

## **REMERCIEMENTS**

*Mon profond respect et mes sincères remerciements :*

*Au Professeur WEBER pour son enseignement, sa confiance et pour me faire l'honneur de présider ce jury.*

*Au Professeur DUBOC pour son enseignement et pour me faire l'honneur d'être membre de ce jury.*

*Au Professeur SPAULDING pour m'avoir communiqué le virus de l'hémodynamique.*

*Au Docteur HELOIRE pour ses conseils et sa précieuse aide à la réalisation de ce travail.*

*A quelques cardiologues d'Ile de France qui ont su me faire découvrir et aimer cette spécialité.*

**Cette thèse est dédiée :**

- A mon frère pour m'avoir donné l'envie.
  
- A mes parents pour m'avoir donné les moyens.
  
- A Anne pour son amour.
  
- A Steph pour son amitié.
  
- A mes grands-parents.
  
- A Pascal, Mumu, Lipo, Lapin, pour ces années passées ensemble.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
<b>THROMBOSE ET MALADIE CORONAIRE</b>	<b>6</b>
<b>A. <u>PROTAGONISTES</u></b>	<b>6-10</b>
I. ----- Endothélium .....	<b>6-8</b>
II. Plaque d'athérome .....	<b>8</b>
III. Plaquettes .....	<b>8</b>
1. Adhésion .....	<b>9</b>
2. Modification de structure.....	<b>9</b>
3. Agrégation.....	<b>10</b>
4. Activation.....	<b>10</b>
<b>B. <u>RUPTURE DE PLAQUE</u></b>	<b>11-15</b>
I. Mécanisme .....	<b>11</b>
a) Rupture et thrombose .....	<b>11</b>
b) Rupture et lipides .....	<b>12</b>
c) Rupture et macrophages .....	<b>12</b>
d) Rupture et contraintes vasculaires. ....	<b>13</b>
II. Corrélation clinique .....	<b>13</b>
a) Angor instable .....	<b>14</b>
b) Nécrose rudimentaire .....	<b>14</b>
c) Infarctus transmural .....	<b>15</b>
d) Mort subite .....	<b>15</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>16-17</b>
<b>METHODES</b>	<b>18-21</b>
<b>A- <u>IN VITRO</u></b>	<b>18</b>
1) Réactifs et anticorps monoclonaux.....	<b>18</b>
2) Synthèse des microparticules endothéliales. ....	<b>18</b>
3) Isolation de plaquettes. ....	<b>18</b>
4) Formation et caractérisation des agrégats EMP-P.....	<b>19</b>

<b>B- <u>IN VIVO</u></b>	<b>19</b>
1) Sélection des patients. ....	<b>19</b>
2) Prélèvements sanguins. ....	<b>20</b>
3) Isolation et caractérisation des agrégats EMP-P dans la circulation périphérique. ....	<b>21</b>
4) Analyse statistique .....	<b>22</b>
<b>RESULTATS</b>	
I. Formation in vitro et caractérisation des agrégats EMP-P. ....	<b>23</b>
II. Caractérisation et quantification des agrégats EMP-P sur échantillons sanguins de sujets sains .....	<b>23</b>
III. Quantification des agrégats EMP-P chez les coronariens stables et au cours de l'infarctus du myocarde .....	<b>24</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>25</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>27</b>
<b>SCHEMAS</b>	<b>28-34</b>
<b>LEGENDES</b>	<b>35-36</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>37-40</b>

## INTRODUCTION

La formation de thrombus à la surface de plaques d'athérosclérose ulcérées joue un rôle fondamental dans la progression de la maladie coronarienne et dans la survenue de syndrome coronarien aigu<sup>1-3</sup>. Dans des conditions physiologiques, l'endothélium vasculaire dispose d'une protection de molécules membranaires qui maintiennent un potentiel anti-thrombotique<sup>4</sup>. Toutefois, lors de la maladie athéromateuse, les cellules endothéliales activées perdent leur propriété anti-coagulante, acquièrent un phénotype pro-coagulant et expriment à leur surface des molécules favorisant l'adhésion plaquettaire<sup>5</sup>.

Les cellules endothéliales activées peuvent libérer des fragments de leur membrane plasmique dans l'espace extracellulaire. Ces fragments, résultant d'un processus d'exocytose par microvésiculation (fragmentation cellulaire), sont appelés microparticules (MP)<sup>6</sup>. Les microparticules ont été détectées dans la circulation périphérique de sujets normaux<sup>6</sup> et, à des niveaux plus élevés, chez des patients avec des syndromes coronariens aigus mais aussi chez des patients atteints de lupus avec anticoagulant circulant<sup>7</sup>.

Au cours de leur formation, les microparticules incluent des éléments cytoplasmiques, des phospholipides de charge négative<sup>8</sup> avec une activité pro-coagulante et des récepteurs de surface cellulaire<sup>9</sup> pouvant amplifier le processus de coagulation en interagissant avec les plaquettes et les cellules pro inflammatoires<sup>6-10</sup>.

Nous avons émis l'hypothèse que les microparticules endothéliales circulantes pouvaient se lier aux plaquettes, formant ainsi des agrégats de microparticules endothéliales et plaquettes (Endothelial Microparticles-Platelets ou EMP-P), et contribuer à la formation de thrombus. L'hypothèse de la formation de EMP-P a d'abord été confirmée *in vitro*. De fait, l'interaction entre les microparticules endothéliales et les plaquettes conduit à la formation d'agrégats comportant à la fois des microparticules et des plaquettes. Des agrégats d'EMP-P similaires ont alors été caractérisés dans la circulation périphérique de sujets sains et de patients avec un syndrome coronarien stable ou à la phase aiguë d'un infarctus du myocarde.

## **THROMBOSE ET MALADIE CORONAIRE**

La thrombose était initialement considérée comme un facteur important d'initiation et de progression des lésions athéromateuses. On sait maintenant que la thrombose joue plusieurs rôles : de manière importante sur le plan clinique, l'incorporation du thrombus à la plaque d'athérome contribue à une rapide croissance de la plaque. Par ailleurs, l'ulcération de la plaque démasque un site de fixation des plaquettes qui, une fois activées, vont former un thrombus mural potentiellement occlusif pouvant aboutir à un angor instable ou à un infarctus du myocarde.

Des thrombus ont été observés dans les artères coronaires de la majorité des individus décédés d'infarctus du myocarde. Ils sont néanmoins moins communs en cas de nécrose sous-endocardique ou de mort subite.

### **A-LES PROTAGONISTES**

#### **I-L'ENDOTHELIUM**

Les cellules endothéliales qui tapissent l'ensemble de l'arbre artériel représentent le plus vaste tissu du corps humain. Elles constituent la principale barrière entre les éléments du sang et le mur artériel. Chez l'adulte, le turnover des cellules endothéliales est relativement lent. Toutefois, Schwartz et Benditt<sup>11</sup> ont observé des « hot spots » où le turnover est plus important, dans l'aorte par exemple.

