

Plaquettes et endothélium : un mariage de raison

Les plaquettes sanguines de mammifères sont spécialisées dans la réponse hémostatique conduisant à l'arrêt du saignement après une blessure vasculaire. Cette fonction qui, dans des conditions pathologiques, peut conduire à la thrombose, a longtemps été considérée comme l'unique rôle de ces éléments cellulaires anucléés.

Toutefois de nouvelles fonctions plaquettaires ont été mises en évidence au fil des ans, en particulier leur participation dans les processus d'inflammation [1]. Cette fonction peut s'exercer soit par la capacité des plaquettes à sécréter diverses substances capables de moduler la réponse inflammatoire, soit par leur interaction avec les leucocytes ou les cellules endothéliales. L'étude des interactions plaquettes-endothélium a connu un développement important au cours des cinq dernières années avec notamment l'identification de plusieurs mécanismes moléculaires régissant ces interactions. Dès 1940, les travaux de Danielli avaient suggéré que les plaquettes sanguines pouvaient apporter des éléments nutritifs aux cellules endothéliales, participant ainsi au maintien de l'intégrité vasculaire [2]. Les études de Johnson et de Folkman pendant les années 1960 ont confirmé et approfondi ce concept [3, 4]. En effet, la perfusion de glandes thyroïdes de chien, pendant cinq heures, avec du plasma pauvre en plaquettes conduit à la perte de l'organe due à des hémorragies importantes. En revanche, l'addition de plaquettes dans le perfusé permet de prolonger grandement la survie de l'organe en maintenant son intégrité vasculaire [4].

L'avènement des cultures de cellules endothéliales, permettant l'étude directe des interactions plaquettes-

endothélium, a constitué une étape importante pour la compréhension moléculaire de ce processus.

L'endothélium : un puissant régulateur de l'activation plaquettaire

Les études *in vitro* ont permis de mettre en évidence la dynamique des relations existant entre les plaquettes et les cellules endothéliales. Parallèlement, le concept initial de barrière passive attribué à l'endothélium s'est avéré erroné. L'endothélium intact, fortement anti-thrombogène, est remarquablement réfractaire à toute adhérence plaquettaire et de façon à préserver cet équilibre, les cellules endothéliales sécrètent des substances telles que la prostacycline, l'oxyde nitrique (NO) et l'ecto-ADPase qui empêchent l'activation plaquettaire et ses conséquences thrombotiques [5]. De même, les chaînes de sulfate d'héparane des protéoglycanes présents à la surface cellulaire, sont capables de lier l'antithrombine III, principal inhibiteur de la thrombine, augmentant ainsi son activité anticoagulante. La thrombomoduline, un inhibiteur de la thrombine présent à la surface des cellules endothéliales, contribue aussi aux propriétés anti-thrombogènes de l'endothélium. Dans les conditions physiologiques, les cellules endothéliales jouent ainsi un rôle important dans la prévention de l'activation plaquettaire afin de maintenir un état non thrombogénique.

L'activation de l'endothélium entraîne l'adhérence des plaquettes

Les tests d'adhérence *in vitro* ont également permis d'étudier les interactions directes existant entre les plaquettes et les cellules endothéliales activées par différents mécanismes.

Ainsi, une infection par le virus de l'herpès fait basculer l'endothélium vers un état thrombotique [6]. Les cellules endothéliales produisent alors davantage de thrombine, ce qui a pour effet d'induire la sécrétion des granules de stockage qui les caractérisent, les corps de Weibel-Palade, et qui contiennent le facteur Willebrand (vWf) et la P-sélectine. Le vWf intervient normalement dans la formation du thrombus plaquettaire grâce à sa capacité à former un pont entre la matrice extracellulaire sous-endothéliale et ses récepteurs plaquettaires, la glycoprotéine (Gp) Ib et la GPIIb/IIIa. Quant à la P-sélectine, elle joue un rôle important dans l'inflammation en permettant le roulement des leucocytes sur l'endothélium. La libération du vWf et sa liaison à la GpIb plaquettaire entraînent une adhérence plaquettaire cinq fois plus importante sur les cellules endothéliales infectées par le virus de l'herpès que sur les mêmes cellules saines [7]. Il est alors devenu apparent que toute perturbation de l'endothélium est susceptible de le rendre pro-adhésif pour les plaquettes grâce à une modulation très rapide de l'expression des molécules d'adhérence. Par exemple, les cellules endothéliales apoptotiques expriment un ligand (non identifié) qui leur permet de lier les plaquettes non activées aussi efficacement que le fait le sous-endothélium par un mécanisme faisant intervenir les intégrines $\beta 1$ plaquettaires [8] (Tableau I). Cette capacité de l'endothélium à modifier rapidement l'expression de molécules d'adhérence à sa surface a surtout été étudiée dans le cadre de réactions inflammatoires. En effet, la fonction la plus connue de ces molécules d'adhérence est de promouvoir le roulement conduisant à l'arrêt des leucocytes sur les cellules endothé-

