G., Bastide, P. et Plat, M.P. (1969). Les enzymes plaquettaires. Exposés annuels de biochimie médicale, Masson, 29, 227.
- 10 Behnke, O. (1970). The morphology of blood platelet membrane systems, Ser. Haemat., 3, 3-16.
- 10a Jobin,F. (1964). Le système hématopoïétique normal. Notes de cours. Université Laval Québec, p 100.

- 11 Hoving, T. (1968). The ultrastructure of blood platelets in normal and abnormal states. Ser. Haemat., 1, 3-64.
- 12- Behnke, O. (1967). Electron microscopic observations on the membrane systems of the rat blood platelet. Anat. Rec., 158, 121-134.
- 13- Larrieu, M.J., Marder, V.J. et Inceman, S. (1965). Effect of fibrinogen degradation products on platelet and coagulation, in Intern. Comm. on Haemostasis and Thromboses. Diffuse Intravascular Clotting. Stuttgart: Schattauer-Verlag Edit.
- 14- Mosesson, M.W., Unfleet, R. (1970). The cold insoluble globulin of human plasma: Purification, primary characterization, and relationship to fibrinogen and other cold insoluble fraction components. J. Biol. Chem., 245, 5728-5736.
- 15- Degos, L., Kahn, A. (1978) Adhésion cellulaire. Médecine/sciences, 6, 314-316.
- 16- Kirby, E.D., Mills, D.C.B. (1987). Methods for studying the von Willebrand factor-Platelet interaction. Modern Methods in Pharmacol., 4, 65-68.
- 17- Pytela, R., Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E. (1985) A125/115 kD cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginin-glycin-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 5766-5770.
- 18- Phillips, D.R. et Poh-Agin, P. (1977). Platelet plasma membrane glycoproteins: evidence for the presence of non-equivalent disulfide bonds using reduced-non-reduced two-dimensional gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 252, 2121-2126.
- 19- Jamieson, G.A. (1988) Properties and functions of platelet membrane glycoproteins GPIb and GPIV. Curr. Stud. Hematol. Blood Transf., 54, 31-43.
- 20- Okumura, T. et Jamieson, G.A. (1976). Platelet glycopcalicin. I- Orientation of glycoproteins of the human platelet surface. J. Biol. Chem., 251, 5944-5949.
- 21- Okumura, T., Lombart, C. et Jamieson, G.A. (1976). Platelet glycopcalicin. II- Purification and characterization. J. Biol. Chem., 251, 5950-5955.

- 22- Okumura, T., Jamieson, G.A. (1976). Platelet glycopcalicin: a single receptor for platelet aggregation induced by thrombin or ristocetin. Thromb. Res., 8, 701-706.
- 23- Montgomery, R.R., Kunicki, T.J., Tave C., Pidard, D. et Corcoran, M. (1983). Diagnosis of Bernard-Soulier syndrome and Glanzmann's thrombasthenia with a monoclonal assay on whole blood. J. Clin. Invest., 71, 385-389.
- 24- Nurden, A.T. et Caen, J.P. (1975). Specific roles for platelets surface glycoproteins in platelet function. Nature, 255, 720-722.
- 25- Ruan, C., Tobelem, G. et Caen, J.P. (1981). Liaison du facteur VIII/ Willebrand aux plaquettes de syndrome de Bernard-Soulier et de thrombasthénie de Glanzmann. Nouv. Rev. Fr. Hématol., 23, 89.
- 26- Jamieson, G.A., et coll. (1979) Platelet membrane glycoproteins in thrombasthenia, Bernard-Soulier syndrome, and storage pool disease. J. Lab. Clin. Med., 93, 652-660.
- 27- Kunicki, T.J., Montgomery, R.R., et Schullek, J. (1985). Cleavage of human von Willebrand factor by platelet calcium-activated protease. Blood, 65, 352-356.
- 28- Kunicki, T.J., Jonhson, M.M. et Asier, R.H. (1978). Absence of the platelet receptor for drug dependent antibodies in the Bernard-Soulier syndrome. J. Clin. Invest., 62, 716-719.
- 29- Berndt, M.C., Gregory, C., Chong, B.H., Zola, H. et Castaldi, P.A. (1983). Blood, 62, 800-807.
- 30- Berndt, M.C., Gregory, C., Kabral, A., Zola, H., Fournier, D. et Castaldi, P.A. (1985). Purification and preliminary characterisation of the glycoprotein Ib complex in the human platelet membrane. Eur. J. Biochem., 151, 637-649.
- 31- Fox, J.E.B. (1985). Linkage of a membrane skeleton to integral membrane glycoproteins in human platelet. J. Clin. Invest., 76, 1673-1683.