L'endothélium forme une barrière hautement sélective, est habituellement considéré comme une surface non thrombogénique, est un tissu à haut métabolisme et est capable de synthétiser plusieurs substances vaso-actives. Les cellules endothéliales examinées en culture ont également des propriétés procoagulantes ; il est probable que ces propriétés sont latentes sur un endothélium sain et qu'elles ne se manifestent qu'en cas de lésion endothéliale.

L'importance de la modulation du tonus vasculaire par l'endothélium a été étudiée.

On sait que l'endothélium libère des médiateurs capables de prévenir les dépôts plaquettaires et le vasospasme. Le premier de ces médiateurs ayant été décrit est la Prostacycline (Moncada et al. en 1976<sup>12</sup>).

En 1980, Furchgott et Zawadzki<sup>13</sup> ont montré que l'effet vasorelaxant de l'acétylcholine était lié à la présence de l'endothélium et plus précisément à la libération par celui-ci d'une substance active sur les cellules musculaires lisses. Ce médiateur spécifique de l'endothélium a été appelé EDRF (Endothélium Derived Relaxing Factor) ; il a été caractérisé par la suite comme le monoxyde d'azote synthétisé à partir de la L-arginine et ses propriétés inhibitrices vis à vis des plaquettes ont rapidement été mises en évidence. Les autres facteurs vasorelaxant libérés par l'endothélium comportent la bradykinine, l'angiotensine II, l'histamine, la norepinephrine, la sérotonine, l'ADP, et l'ATP.

Les cellules endothéliales relarguent également des agents vasoconstricteurs. En 1988, Yanagisawa et al.<sup>14</sup> ont décrit un peptide vasoconstricteur appelé endothéline. La trombine et des facteurs physiques locaux augmentent l'expression du gène préproendothéline et la libération de l'endothéline – I. Ses effets vasoconstricteurs semblent jouer un rôle important dans la physiopathologie des syndromes coronariens aigus. L'endothéline-I pourrait contribuer par ailleurs à la genèse de l'athérosclérose.

L'endothélium peut modifier le tonus vasculaire en libérant des facteurs relaxants tels que la prostacycline et l'EDRF qui préviennent également le dépôts des plaquettes. Dans des conditions physiologiques, ces facteurs relaxants semblent prépondérants. Toutefois, une altération de l'endothélium même modérée peut conduire à une libération plus importante des facteurs constricteurs. De fait, les artères athéroscléreuses ont un tonus vasculaire élevé probablement en rapport avec une diminution de la synthèse d'EDRF. La réponse vasoconstrictrice paradoxale à l'acétylcholine retrouvée sur les artères coronaires athéromateuses humaines a été attribuée à la dysfonction endothéliale. Des études d'angiographie coronaire chez l'humain ont suggéré qu'il existe une altération progressive de la fonction vasoactive de l'endothélium débutant par une dysfonction sélective sur des artères angiographiquement normales et progressant vers une vasoconstriction en réponse à plusieurs facteurs dans les artères coronaires athéromateuses.

Il apparaît donc qu'il existe une prédisposition dans les syndromes coronariens aigus à une vasoconstriction au site de rupture de plaque et de thrombose liée entre autres aux plaquettes et à la thrombine. L'athérosclérose chronique est associée à une vasodilatation anormale ou à une réponse vasoconstrictrice exagérée en rapport avec une dysfonction endothéliale avec diminution de la diffusion de l'EDRF à travers la paroi vasculaire altérée.

## **II- LA PLAQUE D'ATHEROME**

Les plaques athérosclérotiques constituent un épaissement focal de l'intima composé d'une armature fibreuse périphérique entourant un centre graisseux et recouverte d'une couche de cellules endothéliales.

Le tissu fibreux recouvre en surface le centre athéromateux ; il donne à la plaque sa rigidité. Il est composé de collagène, de mucopolysaccharides, d'élastine, de fibrine, et de cellules musculaires lisses clairsemées.

Le centre athéromateux est constitué de lipides contenus dans des cellules spumeuses (macrophages chargés de vésicules lipidiques) et dans l'espace extracellulaire.

La plaque d'athérome contient également des cellules en cours d'apoptose telles que les monocytes ou les cellules endothéliales capables de générer de la thrombine. Ce potentiel procoagulant est attribué à l'exposition de phosphatidyl-sérines à la surface de ces cellules apoptotiques et des microparticules qui en sont issues.

Des forces de cisaillement importantes existent au niveau d'une sténose coronaire représentant des conditions favorables pour l'agrégation plaquettaire et la libération de microparticules procoagulantes.

## **III-PLAQUETTES**

Ce sont des éléments circulant librement à l'état de repos dans les vaisseaux. Elles peuvent être activées in vivo par des molécules circulantes comme la thrombine, la plasmine, certains anticorps ou des composants de la paroi artérielle comme la collagène, ou bien encore par des phénomènes physiopathologiques tels que l'augmentation des forces de cisaillement.



L'activation des plaquettes est un phénomène physiologique bénéfique nécessaire à l'hémostase normale mais peut devenir pathologique lorsqu'elle participe à la thrombose artérielle. Les phénomènes d'activation plaquettaire comportent trois étapes : l'adhésion au sous-endothélium, l'activation proprement dite avec modification de la forme de la plaquette et l'agrégation.

### ***1. L'adhésion***

Les plaquettes peuvent adhérer aux structures du sous-endothélium mises à nu lors d'un endommagement de la paroi artérielle (collagène) ou à une surface anormale comme la plaque d'athérome rompue. Le récepteur majeur de l'adhésion plaquettaire est le complexe membranaire Gp Ib – V – IX. Il représente le site de liaison du facteur Von Willebrandt endothélial. L'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (GIIbIIIa) permet l'adhésion des plaquettes au fibrinogène.

### ***2. Les modifications de la structure plaquettaire au cours de l'activation***

In vitro l'adhésion des plaquettes à des surfaces mimant le sous-endothélium induit le passage de la forme discoïde à la forme sphérique et l'étalement de la plaquette. Il en découle une augmentation de la taille des plaquettes activées.

Il existe du fait de l'activation plaquettaire une perte de la symétrie de répartition des phospholipides membranaires ce qui conduit à l'exposition des phosphatidylsérines, activatrices des complexes ténase (site de haute affinité pour le facteur IXa) et prothrombinase (entraînant la transformation de prothrombine en thrombine).

Le plaquettes activées exposent de plus à leur surface de nouveaux récepteurs membranaires tels que l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  et la P-selectine (permettant l'interaction avec les leucocytes).