liales activées. La famille des sélectines permet le roulement/ralentissement des leucocytes tandis que les étapes suivantes d'adhérence et d'extravasation sont prises en charge par les intégrines $\beta 2$ et des membres de la grande famille des immunoglobulines [9]. De façon similaire, les plaquettes possèdent tout un éventail de molécules d'adhérence dont l'expression et/ou la fonction peuvent être modulées en l'espace de quelques secondes. L'exemple le plus connu est celui de la GpIIb/IIIa (intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$) normalement exprimée dans une conformation inactive et qui peut être rapidement activée de façon à se lier au fibrinogène et promouvoir l'aggrégation plaquettaire [10].

Identification des mécanismes d'adhérence

Au vu de la grande capacité d'adaptation à toute variation de l'environnement, autant du côté plaquettaire que du côté endothélial, il était prévisible que l'adhérence des plaquettes à l'endothélium n'allait pas faire appel à un mécanisme unique mais au contraire pourrait mettre en jeu différentes molécules selon les conditions existantes. Récemment, la technique de microscopie intravitale a permis de montrer que, d'une façon similaire aux leucocytes, les plaquettes peuvent rouler sur l'endothélium activé par l'ionophore du calcium (A23187) ou par une cytokine inflammatoire comme le TNF- α (figure 1) [11]. Le A23187 induit le relargage du contenu des corps de Weibel-Palade et l'expression de la P-sélectine à la surface de l'endothélium. L'utilisation de souris déficientes en P-sélectine a montré qu'en l'absence de P-sélectine endothéliale, le roulement des plaquettes est aboli. Ce phénomène de roulement et d'adhérence plaquettaire sur P-sélectine a également été observé dans les vaisseaux ischémiques soumis à une reperfusion, suggérant que les plaquettes peuvent jouer un rôle dans cette pathologie probablement en participant au recrutement des leucocytes [12]. Dans des conditions inflammatoires, la E-sélectine nouvellement synthétisée est également présente à