- 32- Fox, J.E.B. (1985). Identification of actin-binding protein as the protein linking the membrane skeleton to glycoproteins on platelet plasma membranes. J.Biol.Chem., 280, 11970-11977.
- 33- Hoyer, L.W. (1981). The factor VIII complex : Structure and function. Blood, 58, 1-13.
- 34- Bloom A.L., Giddings, J.C. et Wilks, C.J. (1973). Factor VIII on the vascular intima: Possible importance in haemostasis and thrombosis. Nature, 241, 217-219
- 35- Nachman, R.L., Levine, R., Jaffe, E.A. (1977). Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea-pig megakaryocytes. J.Clin.Invest., 60, 914-921.
- 36- Ruggeri, Z.M. et coll. (1982). Aberrant multimeric structure of von Willebrand factor in a new variant of von Willebrand's disease (type IIc). J.Clin.Invest., 70, 1124-1127.
- 37- Bockenstedt, P., Greenberg, J.M., et Handin, R.I. (1986) Structural basis of von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib and collagen. J.Clin.Invest., 77, 743-749.
- 38- Ruggeri, Z.M. et coll. (1983). Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor. J.Clin.Invest., 72, 1-12.
- 39- Vehar, G.A. et Davie, E.W. (1980). Preparation and properties of bovine factor VIII (Antihemophilic factor). Biochemistry, 19, 401-410.
- 40- Fulcher, C.A., Zimmerman, T.S. (1982). Characterization of the human factor VIII procoagulant protein with a heterologous precipitating antibody. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 79, 1648-1652.
- 41- Ruggeri, Z.M. et coll. (1982). Multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor following administration of DDAVP: Implications for pathophysiology and therapy of von Willebrand's disease subtypes. Blood, 59, 1272-1278.
- 42- Shuai, I. et coll. (1977). Heterogeneity of von Willebrand's disease study of 40 Iranian cases. Br.J.Hematol., 37, 67-83.

- 43- Howard, M.A. et Firkin, B.G. (1971). Ristocetin - A new tool in the investigation of platelet aggregation. Thromb. Diath. Haemorrh., 26, 362-369.
- 44- Coller, B.S. et Gralnick, H.R. (1977). Studies on the mechanism of ristocetin-induced platelet agglutination. Effects of structural modification of ristocetin and vancomycin. J. Clin. Invest., 60, 302-312.
- 45- Danber, J.G., Roberts, J.C. (1968). An electrical double layer theory for platelet adhesiveness and initiation of intravascular thrombosis. Thromb. Diath. Haemorrh., 19, 451-458.
- 46- Greenberg, J. et coll. (1975). Effects on platelet function of removal of platelet sialic acid by neuraminidase. Lab. Invest., 32, 476-484.
- 47- Kirby, E. et Mills, D.C.B. (1975). The interaction of bovine factor VIII with human platelets. J. Clin. Invest., 56, 491-502.
- 48- Coller, B.S. (1980) Polybrene-induced platelet agglutination and reduction in electrophoretic mobility: Enhancement by von Willebrand factor and inhibition by vancomycin. Blood, 55, 276-281.
- 49- Rosborough, T.K. et Swaim, W.R. (1978). Abnormal polybrene-induced platelet agglutination in von Willebrand's disease. Thromb. Res., 12, 937-942.
- 50- De Marco, L. et Shapiro S.S. (1981). Properties of human asialo-factor VIII. A ristocetin-independent platelet aggregating agent. J. Clin. Invest., 68, 321-328.
- 51- Morisato, D.K. et Gralnick, H.R. (1980). Selective binding of the factor VIII / von Willebrand factor protein to human platelets. Blood, 55, 9-15.
- 52- Steiner, M. (1987). Platelet surface glycosaminoglycans are an effective shield for distinct platelet receptors. Biochim. Biophys. ACTA., 931, 286-293.
- 53- Van Der Rest, M. (1987). Biologie du collagène et maladies héréditaires de la matrice cellulaire. Médecine/Science, 3, 411-420.