### ***3. L'agrégation plaquettaire***

L'augmentation d'expression de GpIIbIIIa à la surface membranaire et son activation entraînent une augmentation de la capacité des plaquettes à lier le fibrinogène, étape indispensable au pontage entre deux plaquettes adjacentes et à la formation du thrombus.

### ***4. Physiopathologie de l'activation plaquettaire au cours de la rupture de plaque***

L'ulcération est la principale complication de la plaque athéroscléreuse. Elle survient d'autant plus facilement que la composante lipidique est importante. Le site de rupture se situe le plus souvent à la jonction entre la plaque rigide et la paroi artérielle saine. Il en résulte la perte de la barrière endothéliale ce qui favorise l'activation des plaquettes circulantes.

En effet, lorsqu'il y a perte de protection endothéliale, les plaquettes circulantes entrent en contact avec diverses substances contenues dans la matrice sous-endothéliale ; il s'agit en particulier du fibrinogène permettant les phénomènes d'adhésion via le GpIIbIIIa du facteur Von Willebrandt et du collagène, permettant à la fois l'adhésion et l'activation plaquettaire via l'augmentation du calcium intracellulaire. Les plaquettes entrent également en contact avec des constituants procoagulants de la plaque comme les microparticules résultant de l'apoptose des macrophages ou encore les LDL oxydés.

Par ailleurs, l'endothélium vasculaire synthétise des substances inhibitrices de l'activation plaquettaire telles que le monoxyde d'azote ou bien encore la prostaglandine. Lorsque cet endothélium est altéré, il en résulte une activation plaquettaire.

Lorsque les plaquettes sont activées, elles relarguent des substances capables d'agir sur la motricité vasculaire. Il s'agit en particulier de la sérotonine et du thromboxane A<sub>2</sub> qui, lorsque l'endothélium est lésé, entraînent une vasoconstriction, aggravant encore les phénomènes ischémiques.

On sait depuis plusieurs années grâce à des études anatomopathologiques, que les événements coronariens aigus tels que l'infarctus du myocarde ou l'angor instable sont secondaires à des ruptures de plaque avec formation d'un thrombus entraînant une réduction brutale du diamètre de l'artère voire son occlusion.

## **B-LA RUPTURE DE PLAQUE**

### **I-MECANISME**

La progression des lésions précoces d'athérosclérose vers une manifestation clinique est souvent plus rapide chez le sujet avec facteurs de risque coronarien. Une profonde fissuration de plaque ou une ulcération peut conduire à une occlusion artérielle thrombotique et à un syndrome coronarien aigu.

#### *Ia-Rupture de plaque et thrombose*

Le thrombus mural et son organisation fibrineuse contribuent à la progression de l'athérome. Plusieurs études autopsiques d'artères coronaires chez des patients décédés de cause non cardiaque ont retrouvé des plaques d'athérome fissurées enrichies de thrombus. Par ailleurs, ces mêmes études chez des patients décédés de cardiopathie ischémique retrouvaient également des plaques fissurées avec différents stades d'organisation de thrombus suggérant que la plupart des plaques d'athérome pouvaient incorporer ces thrombus sans forcément avoir une traduction clinique.

Des arguments supplémentaires quant au rôle de l'incorporation de thrombus dans la progression des plaques d'athérome ont été donnés par des études anatomopathologiques retrouvant de vieux thrombus intracoronaires organisés qu'il était difficile de distinguer des plaques d'athérome. Ces aspects suggéraient que des épisodes récurrents de thrombose murale pouvaient conduire graduellement à une occlusion vasculaire et que ce mécanisme était probablement plus fréquent qu'une occlusion totale inaugurale.

Ces hypothèses ont été définitivement prouvées avec l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre les plaquettes, la fibrine, le fibrinogène et leurs produits de dégradation, qui ont mis en évidence des produits dérivés des plaquettes et de la fibrine au niveau de l'intima et de la néointima. Ceci a également été confirmé par des études de pièces d'endariectionomie.

L'organisation fibreuse du thrombus mural se fait grossièrement en trois phases :

- La phase I voit le dépôt des plaquettes organisées en thrombus dans les minutes suivant la lésion vasculaire.
- La phase II est marquée par la migration de cellules musculaires lisses de la média vers l'intima qui dès lors vont proliférer notamment sous l'action de facteurs migratoires et de croissance libérés par les plaquettes.
- La phase III se caractérise par l'épaississement intimal du à l'hypertrophie des cellules musculaires lisses et à l'accumulation de matrice extracellulaire (collagène, protéoglycans, élastine, et glycoprotéine).

### ***Ib-Rupture de plaque riche en lipide.***

Des études anatomopathologiques ont révélé que de relativement petites plaques d'athérome étaient de manière commune composées d'une importante masse de lipides séparée de la lumière vasculaire par une chape fibreuse. De fait, les plaques qui tendent à se rompre sont volontiers petites et molles avec une concentration très élevée en cholestérol ou en ses esters.

L'augmentation des forces de cisaillement dans la zone de sténose produit une brusque variation de pression dans la lumière coronaire et par la même une torsion de la paroi artérielle à chaque contraction cardiaque ce qui peut conduire à la rupture de ces plaques.

Il existe un lien indéniable entre la richesse en lipide de ces plaques et leur susceptibilité à se rompre.

### ***Ic-Rupture de plaque et macrophages.***

La participation des macrophages à l'athérogénèse a été récemment reconsidérée. Les lésions précoces d'athérosclérose chez l'homme sont riches en dérivés de macrophages probablement originaires des monocytes circulants. Avec l'âge certaines lésions deviennent principalement fibromusculaires alors que les autres deviennent fibrolipidiques avec tendance à la rupture. C'est dans ces dernières que les macrophages sont retrouvés en nombre.

Les macrophages participent au transport et au métabolisme des lipides, processus apparaissant crucial dans le développement des plaques avancées d'athérosclérose. Les macrophages semblent également contribuer à l'athérogénèse par d'autres mécanismes incluant le transport et l'oxydation du LDL cholestérol, la sécrétion d'un facteur mitogène favorisant la prolifération des cellules musculaires lisses et la néovascularisation des plaques, et la synthèse de radicaux libres facilitant la lésion endothéliale ainsi que l'agrégation plaquettaire et l'organisation fibromusculaire des thrombus.

De plus les macrophages peuvent libérer des protéases (élastase et collagénase) capables de digérer la matrice extracellulaire, ce qui contribue également à la rupture de plaque.

Des analyses histologiques de plaques riches en lipides dont la rupture a conduit à une thrombose ont révélé la présence de macrophages et de lymphocytes T. Dans le contexte de plaque instable, les macrophages peuvent favoriser une thrombogénèse locale en libérant des facteurs tissulaires et un inhibiteur de l'activation du plasminogène.