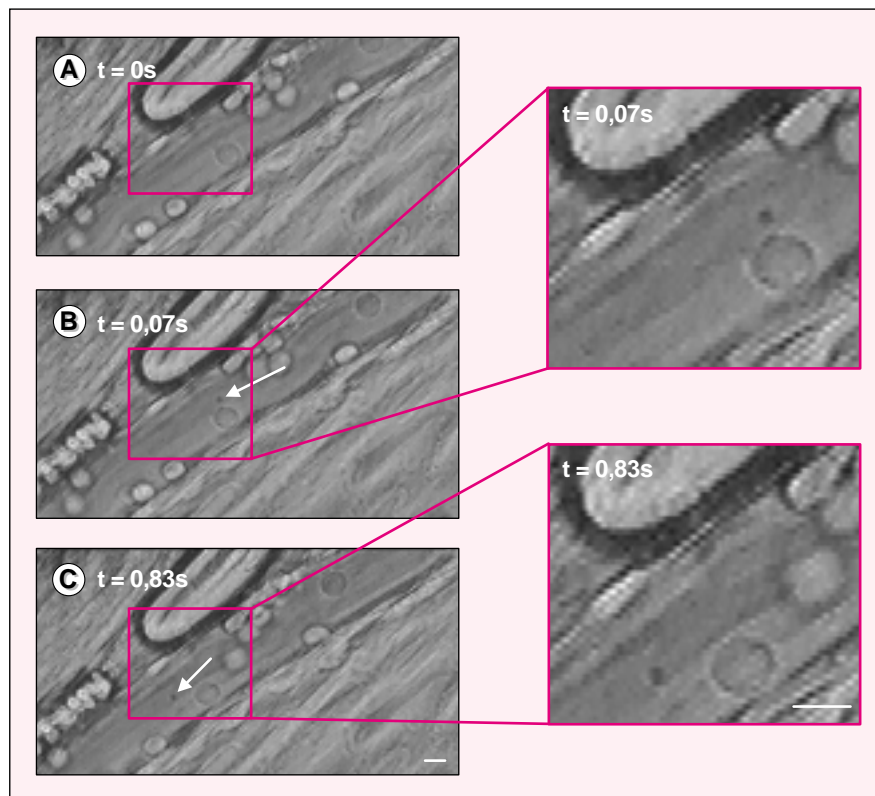


Figure 1. **Microscopie intravitale d'une veinule mésentérique d'une souris stimulée par le TNF- α .** L'encadré met en évidence un leucocyte roulant sur l'endothélium activé (A). Sept centièmes de seconde plus tard (B), on voit apparaître une plaquette (flèche) qui se déplace plus rapidement que ce leucocyte et va le dépasser moins d'une seconde plus tard ($t = 0,83$) (C). Les agrandissements de droite montrent ce phénomène plus en détail. Barre = 10 μm .

la surface des cellules endothéliales. Il semble alors qu'il y ait une coopération entre les deux sélectines (P et E) pour promouvoir le roulement des plaquettes [13]. Les conditions hémodynamiques dans lesquelles ces expériences ont été conduites sont relativement similaires et mettent l'accent sur le rôle des sélectines endothéliales. Dans des conditions légèrement différentes, à des taux de cisaillement plus faibles, il existe, en plus du roulement sur la P-sélectine, une adhérence très importante mais de brève durée sur le vWf libéré des corps de Weibel-Palade après stimulation par l'histamine ou le A23187 [14]. Dans ces conditions, le vWf lié aux cellules endothéliales par l'intermédiaire d'un ligand non identifié peut se lier à la GpIIb plaquettaire et permettre ainsi l'adhérence des plaquettes (Tableau I). Ce phénomène

est transitoire, probablement parce que le vWf est entraîné par le flux, ce qui expliquerait également pourquoi ce phénomène est absent à des taux de cisaillement plus élevés. La présence de ligand(s) du vWf à la surface des plaquettes est connue depuis longtemps mais la démonstration que les plaquettes expriment un ou plusieurs ligand(s) pour les sélectines a lancé plusieurs équipes sur la voie de leur identification. Parmi les différents ligands des sélectines identifiés jusqu'à présent, le PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) est le mieux caractérisé. PSGL-1 est une mucine homodimérique formée de deux sous-unités de ~ 120 kD liées par un pont disulfure [15]. Pour se lier à la P-sélectine, le PSGL-1 doit subir des modifications post-traductionnelles parmi lesquelles des glycosylations protéiques et la sulfatation d'au

Tableau I. Molécules impliquées dans l'adhérence des plaquettes aux cellules endothéliales.

| Plaquettes | Cellules endothéliales | Référence |
|-----------------------------------|--|-----------|
| Au repos | | |
| Gplb α | P-sélectine | [17] |
| PSGL-1 | P-sélectine | [16] |
| ? | E-sélectine | [13] |
| Gplb α | vWF | [7, 14] |
| Intégrines β 1 | Ligand induit par apoptose | [8] |
| Fibrinogène lié à la GplIb/IIIa | ICAM-1 | [26] |
| Activées | | |
| P-sélectine | Ligand induit par le TNF α | [13] |
| | α v β 3 | |
| vWF lié à la GplIb/IIIa | Gplb α | [18] |
| Fibronectine liée à la GplIb/IIIa | α v β 3 | [18] |
| Fibrinogène lié à la GplIb/IIIa | α v β 3 | |
| | ICAM-1 | [18] |
| P-sélectine | <i>peripheral node addressin</i> (PNA α) | [21] |

moins une tyrosine. Par conséquent, la présence de PSGL-1 à la surface cellulaire ne constitue pas une preuve de sa fonctionnalité. La recherche des ligands potentiels des sélectines sur les plaquettes a récemment conduit à l'identification de PSGL-1 à la surface plaquettaire où son expression est 25 à 100 fois plus faible que sur les leucocytes [16]. L'analyse de plaquettes provenant de patients atteints de la forme chronique du purpura thrombocytopénique auto-immun a révélé que le PSGL-1 était exprimé en plus grande quantité sur ces plaquettes. Étant donné que la majorité des plaquettes sont jeunes chez ces patients, ceci suggère que l'expression de cette protéine est peut-être perdue au cours du processus de vieillissement plaquettaire. Le PSGL-1 plaquettaire est fonctionnel puisqu'un anticorps monoclonal dirigé contre cette protéine est capable d'inhiber de façon significative, le roulement des plaquettes sur la P-sélectine endothéliale [16]. Mais il est à noter que cette inhibition n'est pas complète, suggérant l'existence de ligand(s) additionnel(s). L'analyse des candidats potentiels a révélé des similitudes frappantes entre le PSGL-1 et la chaîne α de la Gplb plaquettaire. En effet ces deux récepteurs présentent plusieurs sites de O-glycosylations et une région amino-terminale contenant des résidus acides et des tyrosines sulfatées, caractéristiques qui

