

Identification du nouveau récepteur plaquettaire de l'ADP, le P2Y₁₂, cible de traitements anti-thrombotiques

Une des principales conséquences de l'activation des plaquettes, lors d'une blessure vasculaire par exemple, ou lors de la rupture d'une plaque d'athérome, est leur adhérence, puis leur agrégation, réversible puis irréversible, colmatant la brèche, ou obstruant le vaisseau. Compte tenu du rôle critique de l'agrégation plaquettaire dans le développement des thromboses artérielles, la caractérisation des partenaires moléculaires, en particulier des récepteurs à l'ADP, intervenant dans la cinétique de cette réaction est un enjeu thérapeutique majeur. Un agoniste puissant de l'activation plaquettaire est l'ADP, un nucléotide libéré des granules denses des plaquettes elles-mêmes et sécrété en réponse à la thrombine ou au collagène, ou dans les cellules endommagées au site de la lésion. Les récepteurs des nucléotides sont de type P2 purinergiques. La famille P2 comprend deux sous-groupes, les récepteurs P2Y, couplés aux protéines G à sept domaines transmembranaires, et les canaux ioniques P2X [1]. Certains de ces récepteurs plaquettaires sont caractérisés sur le plan moléculaire, comme P2X₁, un canal calcique, et P2Y₁ [2], couplé à la protéine Gq et responsable de l'augmentation de calcium intracellulaire indispensable à l'activation plaquettaire. D'autres ont été définis uniquement fonctionnellement, sur la base du blocage de l'agrégation par des agents pharmacologiques. Ainsi, deux thiénopyridines produites par Sanofi-Synthelabo et utilisées en thérapeutique, le ticlopidine (Ticlid®) et le clopidogrel (Plavix®), inhibent de façon spécifique l'agrégation plaquettaire *in vivo*, et définissent fonctionnellement un récepteur

à l'ADP différent de P2X₁ et P2Y₁. Ces deux anti-agrégants ont une efficacité supérieure à celle de l'aspirine (qui, elle, agit en inhibant la synthèse de thromboxane A₂, un activateur plaquettaire) pour la prévention des phénomènes de rethrombose chez des sujets athéroscléreux ayant présenté des accidents vasculaires cérébraux, d'infarctus du myocarde ou atteints d'artériopathie [3]. Leur action a aussi été reconnue pour la prévention de thrombose liée à la pose de stents coronariens [4]. C'est le récepteur cible de ces deux anti-agrégants, le P2Y₁₂ [5] qui vient d'être cloné (figure 1). Il est particulièrement important en termes de santé publique, car il est responsable de la stabilité des agrégats plaquettaires.

Nous avons participé, avec P. Conley, M.H. Jantzen et leur équipe de Biotechnologie de San Francisco, Cor Therapeutics, et D. Julius et G. Hollopeter de l'Université de San Francisco, à l'identification moléculaire de ce nouveau récepteur. Le récepteur recherché présentait les caractéristiques des récepteurs couplés aux protéines Gi. On sait que cette famille de protéines G inhibe la formation d'AMP cyclique par l'enzyme adénylyl cyclase. La stratégie utilisée découle de l'observation que les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines Gi couplées aux récepteurs muscariniques induisent une stimulation des canaux potassiques Kir3.1 et Kir3.4. L'augmentation du courant potassique dans les cellules en réponse à l'ADP a servi de révélateur lors du criblage

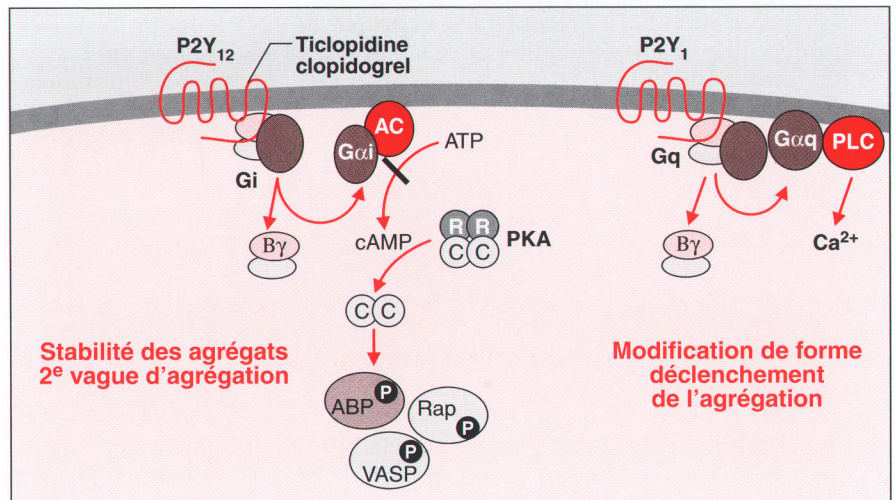


Figure 1. Représentation schématique des deux récepteurs de l'ADP, P2Y₁ et P2Y₁₂, et de la transmission des signaux intraplaquettaires. Ces deux récepteurs interviennent de manière synergique pour assurer l'agrégation des plaquettes en réponse à l'ADP. RAP: ras-related GTP binding protein; VASP: vasodilator-stimulated phosphoprotein; ABP: actin-binding protein.