### ***Id-Rupture de plaque et contraintes vasculaires.***

Il a été mis en évidence que les sites de fissuration de plaques étaient volontiers situés à la jonction de la chape fibreuse avec la paroi artérielle normale adjacente.

Les sites de fragilité de l'arbre endothélial correspondent à des zones de régime turbulent (bifurcations) suggérant un traumatisme direct par lésions de flux.

## **II-CORRELATIONS CLINIQUES**

La rupture d'une plaque d'athérosclérose avec en conséquence une thrombose intraluminaire est un important mécanisme du développement et de la progression de la lésion, et a également un rôle fondamental dans la survenue de l'angor instable, de l'infarctus du myocarde, et de la mort subite.

Chez les patients avec un syndrome coronarien stable, l'angor résulte souvent d'une augmentation des besoins du myocarde en oxygène dépassant la capacité de l'artère sténosée

à augmenter son débit. En opposition, l'angor instable, l'infarctus non transmural ou transmural sont habituellement caractérisés par une brutale réduction du flux coronaire.

### ***Ila-Angor instable***

Dans l'angor instable une petite fissure ou ulcération d'une plaque d'athérome peut conduire à une brusque modification de la morphologie de cette dernière et à une réduction du débit coronaire provoquant une exacerbation de l'angor. Des épisodes répétés d'occlusion vasculaire thrombotique sur le site de rupture de la plaque ou sur un thrombus résiduel peuvent provoquer un angor de repos. Le thrombus est habituellement labile provoquant une occlusion temporaire durant de 10 à 20 minutes. De plus la libération d'une substance vasoactive par le thrombus et la vasoconstriction due à la dysfonction endothéliale peut contribuer à une réduction supplémentaire du débit coronarien.

Ces mécanismes rendent compte d'environ deux tiers des épisodes d'angor instable. Pour le dernier tiers, on peut incriminer une augmentation transitoire de la demande en oxygène ou une occlusion complète d'une artère avec collatéralité insuffisante (angor post infarctus).

### ***Iib- Nécrose rudimentaire***

Dans le cas des nécroses rudimentaires, les caractéristiques angiographiques de la lésion responsable sont similaires à celle de l'angor instable, suggérant que la rupture des plaques est commune aux deux syndromes. Environ un quart des patients avec nécrose rudimentaire sont porteurs d'une artère responsable occluse quand l'angiographie est pratiquée précocement après l'infarctus ; la distalité est habituellement reprise par une collatéralité. Pour les trois quarts restants, l'artère responsable est perméable. Les constatations d'élévation du segment ST à l'électrocardiogramme, d'un pic précoce de créatine kinase plasmatique et une fréquence élevée de vaisseaux angiographiquement impliqués suggèrent que de manière fréquente il existe une occlusion coronaire complète rapidement suivie d'une reperfusion spontanée. Il est probable que dans ce syndrome les lésions de la plaque et les facteurs de risque thrombogénique sont aggravés par rapport à l'angor instable, expliquant cette occlusion thrombotique prolongée.

La thrombolyse spontanée ou la levée du spasme artériel limitent la durée de l'ischémie myocardique et préviennent la nécrose transmurale.

### ***IIC- Infarctus transmural***

Dans l'infarctus transmural, la rupture de plaque est associée avec une lésion artérielle sévère et une ulcération avec un risque thrombogénique défavorable. Ceci conduit à la formation d'un thrombus fixé persistant. Ce thrombus est occlusif et conduit à un brutal arrêt de la perfusion myocardique et à la nécrose du territoire concerné.

Comme pour les autres syndromes coronariens aigus, la sténose coronaire responsable de l'infarctus est fréquemment moyenne à modérée suggérant que la rupture de plaque avec constitution d'un thrombus est le premier déterminant de l'occlusion aiguë.

La fibrinolyse, qu'elle soit pharmacologique ou physiologique est souvent incomplète ; le thrombus mural résiduel augmente la possibilité de réocclusion. Pour un quart des patients avec nécrose transmurale, la thrombose coronaire résulte d'une sténose de haut degré. En effet, l'occlusion thrombotique d'une telle lésion chez ces patients ne conduit souvent pas à la nécrose du fait d'une collatéralité bien développée.

### ***IId- Mort subite***

La mort subite implique fréquemment une lésion coronaire rapidement progressive dans laquelle la rupture de plaque et la thrombose résultante conduisent de manière brutale à une ischémie et une arythmie ventriculaire fatale. L'absence de circulation collatérale ou de microembols plaquettaires contribue probablement à la mort subite ischémique.

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La thrombose artérielle est une étape physiopathologique essentielle au cours de la cardiopathie ischémique, mettant en jeu les plaquettes d'une part, et les cellules endothéliales de l'autre.

Il existe lors d'une altération de la barrière endothéliale ou au site d'une rupture de plaque d'athérome, une augmentation de l'activation plaquettaire, participant à la formation d'un thrombus intra-artériel à l'origine des événements ischémiques aigus.

Gawaz a étudié l'activation plaquettaire au cours de l'infarctus du myocarde chez 15 patients, traités par angioplastie<sup>5</sup>. Après une baisse transitoire du nombre de plaquettes circulantes, il a noté une hausse nette de l'activité plaquettaire post angioplastie. Cette observation a fait émettre l'hypothèse d'une séquestration plaquettaire au niveau du thrombus et a mis en évidence la persistance d'un état procoagulant les jours suivant une angioplastie, secondaire à une effraction endothéliale.

Trois ans plus tard, Mallat a étudié 22 plaques d'athérome chez l'homme<sup>8</sup> (20 pièces d'endarterectomie et 2 pièces d'anévrisme de l'aorte abdominale). Il a mis en évidence une libération de microparticules membranaires avec un potentiel procoagulant par apoptose de cellules inflammatoires. L'importance quantitative de ces microparticules au sein d'une plaque pouvait expliquer l'importance de sa thrombogénicité en cas de rupture, ce qui faisait de l'apoptose un phénomène déterminant du caractère thrombotique de la plaque. La nature propre de ces microparticules restait encore indéterminée.

En 1999, Combes crée *in vitro* des microparticules<sup>6</sup> en stimulant des cultures de cellules endothéliales par le TNF- $\alpha$ . Ces microparticules expriment les mêmes récepteurs membranaires que les cellules endothéliales et possèdent une activité procoagulante via la voie extrinsèque (facteur VII). Ces microparticules ont été mises en évidence dans la circulation périphérique de sujets sains et retrouvées à des taux élevés chez des individus



porteurs de lupus, ce qui laissait penser qu'elles existaient de manière physiologique chez l'homme et pouvaient être augmentées dans certaines pathologies.