- 53a Colman, R.W. et Smith, J.B. (1987). Methods for studying platelets and Megakaryocytes. Alan R Liss, Inc. N-Y, p 66.
- 54- Mayne, R. et Burgeson, R.E. (1987). Structure and function of collagen. Orlando (FL): Academic Press.
- 54a Dickerson, R.E. et Geis, I. (1969). The structure and action of proteins. W.A. Benjamin, p 41
- 55- Van Der Rest, M. (1982). Collagen structure and biosynthesis, in R.L. Cruess. (Ed.) The Musculoskeletal System (pp. 65-79). New-York: Churchill Livingstone.
- 56- Legrand, Y., Rodriguez-Zelballos, M., Kartalis, G., Fauvel, F. et Caen, J.P. (1978). Absorption of factor VIII antigen-activity complex by collagen. Thromb. Res., 13, 909-911.
- 57- Nyman, D. (1977). Interaction of collagen with the Factor VIII antigen activity - von Willebrand factor complex. Thromb. Res., 11, 433-438.
- 58- Gordon, J.L. (1979). Mechanisms of platelet-collagen interaction. Nature, 278, 5699, 13.
- 59- Jaffe, E.A., Hoyer, L.W. et Nachman, R.L. (1973). Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. J. Clin. Invest., 52, 2754-2764.
- 60- Nachman, R.L. et Jaffe, E.A. (1975). Subcellular platelet factor VIII antigen and von Willebrand factor. J. Exp. Med., 142, 1101-1113.
- 61- Baumgartner H.R. (1973). The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition and formation of mural thrombi. Microvasc. Res., 5, 167-179.
- 62- Sakariassen, K.S., Bolbuis, P.A. et Sixma, J.J. (1979). Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-von Willebrand factor bound to the subendothelium. Nature, 279, 636-638.
- 63- Nyman, D. (1980). Von Willebrand factor dependent platelet aggregation and absorption of Factor VIII related antigen by collagen. Thromb. Res., 17, 209-214.

- 64- Legrand, Y., Fauvel, F., Gutman, N., Muh, J.P., Tobelem, G., Souchan, H., Karniguiian, A. et Caen, J.P. (1978). Microfibrils (MF) platelets interaction: requirement of von Willebrand factor. Thromb. Res., 19, 737-39.
- 65- Santoso, S.A. (1981). Absorption of von Willebrand factor/ factor VIII by the genetically distinct interstitial collagens. Thromb. Res., 21, 688-693.
- 66- Caen, J.P., Nurden, A.T., Jeanneau, C., Michel, H., Tobelem, G. (1976). Bernard-Soulier syndrome: a new platelet glycoprotein abnormality - its relationship with platelet adhesion to subendothelium and with the factor VIII / von Willebrand protein. J. Lab. Clin. Med., 87, 586-96.
- 67- Jenkins, C.S.P., Phillips, D.R., Clementson, K.J., Meyer, D., Larrieu, M.J. et Luscher, E.F. (1976). Platelet membrane glycoproteins implicated in ristocetin-induced aggregation. Studies on the proteins of platelets from patients with Bernard-Soulier syndrome and von Willebrand's disease. J. Clin. Invest., 57, 112-24.
- 68- Weiss, H.J., et coll. (1974) Decreased adhesion of giant (Bernard-Soulier) platelets to subendothelium. Am. J. Med., 57, 920-925.
- 69- White, J.G. (1984) The secretory process in platelets. In Cantin M.(ed) : The cell biology of the secretory process. S. Karger New-York, 541.
- 70- White, J.G. (1983) The morphology of platelet function. In Harker and Zimmerman (eds). Methods in Hematology, series 8. Churchill-Livingstone, New-York, 1.
- 71- Gerrard, J.M. (1988). Platelet aggregation: Cellular regulation and physiologic role. Hospital Practice, Jan, 89-108.
- 72- White, J.G., Edson, J.R. et Desnick, S.J. (1971). Studies on platelets in a variant of the Hermansky-Pudlak syndrome. Am. J. Pathol., 63, 319-332.
- 73- Ginsberg, M.H., Taylor, W. et Painter, R.G. (1981). The mechanism of thrombin-induced platelet factor 4 secretion. Blood, 55, 661.

- 74- Lapatina, E.G. et Watson, S.P. (1985). Relative importance of diacyl glycerol phosphatidite, inositol triphosphate and arachidonate metabolism in platelet receptor signalling. Nouv. Rev. Fr. Hématol., 27, 235.
- 75- Dreyfus, B. (1984). Hématologie. Ville: Flammarion Médecine-Sciences, p. 148
- 76- Leung, L.L.K., et Nachman, R.L. (1982). Complex formation of platelet thrombospondin with fibrinogen. J. Clin. Invest., 70, 542-549.
- 77- Jenkins, L.K. et Phillips, D.R. (1982). Purification of glycoprotein IIb and IIIa from human platelet membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-IIIa complex. J. Biol. Chem., 257, 10458.
- 78- Isenberg, W.M., McEver, R.P., Phillips, D.R., Shuman, M.A. et Bainton, D.F. (1987). The platelet fibrinogen receptor: an immunogold-surface replica study of agonist-induced ligand binding and receptor clustering. J. Cell. Biol., 104, 1655.
- 79- Woods, V.L., Wolff, L.E., et Keller, D.M. (1986). 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., 261, 15242.
- 80- George, J.N. et coll. (1986). Platelet surface glycoproteins - Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles, and observation in patient during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. J. Clin. Invest., 78, 340.
- 81- Niiya, K., Hodson, E., Bader, R., Byers Ward, V., Kosiul, J.A., Plow, E.F. et Ruggeri, Z.M. (1987). Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. Blood, 70, 475.
- 82- Kunicki, T.J., Didard, D., Roja, V.P. et Nurden, A.T. (1981). The formation of calcium dependent complexes of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa in solution as determined by crossed immunoelectrophoresis. Blood, 58, 268.