confèrent au PSGL-1 sa capacité à se lier à la P-sélectine. Cette similitude se poursuit également au niveau des ligands de PSGL-1 et Gplb α puisque la P-sélectine et le vWf sont localisés ensemble non seulement dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales mais aussi au niveau des granules α des plaquettes. Il n'était donc pas particulièrement surprenant que la Gplb α ait récemment été identifiée comme un ligand plaquettaire de la P-sélectine capable de promouvoir le roulement des plaquettes sur des cellules endothéliales activées [17]. Il est intéressant de constater que le même récepteur, Gplb α , peut promouvoir les deux phénomènes suivants: d'une part l'adhérence des plaquettes aux cellules endothéliales lorsque l'endothélium est activé et d'autre part, l'adhérence des plaquettes au sous-endothélium lorsque des cellules endothéliales ont disparu lors d'une blessure vasculaire. D'autres mécanismes permettant l'adhérence des plaquettes aux cellules endothéliales ont également été identifiés, impliquant plus particulièrement les plaquettes activées. Après leur activation par la thrombine, les plaquettes sont capables d'adhérer à l'endothélium par l'intermédiaire de la GplIb/IIIa qui se lie à ses ligands (fibrinogène, vWf ou fibronectine), eux-mêmes capables de se lier à leurs récepteurs endothéliaux (ICAM-1, α v β 3 ou Gplb α) [18] (*Tableau I*).

D'autre part, la P-sélectine exprimée à la surface des plaquettes activées peut également participer à ce phénomène d'adhérence puisqu'elle est capable de promouvoir des interactions plaquettes-endothélium par l'intermédiaire d'un ligand endothélial induit par le TNF α [19]. Il est possible que ce ligand soit la Gplb α endothéliale dont l'expression est induite ou augmentée par les cytokines [20]. Enfin, la P-sélectine plaquettaire est également impliquée dans le roulement des plaquettes activées sur les cellules endothéliales spécialisées des venules de ganglions lymphatiques périphériques par l'intermédiaire de son interaction avec une adressine, la *peripheral node addressin* (PNA α) [21]. Le *Tableau I* récapitule les mécanismes d'adhérence impliqués dans les interactions entre les plaquettes et l'endothélium.

Importance biologique des interactions plaquettes-endothélium

La similitude de comportement entre les plaquettes et les leucocytes renforcent l'idée selon laquelle les plaquettes sont impliquées dans les réactions inflammatoires. Chez certains invertébrés il n'existe qu'une cellule sanguine unique pour assurer le rôle double de défense hémostatique et immunologique. Malgré leur spécialisation en experts de l'hémostase, les plaquettes de mammifères semblent avoir conservé certaines propriétés communes aux leucocytes. Leur rôle dans la lutte contre les microorganismes infectieux est bien connue [22, 23] ainsi que leur participation à certaines réactions immunitaires exacerbées comme les allergies ou l'asthme [24]. L'adhérence des plaquettes à l'endothélium représente une étape précoce du processus inflammatoire. Les plaquettes adhérentes sont en effet capables d'influencer positivement le recrutement des leucocytes soit par leur capacité à sécréter des facteurs chimiotactiques ou en établissant des liaisons avec les leucocytes de façon à faciliter leur adhérence aux cellules endothéliales [25]. Contrairement aux leucocytes, il n'a pas été établi avec certitude que les plaquettes sont

capables d'extravasation même si elles possèdent toutes les molécules d'adhérence nécessaires pour traverser l'endothélium.