Toujours en 1999, Mallat a étudié 39 coronariens<sup>7</sup> (12 patients stables et 27 syndromes coronariens aigus ou ACS) et 12 patients non coronariens. Il a retrouvé un taux élevé de microparticules procoagulantes dans la circulation périphérique des patients en ACS, dont la nature endothéliale était prouvée par immunomarquage.

Il a alors émis l'hypothèse d'une participation de ces microparticules à la formation et à la pérennisation des thrombus intra-coronaires, leur origine endothéliale suggérant un rôle important de la lésion endothéliale dans la formation de ces thrombus.

Mutin<sup>15</sup>, également en 1999, retrouvait la présence de cellules endothéliales circulantes, témoignant d'une lésion de l'endothélium, au cours de l'infarctus du myocarde et de l'angor instable. En revanche, ces cellules n'étaient pas retrouvées chez les coronariens stables (86 patients étudiés, 26 infarctus, 33 angor instables, 13 coronariens stables et 14 sujets témoins).

# METHODES

## A-IN VITRO

### *1) Réactifs et anticorps monoclonaux (Acm)*

Les réactifs de cultures cellulaires ont été fournis par Life Technologies (Cergy Pontoise, France).

Le recombinant humain du TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) a été fourni par TEBU (Le Perray en Yvelines, France).

### *2) Synthèse in vitro des microparticules endothéliales*

Les cellules endothéliales ont été obtenues à partir de cellules dérivées de veine ombilicale humaine (HUVEC) Ces cellules, préparées selon la méthode décrite par Jaffe en 1973<sup>16</sup>, ont été incubées avec du TNF- $\alpha$  à la concentration 100ng/ml pendant 24 heures à 37°C. Après trois lavages, les cellules endothéliales ont été rapidement séparées sous l'action d'une trypsine – EDTA pendant 30 secondes à 37°C et analysées par cytométrie de flux. Après chaque expérience, une viabilité a été déterminée par exclusion au bleu trypan et marquage au propidium iodé. Le surnageant de cultures provenant de 10<sup>7</sup> cellules a été collecté et épuré des fragments cellulaires par centrifugation à 4 300 g (environ 1500 tours/min) pendant 5 minutes. Le surnageant a alors été ultra-centrifugé à 100 000 g pendant 90 minutes à 10°C. Les amas de microparticules ont été à nouveau suspendus dans 100 $\mu$ l de PBS et utilisés immédiatement.

### *3) Isolation de plaquettes*

Les plaquettes ont été collectées comme précédemment décrit par Lozano<sup>17</sup>. Des prélèvements de sang veineux ont été effectués sur des volontaires sains et tamponnés au citrate de sodium 3,8%. Le plasma riche en plaquettes était préparé par centrifugation à 130 g

pendant 15 minutes et les plaquettes ont été isolées après nouvelle centrifugation à 900 g pendant 15 minutes. Après deux lavages, la suspension était ajustée à  $3 \times 10^8$  plaquettes/ml dans une solution tampon Hepes (acide hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonique) sans magnésium à pH 7,4.

#### ***4) Formation in vitro et caractérisation des agrégats EMP-P***

Les plaquettes ont par la suite été mises en incubation avec des microparticules dérivées de cellules endothéliales pendant une heure à 37°C. Après centrifugation à 130 g pendant 15 minutes, l'amas était recueilli et incubé avec un anticorps anti-CD105 (spécifique des cellules endothéliales<sup>18</sup>) couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Cliniscience, Paris, France) et avec un anticorps anti-CD41 (spécifique des plaquettes<sup>19</sup>) couplé à la phycoerythrine (PE) (Becton Dickinson, Le Pont de Clix, France) pendant 30 minutes à 4°C. Après trois lavages au PBS, les agrégats ont été analysés par cytométrie de flux selon leur taille, leur granularité et leur positivité au marquage par CD105 et CD41.

## **B- IN VIVO**

### ***1) Sélection des patients***

Quarante-quatre patients présentant des lésions coronariennes significatives (au moins une sténose strictement supérieure à 70% d'une artère coronaire épicaudique) ont été inclus de manière prospective. Vingt patients (19 hommes, âge moyen  $62 \pm 2$  ans) étaient coronariens stables sans signe d'ischémie myocardique au repos ou à l'effort à l'époque de l'étude. Ces patients recevaient un traitement par anti-agrégant plaquettaire (aspirine, ticlopidine ou clopidogrel), un bêtabloquant et une statine en association avec des inhibiteurs calciques ou des dérivés nitrés si nécessaire.

Vingt-quatre patients (19 hommes, âge moyen  $55 \pm 3$  ans) avec infarctus du myocarde étaient directement admis en salle de cathétérisme avant la 6<sup>ème</sup> heure du début des symptômes. Tous les patients ont reçu de l'aspirine et ont été traités avec succès par une angioplastie coronaire percutanée avec implantation d'un stent et obtention d'un flux

coronaire TIMI III. Au cours de l'hospitalisation, leur prise en charge médicale a comporté la prescription d'aspirine, de ticlopidine ou clopidogrel, d'une héparine de bas poids moléculaire, d'un bêtabloquant et d'une statine en association avec des dérivés nitrés par voie intraveineuse en cas de nécessité.

Vingt volontaires sains (19 hommes, âge moyen  $32 \pm 1$ ) sans maladie cardiovasculaire ont été étudiés comme sujets témoins. Tous les patients et volontaires ont donné leur consentement éclairé par écrit.

## ***2) Prélèvements sanguins***

Dix millilitres de sang ont été collectés par ponction d'une veine de l'avant-bras. Les trois premiers millilitres de sang ont été écartés pour éviter toute contamination par des cellules endothéliales résultant du traumatisme de la ponction veineuse.

Pour les patients coronariens stables, les prélèvements sanguins ont été recueillis après un intervalle minimum de six mois suivant toute exploration invasive : coronarographie ou angioplastie.

Pour les patients avec infarctus du myocarde, les prélèvements sanguins ont été recueillis lors de l'admission à l'hôpital avant la ponction fémorale pour treize des vingt-quatre patients, et deux heures après l'angioplastie chez la totalité des 24 patients. Un prélèvement supplémentaire a été recueilli chez 18 de ces patients à la 48<sup>ème</sup> heure de l'angioplastie.

## ***3) Isolation et caractérisation des agrégats EMP-P dans la circulation périphérique***

Tous les anticorps à l'exception de l'anti-CD105 (Cliniscience) provenaient de Becton Dickinson. Les prélèvements périphériques ont été recueillis sur tube avec héparinate de lithium et les cellules sanguines ont été éliminées par choc osmotique en utilisant une solution de NH<sub>4</sub>Cl à 0,14M. Après trois lavages au PBS, les cellules ont été identifiées par un protocole comportant un triple marquage.