- 83- Fujimura, K. et Phillips, D.R. (1983). Calcium cation regulation of glycoprotein IIb-IIIa complex formation in platelet plasma membranes. J. Biol. Chem., 258, 10247.
- 84- Fujimura, K., Fujimoto, T., Kuramoto, A et Phillips, D.R. (1987). Calcium binding to platelet plasma membrane glycoproteins, in H. Yamazaki et J.E. Mustard (Ed.): Platelet activation (p. 87). San Diego: Academic Press.
- 85- Charo I.F., Fitzgerald, L.A., Steiner, B., Rall S.C. Jr, Bekeart, L.S. et Phillips, D.R. (1986). Platelet glycoproteins IIb and IIIa: Evidence for a family of immunologically and structurally related glycoproteins in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8351
- 86- Nurden, A.T., George, J.N., Phillips, D.R. (1985). Platelet membrane glycoproteins: their structure, function and modification in disease, in D.R. Phillips et M.A. Shuman (Ed.): Biochemistry of platelets (p. 159-224) Orlando (FL): Academic Press.
- 87- Collier, B.S., Peerschke, E.I., Scudder, L.E. et Sullivan, C.A. (1983). A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces an thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoprotein IIb and/or IIIa. J. Clin. Invest., 72, 325.
- 88- Pidard, D., Montgomery, R.R., Bennett, J.S. et Kunicki, T.J. (1983). Interaction of AP-2, a monoclonal antibody specific for the human platelet glycoprotein IIb-IIIa complex, with intact platelets. J. Biol. Chem., 258, 12582.
- 89- Vinci, G. et coll. (1982). Immunological study of *in vitro* maturation of human megakaryocytes. Br. J. Haematol., 58, 589.
- 90- Rosa, J.P., Cevallos, M. et McEver, R.P. (1986). Fibrinogen receptor assembly in human erythroleukemia (HEL) cells. Blood, 68, 325a.
- 91- Anderson, D.C. et Springer, T.A. (1987). Leucocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the MAC-1, LFA-1 and p150,95 glycoproteins. Annu. Rev. Med., 38, 175.

- 92- Marguerie, G.A., Plow, E.F. et Edgington, T.S. (1979). Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. J. Biol. Chem., 254, 5357.
- 93- Bennett, J.S. et Vilaire, G. (1979). Exposure of platelet fibrinogen receptor by ADP and epinephrine. J. Clin. Invest. 64, 1393.
- 94 Caen, J.P., Castaldi, P.A., Leclerc, J.C., Inceman, S., Larrieu, M.J., Probst, M. et Bernard, J. (1966). Congenital bleeding disorders with long bleeding time and normal platelet count. I. Galanzmann's thrombasthenia. Am. J. Med., 41, 4, 1966.
- 95- Nachman, R.L., Leung, L.L.K., Kloczewiak, M. et Haniger, J. (1984). Complex formation of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa with the formation D domain. J. Biol. Chem., 259, 8584.
- 96- Doolittle, R.F. (1983). The structure and evolution of vertebrate fibrinogen. Ann. N.Y. Acad. Sci. 408, 13-27.
- 97- Nachman, R.L., Marcus, A.J., et Zucher-Franklin, D. (1967). J. Lab. Clin. Med., 69, 651-658.
- 99- Plow, E.F., Ginsberg, M.H. et Margueric, G.A. (1986). Expression and function of adhesive proteins on the platelet surface, in D.R. Phillips et M.A. Shuman (Ed.): Biochemistry of platelets (p. 226). San Diego: Academic Press.
- 100- Hynes, R.O. et Yamada, K.M. (1982). Fibronectines: Multifunctional modular glycoproteins. J. Cell. Biol., 95, 369-377.
- 101- Margossian, S., Lawler, J. et Slayter, H. (1981). Physical characterization of platelet thrombospondin. J. Biol. Chem., 256, 7495-7500.
- 102- Dawes et coll. (1983). A radioimmunoassay for thrombospondin used in a comparative study of thrombospondin, B-ti homboglobulin, and platelet factor 4 in healthy volunteers. Thromb. Res., 29, 569-581.
- 103- Phillips, D.R., Jennings, L.K. et Prasanna, H.R. (1980).  $Ca^{+2}$  mediated association of glycoprotein G (thrombin sensitive protein thrombospondin) with human platelets. J. Biol. Chem., 255, 11629.