Cependant, l'importance des interactions plaquettes/endothélium n'apparaît pas uniquement dans l'inflammation. Le roulement et l'adhérence plaquettaire sont également susceptibles de fournir des éléments nutritifs aux cellules endothéliales. Ainsi il a récemment été décrit que les plaquettes contiennent plusieurs facteurs de croissance endothéliaux dont le VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Ces facteurs pourraient jouer un rôle important non seulement dans le maintien de l'intégrité endothéliale mais aussi dans les circonstances où il existe une activité angiogénique importante, au cours par exemple des processus de cicatrisation ou du développement de tumeurs. Il est tentant de comparer les plaquettes circulantes à une patrouille d'urgence toujours sur le qui-vive. Toute situation produisant une activation de l'endothélium aurait pour effet d'induire le relargage du contenu des corps de Weibel-Palade et d'exposer le vWf et la P-sélectine, conduisant alors à une accumulation importante et localisée de plaquettes. Le devenir de ce mécanisme d'adhérence serait alors dépendant de la nature et/ou de la sévérité du dommage endothélial. Par exemple, en cas de blessure endothéliale, les plaquettes pourraient être recrutées par la P-sélectine, se déplacer sur le vWf et adhérer de façon ferme sur le fibrinogène [26]. L'interaction des plaquettes avec l'endothélium représenterait par conséquent un mécanisme de défense par lequel les plaquettes pourraient s'accumuler dans le voisinage d'une blessure potentielle de façon à être disponibles pour une réponse immédiate, que cette réponse soit de type hémostatique, inflammatoire ou angiogénique ■

RÉFÉRENCES

- Klinger MH. Platelets and inflammation. *Anat Embryol* 1997; 196: 1-11.
- Danielli JF. Capillary permeability and oedema in the perfused frog. *J Physiol* 1940; 98: 109-29.
- Johnson SA, Balboa RS, Dessel BH. The mechanism of the endothelial supporting function of intact platelets. *Exp Mol Pathol* 1964; 3: 115-27.
- Gimbrone MA Jr., Aster RH, Cotran RS, Corkery J, Jandl JH, Folkman J. Preservation of vascular integrity in organs perfused *in vitro* with a platelet-rich medium. *Nature* 1969; 221: 33-6.
- Pearson JD. Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999; 12: 329-41.
- Curwen KD, Gimbrone MA, Handin RI. *In vitro* studies of thromboresistance: the role of prostacyclin (PGI₂) in platelet adhesion to cultured normal and virally transformed human vascular endothelial cells. *Lab Invest* 1980; 42: 366-74.
- Etingin OR, Silverstein RL, Hajjar DP, von Willebrand factor mediates platelet adhesion to virally infected endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5153-6.
- Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood* 1999; 93: 3831-8.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-14.
- Missy K, Giuriato S, Bodin S, Plantavid M, Payrastre B. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans les plaquettes sanguines: illustration du rôle des intégrines dans la transduction des signaux. *Med Sci* 2001; 16: 153-9.
- Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium *in vivo*: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7450-4.
- Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, et al. Platelet-endothelial interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998; 92: 507-15.
- Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood* 1998; 91: 1318-24.
- Andre P, Denis CV, Saffaripour S, Hynes RO, Ruggeri ZM, Wagner DD. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelial cells in stimulated veins. *Blood* 2000; 96: 3322-8.
- Moore KL. Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk Lymphoma* 1998; 29: 1-15.
- Frenette PS, Denis CV, Weiss L, et al. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions *in vivo*. *J Exp Med* 2000; 191: 1413-22.
- Romo GM, Dong JF, Schade AJ, et al. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med* 1999; 190: 803-14.
- Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta3 integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med* 1998; 187: 329-39.
- Frenette PS, Subbarao S, Mazo IB, von Andrian UH, Wagner DD. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14423-8.
- Beacham DA, Tran LP, Shapiro SS. Cytokine treatment of endothelial cells increases glycoprotein Ib alpha-dependent adhesion to von Willebrand factor. *Blood* 1997; 89: 4071-7.
- Diacovo TG, Puri KD, Warnock RA, Springer TA, von Andrian UH. Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science* 1996; 273: 252-5.
- Joseph M, Auriault C, Capron A, Vorng H, Viens P. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 1983; 303: 810-2.
- Cesbon JY, Capron A, Vargaftig BB, et al. Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Nature* 1987; 325: 533-6.
- Page CP. Platelets as inflammatory cells. *Immunopharmacology* 1989; 17: 51-9.
- Zwaginga JJ, Torres HI, Lammers J, Sixma JJ, Koenderman L, Kuijper PH. Minimal platelet deposition and activation in models of injured vessel wall ensure optimal neutrophil adhesion under flow conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1549-54.
- Massberg S, Enders G, Matos FC, et al. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion *in vivo*. *Blood* 1999; 94: 3829-38.

Cécile V. Denis

Center for Blood Research, Harvard Medical School, 800 Huntington, Boston, MA 02115, États-Unis.

Paul S. Frenette

Mount Sinai School of Medicine, Department of Medicine, One Gustave L. Levy Place, Box 1079, New York, NY 10029, États-Unis.

TIRÉS À PART

P.S. Frenette.