La suspension de cellules a été tout d'abord incubée avec une solution contenant un anticorps anti-CD5 marqué au FITC (spécifique des cellules endothéliales) au 1/100<sup>e</sup> et un

anticorps anti-CD62E marqué à la biotine (spécifique des cellules endothéliales activées<sup>20</sup>) au 1/100<sup>e</sup> pendant une heure à 4°C. Après trois lavages supplémentaires, les cellules ont été incubées avec une solution 1/200<sup>e</sup> de streptavidine couplée au cychrome (30 minutes, 4°C). Puis, une des solutions au 1/100<sup>e</sup> marquée au PE suivantes a été ajoutée pendant une heure, à 4°C : anticorps anti-CD41a (GPIIb/IIIa), anticorps anti-CD42b (GPIb), se liant aux plaquettes activées<sup>21</sup> ; anticorps anti-CD31<sup>22</sup> (PECAM-I, Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule 1, molécule exprimée à la surface des cellules endothéliales) ; anticorps anti-CD14<sup>23</sup> (marqueur de monocytes), anticorps anti-CD3<sup>24</sup> (spécifique des lymphocytes T), anticorps anti-CD19<sup>25</sup> (spécifique des lymphocytes B). Après trois lavages au PBS, les cellules ont été analysées par cytométrie de flux.

Pour la détection de la MCP-I intracellulaire (Macrophage Chemotactic Protéin, une chémokine produite par les cellules endothéliales activées et impliquée dans la pathogénèse de l'athérosclérose<sup>26,27</sup>), les cellules marquées avec des anticorps anti-CD105 et anti-CD62E ont été fixées et perméabilisées en utilisant le réactif Cytotfix/ Cytoperm en accord avec les recommandations de la manufacture (Becton Dickinson). Les cellules ont été alors incubées avec une solution d'anticorps anti-MCPI marquée au PE pendant 30 minutes à 4°C et, après trois lavages au PBS, analysées par cytométrie de flux.

Toutes ces expériences ont été réalisées avec un cytomètre de flux de marque Coulter® Epics®XL™ (Margency, France). En ce qui concerne, la cytométrie de flux, l'excitation des fluorochromes est obtenue grâce à un laser à ion argon qui émet à une longueur d'onde de 488nm. Le Forward scatter (FS) est l'intensité lumineuse reçue par la photodiode située dans l'axe du faisceau laser et est proportionnelle à la taille des éléments. Le Side scatter (SS) est le signal de granulosité récupéré par une seconde photodiode placée à 90 degrés de l'axe du faisceau laser. Les émissions correspondant à la fluorescence verte sont contrôlées par un filtre passe-bande à 530nm et pour la fluorescence rouge à 585nm. Les cellules ont été examinées à un niveau de flux de 100 à 200 éléments par seconde et 10,000 éléments ont été analysés par échantillon. Le niveau d'expression de MCP-I a été déterminé par la mesure de l'intensité de fluorescence exprimé en unité arbitraire (UA) de manière habituelle.

#### ***4) Analyse statistique***

Tous les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Les différences statistiquement significatives entre les groupes ont été analysées selon le test *t* de Student pour la comparaison des moyennes. Un  $p < 0,05$  a été considéré comme significatif.

## RESULTATS

### I- FORMATION IN VITRO ET CARACTERISATION DES AGREGATS PLAQUETTES – MP ENDOTHELIALES

Des plaquettes isolées à partir des prélèvements sanguins périphériques ont pu être sélectionnées suivant les critères de taille et de granulométrie (figure 1A). Ces plaquettes étaient marquées par le CD41a, un marqueur spécifique des plaquettes activées (figure 1B). Après incubation avec des microparticules dérivées de cellules endothéliales activées, de nouveaux éléments de plus grande taille ont pu être observés (figure 1C). Ces éléments exprimaient à la fois le CD41a et le CD105, un marqueur spécifique de cellules endothéliales (figure 1D). Ils ont été appelés agrégats plaquettes – MP endothéliales (EMP-P).

### II- CARACTERISATION ET QUANTIFICATION DES AGREGATS EMP-P SUR ECHANTILLONS DE SUJETS SAINS

Des éléments circulants similaires aux agrégats EMP-P obtenus *in vitro* ont été détectés dans la circulation périphérique des sujets sains (figure 2A). Leur taille était variable mais plus grande que celle des cellules sanguines. Ils étaient marqués par les anticorps CD105 et CD41 (figure 2B). Parmi les éléments CD105-positifs,  $94,3 \pm 1\%$  étaient également CD31-positifs, confirmant à posteriori leur origine endothéliale. De plus, deux marqueurs d'activation endothéliale ont pu être détectés : CD62E, un marqueur membranaire était exprimé sur  $97,7 \pm 0,3\%$  des éléments CD105-positifs (figure 3A), et MCP-I, une chemokine intracellulaire, sur  $96,6 \pm 0,4\%$  de ces mêmes éléments (figure 3B).

D'autres analyses ont montré que des anticorps spécifiques pour des marqueurs plaquettaires, anticorps anti-CD41a et anti-CD42b, pouvaient également se lier à  $68,9 \pm 6,1\%$  et  $46 \pm 6,7\%$  des éléments CD105-positifs, respectivement. Les éléments CD105-positifs n'exprimaient pas les marqueurs spécifiques des lymphocytes T (CD3), ou B (CD19), ou des monocytes (CD14).

Ces éléments ont été appelés EMP-P car ils présentaient la même morphologie et les mêmes caractéristiques immunologiques que les agrégats produits *in vitro*. Comme le représente la figure 4A,  $7,1 \pm 0,3$  agrégats/ $\mu\text{l}$  ont été retrouvés dans la totalité des prélèvements sanguins des volontaires sains.

### **III- QUANTIFICATION DES AGREGATS EMP-P CHEZ LES CORONARIENS STABLES ET AU COURS DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE**

En comparaison avec les sujets sains (figure 4A), on retrouvait chez les patients coronariens stables, un nombre significativement plus élevé d'agrégats circulants ( $16,7 \pm 1,8$  versus  $7,1 \pm 0,3/\mu\text{l}$  ;  $p < 0,001$ ).

En revanche, chez les patients vus à la première heure d'un infarctus du myocarde, on observait une chute significative du nombre d'agrégats circulants ( $2,5 \pm 0,7$  versus  $7,1 \pm 0,3/\mu\text{l}$  ;  $p < 0,001$ ). Le nombre d'agrégats était identique avant ( $2,5 \pm 0,7/\mu\text{l}$ ) et deux heures après ( $1,7 \pm 0,3/\mu\text{l}$ ) angioplastie.

Toutefois, 48 heures après le début de l'infarctus, le nombre des agrégats était retourné à des niveaux proches de ceux observés chez les patients en angor stable ( $14,7 \pm 1,8$  versus  $16,7 \pm 1,8/\mu\text{l}$ ).