- 104- Leung, L.L.K., (1985). Role of thrombospondin in platelet aggregation. J. Clin. Invest., 74, 1764-1772.
- 105- Hemmendinger, S. et coll. (1986). Méthodes d'exploration des fonctions plaquettaires. Ann. Biol. Clin., 44, 347-352.
- 106- Ahlquist, R.P. (1948). A study of adrenotropic receptors. Am. J. Physiol., 153, 586-600.
- 107- Ariens, E.J. et Simonis, A.M. (1983). Physiological and pharmacological aspects of adrenergic receptor classification. Biochem. Pharmacol., 32, 1539-1547.
- 108- Aktories, K., Jakobs, K.H., (1985). Regulation of platelet cyclic AMP formation, in Lungenecker, G.L. (Ed.): The platelets: physiology and pharmacology. Orlando, Academic Press, p. 113.
- 109- Regan, J.W., Nakata, H., Demarint, R.M., Caron M.G. et Lefkowitz, R.J. (1986). Purification and characterization of the human platelet  $\alpha_2$ -adrenergic receptor. J. Biol. Chem., 261, 3894-3900.
- 110- Yu, S.K. et Latour, J.G. (1977). Potentiation by  $\alpha$  and inhibition by  $\beta$ -adrenergic stimulations of rat platelet aggregation; a comparative study with human and rabbit platelets. Thromb. Haemost., 37, 413-422.
- 111- Benovic, J.L., Shorr, R.G.L., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (1984). The mammalian  $\beta_2$ -adrenergic receptor: purification and characterization. Biochemistry, 23, 4510-4518.
- 112- Lanza, F. et Cazenave, J.P. (1987). Recepteurs adrénergiques des plaquettes sanguines. Nouv. Rev. Fr. Hématol., 29, 407-424.
- 113- Ferry, N., Adnot, S., Insel, P.A. et Hanoune, J. (1983). Le système adénylate cyclasique des plaquettes humaines. Nouv. Rev. Fr. Hematol., 25, 343-353.
- 114- Smith, S.K., Limbiad, L.E. (1981). Solubilization of human platelet  $\alpha$ -adrenergic receptors: evidence that agonist occupancy of the receptor stabilizes receptor-effector interaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78, 4026-4030.

- 115- Jacokbs, K.H., Lasch, P., Minuth, M., Aktories, K. et Schultz, G. (1982). Uncoupling of  $\alpha$ -adrenoreceptor-mediated inhibition of human platelet adenylate cyclase by N-éthylmaleimide. J. Biol. Chem., 257, 2829-2833.
- 116- Itoh, H. et coll. (1986). Molecular cloning and sequence determination of cDNAs for  $\alpha$ -subunits of guanine nucleotide-binding proteins Gs, Gi and Go from rat brain. Proc. Natl Acad. Sci. USA., 81, 3776-3780.
- 117- Gilman, A.G. (1987). G proteins: Transducers of receptor generated signals. Annu. Rev. Biochem., 56, 615-649.
- 118- Cerione r.A. et coll. (1986). Mechanism of guanine nucleotide regulatory protein-mediated inhibition of adenylate cyclase; studies with isolated subunits of transducin in a reconstituted system. J. Biol. Chem., 261, 9514-9520.
- 119- Haslam, R.J. (1975). Roles of cyclic nucleotides in platelet function, in J. Knight (Ed.): Biochemistry and pharmacology of platelets. Amsterdam: Associated Scientific Publishers, Amsterdam, p. 121.
- 120- Mills, D.C.B. (1975). Initial biochemistry response of platelets to stimulation, in: Biochemistry and pharmacology of platelets (p. 146). Ciba foundation Symposium 35. New York: Elsevier.
- 121- Mills, D.C.B., Roberts, G.C.K. (1967). Effects of adrenalin on human blood platelets. J. Physiol., 193, 443-453.
- 122- Kerry, R. et Scrutton, M.C. (1985). Platelet adrenoreceptors, in G.E. Longencker (Ed): The platelets: physiology and pharmacology (p. 113). Orlando: Academic Press.
- 123- Milton, J.G., Frojmovic, M.M. (1984). Adrenaline and adenosine diphosphate-induced platelet aggregation require shape change; importance of pseudo-pods. J. Lab. Clin. Med., 104, 805-815.
- 124- Ardlic, N.G., Glew, G. et Schwartz, C.J. (1966). Influence of catecholamines on nucleotide-induced platelet aggregation. Nature, 212, 415-417.