d'une banque d'ADNc de plaquettes de rat, puis de plaquettes humaines. Les clones ont été transfectés dans des ovocytes de xénope transfectés également avec Kir3.1 et Kir3.4 pour détecter les réponses couplées aux protéines Gi par un système électrophysiologique. La sélection progressive des clones déclenchant un courant K⁺ en réponse à l'ADP a permis d'identifier le récepteur recherché. Des caractérisations pharmacologiques du récepteur cloné dans l'œuf de xénope mais aussi dans les cellules CHO ont confirmé qu'il se comportait comme un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines Gi. La transfection associée d'ARNc codant pour la toxine pertussique au clone de rat dénommé P2Y₁₂ a aboli la réponse à l'ADP; l'inhibition de la formation d'AMPc par l'ADP a été inversée par le 2MeSAMP, une réponse relayée par les protéines Gi. Quant à l'inhibiteur spécifique de P2Y₁, le A3P5P, il est sans effet. P2Y₁₂ est très exprimé dans les plaquettes, mais également dans le cerveau, avec un profil évocateur d'une expression gliale. Il possède 4 cystéines dans sa partie extracellulaire, cibles potentielles d'inhibiteurs. Localisé sur le chromosome 3q24-25, il présente 44 % d'homologies avec le récepteur UDP-glucose et seulement 19 % avec P2Y₁. Un point important était de vérifier que P2Y₁₂ correspondait au récepteur supposé anormal chez le patient (M.L.) que nous avons identifié auparavant [6]. Ce patient présente une anomalie congénitale de réponse à l'ADP qui reproduit la thrombopathie provoquée par la prise de ticlopidine et de clopidogrel. Celle-ci associe: (1) la formation d'agrégats plaquettaires instables en réponse à une stimulation par l'ADP; (2) un défaut d'inhibition de l'adénylyl cyclase par l'ADP se traduisant par une réduction du taux d'AMPc préalablement augmenté par addition de PGE₁ (prostaglandine E1); (3) un nombre diminué de récepteurs à l'ADP; et (4) la persistance de modifications de la forme des plaquettes sous l'action d'ADP avec formation de petits agrégats réversibles. Il est à noter que le P2Y₁, autre récepteur plaquettaire de

l'ADP cloné en 1996 [2], est responsable du déclenchement de l'agrégation, qui n'est que transitoire comme le démontre le phénotype des souris avec une délétion de ce gène [1]. Le récepteur P2Y₁, couplé aux protéines Gq, est également un médiateur du changement de forme des plaquettes et de la mobilisation calcique (figure 1).

L'analyse du produit de l'amplification par PCR de l'ADN génomique a montré que le patient (M.L.) présente une mutation du gène codant pour P2Y₁₂ caractérisée par une délétion de deux nucléotides de la région codante au niveau de l'acide aminé 240, déplaçant le cadre de lecture de 28 résidus avant d'introduire un codon stop. Cette mutation, présente sur un seul allèle situé au niveau du 6^e domaine transmembranaire, n'a pas été retrouvée chez 100 témoins examinés. L'effet de cette mutation, évalué dans le système d'ovocytes de xénope décrit précédemment, a montré qu'à l'état homozygote, l'anomalie inhibait la fonction du récepteur mais qu'elle ne présentait pas de caractère dominant négatif à l'état hétérozygote. L'analyse par RT-PCR de l'ARNm provenant du sang total du patient a montré que le transcript de 1,1 kb codant pour le cadre ouvert de lecture de P2Y₁₂ est très faible chez le patient et son séquençage a montré qu'il ne provient que de l'allèle muté. L'anomalie du second allèle qui le rend silencieux n'est pas encore déterminée. Fait intéressant, la fille du patient, qui ne possède que 50 % des récepteurs P2Y₁₂, possède un allèle muté et un allèle normal.

La caractérisation de ce récepteur ouvre des horizons thérapeutiques très intéressants pour la conception de drogues à potentiel antithrombotique et prises *per os*, à utiliser sur un mode chronique. En effet, s'est développée ces dernières années une classe d'anti-agrégants plaquettaires anti-GPIIb-IIIa, inhibiteurs de l'étape ultime de l'agrégation, utilisables par voie intraveineuse, et dont le bénéfice s'est révélé très important dans les situations aiguës, par exemple pour la cardiologie interventionnelle lors d'angioplasties ou pose des *stents* [7]. Les premières tentatives de pro-

duction d'anti-GP I Ib-IIIa actifs par voie orale se sont soldées par un échec pour de multiples raisons [8]. L'intérêt reconnu de la ticlopidine et du clopidogrel sur la prévention des risques thrombotiques est limité par leur délai d'action, puisque ce sont des pro-drogues qui doivent être actives *in vivo* par le foie, et par l'apparition d'effets secondaires [8]. La connaissance du récepteur P2Y₁₂ permettra la conception de drogues agissant directement, sans requérir la production d'un métabolite comme c'est le cas actuellement pour les thiénopyridines.

1. Cattaneo M, Gachet C. ADP receptors and clinical bleeding disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 10: 2281-5
2. Leon C, Vial C, Cazenave JP, Gachet C. Cloning and sequencing of a human cDNA encoding endothelial P2Y₁ purinoceptor. *Gene* 1996; 171: 295-7.
3. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 1996; 348: 1329-39.
4. Muller C, Buttner HJ, Petersen J, Roskamm H. A randomized comparison of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin after the placement of coronary-artery stents. *Circulation* 2000; 101: 590-3.
5. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; 409: 202-7.
6. Nurden P, Savi P, Heilmann E, et al. An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein I Ib-IIIa complex function. *J Clin Invest* 1995; 95: 1612-22.
7. Lincoff AM, Califf RM, Topol EJ. Platelet glycoprotein I Ib/IIIa receptor blockade in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1103-15.
8. Chew DP, Bhatt DL, Sapp S, Topol EJ. Increased mortality with oral platelet glycoprotein I Ib/IIIa antagonists - A meta-analysis of phase III multicenter randomized trials. *Circulation* 2001; 103: 201-6.

**Paquita Nurden
Alan Nurden**

Laboratoire de pathologie cellulaire de l'hémostase, Cnrs UMR 5533, Hôpital cardiologique, 33604 Pessac, France.