Par ailleurs, le niveau d'expression du MCP-I était plus élevé chez les coronariens stables que chez les sujets contrôles ( $30 \pm 2$  et  $22 \pm 2$  UA, respectivement ;  $p < 0,01$ ), et encore plus élevé dans l'infarctus du myocarde ( $41 \pm 5$  UA avant angioplastie ;  $p < 0,05$  ;  $48 \pm 5$  UA, deux heures après angioplastie ;  $p < 0,01$ , en comparaison des coronariens stables) et restait significativement élevé 48 heures plus tard ( $41 \pm 6$  UA) en comparaison des sujets témoins (différence non significative vis à vis des coronariens stables (figure 4B)).



## DISCUSSION

Cette étude rapporte pour la première fois que des microparticules d'origine endothéliale peuvent interagir avec des plaquettes et former des agrégats *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons émis l'hypothèse que les microparticules peuvent interagir avec les plaquettes car elles présentent les mêmes molécules d'adhérence que les cellules endothéliales dont elles sont issues<sup>6</sup>. En particulier, les microparticules présentent ICAM-I (InterCellular Adhesion Molecule-1) et PECAM-1 qui peuvent se lier aux récepteurs GPIIb/IIIa (CD41a) et GPIb (CD42a) respectivement, présents sur les plaquettes<sup>19</sup>. Nous avons donc entrepris de former *in vitro* des microparticules dérivées des cellules endothéliales humaines activées en culture, et d'induire *in vitro* la formation d'agrégats avec des plaquettes fraîchement isolées.

En incubant les microparticules avec les plaquettes, nous avons généré de nouveaux éléments significativement plus grands que les plaquettes. Comme ces éléments présentaient de manière simultanée deux marqueurs spécifiques pour des cellules endothéliales (CD105) et des plaquettes (CD41a), ils ont été individualisés comme les agrégats EMP-P.

Des agrégats identiques ont été observés dans la circulation périphérique des sujets sains. Comme de nombreuses cellules telles que les lymphocytes B et T, les macrophages, les cellules endothéliales et les plaquettes peuvent générer des microparticules<sup>7</sup>, nous avons établi que ces agrégats détectés *in vivo* étaient formés par des plaquettes et des microparticules provenant de cellules endothéliales activées.

Effectivement, en utilisant un panel d'anticorps spécifiques pour ces cellules, seuls les marqueurs de cellules endothéliales activées et plaquettes ont pu être détectés sur ces agrégats.

Enfin, la présence des agrégats EMP-P a été également authentifiée dans la circulation périphérique des patients coronariens. Le haut niveau d'agrégats EMP-P détecté dans le sang périphérique des patients en angor stable comparé aux sujets sains est probablement à mettre en rapport avec l'altération et l'activation chroniques des cellules endothéliales. De fait, le

pourcentage des agrégats exprimant MCP-I, un marqueur de l'activation des cellules endothéliales, et le niveau d'expression de ce marqueur, étaient significativement plus élevés chez les patients en angor stable que chez les sujets sains.

En revanche, nous avons observé un taux d'agrégats EMP-P significativement plus bas lors des premières heures de l'infarctus du myocarde que chez les sujets sains. Cette constatation contraste avec une étude retrouvant des taux élevés de microparticules endothéliales dans le sang périphérique des patients avec infarctus<sup>7</sup>.

Toutefois, dans cette étude, les microparticules étaient quantifiées plusieurs jours après le début de l'infarctus. Par conséquent, les résultats de cette étude ne sont pas en contradiction avec nos propres résultats, puisque 48 heures après l'infarctus, nous avons également observé autant d'agrégats EMP-P que chez les patients d'angor stable, ce qui représente un niveau plus important que chez les sujets sains.

La détection d'un nombre similaire d'agrégats avant et deux heures après l'angioplastie rend peu probable un éventuel artéfact lié à la procédure. De manière similaire, l'augmentation des agrégats EMP-P à la 48<sup>ème</sup> heure en dépit d'une héparinothérapie continue, suggère que ce traitement ne peut être tenu pour responsable de la baisse initiale des agrégats EMP-P. Une baisse transitoire de l'activation des cellules endothéliales est également peu probable, d'autant plus que l'expression de MCP-I atteint son plus haut niveau chez les patients au cours de l'infarctus.

L'hypothèse la plus probable pourrait être que les agrégats EMP-P contribuent à la formation du thrombus et par la même sont séquestrés dans l'artère coronaire responsable de l'infarctus. De fait, l'interaction entre ICAM-I et CD41a, et entre PECAM-I et CD42a au sein des agrégats, reproduit l'adhésion des plaquettes à l'endothélium vasculaire activé.

Compte tenu que cette adhésion déclenche une activation plaquettaire et initie une cascade d'événements conduisant à la thrombose, les agrégats EMP-P circulants pourraient être impliqués dans la formation de thrombus dans lesquels ils seraient retenus. Un tel phénomène pourrait également expliquer que 48 heures après la phase aiguë de l'infarctus du myocarde, les agrégats EMP-P reviennent à des niveaux proches de ceux observés dans le cas de l'angor stable.

## CONCLUSION

Des taux élevés d'agrégats formés par des microparticules dérivées des cellules endothéliales activées et par des plaquettes activées, sont détectés dans le sang périphérique des patients en angor stable.

L'activité pro-coagulante de ces agrégats peut jouer un rôle dans la formation de thrombus. La baisse brutale du nombre de ces agrégats au cours des premières heures des syndromes coronariens aigus peut refléter l'implication de ces EMP-P sur le site de la thrombose.

L'étude des agrégats EMP-P dans la circulation périphérique pourrait aider à évaluer le niveau d'activation endothéliale et l'altération endothéliale créée par l'athérosclérose.

En outre, la baisse nette du nombre de ces agrégats EMP-P au cours de la phase précoce de l'infarctus du myocarde pourrait témoigner de manière indirecte d'une activité thrombotique intra-coronaire.

















## LEGENDES DES FIGURES

**Figure 1.** Analyse en cytométrie de flux des agrégats EMP-P formés *in vitro*. **A** : Analyse des plaquettes isolées selon leur taille et leur granulosité. **B** : Analyse de l'expression membranaire du CD41a (marqueur spécifique du GPIIb/IIIa) et du CD105 (marqueur spécifique des cellules endothéliales) sur les plaquettes. Les plaquettes n'expriment pas CD105 (quadrants de gauche) et la majorité d'entre elles expriment CD41a (quadrant supérieur gauche). **C**: Après incubation de plaquettes isolées avec des microparticules dérivées *in vitro* de cellules endothéliales activées, de nouveaux éléments de grande taille sont observés (zone A). **D**: Les plaquettes et les éléments de la zone A ont été analysés en fonction de leur expression membranaire de CD41a et CD105. Les plaquettes sont CD41a<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup> (quadrant supérieur gauche), alors que les éléments de la zone A sont CD41a<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> (quadrant supérieur droit). Ces éléments sont appelés agrégats microparticules endothéliales-plaquettes (EMP-P).