- 125- Thomas, D.P. (1968). The role of platelet catecholamines in the aggregation of platelets by collagen and thrombin. Exp. Biol., 3, 129-134.
- 126- Beretz, A., Lanza, F. et Cazinave, J.P. (1983). Adrenaline potentiates platelet aggregation induced by PAF-acether and endoperoxide analog U-46619 through stimulation of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors independently of the cyclooxygenase pathway. Thromb. Haemost., 50, 41.
- 127- Vargaftig, B.B., Fouque, F., Benveniste, J. et Odist, J. (1982). Adrenaline and PAF-acether synergize to trigger cyclooxygenase-independent activation of plasma-free human platelets. Thromb. Res., 28, 557-573.
- 128- Rao, G.H.R. et White, J.G. (1981). Epinephrine potentiation of arachidonate-induced aggregation of cyclooxygenase-deficient platelets. Am. J. Hematol., 11, 355-366.
- 129- Bennett, J.S., Vilaire, B. (1979). Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. J. Clin. Invest., 64, 1393-1401.
- 130- Peerschke, E.I. (1982). Induction of human platelet fibrinogen receptors by epinephrine in the absence of released ADP. Blood, 60, 71-77.
- 131- Plow, E.F., Margueric, G.A., (1980). Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by epinephrine and the combination of epinephrine and ADP. J. Biol. Chem., 255, 10971-10977.
- 132- Colman, R.W. (1986). Platelet activation: role on an ADP receptor. Semin. Hematol., 23, 119-128.
- 133- Haslam, R.J. (1973). Interactions of the pharmacological receptors of blood platelets with adenylate cyclase. Semin. Haematol., 6, 333-350.
- 134- Lipps, J.P.M., Sixma, J.J. et Schiphorst, M.E. (1980). Binding of adenosine diphosphate to human blood platelets and to isolated blood platelet membranes. Biochim. Biophys. Acta, 628, 451-467.
- 135- Mustard, J.F., Penny, D.W. et Kinlough-Rathbone, R.L. (1975). Factors responsible for ADP-induced release reaction of human platelets. Am. J. Physiol., 228, 1757-1765.

- 136-Streb et coll. (1983). Release of ca+2 from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-triphosphate. Nature, 306, 67-69.
- 137-Yasaka,T., Boxer,L.A., et Bachner,R.L. (1982). J. Immunol., 128, 1939-1944.
- 138-Camussi, G., et coll. (1981). Mediators of immune-complex-induced aggregation of polymormonuclear neutrophils. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 64, 25.
- 139-Chignard, M., et coll. (1979). The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. Nature, 275, 799.
- 140-Mencia-Huerta, J.M., Benveniste, J. (1979). Platelet-activating factor and macrophage. Eur. J. Immunol., 9, 409.
- 141-Synder, R. (1985). Med. Res. Rev., 5, 107-140.
- 142-McIntyre, T., et coll. (1985). Cultured endothelial cells synthesize both platelet-activating factor and prostacyclin in response to histamine, bradykinine and ADP. J. Clin. Invest., 76, 271-280.
- 143-Page, C.P., Archer, C.B., Paul, W., et Morley, J. (1984). PAF-acether: a mediator of inilammation and asthma. Trends Pharmacol. Sci., 5, 239-241.
- 144-Chignard, M., Le Couedic, J.P., Tence, M., Vargaftig, B.B. et Benveniste, J. (1979). The role of platelet activating factor in platelet aggregation. Nature, 279, 799-800.
- 145-Cazenave, J.P., Benveniste, J., Pinekard, R.N. (1979). Aggregation of rabbit platelets by PAF is independent of the release reaction and the arachidonate pathway and inhibited by membrane active drugs. Lab. Invest., 41, 275-285.
- 146-Macconi,D. et coll. (1985). Acetylglycerophosphorylcholine aggregates human platelets through two distinct pathways both dependent on arachidonic acid metabolism. Lab. Invest., 52, 159-168.

- 147-Küster, L.J., Filep, J. et Frölich, J.C. (1986). Mechanism of PAF-induced platelet aggregation in man. Thromb. Res., **43**, 425-433.
- 148-Lapetina, E.G., (1982). Platelet-activating factor stimulates the phosphatidylinositol cycle. J. Biol. Chem., **257**, 7314-7317.
- 149-Nishizuka, Y., Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U et Kaibuchi K. (1984). Phospholipid turnover in hormone action. Rec. Prog. Horm. Res., **40**, 301-345.
- 150-Vericel, E. et coll. (1987). Platelets and aging I- Aggregation. Arachidonate metabolism and antioxidant status. Thromb. Res., **49**, 331-342.
- 151-Misselwitz, F., Hofmann, U., Leytin, V.L. et Repin, V.S. (1987). Influence of thromboxane receptor-antagonists on the interaction of platelets with solid-phase immobilized human collagen. Biochim. Biophys. ACTA, **46**, 595-598.
- 152-Kinlough-Rathbone, R.L., et coll. (1980). Effect of inhibitors of the arachidonate pathway on the release of granule contents from rabbit platelets adherent to collagen. Lab. Invest., **42**, 28.
- 153-Cazenave, J.P. et coll. (1983). L'agrégation plaquettaire: outil d'investigation clinique et d'étude pharmacologique. Ann. Biol. Clin., **41**, 167-179.
- 154-Vargaftig, B.B., Chignard, M., Benveniste, J. (1981). Present concept on the mechanism of platelet aggregation. Biochem. Pharmacol., **30**, 263.
- 155-Sato T., Herman, L., Chandler, J.A. (1975). Localization of a thrombin-sensitive calcium pool in platelets. J. Hisotchem. Cytochem., **23**, 103-106.
- 156-Murer, E.H., Stewart, G.J. et Rausch, M.A. (1975). Calcium ionophore A23187: Effect on platelet function structure and metabolism. Thromb. Diasthes. Haemorrh., **34**, 72-82.
- 157-Holmsen, H. et Dangelmaier C.A. (1981). Evidence that the platelet plasma membrane is impermeable to calcium and magnesium complexes of A23187. J. Biol. Chem., **256**, 10449-10452.

- 158- Murer, E.H., (1985). The role of platelet calcium. Semin Haematol., 22, 313-323.
- 159- Born, G.V.R. et Cross, M.J. (1963). The aggregation of blood platelets. J. Physiol. (London), 178-195.
- 160- Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354.
- 161- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem., 250, 4007-4021.
- 162- Laemmli, J.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- 163- Bio-Rad Immun-Blot assay kit instruction manual. GAR-HRP (Goat Anti Rabbit IgG) or GAM-FRP (Goat Anti-Mouse IgG).
- 164- Odink, J. (1974). Quantification of the response of platelet suspensions to hypotonic stress. Preservation and transfusion. Proc. Int'l. Soc. Blood Transf., 59, 59-61.
- 165- Park, B.H., Fikrig, S.M. et Smithwick, E.M. (1968). Infection and nitro-blue-tetrazolium reduction by neutrophils: A diagnostic aid. Lancet, 2, 532.
- 168- Phillips, D.R., Morrison, M. (1971). Biochem., 10, 1766.
- 169- Kessler, S. (1981). Use of protein A- Bearing Staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigen from cells. Methods Enzymol., 73, 442-452.
- 170- Kowalska, M.A. et Clerniewski, C.S. (1983). Fluorescence studies of the blood platelet membranes associated with fibrinogen. Biochim.Biophys.ACTA., 729, 275-280.
- 171- Bruck, C., Portetelle, D., Glineur, C., et Bollen, A. (1982). One step purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid by DEAE Affi-Blue Chromatography. J. Immunol. Meth., 53, 313-319.