**Figure 2.** Analyse par cytométrie de flux des agrégats microparticules endothéliales-plaquettes caractérisés *in vivo* chez les sujets sains. **A** : Mise en évidence d'éléments plus grands et à plus forte granulosité que les cellules sanguines (zone A). **B** : Analyse de l'expression membranaire de CD41a et de CD105 sur les cellules sanguines et les éléments de la zone A. Comme *in vitro*, les grands éléments sont CD41a<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> (quadrant supérieur droit). Les plaquettes sont CD41a<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup> (quadrant supérieur gauche). Les autres cellules sanguines sont CD41a<sup>-</sup>, CD105<sup>-</sup>.

**Figure 3.** *In vivo*, analyse par cytométrie de flux de l'activation des agrégats microparticules endothéliales-plaquettes (EMP-P) chez les sujets sains. CD62E est un marqueur membranaire d'activation pour les cellules endothéliales MCP1 est une chemokine intracellulaire dont le niveau est corréllé à l'activation des cellules endothéliales. **A** : Les EMP-P sont CD105<sup>+</sup>, CD62E<sup>+</sup> (quadrant supérieur droit). **B** : Les EMP-P sont CD105<sup>+</sup>, MCP1<sup>+</sup> (quadrant supérieur droit). Les cellules sanguines sont CD105<sup>-</sup>, CD62E<sup>-</sup>, MCP1<sup>-</sup> (quadrant inférieur gauche).

**Figure 4.** Agrégats EMP-P ( MCP-1+ et CD 105+) chez les sujets sains et les coronariens stables.

**Figure 5.** Agrégats EMP-P (MCP-1+ et CD 105+) chez les sujets sains et au cours de l'infarctus du myocarde.

**Figure 6.:** Quantification des agrégats microparticules endothéliales-plaquettes (EMP-P) chez les sujets témoins, les coronariens stables, et les patients avec IDM dans les 6 premières heures, 2 heures, et 48 heures après angioplastie.

**Figure 7.:** Expression de MCP-1 par EMP-P dans la circulation périphérique des sujets témoins, des sujets en angor stable et des sujets en IDM.

## REFERENCES

1. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992; 326:242-50.
2. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992; 326:310-8.
3. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-9.
4. Mutin M, Dignat-George F, Sampol J. Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules. *Tissue Antigens* 1997; 50:449-58.
5. Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, Schiessler A, Schomig A. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation* 1996; 93:229-37.
6. Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999; 104:93-102.
7. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000; 101:841-3.
8. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999; 99:348-53.
9. Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H, et al. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med* 2000; 6:769-75.
10. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 1997; 99:2118-27.
11. Schwartz, S. M., and Bendiit, EP.: Clustering of replicating cells in aortic endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:651,1976.
12. Moncada, S., Herman, A.G., Higgs, E.A., and Vane, J.R: Differential formation of prostacyclin by layers of arterial wall. *Thromb. Res.* 11:323,1977.

13. Furchgott, R. F: Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ. Res.*53:557,1983.
14. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., et al. : A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 322:411,1988.
15. Mutin, M, Canary, I., Blann, A., et al.: Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood*, 93:2951-8, 1999.
16. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52:2745-56.
17. Lozano M, Estebanell E, Cid J, et al. Platelet concentrates prepared and stored under currently optimal conditions: minor impact on platelet adhesive and cohesive functions after storage. *Transfusion* 1999; 39:951-9.
18. Gougos A, Letarte M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 1988; 141:1925-33.
19. 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), alpha<sub>v</sub>beta<sub>3</sub> integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med* 1998; 187:329-39.
20. Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FC, et al. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science* 1990; 250:1130-2.
21. Schick PK, Wojenski CM, Bennett VD, Ivanova T. The synthesis and localization of alternatively spliced fibronectin EIIIB in resting and thrombin-treated megakaryocytes. *Blood* 1996; 87:1817-23.
22. Stockinger H, Gadd SJ, Eher R, et al. Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J Immunol* 1990; 145:3889-97.
23. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249:1431-3.
24. Kanellopoulos JM, Wigglesworth NM, Owen MJ, Crumpton MJ. Biosynthesis and molecular nature of the T3 antigen of human T lymphocytes. *Embo J*1983; 2:1807-14.

25. Bradbury LE, Golmacher VS, Tedder TF. The CD 19 cytoplasmic domain alters signal transduction but not complex formation with TAPA-1 and Leu 13. *J Immunol* 1993; 151:2915-27.
26. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997; 90:909-28.
27. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998; 394:894-7.

## RESUME

Les cellules endothéliales activées à la surface des plaques d'athérosclérose peuvent libérer des microparticules membranaires avec un potentiel pro-coagulant. Nous avons émis l'hypothèse que ces microparticules endothéliales circulantes pouvaient se lier aux plaquettes, former des agrégats et être ainsi impliquées dans la formation de thrombus au cours de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde.

Des agrégats comportant des microparticules endothéliales et des plaquettes ont été créés *in vitro* par incubation du surnageant obtenu après centrifugation de cellules endothéliales activées en culture avec des plaquettes fraîchement prélevées. Les agrégats de microparticules endothéliales et de plaquettes (EMP-P) ont été caractérisés en cytométrie de flux en utilisant des anticorps spécifiques des marqueurs de cellules endothéliales et de plaquettes. Des agrégats EMP-P identiques ont été identifiés *in vivo* dans la circulation périphérique de sujets sains, de coronariens stables, et de sujets en phase aiguë d'un infarctus du myocarde. Le nombre des agrégats EMP-P était significativement plus élevé chez les coronariens stables par rapport à la population témoin. En revanche, les agrégats EMP-P étaient significativement moins nombreux au cours de la phase précoce de l'infarctus du myocarde que dans la population témoin et que chez les coronariens stables, aussi bien avant l'angioplastie primaire que deux heures après la reperfusion. Toutefois, 48 heures après le début de l'infarctus, le taux des agrégats EMP-P avait atteint des valeurs proches de celles observées chez les coronariens stables.

Dans des conditions physiologiques, des microparticules circulantes issues de cellules endothéliales peuvent se lier aux plaquettes et former des agrégats. Le nombre important de ces agrégats chez les patients coronariens stables est le reflet possible d'un état d'activation



des cellules endothéliales et d'un état thrombotique favorable. Le petit nombre des agrégats EMP-P au cours de la première heure de l'infarctus peut suggérer une contribution de ces agrégats à la formation du thrombus.