- 172- MacSween, J.M. et Eastwood, S.L. (1981). Recovery of antigen from staphylococcal protein A- Antibody absorbents. Methods Enzymol., 73, 459-471.
- 173- Kim, B.K. et Baldini, M.G. (1974). The platelet response to hypotonic shock. Its value as an indicator of platelet viability after storage. Transf., 14, 130-138.
- 174- Cieriewski, C.S., Kowalska, M.A., Frajewski, T. et Janiak, A. (1982). Binding of fibrinogen molecules to pig platelets and their membranes. Biochim.Biophys.ACTA., 714, 543-548.
- 175- Franck, F. (1986). Purification of IgG monoclonal antibodies from ascitic fluid based on Rivanol precipitation. Methods Enzymol., 121, 631-638.
- 176- Lowe, C.R. et Pearson, J.C. (1984). Affinity chromatography on immobilized dyes. Meth. in Enzymol., 104, 97-112.
- 177- Thompson, S.T., Cass, K.H. et Stellwagen, E. (1975). Bleu dextran-sepharose : An affinity column for the dinucleotide fold in protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 669.
- 178- Wilson, J.E. (1973). Applications of bleu dextran and cibacron bleu F3GA in purification and structural studies of nucleotide requiring enzymes. Biochem. Biophys. Res. Comm., 72, 816.
- 179- Ey P.L., Prowse, S.J. et Jenkin, C.R. (1978). Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. Immunochemistry, 15, 429.
- 180- Richard, J., Pink, L., Ziegler, A. (1979). Radiolabeling and immunoprecipitation of cell-surface macromolecule. Immunol. Meth., 10, 169-179.
- 181- Kanaho, Y., Fujii, T. (1982). Effect of some amphilic drugs on the membrane morphology and aggregation of rabbit platelets. Biochem.Biophys.Res.Comm., 106, 513-519.
- 182- Kaywin, P. et coll. (1978). Deficiency of platelet  $\alpha$ -adrenoceptors in essential thrombocythemia: decreased epinephrine responsiveness associated with a deficiency of platelet  $\alpha$ -adrenergic receptors. N. Engl. J. Med., 299, 505-509.

- 183-Kitagawa, S., Shinohara, T. et Kametami, F. (1984). Effects of alcohols on ADP-induced aggregation and membrane fluidity of gel-filtered bovine blood platelets. J. Memb. Biol., 79, 97-102.
- 184-Steiner, M. (1981). Vitamin E changes the membrane fluidity of human platelets. Biochim. Biophys. ACTA, 640, 100-105.
- 185-Deuticke, B. (1977). Properties and structural basis of simple diffusion pathways in the erythrocyte membrane. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 78, 1-97.
- 186-Noji, S., Takahashi, T. et Kon, H. (1982). A spin-label study of the correlation between stomatocyte formation and membrane fluidization of erythrocytes. Biochem. Pharmacol., 31, 3173-3180.
- 187-Phillips, D.R. et Pohagin, P. (1977). Platelet plasma membrane glycoproteins. J. Biol. Chem., 252, 2121-2126.
- 188-Sonnenberg, A. Janssen, H., Hogervorst, F., Calafat, J. et Hilgers, J. (1987). A complex of platelet glycoproteins Ic et IIa identified by a rat monoclonal antibody. J. Biol. Chem., 262, 10376-10383.
- 189-Piotrowicz, R.S. et coll. (1988). Glycoprotein Ic-IIa functions as an activation-independent fibronectin receptor on human platelets. J. Cell Biol., 106, 1359-1364.
- 190-Pischel, K.D., Bleuestein, H.G. et Woods, V.L. (1988). Platelet glycoproteins Ia, Ic and IIa are physicochemically indistinguishable from the very late activation antigens adhesion-related proteins of lymphocytes and other cell types. J. Clin. Invest., 81, 505-513.
- 191-Colman, R.W. et coll. (1988). Distinction between glycoprotein IIIa and the 100 kDa membrane protein (aggregin) mediating ADP-induced platelet activation. Arch. Biochem. Biophys., 262, 298-306.
- 192-Mehta, J., Menhta, P. et Ostrowski, N. (1985). Increase in human platelet  $\alpha$ 2-adrenergic receptor affinity for agonists in unstable angina. J. Lab. Clin. Med., 106, 661-666.

- 193- Houslay, M.D., Bojanic, D. et Wilson, A. (1986). Platelet activating factor and U44069 stimulate a GTPase activity in human platelets which is distinct from the guanine nucleotide regulatory proteins, Ns and Ni. Biochem J., 234, 737-740.
- 194- Jakobs, K.H. et coll. (1985). Adv. cyclic. nucleotid. Res., 18, 137-150.
- 195- Clementson, K.J., Luscher, E.F. (1988). Membrane glycoprotein abnormalities in pathological platelets. Biochim.Biophys.ACTA., 947, 53-73.
- 196- Meyer, D. (1982). Facteur Willebrand et adhésion des plaquettes au sous-endothélium de la paroi vasculaire. Nouv. Rev. Fr. Hematol., 24, 145-151.
- 197- Maclouf, J., Bellucci, S. (1986). Thromboxane A2, prostacycline ou le duel plaquette-vaisseaux. Médecine/sciences, 10, 552-557.
- 198- Phillips, D.R., et coll. (1988). The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. Blood, 71, 831-839.
- 199- Mosesson, M.W., Doolittle, R.F. (1983). Molecular biology of fibrinogen and fibrin. Ann. N-Y. Acad. Sci., 408, page couverture.